

Sónia Margarida Alves Pereira

# REABSORÇÃO RADICULAR APICAL EXTERNA ASSOCIADA AO TRATAMENTO ORTODÔNTICO: FATORES DE SUSCETIBILIDADE GENÉTICOS, BIOLÓGICOS E MECÂNICOS

Tese de Doutoramento em Ciências da Saúde - Ramo de Medicina Dentária, especialidade de Odontopediatria e Ortodôncia (Ortodôncia), orientada pelo Senhor Professor Doutor João Luís Maló de Abreu, Senhora Professora Doutora Henriqueta Alexandra Mendes Brêda Lobo Coimbra Silva e Senhor Professor Doutor Miguel Angel Guevara Lopez e apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.

Abril de 2014



UNIVERSIDADE DE COIMBRA



Tese ao grau de Doutor apresentada  
à Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra



**Orientadores:**

Professor Doutor João Luis Maló de Abreu  
Faculdade de Medicina – Universidade de Coimbra

Professora Doutora Henriqueta Alexandra Mendes Brêda Lobo Coimbra Silva  
Faculdade de Medicina – Universidade de Coimbra

Professor Doutor Miguel Angel Guevara Lopez  
IEETA – Departamento de Electrónica, Telecomunicações e Informática (DETI)  
Universidade de Aveiro

A Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra não aceita qualquer  
responsabilidade em relação à doutrina e à forma desta Tese  
(Regimento da Faculdade de Medicina de Coimbra, 1931, Art. 108, § único)



**Ao meu pai Avelino  
e à minha mãe Celeste**



**Aos meus filhos  
Maria Miguel e Pedro Miguel  
e ao Fernando**



**Aos meus amigos**



“ Muitas coisas, fique dito de uma vez por todas, quero “não” sabê-las.  
A sabedoria impõe limites ao próprio conhecimento. “

F.Nietzsche, *Crepúsculo dos Ídolos*



## Agradecimentos

A tese aqui apresentada reflete o trabalho e o empenho dedicado à Área de Medicina Dentária que, ao longo de cinco anos, fomos realizando com toda a dedicação e desejo de aprendizagem constante.

Só foi possível graças à orientação e apoio de pessoas a quem quero, também aqui, expressar o meu agradecimento.

Ao Professor Doutor João Luis Maló de Abreu, com quem tivémos o privilégio de colaborar e que sempre nos impulsionou e apoiou de forma incondicional a progredirmos na carreira académica. Não podemos esquecer que é graças ao Senhor Professor que hoje nos podemos orgulhar da Área de Medicina Dentária por si criada e onde trabalhamos e que se apresenta como um exemplo de excelência, quer no domínio do ensino e investigação, quer no do tratamento de doentes. Também devemos agradecer a confiança que em nós depositou ao aceitar orientar esta dissertação e não esqueceremos a honra de termos sido seus discípulos na cadeira de Ortodôncia.

À Professora Doutora Henriqueta Silva não podemos deixar de endereçar um especial agradecimento, pois lhe devemos todo um trabalho dedicado à co-orientação desta dissertação, o qual implicou muitas horas de trabalho, disponibilidade e sabedoria. Foi para nós sempre um exemplo de rigor e de dedicação, que nos incentivou a querer fazer melhor. Foi a sua visão abrangente das diversas áreas desta dissertação, que nos conduziu no rumo que pretendíamos. Uma co-orientação sempre subtil, pertinente e amiga.



Ao Professor Doutor Miguel Angel Guevara Lopez o nosso obrigado pelo privilégio que nos deu de com ele podermos ter colaborado e pelo seu apoio num domínio tão específico como é o da Informática. Tal tornou possível a criação de uma aplicação informática essencial à leitura dos exames radiográficos imprescindíveis no desenrolar deste trabalho.

Ao Professor Doutor Nuno Lavado pelo auxílio prestado e pelo rigor que colocou na análise estatística dos dados a trabalhar, determinantes numa dissertação deste tipo.

Ao Dr. Luís Mesquita, técnico do Laboratório do Departamento de Genética Médica, da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, pelo apoio prestado na realização das técnicas de genotipagem.

Ao Dr. Marcolino Gomes não podemos deixar de exprimir a nossa gratidão pelo contributo fomecido na aquisição de novas competências e saberes e pela partilha da sua experiência na área da Ortodôncia.

À Dra. Ana Luísa Maló e ao Dr. Francisco do Vale, colegas docentes de Ortodôncia, pela colaboração e partilha de conhecimentos ao longo dos anos em que trabalhamos juntos nesta Faculdade.

À Dra. Rita Sousa, que amavelmente nos incentivou de forma determinada a elaborarmos esta dissertação voltada para a área da Genética.

Ao Dr. Paulo Gil Agostinho, pela disponibilidade e apoio prestado na área da Imagiologia, determinante na leitura das imagens radiográficas.

Aos Drs. Ana Sousa, Carina Barros, Cesário Costa, Paula Barbosa, Paula Teixeira e Rita Barroso, colegas que, durante a realização do seu Curso de Pós-graduação de Ortodôncia, na nossa Faculdade, colaboraram na recolha de dados, ao longo da fase experimental deste trabalho.

À D. Maria José Bera e D. Maria de Lurdes Mendes, funcionárias da Biblioteca da Faculdade, na Área de Medicina Dentária, pela permanente disponibilidade no auxílio da requisição dos artigos científicos solicitados.

Aos restantes funcionários da Área de Medicina Dentária da nossa Faculdade, que sempre se mostraram solícitos na resolução de todas as questões que foram surgindo ao longo da preparação desta dissertação.

A todos o nosso bem-haja.



Sónia Margarida Alves Pereira

Reabsorção radicular apical externa associada ao tratamento ortodôntico:  
fatores de suscetibilidade genéticos, biológicos e mecânicos

---

Coimbra, 2014



# Sumário

## 1 - Introdução

- 1 . Reabsorção Radicular Apical Externa
- 2 . Mecanismos celulares e moleculares
- 3 . Fatores de risco
- 4 . Diagnóstico imagiológico
- 5 . Objetivos

## 2 - Materiais e métodos

- 1 . Desenho do estudo
- 2 . População
- 3 . Avaliação da RRAE
- 4 . Caracterização genotípica
- 5 . Análise estatística

## 3 - Resultados

- 1 . Erro intra-operador
- 2 . Caracterização e comparação da reabsorção por dente
- 3 . Caracterização da reabsorção por indivíduo
- 4 . Modelo de previsão de suscetibilidade à RRAE

## 4 - Discussão

- 1 . Desenho do estudo
- 2 . Valores de Reabsorção Radicular Apical Externa (RRAE)
- 3 . Fatores não genéticos
- 4 . Fatores genéticos
- 5 . A RRAE como fenótipo complexo
- 6 . Aplicação clínica

## 5 - Conclusões e perspectivas futuras

## 6 - Resumo

## 7 - Abstract

## 8 - Bibliografia

## 9 - Anexos

- 1 . Lista de abreviaturas e símbolos
- 2 . Glossário
- 3 . Consentimento informado do paciente
- 4 . Autorização da Comissão de Ética da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra
- 5 . Inquérito clínico
- 6 . Dados estatísticos
- 7 . Índice de tabelas
- 8 . Índice de Figuras

## 10 - Índice



## I - Introdução

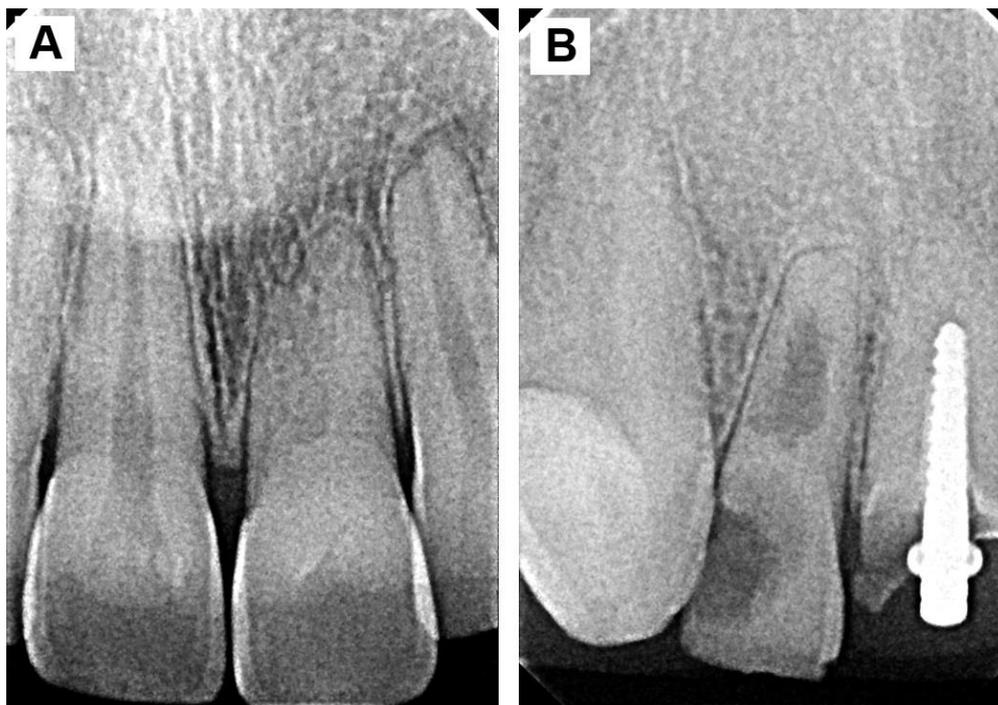
---



## I . Reabsorção Radicular Apical Externa

A reabsorção radicular pode ser fisiológica e desejável, como a que ocorre nos dentes decíduos de modo a permitir a sua substituição pela dentição definitiva. O processo de reabsorção radicular em dentes permanentes é um fenómeno patológico, descrito já em 1856 por Bates, citado por DOUGHERTY<sup>1</sup>. A associação entre a reabsorção radicular e o tratamento ortodôntico (TO) poderá ter sido relatada pela primeira vez por Ottolengui citado por MOHANDESAN et al.<sup>2</sup> mas a importância do problema só se imporia mais tarde, com a evidência radiográfica apresentada por Albert Ketcham, em estudos publicados em 1927 e 1929, citados por WAHL<sup>3</sup>. Com o aparecimento e generalização do uso dos equipamentos de radiologia dentária, Ketcham pode avaliar vários casos tratados ortodonticamente e no seu último estudo, em 500 pacientes, constatou a existência de reabsorção radicular em 21% dos pacientes. Na altura, a apresentação desta evidência radiográfica causou agitação na comunidade ortodôntica.

A classificação dos vários tipos de reabsorção radicular é difícil, como o testemunham a multiplicidade de classificações existentes, quase todas elas baseadas em mecanismos etiológicos e alterações histológicas. De um modo geral ela é classificada como externa, com origem na superfície periodontal da raiz, ou interna, com origem nos canais radiculares e portanto relacionada primitivamente com uma causa pulpar (Fig. I.1). A reabsorção interna é mais rara e geralmente deve-se a inflamação da polpa de natureza traumática ou infecciosa. De acordo com a localização anatómica, a reabsorção externa poderá ainda ser classificada como apical ou cervical, podendo ser isolada ou afetar múltiplos dentes.



**Figura 1.1.** Exemplos de diagnóstico radiológico de reabsorção radicular apical externa (A) e de reabsorção radicular interna associada a reabsorção radicular apical externa (B).

A classificação de Bakland<sup>4</sup> subdivide a reabsorção externa em vários subtipos de acordo com os diferentes mecanismos etiológicos (Tabela 1.1). Encontramos várias causas, a maioria delas locais, incluindo patologia inflamatória, estimulação mecânica, nomeadamente a associada ao TO, lesões traumáticas, tumores e algumas doenças sistémicas. A reabsorção radicular externa de dentes isolados pode ser um achado radiológico acidental, e reabsorções apicais de 1 a 3 mm foram descritas em cerca de 7% a 13% de indivíduos não submetidos a TO<sup>5</sup>.

Andreasen<sup>6</sup> classificou a reabsorção radicular externa em três tipos: de superfície, inflamatória e por substituição. A reabsorção de superfície ocorreria sob a forma de micro-defeitos e teria capacidade de autorreparação. Estes defeitos tendem a ocorrer em toda a superfície radicular, mas são mais frequentes no terço apical. Geralmente a reparação ocorre com formação de cimento secundário.

Tabela 1.1. Classificação etiológica das reabsorções radiculares<sup>4</sup>

Local	Tipo	Etiologia
Interna		Traumatismo
		Infeção
Externa	De superfície Inflamatória	Traumatismo
		Traumatismo
		Infeção
	De substituição (Anquilose)	Avulsão e reimplantação Luxação Transplantação
	Pressão	<b>Tratamento ortodôntico</b> Forças de oclusão excessivas Dentes impactados Dentes supranumerários Tumores Quistos
	Associada a doenças sistémicas	Hiperparatiroidismo Doença de Paget Síndrome de Papillon-Lefèvre Displasia óssea Doença renal Doença hepática
	Invasiva (cervical)	Traumatismo <b>Tratamento ortodôntico</b> Tratamento periodontal Branqueamento dentário intracoronal Desconhecida
Idiopática	Desconhecida	

A reabsorção inflamatória usualmente envolve camadas de cimento mais profundas expondo os túbulos dentinários ao ambiente periodontal. Os túbulos dentinários são assim submetidos à ação de células inflamatórias, como os macrófagos e a células de reabsorção, como os osteoclastos. Este tipo de reabsorção é a mais frequentemente associada ao TO. Finalmente, a reabsorção por substituição ocorre quando o osso alveolar começa a substituir a superfície radicular reabsorvida, resultando em anquilose. Esta classificação baseia-se mais no grau de gravidade das lesões do que nos mecanismos etiológicos.

A reabsorção radicular que tipicamente ocorre como complicação iatrogénica associada ao TO é uma reabsorção radicular apical externa (RRAE) e consiste na remoção ativa de cimento e dentina ao nível apical, com redução permanente da raiz, podendo ser visualizada nas

radiografias dentárias de rotina<sup>7-9</sup>. Trata-se de um processo biológico complexo que ocorre quando as forças mecânicas criadas ao nível do ápice excedem a resistência e a capacidade de reparação dos tecidos periapicais<sup>10</sup>.

Embora a RRAE raramente afete a função do dente, em alguns pacientes pode ser severa e conduzir a uma perda permanente e considerável da estrutura do ápice radicular, podendo, em situações extremas, afetar a longevidade do dente e comprometer os resultados de um TO bem-sucedido.

A reabsorção radicular associada ao movimento ortodôntico tem sido alvo de grande preocupação e motivo de estudo para muitos investigadores. O interesse crescente por este fenómeno nas últimas duas décadas deve-se essencialmente a dois motivos: o primeiro prende-se com o facto do conhecimento mais profundo do genoma humano ter criado a expectativa de que a identificação dos genes de suscetibilidade aos fenótipos multifatoriais, como a RRAE, propiciaria uma medicina preventiva personalizada; o segundo deve-se ao número crescente de ações jurídicas contra ortodontistas, por reabsorções radiculares iatrogénicas.

A verificação imagiológica da RRAE é difícil antes dos 5-6 meses após o início do tratamento, visto a imagiologia convencional, geralmente utilizada nestes estudos clínicos, só conseguir identificar a reabsorção radicular quando a perda de tecido mineralizado é de pelo menos 60 a 70%<sup>8, 11</sup>. Os estudos histológicos conseguem identificar a reabsorção muito precocemente, a partir das sete semanas de movimento ortodôntico<sup>12, 13</sup>. Esta divergência faz com que as taxas de RRAE associada ao TO variem consoante o critério de diagnóstico. Para a maioria dos autores, o critério utilizado é o imagiológico, o único com interesse na prática clínica.

Sabe-se que, apesar de a RRAE poder ocorrer em qualquer dente, é mais frequente nos incisivos maxilares, aos quais se seguem os incisivos mandibulares e os primeiros molares mandibulares<sup>7, 8, 12, 14-20</sup>. Na maioria dos pacientes ocorre reabsorção ligeira, com valores médios de 0.5 a 3 mm, raramente comprometendo a função dentária. Contudo, em 30% dos doentes, a reabsorção pode ser superior a 3 mm e em 2-5% dos doentes a RRAE é classificada como severa, apresentando valores que podem exceder os 5 mm ou 1/3 da dimensão inicial, colocando em perigo a longevidade do dente<sup>21</sup>.

Apesar da inexistência de critérios rigorosos e consensuais para o diagnóstico deste fenótipo, ao longo dos anos os autores têm proposto a sua avaliação de duas formas: usando escalas ordinais com as quais são comparados os dentes nas radiografias<sup>22</sup> ou através da medição direta da raiz em radiografias<sup>17, 23-25</sup>. A maior parte dos estudos recentes considera como patológica a reabsorção apical radicular superior a 2 mm<sup>26-28</sup>.

A RRAE associada ao tratamento ortodôntico, que passaremos a designar apenas por RRAE, é um fenótipo multifatorial ou complexo e a sua etiologia tem sido alvo de muito estudo e debate. A suscetibilidade à RRAE depende tanto de fatores ambientais, como é o caso das forças

mecânicas aplicadas, como de fatores de risco biológicos<sup>29</sup>. Os fatores de risco biológicos, ou relacionados com o paciente, incluem a suscetibilidade genética, que tem merecido grande destaque nos estudos mais recentes<sup>26, 27, 29-32</sup>. Contudo, ainda pouco se conhece sobre a forma como a força ortodôntica afeta a expressão dos genes que codificam as proteínas envolvidas no movimento dentário, na remodelação do osso alveolar ou na reparação das estruturas periodontais e radiculares. De facto, a mesma força ortodôntica tem aparentemente efeitos muito diferentes dependendo de características intrínsecas do paciente<sup>17, 24, 33</sup>, estimando-se que só expliquem 25% da variabilidade interindividual da RRAE<sup>34, 35</sup>.

O risco de RRAE é inerente ao tratamento ortodôntico. Assim se compreende a importância de um conhecimento aprofundado dos mecanismos etiopatogénicos envolvidos e da construção de um modelo integrado de suscetibilidade a esta complicação, de modo a permitir um tratamento personalizado que reduza a sua taxa de ocorrência.

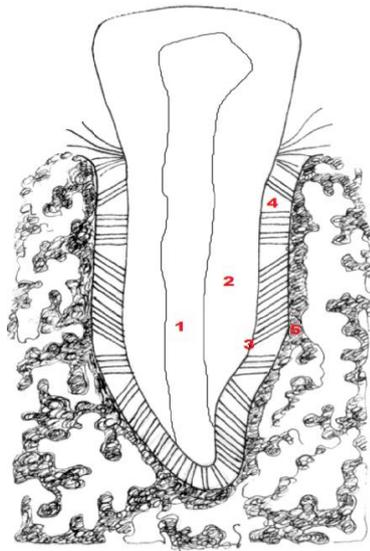
O conhecimento dos perfis genéticos de suscetibilidade à RRAE, para além de contribuir para este modelo integrado de risco, esclarece qual o papel de alguns mediadores na patologia molecular deste fenótipo e propicia a identificação de novos alvos terapêuticos.

## 2 . Mecanismos celulares e moleculares

### 2.1. Células e estruturas intervenientes

As estruturas dentárias envolvidas na RRAE são essencialmente a raiz dentária e o periodonto. O periodonto é composto pelos tecidos que asseguram a fixação do dente ao maxilar e inclui dois tecidos mineralizados, o osso alveolar e o cimento, e dois tecidos fibrosos, a gengiva e o ligamento periodontal (LP). A gengiva que recobre a crista alveolar constitui o periodonto de proteção do dente, e o ligamento periodontal, osso e cimento, que recobrem a raiz, formam o periodonto de sustentação. No âmbito deste trabalho passaremos a referir o periodonto de sustentação apenas como periodonto. Embora anatomicamente distintos, raiz e periodonto formam um complexo dinâmico, mutuamente dependente na resposta aos fenómenos fisiológicos e patológicos (Fig.1.2).

A raiz é constituída pela polpa, dentina e cimento. A junção amelo-cementária, que por questões descritivas de anatomia dentária também é referida como linha cervical, forma a linha de demarcação entre a coroa e a raiz. Enquanto a polpa e dentina se estendem da coroa à raiz, o revestimento da coroa é o esmalte e o da raiz é o cimento.



**Figura 1.2.** Esquema do dente e periodonto de sustentação. Polpa (1), dentina (2), cemento (3), ligamento periodontal (4), osso alveolar (5).

Ao cemento, tecido calcificado que recobre as raízes dentárias, tem sido atribuído um papel importante na remodelação dos tecidos periodontais secundária ao tratamento ortodôntico. Funciona como suporte, permitindo a fixação das fibras de Sharpey do ligamento periodontal à sua superfície. Identificam-se dois tipos de cemento: o cemento primário ou acelular, que se encontra especialmente no terço cervical da raiz, e o cemento secundário ou celular, localizado no terço apical da raiz, que se forma em resposta às necessidades funcionais. Este cemento está dependente da vascularização local sendo mais suscetível a forças de pressão que comprometam a irrigação. As células responsáveis pela formação do cemento, os cementoblastos, encontram-se na superfície do cemento, mais precisamente a revestir uma região periférica não mineralizada da matriz, o cementoide. Os cementoblastos formam cemento continuamente ao longo da vida, garantindo a manutenção desta camada protetora da dentina radicular.

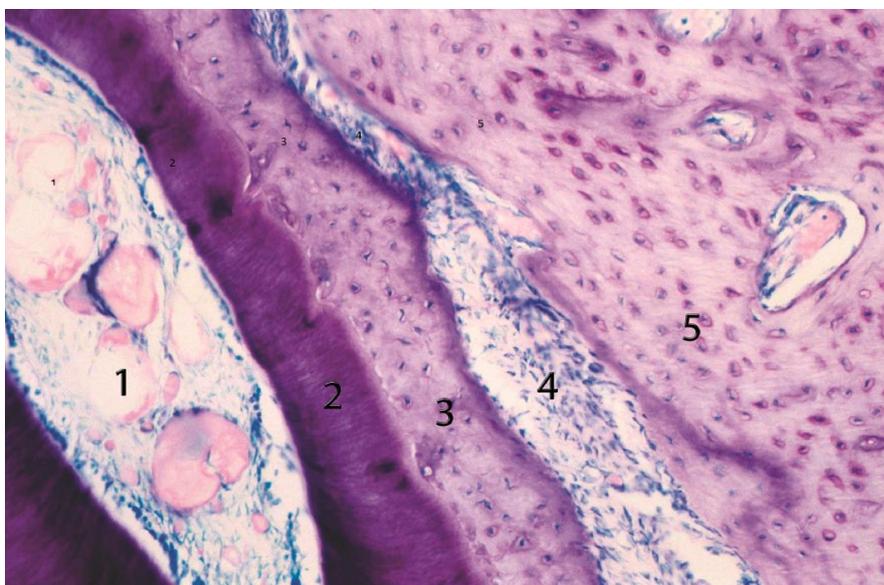
O ligamento periodontal, localizado entre o cemento e o osso alveolar, é um tecido conjuntivo laxo constituído por fibras de colagénio (fibras de Sharpey), raras fibras elásticas, vasos sanguíneos e linfáticos, terminações nervosas e diversos tipos celulares, que incluem fibroblastos, macrófagos e células com capacidade de diferenciação em células de síntese ou de reabsorção óssea e dentária (Fig. 1.3). Tem uma espessura média de 0.25 mm.

No LP encontram-se vestígios celulares da bainha epitelial de Hertwig, denominados de restos epiteliais de Malassez, aparentemente sem nenhuma função, mas que ocasionalmente dão origem a quistos secundários a patologia inflamatória do LP. A agressão do LP durante o tratamento ortodôntico e a resposta do seu componente celular parecem ter um papel fulcral na RRAE<sup>36</sup>.

O osso alveolar faz parte do periodonto de inserção e desenvolve-se à medida que os dentes erupcionam. Nele se inserem as terminações externas das fibras de Sharpey. Com

abundante irrigação e inervação, é extremamente dinâmico, sofrendo contínua remodelação<sup>37</sup>, devido à atividade de células como os osteoblastos e os osteoclastos. A matriz óssea ou osteoide é produzida pelos osteoblastos e sofre mineralização pela deposição de minerais<sup>38</sup>.

Para fenômenos fisiológicos como a biogênese do dente, a reabsorção da raiz dos dentes decíduos e a remodelação do periodonto associada ao tratamento ortodôntico, são fundamentais células que promovem a síntese dos tecidos, como os osteoblastos para o osso e os odontoblastos e cementoblastos para o dente, assim como as células que promovem a reabsorção dos tecidos, os odontoclastos e os osteoclastos, que também atuam ao nível do dente e do osso respectivamente.



**Figura 1.3.** Imagem histológica da raiz dentária e do periodonto de sustentação<sup>39</sup>. Imagem proveniente da tese de mestrado da autora: Giemsa, 100x no original. Polpa (1), dentina (2), cemento celular (3), ligamento periodontal (4), osso alveolar (5).

Os odontoclastos têm características morfológicas e funcionais semelhantes às dos osteoclastos, as células responsáveis pela reabsorção óssea<sup>40-42</sup>, e pensa-se que ambos se diferenciam de células progenitoras hematopoiéticas da medula óssea. Estas células progenitoras podem afluir continuamente ao periodonto através da vascularização local, nomeadamente pelo ligamento periodontal. Demonstrou-se que durante a reabsorção da raiz, os odontoclastos apresentam atividade da H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>/ATPase (responsável pela acidificação do meio que promove a desmineralização do osso), da catepsina K e da metaloproteinase tipo 9 (MMP-9) com localização subcelular idêntica à observada nos osteoclastos durante a remodelação óssea<sup>42</sup>. Também há evidências de que vias de sinalização importantes para a diferenciação e atividade dos osteoclastos, como a RANK/RANKL/OPG são igualmente determinantes para os odontoclastos,

dados que a expressão do RANKL foi evidenciada em odontoclastos durante a reabsorção radicular<sup>41</sup>.

Os odontoblastos têm origem em células ectomesenquimatosas que migram da crista neural na fase inicial do desenvolvimento embrionário da face e são responsáveis pela formação da dentina. Em situações patológicas com destruição da dentina e perda dos odontoblastos, células com características semelhantes surgem na polpa dentária, provavelmente por diferenciação de fibroblastos, formando a dentina de reparação<sup>43,44</sup>.

Os cementoblastos têm uma origem mais discutível, podendo diferenciar-se a partir de células do folículo dentário<sup>45, 46</sup>. No LP parecem existir células com capacidade de diferenciação em odontoblastos ou cementoblastos e a diferenciação numa ou noutra linhagem poderá estar dependente de estímulos locais<sup>47</sup>.

Já os osteoblastos surgem de células progenitoras localizadas no periósteo e medula óssea, sob a influência de proteínas morfogênicas ósseas (BMPs, de *bone morphogenetic proteins*) e outros fatores de crescimento como o fator de crescimento dos fibroblastos (FGF), o fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF) e o fator de crescimento transformador beta (TGF- $\beta$ ). Curiosamente, estes mediadores também parecem ser importantes para a diferenciação das células da polpa dentária em odontoblastos<sup>42</sup>.

Estudos sobre a capacidade de transdiferenciação de células tronco do adulto e regeneração de tecidos periodontais têm evidenciado as semelhanças entre estes diferentes tipos de células. Estudos *in vitro* de culturas em três dimensões demonstraram que células tronco do ligamento periodontal podem diferenciar-se e adquirir características fenotípicas de células de tecido ósseo, de cemento e de cartilagem quando expostas à proteína I do cemento (CEMPI)<sup>48</sup>. Em modelos animais de odontogênese, células do folículo dentário diferenciam-se em cementoblastos na presença de células da bainha epitelial de Hertwig e em osteoblastos na presença de células da papila<sup>49, 50</sup>. Estudos anteriores já haviam sugerido que células tronco da papila dentária tinham não só potencial odontogênico como osteogênico<sup>51</sup>.

Para além de poderem ter origens comuns, estas células partilham ainda, como veremos, mediadores e vias de sinalização, tornando difícil separar a remodelação óssea da remodelação das estruturas dentárias.

## 2.2. Mecanismos biológicos

Concettualmente, a Ortodontia consiste na movimentação do dente “dentro” do tecido ósseo. O movimento dentário ocorre por aplicação de uma força que provoca a remodelação da raiz e do periodonto.

Classicamente sempre se considerou que na base deste processo estão forças simétricas de pressão e de tensão ao nível do LP, com alteração da perfusão sanguínea e consequente necrose assética desta estrutura. Embora estudos recentes recorrendo a microtomografias computadorizadas e análise de elementos finitos nem sempre tenham conseguido comprovar a teoria das forças simétricas de pressão/tensão<sup>52</sup>, confirmaram o papel fulcral do LP no desenrolar da resposta biológica às forças ortodônticas, independentemente do tipo de forças envolvidas<sup>53</sup>.

A tradução histológica inicial dos fenómenos de remodelação é o aparecimento de zonas de hialinização, correspondendo a necrose tecidual, visíveis a partir do 2º ou 3º dia após a aplicação do aparelho ortodôntico<sup>39, 54, 55</sup>. A necrose ocorreria sobretudo na área de pressão. Como consequência, ocorrem ao local células imunoinflamatórias, inicialmente macrófagos, seguidos de outros tipos celulares incluindo fibroblastos e células com capacidade de diferenciação em células de remodelação do periodonto e raiz. Estas células reabsorvem os restos necróticos e libertam mediadores que vão contribuir para a remodelação das estruturas envolvidas. A reabsorção do tecido hialino seria essencial para permitir a progressão do movimento dentário. Estudos recentes sugerem que a formação de tecido necrótico e a sua reabsorção não se limita à fase inicial, ocorrendo também na fase linear do movimento dentário<sup>56</sup>. Salientando a importância dos fenómenos inflamatórios envolvidos, Brezniak e Wasserstein designaram a RRAE associada ao TO de Reabsorção Radicular Inflamatória Induzida Ortodonticamente<sup>8</sup>.

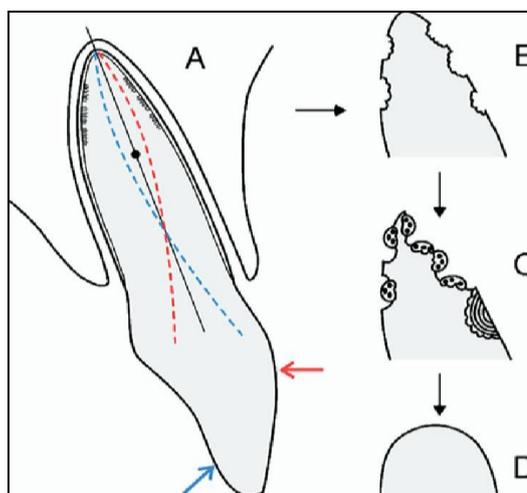
O tecido hialinizado que se forma durante o movimento dentário tem sido encontrado junto de áreas de reabsorção radicular, coincidindo com as zonas de pressão do LP<sup>57</sup>. A eliminação inicial deste tecido necrótico dá-se na periferia da zona hialina, contudo, durante a sua remoção, a superfície externa radicular mais próxima pode ser danificada<sup>54,55</sup>. Observam-se lacunas de reabsorção ao nível do cimento e da dentina radicular que se vão expandindo e, consequentemente, a pressão exercida pela força vai-se reduzindo, permitindo a reversão do processo e a reparação das estruturas<sup>8</sup>. Estudos histológicos em animais<sup>58</sup> e em humanos<sup>59</sup> testemunham claramente a ocorrência de lacunas de reabsorção em 90% dos doentes, quando a raiz é comprimida contra o alvéolo dentário<sup>60</sup>.

A remodelação do osso alveolar também é evidenciada pela formação de lacunas de reabsorção e pela presença de osteoclastos e osteoblastos<sup>37</sup>. Segundo os estudos de Sandstedt citados por VON BÖHL<sup>56</sup> no lado de pressão ocorre reabsorção óssea enquanto no lado de tensão surge neoformação de osso. A remodelação do osso alveolar é essencial para a integridade da raiz, pelo que fatores que induzam a deficiente reabsorção óssea inicial podem favorecer a reabsorção da raiz<sup>61</sup>.

Felizmente, o facto de o cimento ser altamente denso e mineralizado, torna-o mais resistente que o osso, pelo que a aplicação de forças ortodônticas provoca mais reabsorção óssea

do que remoção de cimento. Por outro lado, os cementoblastos têm capacidade de regenerar o cimento. A remodelação e reparação da superfície radicular parece começar duas semanas após a remoção da força, com a aposição de cimento acelular, seguido de cimento celular. Este processo verificou-se em 38 e 82% das lacunas de reabsorção de pré-molares humanos, após as 2 e 5 semanas, respectivamente<sup>57</sup>. Mas, dependendo da intensidade e duração da pressão, a fina camada de cementoblastos pode ser destruída, e se a reabsorção exceder a capacidade de reparação, a dentina é exposta à ação dos odontoclastos/osteoclastos podendo ocorrer reabsorção irreversível<sup>62</sup>. No caso de uma ilha de cimento ou dentina se separar da superfície radicular, ela será reabsorvida, sem que haja possibilidade de reparação da raiz danificada<sup>63</sup> (Fig. 1.4). Segundo os estudos clássicos de Schwarz citado por VON BÖHL<sup>56</sup>, a mobilização dos dentes sem lesar o LP e a raiz é possível desde que a pressão exercida no LP não exceda a pressão sanguínea capilar.

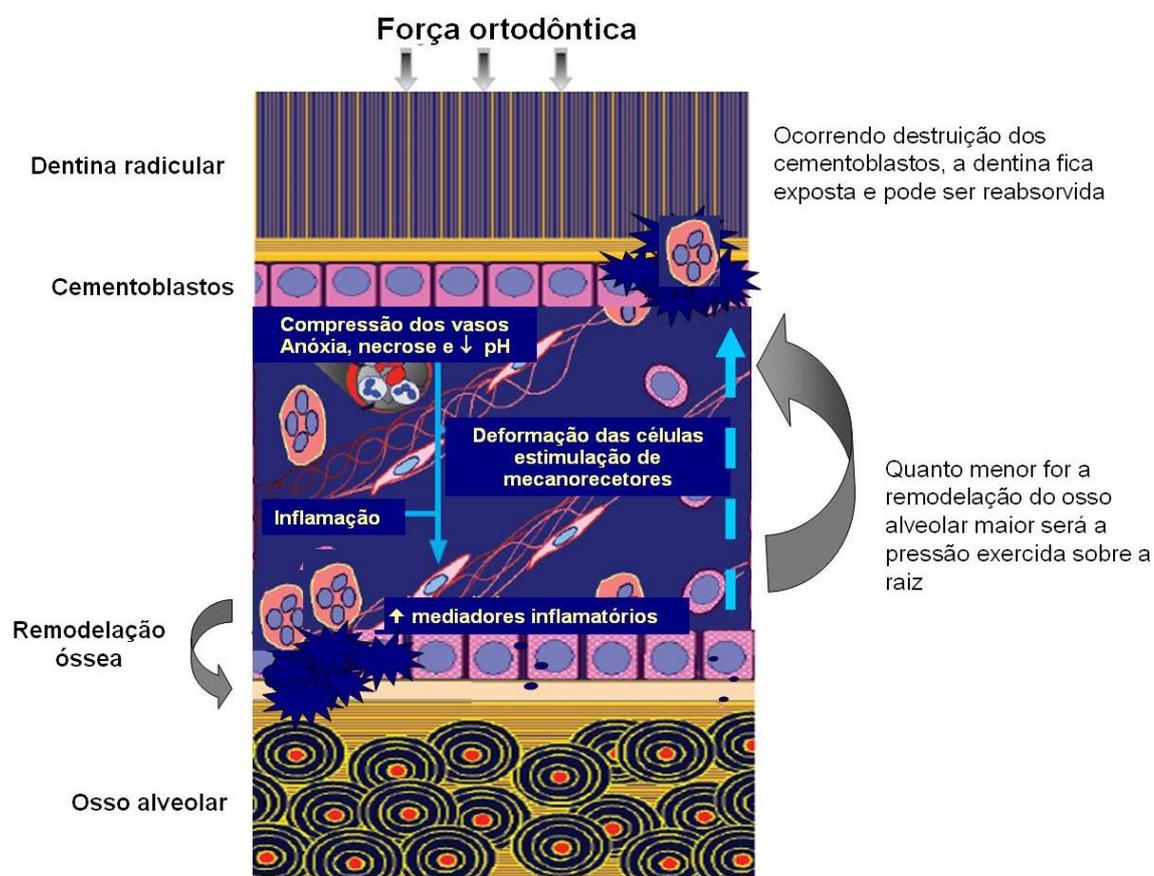
Assim, a RRAE poderá ocorrer quando as forças criadas ao nível do ápice excedem a resistência e a capacidade de reparação dos tecidos periapicais<sup>10</sup>. Podemos considerar que o grau de reabsorção da raiz depende do equilíbrio entre forças mecânicas e “forças moleculares”. As forças mecânicas incluem não só a força externa exercida mas também a resistência dos tecidos e a pressão sanguínea capilar; as “forças moleculares” resultam do equilíbrio funcional entre os vários mediadores e dependem não só da intensidade da resultante da força mecânica mas também do perfil genético do indivíduo.



**Figura 1.4.** Progressão da reabsorção radicular apical externa (A-D), quando o dente é submetido a forças ortodônticas (representadas pela seta vermelha e azul). Adaptado de Roberts *et al.*<sup>64</sup>

Quando os mediadores libertados em consequência da agressão do LP não asseguram uma remodelação eficaz do osso alveolar, a tensão local aumenta induzindo a RRAE (menor reabsorção do osso alveolar e maior reabsorção da raiz). A ativação das múltiplas vias de

sinalização molecular envolvidas resulta, indiretamente, da libertação de mediadores pelas células locais necrosadas e das células imunoinflamatórias que aí confluem e, diretamente, da estimulação de mecanoreceptores celulares (Fig.1.5).



**Figura 1.5.** Mecanismos envolvidos na resposta da raiz e periodonto às forças ortodônticas. Adaptado de Consolaro *et al.*<sup>65</sup>

Qualquer que seja o grau de reabsorção, raiz, ligamento periodontal e osso alveolar são remodelados adaptando-se à nova arquitetura estabelecida, fator importante para a estabilização do dente na nova posição.

A localização preferencialmente apical da reabsorção radicular externa da raiz<sup>66</sup> pode ter três justificações. A primeira deve-se ao facto das forças ortodônticas serem muito mais concentradas no ápice radicular, visto o movimento nunca se dar completamente em translação, e geralmente o fulcro ser oclusal relativamente à porção apical da raiz<sup>67</sup>. A segunda diz respeito à orientação das fibras periodontais, dispostas em diferentes direcções na região apical, o que pode condicionar maior stress nessa zona<sup>66</sup>. A terceira está relacionada com o facto do terço coronário estar coberto por cimento acelular, enquanto o terço radicular apical está coberto por

cimento celular<sup>67, 68</sup>, mais vulnerável e facilmente agredido quando sujeito a pressão e consequente redução da pressão sanguínea, como ocorre durante o TO.

Os fenômenos descritos de remodelação óssea e das estruturas dentárias são interdependentes, não só pela mútua indução de forças de pressão mas eventualmente também pela liberação de mediadores moleculares que atuam bidirecionalmente em ambas as estruturas.

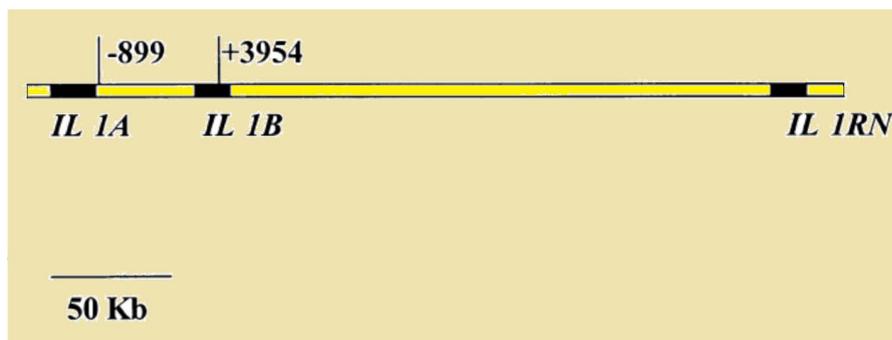
### 2.3. Mediadores moleculares

Nos últimos anos, o conhecimento sobre os mecanismos de sinalização celular implicados no movimento dentário sofreu uma enorme expansão. Como foi anteriormente referido, hoje sabe-se que a força exercida por um aparelho ortodôntico ao nível do LP desencadeia uma resposta inflamatória e induz a liberação de mediadores que atuam no microambiente local e que em última análise serão os responsáveis pelas alterações histológicas e anatómicas observadas. Estes mediadores têm origem nas células do próprio LP e nas células imunoinflamatórias atraídas ao local; as células alvo, incluem as células anteriormente descritas com função de remodelação do complexo dentoalveolar.

Entre os mediadores libertados, as citocinas, nomeadamente a interleucina I (IL1), têm um papel de grande relevo<sup>69, 70</sup>. As citocinas são proteínas produzidas por células imunoinflamatórias com múltiplas funções na resposta imunitária e inflamatória, interferindo com a diferenciação, proliferação, migração e apoptose celulares<sup>71</sup>. As citocinas têm vindo a ser implicadas em várias condições patológicas como a doença cardiovascular, a doença periodontal, o cancro e as doenças autoimunes, e as suas concentrações séricas podem ser usadas como marcadores de prognóstico.

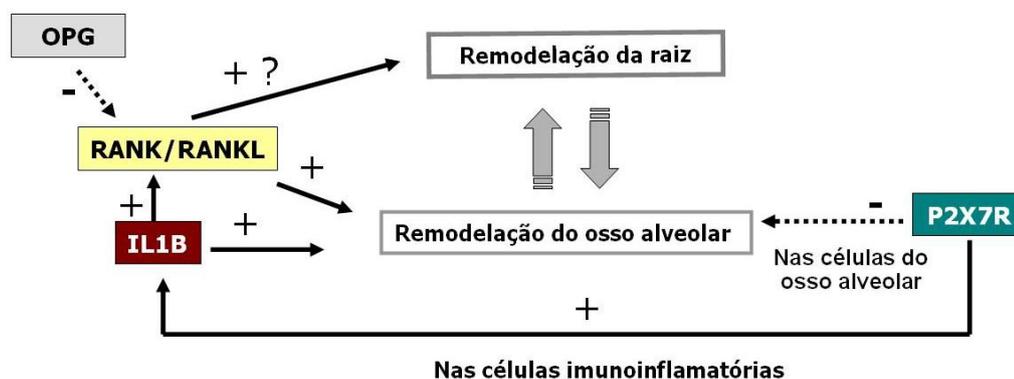
A IL1 é produzida por monócitos e macrófagos e tem como principal função a mediação da fase aguda das respostas inflamatórias<sup>72</sup>. Ao nível do tecido ósseo é conhecida a sua capacidade de ativação dos osteoclastos<sup>70</sup>. Induz ainda, a produção de outras citocinas pró-inflamatórias e proteínas associadas. A família da IL1 inclui três proteínas: a interleucina 1A (IL1A) (codificada pelo gene *IL1A*), a interleucina 1B (codificada pelo gene *IL1B*) e o antagonista dos recetores da IL1, o IL1RN, codificado pelo respetivo gene. Os três genes dispõem-se ao longo de uma região de 300 kb no braço longo do cromossoma 2 (Fig1.6).

Os agonistas IL1A e a IL1B compartilham uma estrutura terciária muito semelhante, os mesmos fatores de regulação e funções, enquanto o IL1RN funciona como um recetor antagonista, impedindo a ligação da IL1A e IL1B ao recetor<sup>73</sup>. Relativamente à capacidade de indução da reabsorção óssea, a IL1B é 15 vezes mais potente do que a IL1A e 1000 vezes mais potente do que uma outra citocina, o fator de necrose tumoral (TNF).



**Figura 1.6.** Localização próxima, em 2q13 (cromossoma 2, braço longo, banda 1, sub-banda 3) dos genes da família da IL1, *IL1A*, *IL1B* e *IL1RN*. A região inclui aproximadamente 300 Kb.

A presença de elevados níveis de IL1B no tecido periodontal e no fluido crevicular gengival de pacientes sujeitos a TO tem sido associada ao processo de remodelação óssea, o que implica um papel desta citocina no movimento dentário ortodôntico<sup>36, 74-76</sup> (Fig.1.7). A IL1B também tem sido encontrada em níveis elevados no fluido crevicular nos processos de perda óssea das patologias periodontais<sup>77, 78</sup> e peri-radiculares<sup>79, 80</sup>. Ao contrário do que se passa na periodontite, na RRAE a reabsorção do osso alveolar é benéfica e pode ser importante para diminuir a tensão exercida sobre o LP e a raiz do dente. Esta hipótese é apoiada por modelos experimentais de forças ortodônticas que mostraram que ratos *knock-out* para o gene da IL1B desenvolviam mais RRAE do que os ratos *wild-type*<sup>81</sup>.



**Figura 1.7.** Atuação do sistema RANK/RANKL/OPG, da IL1B e do P2x7R ao nível da remodelação óssea e da raiz. Dada a interdependência funcional das moléculas, a repercussão ao nível da reabsorção da raiz é difícil de prever e vai depender do equilíbrio estabelecido.

Vários outros mediadores também têm sido associados aos fenômenos inflamatórios e de remodelação tecidulares induzidos pelo tratamento ortodôntico, incluindo as prostaglandinas, fatores de crescimento e metaloproteinasas, interferões (IFN), fator estimulador de colónias (CSF), fator de transformação de crescimento beta (TGFB), os fatores de necrose tumoral alfa e beta (TNF $\alpha$  e TNF $\beta$ ) ou a interleucina 6 (IL-6)<sup>82-84</sup>. Muitos destes mediadores são libertados quer

pelas células inflamatórias quer por outras células locais, como resposta à estimulação desencadeada pelas citocinas.

O sistema constituído pelo ligando do recetor de ativação do fator nuclear kB, RANKL (também designado de recetor do fator de diferenciação dos osteoclastos), pelo seu recetor RANK, e pela osteoprotegerina (OPG), todos eles relacionados com a família de recetores dos fatores de necrose tumoral (TNF), é igualmente fundamental para a remodelação do tecido ósseo e parece participar no desenvolvimento da RRAE.

O RANKL é também designado por TNFSF11 (ligando da superfamília do recetor do fator de necrose tumoral, membro 11, ou ainda ligando do recetor ativador do NF-KAPPA-B). É um polipeptídeo com 317 aminoácidos codificado pelo gene *TNFSF11*, que se expressa nos osteoblastos, osteócitos, células do estroma da medula óssea precursoras dos osteoclastos, linfócitos T e células cancerígenas. Por interação com o seu recetor induz a diferenciação e ativação dos osteoclastos, promovendo a reabsorção óssea. Ao nível do sistema imunitário, parece estar envolvido na regulação da apoptose<sup>85</sup>.

O RANK, recetor do RANKL, é uma proteína transmembranar de 616 aminoácidos que se expressa na superfície dos osteoclastos, linfócitos T, células dendríticas, células endoteliais e também células cancerígenas. Quer o RANKL quer o RANK foram igualmente descritos em odontoblastos, fibroblastos da polpa e do ligamento periodontal, assim como em odontoclastos isolados<sup>86</sup>. Ao nível do osso, a interação RANKL/RANK estimula a diferenciação e ativação dos osteoclastos e consequente reabsorção óssea<sup>71</sup> (Fig. 1.7). Li *et al.*<sup>87</sup> utilizaram ratos *knock-out* para o RANK e constataram que estes ratos tinham um défice de osteoclastos e defeitos profundos na reabsorção e remodelação óssea, mostrando osteopetrose e ainda defeitos no desenvolvimento do osso endocondral.

A OPG, também designada como fator inibidor da osteoclastogénese, é um recetor solúvel, sem domínio transmembranar, com 410 aminoácidos. Produzida pelos osteoblastos e pelas células osteogénicas do estroma, tem um efeito protetor sobre a reabsorção óssea ao atuar como um recetor competitivo do RANK, impedindo a sua ligação ao RANKL<sup>88-90</sup> (Fig. 1.7).

Mutações nos genes que codificam estas três proteínas associam-se a doenças ósseas hereditárias como a osteopetrose familiar recessiva, a osteólise familiar e a doença de Paget esporádica<sup>91</sup>.

Vários estudos *in vivo* evidenciam que o tratamento ortodôntico altera os níveis e padrão de expressão destas moléculas<sup>85, 92</sup>. Verificou-se que no ligamento periodontal, do lado de compressão do dente, a expressão do RANKL está aumentada associando-se a ativação dos osteoclastos e a aceleração do movimento dentário; ao invés, no lado de tensão, ocorre um acréscimo na produção de OPG. Em modelos animais foi também verificado que a transferência do gene da OPG para tecidos periodontais inibia a osteoclastogénese dependente do RANK e

diminuía o movimento dentário, enquanto a transferência do gene do RANKL induzia os efeitos opostos<sup>93</sup>.

Estudos *in vitro* com cultura de células do LP, submetidas a forças de compressão, mostraram aumento da expressão do RANKL e da IL1B, e que a produção de IL1B regulava a produção de RANK, a qual era inibida quando se adicionava ao meio de cultura um antagonista do recetor da IL1<sup>94</sup>. Num outro estudo, verificou-se que cementoblastos humanos submetidos a tensão e estimulados com IL1 induziam a expressão de RANKL e em menor grau de OPG<sup>47</sup>. A duração e intensidade das forças de tensão, conhecidos fatores de risco para a RRAE, também se associaram a variação do aumento da secreção de RANKL e diminuição da secreção de OPG em células do LP<sup>92, 95</sup>. O próprio aumento da intensidade do movimento dentário por irradiação com laser de baixa intensidade, com eventual utilidade na redução do tempo de tratamento, poderá também ser explicado pela via RANKL/RANK/OPG<sup>96</sup>.

Tal como para a IL1B, estes mediadores também poderão ter um papel na destruição do osso alveolar na periodontite, tendo sido detetados níveis elevados de RANKL e diminuídos de OPG no líquido crevicular destes doentes<sup>97, 98</sup>.

A maioria dos trabalhos descritos avalia a variação dos níveis destas moléculas induzida pelo TO, mas poucos descrevem as diferenças na presença ou ausência de RRAE. Num dos poucos trabalhos que avalia este aspeto, Yamaguchi *et al.*<sup>95</sup> descrevem um aumento significativo de RANKL e redução de OPG nas células do LP humano em casos de reabsorção radicular severa. Este achado, aparentemente contraditório com as funções do RANKL e OPG ao nível do tecido ósseo, poderá explicar-se se considerarmos que estas moléculas também podem induzir diretamente a reabsorção da raiz. De facto, são múltiplas as evidências que sugerem a existência de um processo de regulação comum à reabsorção dos tecidos mineralizados do osso e do dente, como sejam as anteriormente descritas origens comuns de células tronco, a capacidade de transdiferenciação celular e a partilha de mediadores moleculares (Fig. 1.7). Voltaremos a este assunto na discussão.

Outro fator recentemente implicado na resposta biológica ao TO é o recetor purinérgico P2RX7 (Recetor Purinérgico P2X, Canal Iónico de abertura dependente de ligando, 7). O P2RX7 é um canal iónico, não seletivo, dependente de ATP, que se expressa em múltiplas células, nomeadamente nos osteoblastos, osteoclastos e osteócitos, células do sistema imunitário, epiteliais, neuronais e gliais<sup>99-102</sup>. Recentemente, o P2RX7 foi ainda identificado em células do LP de dentes submetidos a forças ortodônticas<sup>103</sup>. Nos ossos longos, a ativação do P2RX7 tem um efeito pró-osteogénico, induzindo a apoptose dos osteoclastos e a diferenciação e ativação dos osteoblastos<sup>100, 104</sup>. Ratos *knock-out* que não expressam o recetor apresentam uma significativa redução da massa óssea nos ossos longos e aumento do número de osteoclastos<sup>105</sup>. O P2RX7 está envolvido na formação óssea induzida mecanicamente, sendo-lhe atribuída cerca de 73% da

resposta osteogénica à tensão *in vivo*<sup>99, 100</sup>. Este efeito seria mediado pela libertação da prostaglandina E2<sup>102</sup>.

Nas células imunoinflamatórias, a ativação do P2RX7 pode induzir a libertação de citocinas, como a IL1B, IL1A, IL6, IL18 ou o TNF $\alpha$ <sup>106, 107</sup>. A libertação destes mediadores atrairia ao local células capazes de metabolizar tecidos necróticos e apoptóticos como macrófagos e neutrófilos.

Pouco se sabe do papel do P2RX7 na etiopatogenia da RRAE, embora, aparentemente, o efeito predominante resulte da sua função nos fenómenos inflamatórios locais e da indução de libertação de IL1B. A IL1B, por sua vez, como anteriormente descrito, estimula os osteoclastos, quer diretamente quer por ativação do sistema RANK/RANKL. Esta hipótese apoia-se num dos raros estudos sobre o tema, no qual Viecilli *et al.* utilizando ratos *knock-out* para o gene *P2RX7*, encontraram um aumento do infiltrado de macrófagos e de hialinização ao nível do LP assim como um aumento da ocorrência de RRAE comparativamente aos animais *wild-type*<sup>103</sup>, explicada pela diminuição da libertação local de IL1B e insuficiente remodelação óssea. A figura 1.7 ilustra a interdependência funcional do sistema RANK/RANKL/OPG, da IL1B e do P2RX7 ao nível da remodelação óssea e da raiz.

### 3 . Fatores de risco

Múltiplos estudos anteriores associaram a RRAE consequente ao TO a fatores mecânicos e clínicos dependentes do tratamento e a diversos fatores biológicos relacionados com o paciente, entre eles a suscetibilidade individual geneticamente determinada<sup>29, 108</sup>.

#### 3.1. Fatores de risco relacionados com o tratamento ortodôntico

Entre os vários fatores relacionados com o tratamento ortodôntico, incluem-se a duração do tratamento, a quantidade de deslocamento apical, as características das forças aplicadas, a direção do movimento dentário, o tipo de aparelho e a técnica de tratamento.

##### 3.1.1. Duração de tratamento

A duração do tratamento é um dos fatores mecânicos mais referenciados como estando relacionado com a RRAE<sup>2, 17, 22, 68, 109-114</sup>. Alguns destes estudos recorreram a ortopantomografias para a medição de RRAE<sup>111, 113</sup>, outros a radiografias periapicais<sup>2, 22, 68</sup> ou ainda a radiografias cefalométricas<sup>114</sup>.

Num estudo retrospectivo recente os autores analisaram alguns fatores predisponentes para a reabsorção radicular apical dos incisivos superiores em pacientes ortodônticos sujeitos a “retração em massa” dos incisivos superiores e a intrusão com mini-implantes, tendo obtido uma correlação muito significativa entre a RRAE e a duração do tratamento<sup>114</sup>.

Em alguns trabalhos foi ainda analisado o fator duração do tratamento por estádios. Mohandesan *et al.*<sup>2</sup>, só avaliaram a reabsorção radicular aos 6 e 12 meses, pelo que não é possível inferir sobre os perigos de um TO muito prolongado, mas somente sobre as diferenças de RRAE ao longo do primeiro ano. Baumrind *et al.*<sup>68</sup> encontraram um aumento de 0,38 mm por cada ano de tratamento. Já Nanekrungsan *et al.*<sup>115</sup>, que avaliaram a % RRAE por grupos de tempo de tratamento (1, 2, 3 e mais de 3 anos), verificaram um aumento progressivo só a partir do 3º ano.

Contudo, há outros autores que não comprovaram a associação entre o aumento da duração do tratamento e a ocorrência de RRAE<sup>11, 34, 116, 117</sup>.

A discordância dos resultados pode ter várias explicações. Para além da variabilidade das amostras e das metodologias utilizadas no diagnóstico e nos protocolos terapêuticos, há a considerar que uma maior duração do tratamento nem sempre corresponde a um TO “ativo” prolongado, pois se o paciente faltar frequentemente às consultas de controlo ou se o clínico preferir períodos mais longo entre consultas, o doente estará sujeito a menos períodos de ativação. Outra variável que pode confundir e influenciar a duração de tratamento é a existência de planos de tratamentos mais complexos.

### ***3.1.2. Deslocamento apical***

A quantidade de deslocamento apical pode constituir um bom indicador do grau de ativação global dos aparelhos ortodônticos. Os incisivos superiores são, provavelmente, dos dentes sujeitos a maior deslocamento apical e talvez seja esta a razão de serem mais propensos a níveis severos de reabsorção radicular. Numa meta-análise<sup>112</sup> conduzida no sentido de elucidar sobre os possíveis fatores etiológicos da RRAE induzida pelo TO, verificou-se que a média de reabsorção radicular apical se correlacionou fortemente com a totalidade do deslocamento apical ( $r = 0,822$ ) e com a duração do tratamento ( $r = 0,852$ ). Em 2005 um outro estudo veio corroborar a importância destes mesmos fatores<sup>118</sup>.

### ***3.1.3. Características das forças aplicadas***

As características das forças utilizadas, como a magnitude, o seu intervalo de aplicação e variação da intensidade da força aplicada ao longo do tempo, também têm sido frequentemente estudadas.

### 3.1.3.1. Magnitude da força

Há na literatura opiniões diferentes sobre o nível de força que resulta no melhor efeito mecânico ao nível do ligamento periodontal, durante o movimento ortodôntico. Assume-se que um sistema de forças ótimo é importante para uma resposta biológica adequada ao nível do LP<sup>119</sup>.

Nas últimas 8 décadas, o conceito de “força ideal” mudou substancialmente. Em 1932, Schwartz citado por VON BÖHL<sup>56</sup> introduziu este conceito e para este autor, o nível ótimo de força é o comparável à pressão que o sangue exerce nas paredes dos capilares do LP, devendo ser só ligeiramente superior, de modo a comprimir parcialmente os vasos sem os obstruir. De acordo com Schwartz, forças bem inferiores ao nível ideal não causariam reação no LP e as que excedessem esse nível levariam à formação de áreas de necrose e ao atraso no movimento dentário. Esta definição foi ligeiramente modificada por Oppenheim<sup>120</sup> citado por BREZNIAK<sup>8</sup> que defendeu o uso da força mais leve, ainda capaz de provocar movimentação dentária e, por Reitan<sup>121</sup> citado por HARRIS<sup>122</sup>, que demonstrou a existência de áreas acelulares no lado de pressão, mesmo com o uso de forças leves, recomendando este nível de força.

Atualmente, considera-se que a força ótima será a que tem magnitude e características (intervalo de aplicação e variação de intensidade) que permitam produzir a movimentação dentária necessária sem dano tecidual e com o máximo conforto do paciente. A força ideal pode ser muito diferente para cada indivíduo e para cada dente<sup>63, 123, 124</sup>, continuando a não haver evidência científica do nível de força recomendado para a melhor eficiência na ortodontia clínica<sup>125</sup>.

A aplicação de forças leves induz um movimento dentário com reduzido “custo” biológico, com a formação de pequenas áreas de hialinização, reabsorção óssea direta e sem remoção de cementoblastos<sup>123, 126-128</sup>. A aplicação de forças pesadas resulta em maior “custo” biológico, com a formação de áreas hialinas extensas, reabsorção óssea indireta, remoção de cementoblastos, atraso no início do movimento dentário e eventuais danos irreversíveis das estruturas dentárias e do periodonto de sustentação<sup>129</sup>. Assim, a magnitude da força é considerada um fator determinante do grau de reabsorção radicular<sup>109, 123, 128, 130</sup>.

Em vários ensaios clínicos randomizados, a aplicação de forças pesadas produziu significativamente mais reabsorção radicular do que a aplicação de forças leves ou do que a sua não aplicação<sup>131-133</sup>. Num destes estudos clínicos verificou-se que o volume médio das crateras de reabsorção era 11,59 vezes maior no grupo de forças pesadas do que no grupo de controlo<sup>132</sup>. Estes resultados são consistentemente descritos tanto no lado de compressão como no de tensão<sup>62, 109, 127, 133</sup>.

A magnitude da força depende do aparelho ortodôntico, do movimento a ser realizado, do total de área radicular envolvida, da quantidade de osso de suporte e das características do

periodonto de sustentação e proteção. Idealmente, a força deveria ser quantificada de forma individual, mas isso obrigaria um controlo absoluto e impossível de todas estas variáveis. Embora a literatura ainda seja inconclusiva, pensa-se que mais importante do que a magnitude da força aplicada, é a sua resultante por área radicular, parâmetro ainda mais difícil de avaliar com precisão<sup>9</sup>.

A realidade é que há grande dificuldade na avaliação fidedigna da intensidade das forças aplicadas pelo ortodontista. No trabalho de Kuroi *et al.*<sup>134</sup> foi pedido a 20 ortodontistas que aplicassem uma força adequada para a movimentação de um dente com um aparelho simples, constituído por uma banda no molar, um bracket no dente a ser movimentado e um fio ortodôntico. Os resultados mostraram que as forças aplicadas tiveram grande variedade inter e intra-operadores (de 30 a 100 cN) e que alguns recorreram à medição da força por instrumentos específicos enquanto a maioria se baseou na sensibilidade digital.

Estudos recentes em ratos recorrendo a microtomografia computadorizada, a cortes histológicos e a análise de elementos finitos de modo a poder reproduzir os diferentes níveis de tensão radicular, concluíram por uma relação direta entre RRAE e magnitude das forças utilizadas. Confirmaram ainda que a RRAE severa estava associada à formação de tecido hialinizado no LP, decorrente de forças elevadas ou de aplicação mais prolongada<sup>103</sup>.

### 3.1.3.2. Intervalo de aplicação da força

O intervalo de aplicação da força, que corresponde ao tempo entre consultas, pode influenciar a suscetibilidade à RRAE. Como já anteriormente descrito, a força ortodôntica cria uma zona de pressão no LP, e, como resposta tecidual, há formação de áreas hialinas e reabsorção local dos tecidos, de forma a aliviar a pressão, permitindo a reparação e remodelação<sup>129</sup>. A aplicação iterativa de novas forças implica a persistência das lesões e poderá dificultar a reconstituição dos tecidos. Desta forma, o aumento no intervalo de aplicação da força facilitaria a reparação<sup>135</sup>. O planeamento do TO deve ter em conta este facto, pelo que as consultas de controlo ortodôntico para reaplicação de forças, devem ser realizadas, em média, a cada três semanas. No entanto, perante uma situação de risco aumentado de reabsorção radicular, pode e deve aumentar-se o intervalo de aplicação.

### 3.1.3.3. Forças contínuas / descontínuas

A variação da intensidade da força aplicada ao longo do tempo também tem sido estudada. Relativamente a esta característica, as forças são classificadas como contínuas ou descontínuas, podendo as últimas serem intermitentes ou interrompidas.

A força contínua é aquela que exerce uma carga de valor constante sobre os dentes. Clinicamente, é muito difícil conseguir a aplicação de forças verdadeiramente contínuas, dado que há sempre uma redução da magnitude da força inicial à medida que o dente se vai movimentando e ocorre remodelação do periodonto<sup>13, 59, 136</sup>. Atualmente, o recurso a fios e molas de níquel-titânio, permite gerar forças de ação contínua e de valor constante, mas são uma exceção no âmbito dos materiais e sistemas usados em ortodontia.

A força intermitente pode ser definida como uma força contínua intervalada por períodos de repouso e que estaria associada aos aparelhos removíveis e a alguns complementos do TO com aparelhos fixos, como os elásticos intermaxilares<sup>63</sup>. Os níveis de força declinam abruptamente até zero de forma intermitente, quando o aparelho ortodôntico é removido pelo paciente. Uma força desta natureza, geralmente é de elevada magnitude, promove movimentos de *jiggling*, sem um período ideal de repouso para a reconstituição dos tecidos. No entanto, há baixa evidência de que as forças de *jiggling* tenham um papel no aumento da reabsorção radicular<sup>8, 24</sup>.

A força designada por interrompida, não é mais do que uma subdivisão da força intermitente. Ela vai reduzindo de magnitude, devido ao movimento dentário e à alteração das propriedades do sistema mecânico do aparelho. Tanto as forças contínuas como as interrompidas, podem ser obtidas pelos aparelhos fixos. A força interrompida, caracteriza-se por ser ativa durante um determinado tempo e depois se dissipar, criando um período de repouso no qual o dente que foi movimentado é apenas mantido em posição. Este período de repouso propicia melhores condições de reparação dos tecidos e cria condições mais favoráveis a uma nova resposta quando o aparelho for reativado. As alterações no LP só se dão na fase inicial, após a aplicação da força, dado que a intensidade da força se vai reduzindo até atingir níveis inócuos. Nesta fase, o dente deixa de se movimentar, permitindo a reparação e remodelação das estruturas.

Há uma evidência científica limitada de que as forças contínuas produzam significativamente mais reabsorção radicular do que as forças interrompidas. *Acar et al.*<sup>137</sup> compararam o efeito obtido com uma força de 100 g efetuada por elásticos intraorais com aplicação descontínua (12 horas por dia) e contínua (24 horas por dia), tendo constatado que a aplicação da força contínua provocou significativamente mais reabsorção radicular do que a força descontínua. Estes resultados estão de acordo com os de outros estudos segundo os quais as forças interrompidas provocam menos reabsorção radicular do que as forças contínuas<sup>29, 138-141</sup>.

Os sistemas mecânicos com menor risco de RRAE seriam os que exercem uma força de magnitude leve e de natureza interrompida (descontínua), se utilizados com um intervalo de aplicação suficientemente amplo para permitir que se complete o ciclo do movimento dentário assegurando a remodelação e recuperação das estruturas.

### 3.1.4. Direção do movimento dentário

A evidência científica tem revelado que mais importante do que a magnitude absoluta de força aplicada, são a força resultante por área radicular e a sua distribuição ao longo da raiz e osso adjacente, na dependência do tipo de movimento dentário induzido<sup>13, 20, 59, 127</sup>.

A maior concentração de força tem sido observada nos movimentos de intrusão, de torque<sup>142</sup> e de inclinação não controlada (*tipping*), quando se usam forças pesadas<sup>143, 144</sup>.

Num estudo de Hans *et al.*<sup>145</sup>, verificou-se que a força extrusiva não resultou em maior nível de RRAE, quando comparada com o grupo controle, enquanto que a força intrusiva resultou em quatro vezes mais RRAE, quando comparada com a força extrusiva. Estes resultados estão de acordo com a literatura anterior que já referia que o maior dano é observado com movimentos dentários intrusivos porque concentram a pressão no ápice radicular<sup>10, 34, 146, 147</sup>.

Weltman *et al.*<sup>29</sup>, estudaram os fatores etiológicos da RRAE através de uma revisão sistemática de 11 ensaios clínicos randomizados, sugeriram a necessidade do uso de forças leves, muito particularmente na intrusão de incisivos. Foi também sugerido que a duração do tratamento é de particular importância quando há intrusão dos dentes antero-superiores e que nos pacientes com elevado potencial de reabsorção é necessária uma vigilância apertada durante os movimentos de intrusão<sup>110</sup>.

Os movimentos de torque radicular induzidos aos incisivos superiores estão fortemente relacionados com a reabsorção apical destas raízes. No âmbito dos movimentos dentários efetuados, a conjugação de intrusão e torque palatino/lingual das raízes é a causa mais forte da RRAE<sup>10, 146, 148</sup>.

Os movimentos de gressão estão associados a um risco menor de RRAE, dado que a tensão é distribuída de forma mais uniforme ao longo de toda a raiz<sup>10</sup>.

Muitos dos estudos até agora efetuados no âmbito da RRAE em humanos são retrospectivos, o que dificulta a avaliação dos fatores mecânicos associados ao TO. No futuro, são necessários trabalhos prospectivos, direcionados para a avaliação de tipos de movimentos dentários específicos.

### 3.1.5. Tipo de aparelho

O tipo de aparelho utilizado poderá influenciar a ocorrência de RRAE. Estudos mais antigos encontraram menos reabsorção radicular nos pacientes com aparelhos removíveis do que naqueles que usavam aparelhos fixos<sup>24, 149</sup>. Mais recentemente, foram comparadas as forças aplicadas por aparelhos removíveis termoplásticos e por aparelhos ortodônticos fixos, tendo-se verificado que as forças pesadas dos aparelhos fixos (225 g) produziram mais RRAE do que as forças leves (25 g) nos aparelhos fixos ou que as forças efetuadas por aparelhos removíveis

termoplásticos<sup>133</sup> Concluiu-se que as forças leves aplicadas por aparelhos fixos e as forças produzidas por dispositivos removíveis termoplásticos tinham um risco semelhante de RRAE.

O uso de elásticos intermaxilares de classe II também tem sido associado a maior grau de RRAE, devido às forças de *jiggling* nos dentes de ancoragem<sup>24, 116</sup>. Quanto à técnica Invisalign, um estudo longitudinal recente, com 100 pacientes, não evidenciou aumento significativo de reabsorção radicular mensurável<sup>150</sup>.

Além do aparelho ortodôntico de base selecionado para o paciente, frequentemente é necessário recorrer a aparelhos complementares para ancoragem ou expansão maxilar. Quando o TO passa por uma expansão maxilar rápida, o aparelho Hyrax, que é um expansor de ancoragem dentária, é muitas vezes o eleito. No que diz respeito ao uso deste tipo de aparelho, os estudos clínicos anteriores focaram-se na reabsorção radicular de molares e pré-molares maxilares, que são os dentes de ancoragem para este aparelho, tendo encontrado maior frequência de RRAE nas suas superfícies radiculares vestibulares e apicais<sup>130, 151-153</sup>. A associação entre RRAE nos incisivos maxilares e o aparelho Hyrax só foi estudada em humanos por Sameshima e Sinclair<sup>19</sup>, sem que se tenha encontrado qualquer correlação. Num estudo em gatos, o uso deste aparelho constituiu um fator de risco para RRAE nos incisivos centrais, tendo os autores sugerido que a associação se relacionava com casos de *tipping* severo e de proximidade radicular dos incisivos<sup>154</sup>. Mais recentemente, têm vindo a ser desenvolvidos aparelhos de expansão maxilar com ancoragem óssea, ao invés de ancoragem dentária, com o intuito de reduzir os efeitos colaterais dento-alveolares, como é o caso da reabsorção radicular<sup>155-157</sup>.

### **3.1.6. Técnica de tratamento**

Alguns autores sugeriram que a técnica de Begg podia induzir efeitos mais nocivos sobre as raízes<sup>158</sup>, mas vários outros não encontram diferenças realmente significativas entre as técnicas de Begg, Tweed, Straight-wire ou Edgewise<sup>10, 34, 159</sup>. Também ainda não se comprovou qualquer influência do tipo de sistemas Edgewise, convencionais ou auto ligáveis, ativos ou passivos<sup>14, 160, 161</sup>.

A utilização de materiais ortodônticos contemporâneos produz significativamente menos reabsorção radicular do que as técnicas standardizadas mais antigas. Acredita-se que para tal contribuam o uso de arcos<sup>162</sup> super-elásticos e termo-ativáveis e de arcos de aço retangulares de menor secção durante a retração dos incisivos e o acabamento.

## **3.2. Fatores de risco relacionados com o paciente**

Vários fatores biológicos têm sido descritos nos últimos 50 anos como contribuindo para a suscetibilidade à RRAE, contudo o tema permanece controverso.

De entre os fatores mais estudados destacam-se a idade, gênero, algumas características da raiz, traumatismos dentários, maus hábitos orais, severidade e tipo de má oclusão, saúde oral, doenças concomitantes ou medicação sistêmica.

### **3.2.1. Idade**

Com o aumento da idade média da população e o maior interesse pela estética, os adultos têm realizado cada vez mais tratamentos ortodônticos. Assim, é do máximo interesse perceber se a idade é um fator de risco de RRAE. Bishara *et al.*<sup>163</sup> compararam as medições de radiografias periapicais de adultos que não efetuaram TO, aos 25 e aos 45 anos, e verificaram que o comprimento radicular permanecia estável, o que os levou a inferir da segurança do TO neste intervalo etário. Contudo, estão descritas alterações fisiológicas dos tecidos nos adultos que podem propiciar a reabsorção das raízes: o ligamento periodontal torna-se menos vascularizado e mais estreito, o osso mais denso e avascular e o cemento mais espesso<sup>116</sup>. O facto do terço apical da raiz ser mais fortemente ancorado nos pacientes adultos do que nos jovens poderia igualmente dificultar o movimento dentário e aumentar o stresse mecânico sobre a raiz.

A verdade é que, salvo algumas exceções<sup>20, 24, 109, 164</sup>, a maioria dos autores não encontrou evidência da associação entre a RRAE e a idade cronológica<sup>2, 17, 22, 31, 57, 68, 122</sup>. Se os dentes do adulto forem movidos com forças leves e cuidadosamente na fase inicial, o TO não conduz necessariamente à RRAE<sup>165</sup>.

### **3.2.2. Género**

A influência do género tem sido avaliada por vários autores. A maioria não encontra uma associação consistente<sup>10, 17, 20, 34, 163</sup>. Os dados do estudo clínico randomizado de Scott *et al.*<sup>161</sup> também apontam para a improbabilidade de o género ser um fator de risco para a RRAE.

No entanto, há conclusões contraditórias com autores a relatarem o género masculino como mais suscetível à RRAE<sup>68, 166</sup>, enquanto outros encontraram maior prevalência no género feminino<sup>2, 167, 168</sup>.

### **3.2.3. Características da raiz**

Algumas características da raiz como a morfologia radicular, a existência de RRAE prévia ao TO, a rizogénese incompleta e o tratamento endodôntico, têm sido implicadas na etiologia da RRAE.

### 3.2.3.1. Morfologia radicular

Dos diferentes tipos morfológicos de raízes, as triangulares, as em forma de pipeta e as raízes dilaceradas são as que propiciam maior concentração de forças por área de ligamento periodontal na região apical. Este facto, segundo vários autores, facilita a ocorrência de lesões graves no cemento e, conseqüentemente, maior suscetibilidade à RRAE<sup>11, 20, 34, 115, 116, 168</sup>. Contudo, nem todos os autores encontraram uma correlação significativa entre anomalias radiculares e RRAE<sup>11</sup> e nos estudos mais recentes esta variável já não tem sido analisada.

### 3.2.3.2. Rizogénese incompleta

A literatura é unânime ao admitir que as conseqüências biológicas do movimento dentário ortodôntico em dentes com rizogénese incompleta são menores do que as verificadas nos dentes com rizogénese completa<sup>25, 169, 170</sup>. As forças aplicadas nos dentes com rizogénese incompleta não propiciam tão facilmente isquemia do LP, morte dos cementoblastos ou produção de elevados níveis locais de mediadores de reabsorção<sup>25</sup>. Desta forma, pode considerar-se que dentes imaturos, com ápice aberto, são menos suscetíveis à reabsorção. Segundo Linge e Linge<sup>24</sup>, provavelmente este achado deve-se ao facto da sua nutrição ser melhor e de terem maior número de células na área apical. Outra possível explicação é o facto da camada espessa de pré-dentina destas raízes ter um efeito preventivo.

### 3.2.3.3. Dentes com tratamento endodôntico

A existência de antecedentes de tratamento endodôntico não contraindica um tratamento ortodôntico<sup>171</sup>. O movimento dentário ortodôntico de dentes com tratamento endodôntico é similar ao dos dentes vitais<sup>116, 166, 171</sup>, dado que os processos que ocorrem durante o movimento ortodôntico provêm de alterações no periodonto adjacente e não dependem da vitalidade pulpar. Vários estudos apontam mesmo para o facto dos dentes com tratamento endodôntico serem menos vulneráveis à RRAE quando comparados com os dentes vitais<sup>8, 148, 172, 173</sup>. Essa maior resistência poderia dever-se a um aumento da dureza e densidade dentinária, promovida pela diminuição da hidratação da dentina radicular<sup>171</sup>.

### 3.2.3.4. Existência de RRAE prévia ao tratamento ortodôntico

Vários autores são unânimes quanto ao facto de existir elevada correlação entre o número de dentes envolvidos e gravidade de reabsorção radicular presentes no início do TO e a RRAE existente quando o aparelho ortodôntico é removido<sup>12, 16, 17, 22, 173</sup>. Assim, a presença de

reabsorções radiculares prévias ao tratamento poderia indicar um aumento de suscetibilidade individual à reabsorção durante o tratamento.

#### ***3.2.4. Traumatismo dentário***

Os dentes traumatizados apresentam maior tendência para a reabsorção radicular espontânea, não induzida por TO. Esta predisposição está diretamente relacionada com a gravidade do traumatismo do periodonto<sup>12, 159</sup>. A evidência científica de estudos comparativos entre dentes traumatizados e não traumatizados sujeitos a TO, diz-nos que os primeiros são mais suscetíveis à reabsorção radicular, devido a lesões do LP e do cimento<sup>17, 115, 171, 174</sup>.

Segundo Andreasen *et al.*<sup>175</sup> as forças traumáticas comprimem o ligamento periodontal e a RRAE surge como uma sequela do processo de cicatrização, em que o LP é reduzido ou mesmo perdido. A característica biológica dos dentes traumatizados que melhor poderá explicar a sua predisposição para a reabsorção radicular é a lesão da camada de cementoblastos que reveste e protege a raiz. Apesar de tudo, e dados os resultados inconclusivos dos vários estudos epidemiológicos, não está contraindicada a movimentação de dentes traumatizados, desde que haja um bom planeamento com controlo de forças e dos movimentos dentários.

#### ***3.2.5. Maus hábitos orais / Mordida aberta anterior***

A pressão atípica da língua associada a interposição lingual e a mordida aberta anterior que lhe está associada, foram referidos como fatores agravantes da reabsorção radicular<sup>176, 177</sup>. Newman<sup>176</sup> justifica este facto com a função anormal da língua, que exerce uma força crónica e intermitente sobre os dentes anteriores. Linge e Linge<sup>24</sup> verificaram que hábitos como a sucção digital e onicofagia não possuíam uma relação direta com a RRAE, contudo, os mesmos autores, numa investigação posterior<sup>17</sup>, constataram uma correlação entre os maus hábitos de interposição lingual e a RRAE. A ação da pressão atípica da língua sobre as raízes deve ser analisada antes do início do TO, considerando a intensidade e a frequência do hábito. Embora a relação causa-efeito entre maus hábitos orais e aumento de risco de reabsorção ainda não esteja devidamente esclarecida ou comprovada, antes do início do tratamento recomenda-se sempre a eliminação do hábito.

#### ***3.2.6. Severidade e tipo de má oclusão***

Não há evidência científica da existência de correlação entre má oclusão e RRAE induzida pelo tratamento ortodôntico<sup>7</sup>. Contudo, seria expectável que a presença de má oclusão severa fosse um fator de risco por exigir maiores amplitudes de movimento dentário, pelo tipo de

mecânica envolvida<sup>122</sup> e por requerer um tratamento mais prolongado<sup>110</sup>. De facto, num estudo de Kaley e Phillips<sup>146</sup>, verificou-se que pacientes de Classe I com um *overjet* aceitável evidenciaram significativamente menos RRAE do que os pacientes de Classe II ou III.

Os tratamentos que envolvem a extração de pré-molares com o intuito de camuflar discrepâncias esqueléticas ou desarmonias dento-maxilares acentuadas requerem uma grande amplitude de movimentos dentários, o que pode predispor à reabsorção radicular, por se ir além dos limites biológicos<sup>7</sup>.

### **3.2.7. Saúde oral**

Baden<sup>178</sup> verificou que o equilíbrio, entre a resistência e a reparação dos tecidos periapicais pode estar alterado quando os dentes não têm capacidade de suportar forças normais, por terem um periodonto enfraquecido, nomeadamente por doença periodontal ou perda de dentes. Harris *et al.*<sup>179</sup> referem uma forte relação estatística entre a ocorrência de RRAE e estes fatores, concluindo que a perda de estabilidade dos dentes adjacentes, o uso mais acentuado dos dentes remanescentes e a perda de ancoragem óssea radicular, são indicadores significativos de suscetibilidade à RRAE.

### **3.2.8. Condição sistémica do paciente**

Embora a maior ou menor frequência de RRAE durante o tratamento ortodôntico pareça estar associada principalmente a fatores locais<sup>180</sup>, algumas doenças sistémicas têm sido implicadas.

Foi descrito um aumento da incidência de RRAE em doentes com asma, mas apenas relativamente aos molares do maxilar superior<sup>181</sup>, o que poderá dever-se à proximidade destas raízes com o seio maxilar inflamado e à atuação dos mediadores inflamatórios<sup>36</sup>. Alguns estudos clínicos evidenciam um aumento de risco nos pacientes com alergias, mas sem resultados estatisticamente significativos<sup>182</sup>, embora numa amostra de população japonesa se tenha encontrado associação com significado estatístico<sup>183</sup>.

Durante décadas, as endocrinopatias foram referidas como causas de alterações ao nível ósseo e de fenómenos associados ao TO, como a velocidade do movimento dentário e as reabsorções radiculares. A possível relação entre reabsorção radicular e endocrinopatias foi estudada por Francischone *et al.*<sup>180</sup> em amostras de grande dimensão, sem que se tenha confirmado a associação. Embora se pense que a taxa de remodelação óssea influencia o movimento dentário, estudos em modelo animal sugerem que uma taxa de remodelação óssea elevada, como no caso do hipertiroidismo, ou reduzida, como no hipotiroidismo ou hiperparatiroidismo, não influencia a RRAE induzida por TO<sup>184</sup>. Estudos de cementoblastos

também não conseguiram identificar a presença de recetores para mediadores hormonais de remodelação óssea, como a paratormona, nestas células, tornando pouco provável uma correlação com a RRAE<sup>180, 185</sup>.

### 3.2.9. Efeito de certos fármacos

A hipótese de que certos fármacos podem influenciar a reabsorção radicular, estimulando-a ou inibindo-a, ainda não está devidamente comprovada.

Estudos *in vivo* com ratos submetidos a TO mostraram que a administração de corticosteroides em doses altas (15 mg/kg) aumentava a reabsorção radicular, mas que em doses baixas (1 mg/kg) a reduzia<sup>186</sup>. Há relatos em como a administração de prednisolona influencia o movimento dentário em ratos e reduz a reabsorção radicular, por interferir com o metabolismo do ácido hialurónico<sup>187</sup>.

Os efeitos da hormona L-tiroxina, também são controversos. Há estudos em modelos animais a demonstrar que o aumento das doses de L-tiroxina reduz a RRAE e aumenta o movimento dentário<sup>188</sup>. Esta redução de RRAE em humanos também foi relatada, mas estes resultados devem ser interpretados com cautela dado que não há estudos randomizados com pacientes ortodônticos submetidos a administração de L-tiroxina.

Os bifosfonatos são usualmente indicados para a prevenção e tratamento da osteoporose. Os seus efeitos de alteração do metabolismo ósseo, são ainda desconhecidos no paciente ortodôntico<sup>189, 190</sup>. Estudos em ratos parecem relacionar a inibição da reabsorção óssea induzida pelos bifosfonatos com a inibição da reabsorção radicular, dependendo da dosagem utilizada<sup>191</sup>. No entanto, também tem sido demonstrado que este fármaco produz alterações da superfície do cemento, inibindo a formação de cemento acelular e aumentando a vulnerabilidade da raiz para a reabsorção<sup>192</sup>. Um estudo recente com mulheres de mais de 50 anos sujeitas a esta medicação, revelou a existência de RRAE moderada nos dentes maxilares anteriores, pelo que foi recomendado o uso de forças leves nestes pacientes, por forma a minorar estes efeitos<sup>189</sup>.

A administração de anti-inflamatórios não-esteroides limita o movimento dentário, provavelmente por inibição da síntese de prostaglandinas e consequente redução da reabsorção óssea<sup>193</sup>.

Os metabólitos da vitamina D têm a função de controlar a absorção intestinal de cálcio e fosfato. Relativamente ao seu possível uso no controle da movimentação dentária induzida, Collins e Sinclair<sup>194</sup> demonstraram que a administração tópica de 1,25-diidroxicalciferol aumenta o grau do movimento, sem efeitos colaterais aparentes. Contudo, a utilização da vitamina D na Ortodontia clínica ainda necessita de estudos mais aprofundados, de forma a determinar a

dosagem correta, a frequência das administrações e, principalmente, os possíveis efeitos colaterais locais e sistêmicos que podem decorrer da sua utilização a longo prazo.

Há autores<sup>193</sup> a referirem que os estrogénios diminuem a taxa de movimentação ortodôntica e que pacientes a tomarem contraceptivos orais ou a fazerem terapêutica hormonal de substituição poderão ter diminuição do índice de reabsorção óssea. Outros trabalhos<sup>195, 196</sup> citados por RAMOS<sup>197</sup> referem que a exposição a contraceptivos orais, bem como o estado de gravidez, não interferem com o movimento ortodôntico, nem com o processo de reabsorção radicular.

Para um fármaco ser capaz de interferir na taxa de remodelação óssea dos maxilares, deve ter um efeito muito específico para esta região ou a sua aplicação deve ser local. Além disso, a dosagem deve ser alta e o período de ação muito prolongado<sup>198</sup>. Os analgésicos e os anti-inflamatórios, apesar de exercerem efeito sobre certos mediadores locais da remodelação óssea, se forem administrados em pequenas doses e por curtos períodos de tempo não interferem significativamente na velocidade da movimentação dentária. Os corticosteroides podem levar à osteoporose, se administrados por períodos longos e em doses elevadas, mas nos maxilares, isto só acontecerá numa fase muito avançada da doença. Nos trabalhos experimentais, de modelo animal, que têm vindo a ser realizados para detetar o efeito dos medicamentos sobre os tecidos, as doses utilizadas são elevadas e os períodos de exposição muito longos, uma vez que estes animais têm um tempo de vida curto. Desta forma, ainda não há garantias sobre qualquer alteração no movimento dentário causada por algum tipo de medicamento que o paciente tenha tomado durante o tratamento ortodôntico.

É relevante recordar que a maioria dos pacientes submetidos a tratamento ortodôntico são adolescentes e jovens saudáveis, e que as situações de doenças concomitantes ou de medicação sistémica com possível efeito ao nível das estruturas envolvidas na RRAE são verdadeiras exceções.

### 3.3. Suscetibilidade genética

#### 3.3.1. Polimorfismos do DNA

Os estudos recentes de sequenciação do genoma humano permitiram identificar a existência de milhões de variações entre os indivíduos da população saudável, denominados polimorfismos. Estas variantes genéticas são frequentes e geralmente apresentam uma frequência alélica superior a 1%. A sua caracterização e localização no genoma têm contribuído de forma significativa para a investigação médica, permitindo identificar diferenças na suscetibilidade genética dos indivíduos para múltiplas doenças.

Os polimorfismos do DNA são habitualmente classificados como *Restriction Fragment Length Polymorphism* (polimorfismos em comprimento de fragmentos de restrição ou RFLPs), *Variable Number Tandem Repeats* (polimorfismos de número variável de repetições em tandem ou VNTR), *Single Nucleotide Polymorphisms* (polimorfismos de nucleótido único ou SNPs) e *Copy Number Variations* (variações do número de cópias ou CNVs).

Os SNPs são variações que consistem na substituição de um único nucleótido por outro<sup>199</sup>. Estão contabilizados em mais de dez milhões ao longo de todo o genoma, localizam-se tanto em regiões codificantes como em regiões não codificantes e são a principal causa da variação fenotípica entre humanos. A sua enorme densidade confere-lhes um grande potencial na identificação de genes de suscetibilidade a doenças multifatoriais. As novas tecnologias de *arrays* permitem a caracterização simultânea de milhares de SNPs e vieram revolucionar o estudo destas doenças<sup>200</sup>. Os RFLPs são variantes de SNPs que se localizam em sequências reconhecidas por enzimas que digerem a dupla cadeia de DNA, as endonucleases de restrição, pelo que podem ser identificados recorrendo a estas enzimas.

Os VNTRs, consistem na variação do número de repetições de motivos dispostos sequencialmente, em tandem, e, dependendo da sua extensão, classificam-se em satélites, minissatélites e microssatélites ou STRs (de *Short Tandem Repeats*)<sup>200, 201</sup>. Os alelos diferem no número de repetições do motivo. De ampla distribuição pelo genoma, são mais frequentes em regiões não codificantes. Muito variáveis, são o tipo de polimorfismo utilizado em Medicina Forense, sendo também frequentemente utilizados como marcadores genéticos.

Os CNVs consistem em variações genómicas estruturais quantitativas (deleção, duplicação/amplificação) compostas por segmentos longos de DNA que variam de 1 kilobase (kb) até várias megabases (Mb), englobando um ou vários genes e regiões não codificantes. São as variantes genéticas mais recentemente descobertas, com elevado potencial no estudo de fenótipos complexos<sup>202, 203</sup>.

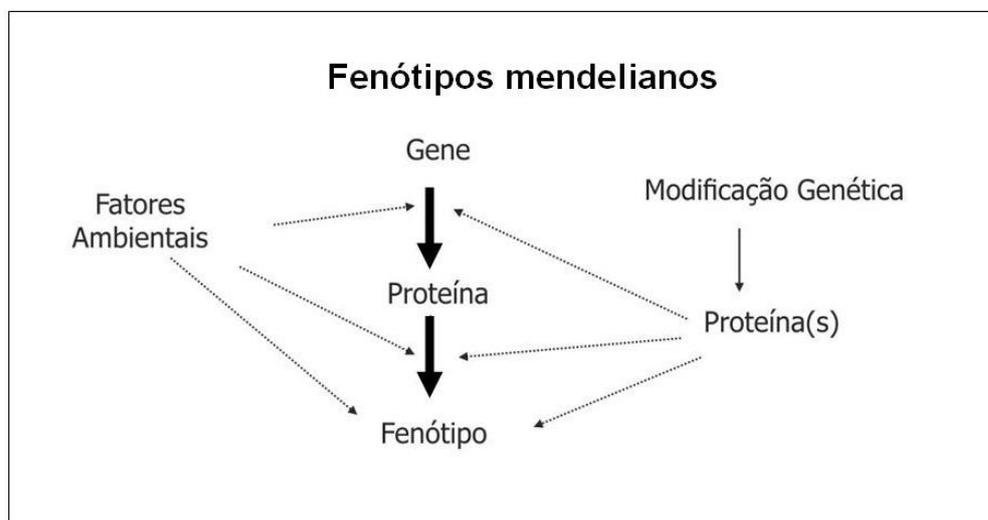
Os polimorfismos que interferem com a expressão génica podem ter consequências fenotípicas. Estes polimorfismos podem estar presentes nas regiões codificantes e originar substituição de aminoácidos (variações *missense*) com consequente alteração nas propriedades e função das proteínas, ou localizar-se em regiões reguladoras (região promotora, 5' UTR e 3' UTR) e interferir com a taxa de transcrição e com a quantidade de proteína sintetizada. Podem ainda interferir com o *splicing*, e, por exemplo, originar a síntese de isoformas de proteínas, ou alterar a estabilidade do RNA e, conseqüentemente, diminuir a síntese proteica<sup>202, 204</sup>.

Alguns polimorfismos não interferem com a expressão génica, como acontece com a maioria dos que se localizam em regiões não codificantes ou que originam variações sinónimas (sem variação do aminoácido). Estes polimorfismos, não funcionais, são os utilizados em Medicina Forense e podem ser muito úteis para estudos de genética clínica e na investigação ao

funcionarem como marcadores. Eles são marcadores porque sendo de localização bem conhecida, “marcam” posições no genoma e podem assinalar a presença de genes próximos, associados a doenças, com os quais co-segregam. Esta característica dos polimorfismos é explorada nos estudos de identificação dos genes de suscetibilidade aos fenótipos genéticos.

### 3.3.2. Fenótipos complexos

O fenótipo, entendido como toda a característica ou fenômeno passível de ser identificado e avaliado, é determinado pela interação de fatores genéticos e ambientais. As variantes genéticas designadas por mutações, responsáveis pelas doenças monogênicas, são raras na população e caracterizam-se por constituírem genótipos de elevada penetrância, ou seja, com uma probabilidade de manifestação da doença geralmente superior a 60% (quase sempre superior a 80%). Mas mesmo nestas doenças hereditárias, de transmissão mendeliana, fenômenos como a penetrância incompleta ou a expressividade variável só se explicam pela coexistência de genes modificadores e pela influência de fatores externos ao doente, a maioria ainda desconhecidos (Fig.1.8).



**Figura 1.8.** Fatores que determinam os fenótipos mendelianos, ditos “monogênicos”. Adaptado de Abass et al.<sup>205</sup>

Mais frequentes na população, são os fenótipos e doenças genéticas complexas ou multifatoriais, determinadas pela interação de fatores ambientais com dezenas a centenas de variantes genéticas, sendo por isso poligênicas (Fig. 1.9). Estas variantes genéticas associadas aos fenótipos complexos são os polimorfismos e por si só não causam doença, embora cada uma, individualmente, possa contribuir para um pequeno aumento ou redução da suscetibilidade ao fenótipo, sendo por isso consideradas variantes de baixa penetrância. São deste tipo, doenças

como a diabetes *mellitus* não insulino-dependente, a maioria dos câncros, a periodontite, as fendas não síndromicas do lábio e palato, a cárie dentária ou a RRAE. Dada a impossibilidade de reprodução das condições ambientais e da transmissão de um perfil genético complexo, as doenças multifatoriais ou complexas, embora apresentem agregação familiar, têm um baixo risco de recorrência e de transmissão.

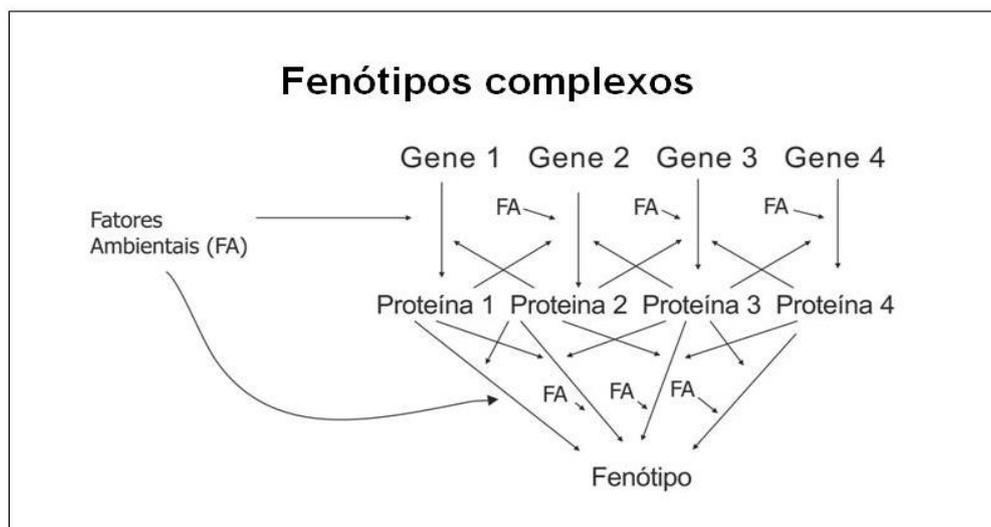


Figura 1.9. Fatores que determinam os fenótipos complexos ou multifatoriais. Adaptado de Abass *et al.*<sup>205</sup>

A quantificação da contribuição genética para os fenótipos complexos é dada pelo conceito de herdabilidade, que avalia a proporção da variabilidade fenotípica atribuível à variabilidade genética da população. A herdabilidade é específica de uma população e varia inversamente com a variabilidade dos fatores ambientais. Por exemplo, na RRAE, a herdabilidade pode aumentar se todos os especialistas adotarem o mesmo protocolo terapêutico. Um dos métodos para avaliar a herdabilidade, é através do estudo da concordância entre gêmeos monozigóticos e dizigóticos. Nas doenças monogênicas, a concordância entre gêmeos monozigóticos é de 100% e dos dizigóticos de 50%, e a herdabilidade é próxima de 100%. Nos fenótipos complexos, a herdabilidade varia de 30% para o cancro da mama a cerca de 70% para as anomalias do espectro do autismo<sup>206</sup>. As previsões de herdabilidade só são aplicáveis a populações e não a indivíduos.

De entre os diversos estudos de identificação dos fatores de risco para a RRAE associada a tratamento ortodôntico, tem-se concluído que os fatores classicamente avaliados, biológicos e relacionados com o tratamento, apenas explicam cerca de 25% da variação deste fenótipo<sup>34, 35</sup>. Vários foram os autores que propuseram a influência da genética na ocorrência da RRAE induzida pelo movimento ortodôntico. Alguns referem que quando essa suscetibilidade

individual existe, a reabsorção radicular pode ocorrer mesmo na ausência de outros fatores etiológicos<sup>122</sup>. Newman<sup>167</sup>, foi o primeiro a propor a existência de agregação familiar para a RRAE, contudo, depois dele, vários autores têm vindo a debater este tema<sup>16, 61, 122, 207</sup>. Ngan *et al.*<sup>207</sup> confirmaram a existência de uma componente genética na RRAE num estudo retrospectivo de gémeos, tendo encontrado índices de concordância para gémeos monozigóticos de aproximadamente o dobro dos encontrados nos gémeos dizigóticos. Como era de esperar, a concordância dos gémeos monozigóticos foi inferior a 100%, confirmando a importância dos fatores ambientais na RRAE.

A análise de trios, pais e filho, ou pares de irmãos, também tem sido utilizada. Harris *et al.*<sup>122</sup> realizaram um estudo sobre o componente genético da RRAE no qual avaliaram exames radiográficos de pré e pós tratamento de 103 pares de irmãos, tendo verificado a existência de uma herdabilidade elevada de cerca de 70% para as raízes dos incisivos maxilares e dos primeiros molares mandibulares, mas insignificante para os incisivos mandibulares, o que explicaram pela escassa variação obtida no comprimento destas raízes. Além disso, constataram uma variação na reabsorção radicular muito mais significativa entre famílias do que entre os irmãos da mesma família. Este dado pode ser muito importante no planeamento do TO de um paciente cujo irmão tenha sofrido RRAE significativa. Este trabalho foi o primeiro a quantificar a contribuição genética para a RRAE e foi confirmado mais tarde por Hartsfield *et al.*<sup>16</sup> que obtiveram resultados semelhantes.

Na tentativa de melhorar a capacidade de prever a sua ocorrência, nos últimos anos a investigação tem sido particularmente dirigida para a identificação das variantes genéticas de suscetibilidade à RRAE.

### ***3.3.3. Estudos de associação***

Para a identificação dos genes de suscetibilidade aos fenótipos de etiologia genética, a estratégia a adotar depende da penetrância das variantes genéticas envolvidas. Para variantes de elevada penetrância, com um modo de transmissão mendeliano, utilizam-se estudos de ligação, recorrendo a marcadores genéticos polimórficos. Em famílias afetadas, procuram identificar-se os polimorfismos que co-segrem com a doença ao longo das gerações. Estes polimorfismos funcionam como marcadores, identificando a posição do gene que verdadeiramente está envolvido no fenótipo, tomando possível a sua posterior caracterização. São necessárias famílias extensas, com vários elementos doentes.

Os estudos de ligação têm pouco poder estatístico para detetar variantes de baixa ou moderada penetrância como os polimorfismos associados a fenótipos complexos, com um baixo risco de transmissão, e para os quais os agregados familiares têm um escasso número de doentes.

Nestes casos, a abordagem que se tem revelado mais eficaz consiste em estudos de associação em populações.

Os estudos de associação consistem na comparação da frequência de uma variante específica entre casos e controlos. As variantes mais frequentes nos doentes assinalam genes de suscetibilidade. Na metodologia do gene candidato, selecionam-se genes funcionalmente relacionados com a etiopatogenia da doença, ou posicionados num *locus* previamente relacionado com a doença através de estudos de ligação<sup>202, 204</sup>. Avanços tecnológicos recentes, com o recurso aos *microarrays*, permitiram a análise simultânea de centenas a milhares de SNPs por indivíduo<sup>208</sup>. Nestes estudos, as variantes genéticas não são selecionadas pela sua hipotética relação funcional com o fenótipo e podem estar localizadas em regiões não codificantes, pretendendo-se sobretudo uma cobertura global do genoma (*Genome-Wide Association studies*, ou GWA). Os GWAs têm custos muito avultados e exigem amostras de populações na ordem das centenas a milhares de indivíduos. Têm a vantagem de identificar novas e imprevistas associações, mas a verdade é que os resultados nem sempre são reproduzidos, os marcadores identificados são de baixa penetrância e até ao presente sem utilidade clínica evidente<sup>203</sup>.

Com o Projeto do Genoma Humano, que foi concluído em 2003 e o *International HapMap Project* (2005), os investigadores têm, atualmente, novas ferramentas para a identificar as variantes genéticas de suscetibilidade para as doenças comuns.

### 3.4. Genes de suscetibilidade para a reabsorção radicular

Como já foi referido, a investigação sobre a suscetibilidade genética para a RRAE tem-se baseado na estratégia de genes candidatos, muito provavelmente devido às exigências metodológicas dos estudos de tipo GWA, que requerem amostras de enormes dimensões e critérios de diagnóstico precisos, duas condições difíceis de concretizar no estudo da RRAE.

Os genes candidatos até agora estudados, codificam proteínas relacionadas com a remodelação óssea e da raiz dentária e/ou com funções imuno-inflamatórias (Tabela 1.2). Os genes do grupo da IL1, a IL1A e a IL1B, são os mais referenciados.

Para este trabalho estudámos polimorfismos de 4 genes candidatos, o gene *IL1B*, o gene *TNFRSF11B*, o gene *TNFRSF11A* e o gene *P2RX7*, pelo claro envolvimento das proteínas por eles codificadas na remodelação dos tecidos ósseos e da raiz do dente (Tabela 1.3). Estes genes já foram igualmente associados a suscetibilidade à periodontite, a alterações do metabolismo ósseo, e alguns deles a RRAE. Os polimorfismos foram selecionados pela sua frequência (superior a 5%), pelo seu potencial papel funcional na expressão génica, e, no caso do SNP da IL1B, também por ser um marcador amplamente referenciado na literatura.

Tabela 1.2. Genes e polimorfismos investigados como fatores de suscetibilidade à RRAE

Gene* e polimorfismo	Estudo	Rx	Resultados	Ref.
<i>IL1B</i> (rs1143634)	35 famílias americanas caucasianas (n = 118)	P e C	Evidência de DL com a RRAE, nos incisivos centrais maxilares	Al-Qawasmi 2003 <sup>61</sup>
<i>TNSALP</i> <i>TNF</i> <i>TNFRSF11A</i>	38 famílias americanas caucasianas (n = 124)	P e C	Evidência de DL entre o STR próximo do gene <i>TNFRSF11A</i> e a RRAE, nos incisivos centrais maxilares	Al-Qawasmi 2003 <sup>209</sup>
<i>IL1B</i> (rs1143634)	61 brasileiros	Per	Associação significativa	Bastos L 2009 <sup>26</sup>
<i>IL1A</i> (rs1800587) <i>IL1B</i> (rs1143634)	49 alemães	P	Associação apenas para o SNP do gene <i>IL1A</i>	Gülden N 2009 <sup>30</sup>
<i>IL1B</i> (rs1143634)	54 japoneses	P e C	Sem associação	Tomoyasu Y 2009 <sup>210</sup>
<i>IL1A</i> (rs1800587) <i>IL1B</i> (rs1143634)	93 espanhóis caucasianos Em dentes endodonciados	P e C	Associação apenas para o SNP do gene <i>IL1B</i>	Iglesias-Linares 2012 <sup>31</sup>
<i>IL1A</i> (rs1800587) <i>IL1B</i> (rs1143634) <i>IL1RN</i> (rs419598)	106 República Checa	P e C	Associação apenas para o SNP do gene <i>IL1RN</i> , especialmente no sexo feminino	Linhartova P 2013 <sup>28</sup>
<i>IL1A</i> (rs1800587) <i>IL1B</i> (rs1143634) <i>IL1RN</i> (rs419598)	54 espanhóis caucasianos	P e C	Associação apenas para os SNPs da <i>IL1B</i> e da <i>IL1RN</i>	Iglesias-Linares 2012 <sup>27</sup>
<i>VDR</i> (rs731236)	377 brasileiros	Per	Associação significativa	Fontana 2012 <sup>211</sup>

Referências: C- Radiografia cefalométrica; P- Radiografia panorâmica; Per- Radiografia periapical; DL- Desequilíbrio de ligação; *IL1B*- gene da interleucina 1 beta; *TNSALP*- gene da fosfatase alcalina não específica de tecido; *TNF*- gene do fator de necrose tumoral alfa; *TNFRSF11A*- recetor ativador do NF-KAPPA-B; *IL1A*- gene da interleucina 1 alfa; *IL1RN*- gene do antagonista da interleucina 1; *VDR*- gene do recetor da vitamina D; \* De acordo com a *Hugo Gene Nomenclature Committee* (OMIM: www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/)

Tabela 1.3. Genes e SNPs estudados

Gene <sup>1</sup> /proteína	Refer SNP <sup>2</sup> /Nome com	Localização no genoma <sup>2</sup>	Consequência funcional
<i>TNFRSF11B</i> /OPG	rs3102735 /163A>G	<i>NG_012202.1:g.4314A&gt;G</i> <i>NM_002546.3:c.1010A&gt;G</i> Região reguladora 8q24.12	Variante da região reguladora com possível interferência quantitativa na expressão gênica
<i>TNFRSF11A</i> /RANK	rs1805034 /575C>T	<i>NG_008098.1:g.39694C&gt;T</i> <i>NM_003839.2:c.575C&gt;T</i> Exão 6 18q21.33	Variante <i>missense</i> (p.Val192Ala) com possível interferência na função da proteína
<i>IL1B</i> /IL1B	rs1143634 /3954C>T	<i>NG_008851.1:g.8967C&gt;T</i> <i>NM_000576.2:c.315C&gt;T</i> Exão 5 2q13	Variante sinónima (p.Phe105Phe) com possível interferência quantitativa na expressão gênica ou com função de marcador
<i>P2RX7</i> /P2RX7	rs1718119	<i>NG_011471.2:g.49426G&gt;A</i> <i>NM_002562.5:c.1042G&gt;A</i> Exão 11 12q24.31	Variante <i>missense</i> (p.Ala348Thr) com ganho de função

1 – De acordo com a Hugo Gene Nomenclature Committee (OMIM: [www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/)); SNP – Single Nucleotide Polymorphism; 2 - De acordo com a base de dados SNP ([www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/)); Nome com- nome comum; OPG – Osteoprotegerina; RANK- Recetor Ativador do NF-KAPPA-B; IL1B – Interleucina 1 Beta; P2RX7 - Recetor Purinérgico P2X, Canal Iónico de abertura dependente de ligando, 7.

### 3.4.1. Polimorfismo rs1143634 do gene *IL1B*

O gene *IL1B* é constituído por 430 kb e a sua expressão é regulada ao nível da transcrição e pós-transcrição. Um dos seus múltiplos polimorfismos, o SNP rs1143634, ou 3954C>T, foi o primeiro a ser identificado como um fator de suscetibilidade para RRAE em 2003, por Al-Qawasmi *et al.*<sup>61</sup>. Neste trabalho pioneiro, os pacientes homocigotos para o alelo com citosina (C, também designado de alelo 1) apresentaram um risco de desenvolver RRAE (definida para valores superiores a 2 mm) cerca de 5,6 vezes superior relativamente aos restantes pacientes (heterocigotos ou homocigotos para o alelo com timina, T). O polimorfismo explicava 15% da variação da RRAE nos incisivos centrais maxilares.

O SNP rs1143634 localiza-se no exão 5, codão 105, e embora seja uma variante sinónima, (p.Phe105Phe; não alterando o aminoácido fenilalanina da posição 105), tem-lhe sido atribuído um papel funcional na expressão gênica. Estudos *in vitro* com monócitos humanos evidenciaram que a homocigotia para a variante T se associava a níveis de IL1B 4 vezes superiores, e a heterocigotia a níveis 2 vezes superiores, relativamente à homocigotia para o alelo C<sup>212</sup>. O

mesmo foi confirmado com doseamentos da IL1B no líquido crevicular de pacientes submetidos a tratamento ortodôntico<sup>213</sup>.

Estes resultados sugeriram que o alelo C seria um fator de risco para RRAE porque, ao reduzir a produção de IL1B, impediria a remodelação do osso alveolar, favorecendo, assim, a pressão e stresse prolongados exercidos sobre a raiz dentária<sup>61</sup> (Fig 1.10). Estudos com modelos de ratos *knock-out* para o gene *IL1B* submetidos a forças ortodônticas parecem confirmar esta hipótese, uma vez que os animais que não expressavam a citocina apresentaram níveis mais elevados de RRAE<sup>81</sup>. Contudo, há resultados discordantes: em ensaios *in vitro*, o aumento da produção da IL1B pelo alelo T não foi confirmado por alguns autores<sup>214, 215</sup> e num estudo em que se comparou a produção da interleucina por monócitos de doentes submetidos a TO, não se encontraram diferenças significativas nos níveis de IL1B entre pacientes com e sem RRAE<sup>216</sup>.

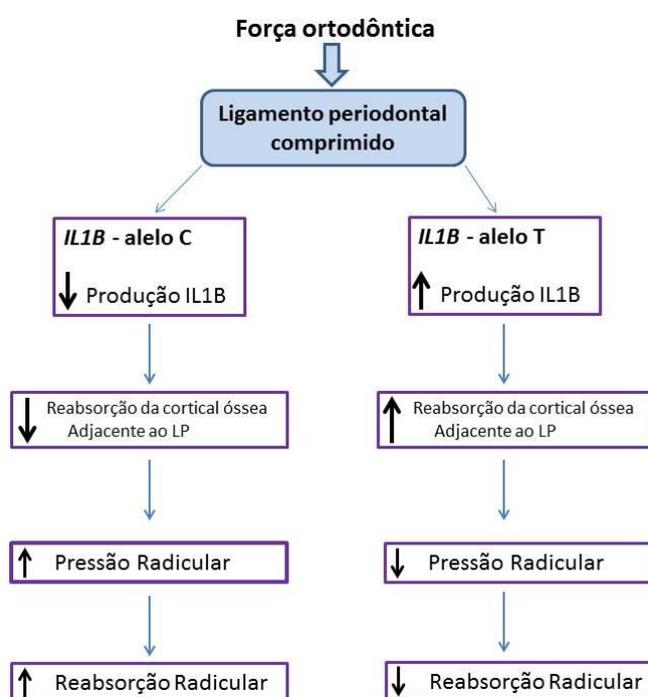


Figura 1.10. Modelo proposto para a interferência do SNP rs1143634 do gene da IL1B na RRAE.

A associação entre a variante C deste polimorfismo e a RRAE tem sido frequentemente descrita em populações geograficamente distintas como as do Brasil, EUA ou Espanha<sup>26, 27, 61</sup>, embora com pequenas diferenças nos resultados. Na amostra brasileira<sup>26</sup>, os pacientes com alelo C, homo e heterozigotos, apresentaram um aumento de suscetibilidade para RRAE com um *odd ratio* (OR) de 4 comparativamente aos doentes com genótipo TT, enquanto na amostra de Espanha<sup>27</sup> se verificou que o genótipo CC era o de risco, com um *odd ratio* de 3,477 quando comparado aos genótipos CT e TT. No entanto, alguns estudos clínicos não confirmaram esta associação<sup>28, 30, 210</sup> e outros identificaram o outro alelo, T, como sendo o de maior risco. Foi o caso

de Iglesias *et al.*<sup>31</sup> que, ao avaliarem a ocorrência de RRAE em dentes endodonciados, encontraram um aumento de predisposição genética para os homozigotos para o alelo T (OR = 11.59), quando comparados com os homozigotos ou os heterozigotos para o alelo C ( $p = 0.006$ ). Curiosamente, os mesmos autores, num outro estudo com dentes vitais, tinham verificado uma associação quer com o alelo C quer com um outro polimorfismo do gene *IL1RN*.

O estudo de Bastos e Lages<sup>26</sup> tem a particularidade de ter recorrido a radiografias periapicais para avaliar a RRAE, embora com uma amostra reduzida, de apenas 61 indivíduos.

### 3.4.2. Polimorfismo rs1805034 do gene *TNFRSF11A*

Como anteriormente descrito, há múltiplas evidências da importância do sistema RANK/RANKL/OPG no metabolismo ósseo e também na resposta biológica ao TO. Polimorfismos nos genes que codificam estas proteínas têm por isso sido frequentemente estudados em associação a patologia óssea e articular. Os estudos de associação com a RRAE têm sido escassos.

O gene *TNFRSF11A* (membro 11A da superfamília do recetor do fator de necrose tumoral ou ainda recetor ativador do NF-KAPPA-B), localizado em 18q21, codifica a proteína RANK. O SNP rs1805034, ou 575C>T, localiza-se no exão 6 e é uma variação *missense*, levando à substituição do aminoácido valina pela alanina na posição 192 da proteína (p.Val192Ala), o que poderá alterar qualitativamente a função da proteína. Este SNP foi anteriormente estudado em relação com a necrose assética após artroplastia<sup>217</sup>, a artrite reumatoide<sup>218</sup> e a doença de Paget do osso esporádica<sup>91</sup>. Vários outros polimorfismos deste gene têm sido associados às mesmas e a outras patologias osteoarticulares<sup>219</sup>.

Um dos raros estudos genéticos sobre o papel do gene *TNFRSF11A* na suscetibilidade à RRAE, consistiu num estudo de ligação com pares de irmãos<sup>209</sup> onde foi identificada uma associação entre o marcador microssatélite D18S64, fortemente ligado ao gene *TNFRSF11A*, e a RRAE afetando os incisivos centrais superiores, sugerindo o envolvimento deste *locus* ou de outro nas suas proximidades. Nas bases de dados consultadas, não há registo de outros artigos publicados que associem polimorfismos deste gene à suscetibilidade genética para a RRAE.

### 3.4.3. Polimorfismo rs3102735 do gene *TNFRSF11B*

O gene humano da osteoprotegerina (OPG), designado por *TNFRSF11B* (membro 11B da superfamília do recetor do fator de necrose tumoral), está localizado no cromossoma 8 (8q24), tem 29 kb e consiste em cinco exões e 4 intrões. Existem 4 transcritos para o *TNFRSF11B* sendo o 4 o predominante. A maioria dos polimorfismos deste gene localiza-se em

regiões reguladoras, principalmente na região flanqueadora 5', mas também nas junções exão/intrão.

O SNP estudado, o rs3102735, ou -1010A>G (previamente designado por A163G), localiza-se na região reguladora, pelo que poderá influenciar a taxa de transcrição do gene e os níveis de síntese da proteína OPG. Este SNP tem sido associado ao risco de fraturas e baixos índices de densidade óssea<sup>220-222</sup>.

#### ***3.4.4. Polimorfismo rs1718119 do gene P2RX7***

O gene humano *P2RX7* (Recetor Purinérgico P2X, Canal Iónico de abertura pendente de ligando, 7) está localizado no cromossoma 12 (q24.31). Codifica um recetor purinérgico extracelular, com funções de canal iónico, não seletivo, dependente de ATP. Dos muitos polimorfismos descritos neste gene, 11 SNPs não sinónimos têm repercussão na função do recetor. Três variantes com perda de função (p.Glu496Ala, p.Ile568Asn, p.Arg307Gln) e duas com ganho de função (p.His155Tyr e p.Ala348Thr) foram já associadas a vários fenótipos osteoarticulares<sup>101, 104, 223</sup>.

O SNP rs1718119 corresponde à variante *missense* com ganho de função p.Ala348Thr (na posição 348 da proteína, o aminoácido alanina é substituído pelo aminoácido treonina). Localizado no exão 11, consiste na transição G>A, embora na base de dados SNP venha descrito como T>C, por ter sido inicialmente referenciado na cadeia complementar. De acordo com a função pró-osteogénica do P2X7R, a variante com ganho de função, (nucleótido adenina, A, correspondendo ao aminoácido treonina), foi associada a aumento da densidade óssea e diminuição do risco de fraturas<sup>101</sup>.

O recetor P2X7 compreende um volumoso domínio extracelular glicosilado e rico em cisteínas, dois domínios transmembranares (Tm1 e TM2), um curto domínio intracelular correspondendo ao terminal amina (N) e um domínio intracelular de comprimento variável, correspondendo ao terminal carboxílico (C)<sup>102, 224, 225</sup>. A variante p.Ala348Thr está localizada no domínio Tm2. Estudos de mutagénese dirigida sugerem que o resíduo 348 é importante para a função do canal iónico quando este está aberto<sup>226</sup>.

Ensaio *in vitro*, com expressão de sequências recombinantes em monócitos humanos, demonstraram que haplótipos do *P2RX7* com a variante p.Ala348Thr exibiam um ganho de função, dependente da presença desta variante, e induziam um aumento da produção de IL1B<sup>227</sup>.

Até ao momento, não há referências a estudos de populações sobre o papel dos polimorfismos deste gene na suscetibilidade à RRAE.

### 3.4.5. Outros polimorfismos

Para o gene do recetor antagonista da IL1, o *IL1RN*, alguns polimorfismos, de tipo SNP e VNTRs, têm sido ocasionalmente associados a RRAE<sup>27, 32</sup>. O antagonismo funcional entre a proteína IL1RN e a IL1B torna estes estudos relevantes, contudo, as variantes alélicas destes polimorfismos são raras e o seu significado funcional duvidoso, sendo necessários estudos mais conclusivos.

O polimorfismo (rs731236) do gene *VDR* (que codifica o recetor da vitamina D) foi associado ao aumento de expressão da RANKL e a diminuição da expressão da OPG, promovendo a diferenciação osteoclástica. Desta forma, poderá influenciar a suscetibilidade à RRAE, à semelhança do que tem sido descrito para a osteoporose e para a periodontite<sup>211</sup>.

Outro gene candidato é o da fosfatase alcalina não específica aos tecidos, codificada pelo gene *TNSALP*, uma enzima com um papel relevante na mineralização e formação do cimento<sup>228</sup>. Em ratos sem expressão do gene *TNSALP* verificou-se uma redução da formação de cimento acelular nos molares e atraso na erupção dentária<sup>228</sup>.

Estudos prévios implicam o Fator de Necrose Tumoral alfa ( $TNF\alpha$ ) na remodelação óssea *in vitro* e *in vivo*<sup>229</sup>, justificando a sua inclusão como gene candidato para a RRAE. Além disso, há evidências de que os níveis de  $TNF\alpha$  no sulco gengival estão elevados durante o TO<sup>230</sup>. Contudo, num estudo de Al-Qawasmi *et al.*<sup>209</sup> não se evidenciou qualquer associação entre a RRAE e o polimorfismo selecionado deste gene,

Eventualmente, outros polimorfismos de mediadores envolvidos na reabsorção óssea e da raiz dentária poderão vir a ser relacionados com a RRAE, como sejam polimorfismos dos genes da IL-6 e do  $TNF\beta$  entre muitos outros.

## 4 . Diagnóstico imagiológico

Para a identificação de genes de suscetibilidade a fenótipos complexos, a definição de critérios objetivos de diagnóstico é essencial. Na avaliação da dimensão da raiz dos dentes, tal só pode ser conseguido por avaliação imagiológica. A imagiologia aplicada à Medicina Dentária é uma área científica e tecnológica em constante evolução. Técnicas como tomografia computadorizada de feixe cónico (TCFC) permitem, atualmente, a análise detalhada das estruturas dentárias e do periodonto em três dimensões. Contudo, o risco de exposição a radiação ionizante tem restringido as indicações para a sua aplicação clínica e limitado a sua utilização em investigação.

#### 4.1. Ortopantomografia

Em finais dos anos 50, o Dr. Yrjö Veli Paatero experimentou e propôs um método de radiografias panorâmicas para as arcadas dentárias<sup>231, 232</sup>. Foi ele que desenvolveu os fundamentos da radiografia panorâmica a partir dos princípios da tomografia, tendo-a designado de pantomografia, uma contração das palavras panorâmica e tomografia. Esta técnica tomou possível radiografar as superfícies curvas dos maxilares desdobrando-as num só plano. Apresentou ainda a evolução dos processos radiográficos com 3 centros rotacionais, conhecidos por centros ortopantomográficos, que se mantêm até à atualidade. Este exame radiográfico tem vindo a ser designado de múltiplas formas, mas no presente trabalho, iremos adotar o termo ortopantomografia (OPT).

Nesta técnica, o filme e a ampola giram simultaneamente em direções opostas, descrevendo uma elipse, permitindo, recorrendo a um colimador, criar secções de imagens relativas a uma determinada área anatómica, designadas panoramas. As secções das imagens são adicionadas umas às outras formando uma imagem única<sup>231</sup>. Cada secção de imagem é formada tendo como base um único plano, a “área de corte” ou “área focal” (*focal trough*). A “área focal” representa uma zona imaginária de três dimensões com a forma da arcada dentária e de dimensões específicas, utilizada para posicionar os dentes anteriores do paciente<sup>232, 233</sup> (Fig. 1.11). O principal inconveniente desta técnica é que a imagem resultante é uma radiografia seccional produzida pelo movimento do aparelho em que, como em todas as outras formas de tomografia, só as estruturas localizadas dentro da “área de corte” são evidentes na imagem final. Assim, todas as estruturas fora desta área são distorcidas ou eliminadas<sup>232</sup>.

Recorrendo a um feixe de radiação estreito, de origem extra oral, é possível limitar a difusão dos raios X, aumentar o contraste da imagem e diminuir a dose de radiação. Quanto à dimensão vertical da imagem, ela não é afetada pela rotação do feixe no plano horizontal. De realçar que a imagem geométrica resultante desta técnica, mantém as suas proporções<sup>231</sup>.



Figura 1.11. Esquema representativo da Zona focal. Fonte: William S. Moore<sup>233</sup>.

Na clínica ortodôntica, a OPT e a telerradiografia de perfil da face são exames requisitados por rotina e com vasta aplicação clínica, dado que se consideram essenciais para um correto diagnóstico e tratamento ortodôntico. Na realidade, este tipo de exame radiográfico permite uma representação panorâmica do sistema mastigatório, estendendo-se desde a porção inferior das órbitas até ao bordo inferior da mandíbula e incluindo as articulações tempomandibulares e os seios maxilares. Outras vantagens da radiografia panorâmica em ortodontia são a reduzida exposição a radiação, o menor consumo de tempo pelo operador (dado que o posicionamento do paciente é relativamente simples), o menor gasto de tempo de consulta para o paciente e a melhor colaboração do mesmo<sup>232</sup>. Note-se que a dose efetiva de radiação é cerca de um quinto da dose de um *status* periapical completo.

Apesar de este exame apresentar limitações capazes de reduzir a qualidade da imagem radiográfica, algumas delas são contornáveis desde que haja um bom conhecimento da técnica a aplicar. A qualidade da imagem radiográfica final depende essencialmente do correto posicionamento do paciente e da proximidade das estruturas anatómicas requeridas à origem do foco.

Para o posicionamento do paciente há orientações técnicas específicas consensuais. Quanto à proximidade das estruturas anatómicas alvo com a origem do foco, na maioria dos aparelhos comerciais ela é variável, enquanto a distância foco-filme permanece constante. Aliás, a maior desvantagem desta técnica radiográfica passa precisamente pelo facto da proporção da distância foco-objeto com a distância objeto-filme não ser igual em todas as regiões, resultando num fator de ampliação variável<sup>231</sup>. Particularmente nos casos de classes esqueléticas II e III torna-se muito difícil obter uma boa definição da imagem do sector anterior mandibular e maxilar em simultâneo, o que dificulta a obtenção de medições lineares precisas.

Relativamente à possível alteração das dimensões, obtida na OPT, ela ocorre basicamente na dimensão horizontal da imagem. Quanto ao fator de ampliação, ele está estimado em cerca de 20-35%<sup>234</sup>, sendo idêntico nos planos horizontal e vertical, dentro da zona focal. Na dimensão vertical, a ampliação das estruturas fora da zona focal varia muito pouco e em função da profundidade do objeto<sup>235-238</sup>. Na dimensão horizontal, a ampliação fora da zona focal, aumenta consideravelmente com o incremento da distância entre o centro de rotação e a zona focal, no lado do centro de rotação.

Para se obter uma qualidade de diagnóstico máxima, a OPT deve respeitar os seguintes critérios de qualidade: mandíbula em forma de "U", raízes dos dentes anteriores facilmente visíveis com o mínimo de distorção e sem opacidade, simetria dos côndilos e do ramo da mandíbula, ampliação igual em ambos os lados da linha média, plano oclusal com ligeira curva para cima e ainda ausência de objetos metálicos removíveis (Fig. 1.12)<sup>232, 233, 239</sup>.



**Figura 1.12.** Imagens de ortopantomografia: (A) respeitando os critérios de qualidade e (B) sem critérios de qualidade.

#### 4.2. Radiografia Periapical

A radiografia periapical permite uma imagem com mais pormenor e menor distorção, com um fator de ampliação usualmente inferior a 5%<sup>238</sup>. Gher<sup>240</sup> avaliou o comprimento de um implante dentário, comparando as medições obtidas na radiografia periapical e na OPT e verificou

uma precisão de cerca de 0,3 mm para a periapical e de 0,4 a 1,7 mm para a OPT. Contudo, se for efetuada na consulta ortodôntica, a radiografia periapical exigirá várias aquisições radiográficas de forma a abranger toda a dentição, com maior exposição a radiação, e não exclui a necessidade da obrigatória ortopantomografia inicial. Nos casos em que os ápices não são visualizáveis com precisão ou em que existam fatores que indiquem um risco acrescido de RRAE ou perda óssea vertical, as radiografias periapicais estão indicadas, ainda que como exame complementar à OPT<sup>234</sup>

Sameshima e Asgarifar<sup>234</sup> efetuaram um estudo com o intuito de perceberem qual dos 2 tipos de radiografia, periapical ou ortopantomografia, seria mais eficaz na avaliação da forma radicular na fase de pré-tratamento e na quantificação da reabsorção radicular apical externa no pós-tratamento. Tal como outros autores, confirmaram o sobrediagnóstico de RRAE na OPT relativamente à radiografia periapical, mesmo depois de aplicado o fator de correção de ampliação de cerca de 20-35%. Contudo, só nos incisivos inferiores é que essas diferenças foram estatisticamente significativas. Na região maxilar anterior, a zona que apresenta usualmente maior índice de RRAE, as diferenças na avaliação do comprimento das raízes entre os 2 tipos de radiografia foram inferiores a 0,2 mm. Quanto à forma radicular, os resultados deste trabalho indicaram que as radiografias periapicais permitiam a sua visualização de forma mais detalhada.

A maior exatidão das radiografias periapicais na medição da RRAE, conseguida pela técnica de paralelismo, não exclui algumas dificuldades e a sua acuidade já tem sido questionada, devido aos erros provocados pela variação na morfologia dentária<sup>241</sup>.

### 4.3. Novas técnicas de imagiologia

A tomografia computadorizada de feixe cónico (TCFC) é um método imagiológico que permite a obtenção de imagens tridimensionais das estruturas da região maxilo-facial. Quando comparada com a tomografia computadorizada convencional, o uso da tecnologia TCFC tem vantagens importantes na prática clínica, como a redução significativa da dose de radiação<sup>242, 243</sup> a obtenção de uma imagem espacial de elevada resolução, o menor tempo de exposição, o menor número de artefactos e a análise em tempo real<sup>244</sup>. Vários estudos têm comprovado que, graças ao recurso a um voxel isotrópico, a TCFC consegue obter grande precisão nas medidas lineares<sup>245-247</sup>.

Por tudo isto, esta técnica tem ganho popularidade em várias áreas da Medicina Dentária, incluindo a ortodontia. Contudo, a TCFC não está indicada como exame de rotina no paciente ortodôntico dado o acréscimo considerável de dosagem de radiação comparativamente às radiografias convencionais em 2D<sup>248-250</sup>. As doses de radiação da TCFC são 3 a 7 vezes maiores do que as da OPT e 40% inferiores às da convencional tomografia computadorizada<sup>251</sup>. A Academia

Americana de Radiologia Oral e Maxilo-facial desenvolveu algumas diretrizes para a prática clínica, das quais se destacam as seguintes: 1) os benefícios provenientes da utilização da TCFC no diagnóstico e/ou tratamento devem superar os potenciais riscos associados à exposição da radiação; 2) a utilização da TCFC deve ser restrita a situações em que uma dúvida clínica não consiga ser respondida por métodos convencionais clínicos não radiográficos ou métodos radiográficos com menor dose de radiação; 3) evitar pedir uma TCFC unicamente para a obtenção de telerradiografia e/ou ortopantomografia; 4) evitar tirar radiografias convencionais em 2D se o exame clínico indicar que um estudo através de TCFC é o mais adequado<sup>243</sup>.

Atualmente, na área da ortodontia, uma das indicações para a TCFC é a avaliação da reabsorção radicular. O clínico deve decidir em consciência e com base nas diretrizes mais atuais. Dudic *et al.*<sup>252</sup>, em 2009, compararam a capacidade de detecção da RRAE associada ao tratamento ortodôntico por meio de OPT e de TCFC num estudo de 22 doentes, onde avaliaram todos os dentes. Verificaram que 33,5% e 49% dos dentes sofreram reabsorção moderada quando avaliados através de OPT e TCFC, respetivamente. Concluíram que a RRAE é subestimada quando avaliada por OPT e que a TCFC pode ser um método de diagnóstico complementar útil à radiografia convencional, para ser aplicado quando é necessário decidir sobre a modificação ou continuação do TO devido à ocorrência de RRAE.

Recentemente, Ren *et al.*<sup>253</sup> compararam a precisão da TCFC e da radiografia periapical para detecção de RRAE, em modelos de dentes isolados, tendo obtido valores de sensibilidade e especificidade de 75,8% e 96,3% para a TCFC e de 67,5% e 82,5% para a periapical. Os autores referem que a radiografia periapical quando usada como elemento de diagnóstico da RRAE, tende a subestimá-la.

Estes resultados não deixam de ser confusos quando analisados globalmente com os estudos anteriores, segundo os quais a OPT sobrestimava a incidência de RRAE quando comparada com a periapical<sup>234</sup>, sugerindo a necessidade de estudos randomizados com amostras de maior dimensão.

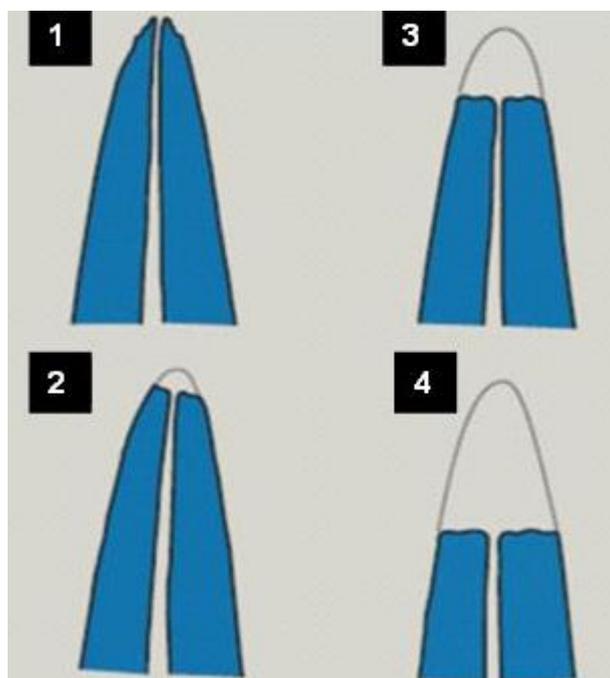
#### 4.4. Medição da RRAE em radiografias

Com base em trabalhos prévios de Al-Qawasmi *et al.*<sup>61, 209</sup>, a maioria dos autores tem considerado como valor corte (*cut-off*) para a significância clínica de RRAE o valor de 2 mm, dividindo os indivíduos em grupo controlo, se RRAE < a 2mm, e doentes, se RRAE ≥ 2mm. Este valor provavelmente resultou dos estudos iniciais<sup>24</sup> onde se encontrou um encurtamento médio da raiz de 1,34 mm nos pacientes submetidos a TO. Dadas as limitações das medições efetuadas

a partir das OPT, o valor terá sido arredondado para 2 mm<sup>26</sup>. O facto é que não existe evidência científica do valor clínico deste valor.

Relativamente ao grau de severidade da reabsorção, a classificação de Levander e Malmgren, de 1988<sup>22</sup>, é das mais referenciadas. Estes autores avaliaram radiograficamente a reabsorção radicular durante o TO e estabeleceram uma classificação com quatro níveis (Fig. I.13). Outros autores também propuseram classificações para a reabsorção radicular por níveis, mas nunca tiveram grande aceitação<sup>11, 34, 162, 254, 255</sup>.

Na investigação ortodôntica, para avaliar e quantificar a RRAE, os autores têm recorrido às mais diversas metodologias, desde as escalas ordinais, como as de Levander e Malmgren, a calibradores manuais digitais, a softwares específicos e imagem digital, a microscopia ótica ou eletrónica e, mais recentemente, a tecnologias de imagem 3D (TCFC).



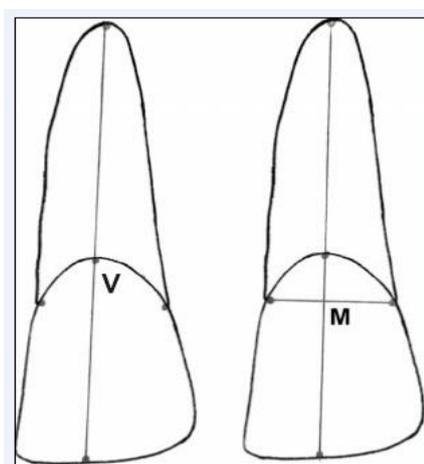
**Figura I.13.** Classificação dos níveis de reabsorção radicular durante o tratamento ortodôntico, sugerida por Levander e Malmgren<sup>22</sup>.

1- Reabsorção mínima (contorno apical irregular); 2- Reabsorção moderada ( $\leq 2\text{mm}$ ); 3- Reabsorção severa ( $> 2\text{mm} < 1/3$  da raiz); 4- Reabsorção extrema ( $> 1/3$  da raiz).

No entanto, na maioria dos trabalhos sobre os fatores de suscetibilidade à RRAE, os autores caracterizam a RRAE de forma quantitativa a partir de radiografias cefalométricas<sup>10, 27, 28, 61, 116, 122, 209, 210, 256-260</sup>, ortopantomografias<sup>27, 28, 30-32, 61, 111, 113, 122, 209, 210, 261</sup> ou ainda radiografias periapicais<sup>26, 115, 117, 211, 262</sup>.

Para contornar a imprecisão das medições do comprimento da raiz, alguns, raros, autores, preferem avaliar a proporção coroa/raiz<sup>30</sup>, método igualmente adotado neste trabalho.

A identificação da junção amelo-cementária na radiografia é crucial para a correta medição da raiz dentária. Brezniak *et al.*<sup>263</sup> para calcularem as alterações no comprimento radicular em duas radiografias diferentes, definiram 2 pontos de junção amelo-cementária: a vestibular, que é o ponto mais apical, no lado vestibular da coroa, e a mediana, o ponto médio da linha que une os pontos da junção amelo-cementária mesial e distal (Figura 1.14). Segundo estes autores, as variações na angulação entre o dente e o filme interferem com as medições dos comprimentos do dente e da raiz na radiografia e a medição através da simples subtração do comprimento radicular na radiografia inicial, pré-tratamento (T1), e radiografia final, pós-tratamento (T2), pode conduzir a resultados de alongamento ou encurtamento, em função da direção das angulações. Este erro deve ser corrigido recorrendo a fórmulas específicas<sup>14, 17, 68, 110, 131, 164, 263</sup>.



**Figura 1.14.** Pontos de referência para avaliação de RRAE. **V**- Junção amelo-cementária vestibular; **M** - Junção amelo-cementária mediana.

Fonte: Brezniak *et al.*<sup>263</sup>

Na fórmula inicialmente proposta por Linge e Linge<sup>17</sup>, considerando que durante o TO o comprimento da coroa permanece inalterado, a razão entre o comprimento inicial da coroa (C1) e o comprimento final da coroa (C2), determina o fator de ampliação da radiografia. O valor do comprimento final da raiz (R2) deve ser corrigido multiplicando pelo fator de ampliação (C1/C2).

Uma outra fórmula, a de McFadden<sup>110</sup>, efetua correções para o comprimento da raiz das duas radiografias, inicial (R1) e final (R2), recorrendo a um fator Cx obtido a partir da medição das coroas, sendo  $Cx = (C1 + C2) / 2$ . Assim, R1 ajustada =  $R1 (Cx / C1)$  e R2 ajustada =  $R2 (Cx / C2)$ .

Para Brezniak *et al.*<sup>263</sup>, que testaram as duas fórmulas, o melhor método para calcular o encurtamento da raiz é o de Linge e Linge<sup>17</sup>, defendendo a escolha da junção amelo-cementária mediana como ponto de referência dentário no cálculo do comprimento radicular.

Dada a dificuldade de visualização precisa da junção amelo-cementária em qualquer tipo de radiografia, mas particularmente nas OPT, poder-se-ia avaliar a RRAE medindo o comprimento

total do dente. Contudo, os diversos autores que estudam este tema não o têm feito, pela necessidade de corrigir a angulação e ampliação da imagem, utilizando a medição da coroa antes e após o TO.

A radiografia digital é frequentemente usada na prática clínica dentária, dada a economia de tempo, as suas vantagens de armazenamento e a maior facilidade de interpretação das imagens<sup>252, 264</sup>. A reconstrução digital de radiografias, recorrendo a software específico de tratamento e análise da imagem, possibilita uma análise mais precisa e facilita a deteção precoce de pequenas modificações no comprimento radicular<sup>265, 266</sup>.

## 5 . Objetivos

Os principais objetivos deste estudo foram: propor um modelo integrado de suscetibilidade à RRAE, de modo a permitir uma abordagem personalizada do paciente ortodôntico, com otimização dos resultados e minimização da ocorrência desta complicação, e contribuir para o esclarecimento dos mecanismos envolvidos na etiopatogenia deste fenótipo.

Como objetivos secundários definiram-se:

- avaliar a contribuição, para a suscetibilidade à RRAE, de treze variáveis, clínicas e relacionadas com o TO: idade de início do tratamento, género, medicação sistémica crónica, doenças crónicas do foro endócrino, antecedentes familiares, duração do tratamento ortodôntico, aplicação de aparelho Hyrax, aplicação de aparelho funcional fixo, extração de pré-molares, mordida aberta anterior, interposição lingual, padrão esquelético e overjet;

- avaliar a contribuição, para a suscetibilidade à RRAE, de quatro SNPs dos genes candidatos *IL1B*, *TNFRSF11A*, *TNFRSF11B* e *P2RX7*.

- descrever as frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos selecionados na população portuguesa, dada a sua eventual importância não só para a patologia oral como para outras patologias de diversas especialidades médicas



## 2 - Materiais e métodos

---



## 1 . Desenho do estudo

Este trabalho é um estudo retrospectivo e observacional e envolveu diferentes instituições: o Serviço de Ortodontia da Área de Medicina Dentária da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra e duas clínicas ortodônticas privadas onde trabalha a autora deste estudo, de onde foram selecionados os pacientes, e o Serviço de Genética Médica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, onde foi realizado o estudo genético.

A aplicação informática criada para a determinação de RRAE a partir das imagens de ortopantomografia foi desenvolvida em colaboração com um dos orientadores desta dissertação, o Professor Doutor Miguel Angel Guevara Lopez. O tratamento estatístico foi realizado com o apoio técnico e científico do Professor Doutor Nuno Filipe Jorge Lavado.

## 2 . População

A amostra de pacientes foi construída a partir do arquivo da consulta da Pós-graduação de Ortodontia da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra e do arquivo de duas clínicas ortodônticas privadas. Foram analisados os processos de pacientes que iniciaram e terminaram o tratamento entre 2000 e 2010, num total de 790. Deste universo, foram aleatoriamente selecionados pacientes, não consanguíneos, que cumpriam os critérios de inclusão definidos para este estudo, para serem contactados pela autora do projeto no sentido de se explicar o âmbito do trabalho e pedir a sua colaboração, informando da necessidade futura da sua presença numa consulta para recolha de amostras de saliva e eventual fornecimento de alguns dados clínicos. Como resultado deste longo trabalho de seleção, foram reunidos 212 pacientes que acederam em colaborar. Contudo, a amostra final apenas incluiu 195 indivíduos, tendo os restantes sido excluídos por ausência de resultados genéticos ou por critérios de análise estatística. Foram avaliados 6 dentes do maxilar superior, os quatro incisivos e os dois caninos.

Os critérios de inclusão dos pacientes neste estudo foram os seguintes:

- ser de raça caucasiana e de origem portuguesa (até à segunda geração de ascendentes);
- ter concluído tratamento ortodôntico fixo, seguindo um protocolo estandardizado, com a técnica de *straight-wire* e aparelho fixo pré-ajustado com prescrição de Roth e *slot* de 0.018/0.030 polegadas;
- ter uma ortopantomografia prévia ao tratamento (realizada nos 6 meses anteriores) e outra efetuada nos 6 meses que se seguiram à remoção dos aparelhos fixos; ambas cumprindo os critérios de qualidade deste tipo de exame;
- ter um processo clínico completo, com história clínica que permitisse a recolha de todos os parâmetros pretendidos;
- não apresentar malformações craniofaciais, agenesias dentárias, dentes supranumerários ou caninos maxilares impactados;
- possuir uma dentição em que os incisivos e caninos maxilares tivessem atingido uma formação radicular completa à data do início do tratamento;
- ausência de fraturas coronárias, de traumatismos ou de cáries nos bordos incisais antes e durante o tratamento;
- ausência de raízes com morfologia aberrante;
- ter um plano de tratamento sem extrações no maxilar superior (à exceção dos sisos), ou só com extração de 2 pré-molares maxilares e sem cirurgia ortognática;
- ausência de doença periodontal.

Os pacientes deram o consentimento informado por escrito (Anexo 3), de acordo com os princípios éticos da investigação médica e dos direitos humanos, referidos na declaração de Helsínquia (versão 2002, [www.wma.net/e/policy/b3.htm](http://www.wma.net/e/policy/b3.htm)). Este projeto de investigação, na área de experimentação clínica, foi aprovado pela Comissão de Ética da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra (Anexo 4).

Os dados clínicos foram recolhidos por consulta do processo clínico e por um inquérito ao qual os pacientes responderam na mesma consulta (Anexo 5) que permitiu a recolha de saliva para extração de DNA. Para além dos parâmetros dos critérios de inclusão, foram analisadas as seguintes variáveis clínicas: género, idade no início do tratamento, medicação sistémica crónica, doenças crónicas do foro endócrino, antecedentes familiares, duração do tratamento, extrações

de pré-molares superiores, padrão esquelético, aplicação de expansor Hyrax, aplicação de aparelho funcional fixo, *overjet*, mordida aberta anterior e interposição da língua.

Os expansores maxilares Hyrax foram sempre aplicados no início do tratamento ortodôntico, ativados com quatro voltas no dia da cimentação e com duas voltas por dia (0.25 mm por volta) durante o período ativo e mantidos por seis meses. O uso de aparelho funcional fixo e os antecedentes de medicação sistêmica e de endocrinopatias foram excluídos da análise estatística posterior, devido ao reduzido número de pacientes existentes. Da mesma forma, excluímos a variável antecedentes familiares, por ausência de pacientes com antecedentes familiares conhecidos de RRAE.

Os 195 pacientes da amostra final incluíram 72 homens e 123 mulheres, com uma idade média de 17.24 anos e um desvio padrão de 6.8 anos; o tempo médio de tratamento foi de 36 meses, com um desvio padrão de 10 meses.

### 3 . Avaliação da RRAE

#### 3.1. Avaliação das ortopantomografias

As ortopantomografias (OPT) foram todas realizadas com ortopantomógrafo *Gendex Orthoralix SD-2 CEPH*. O fator de ampliação deste equipamento é de 1.25:1.

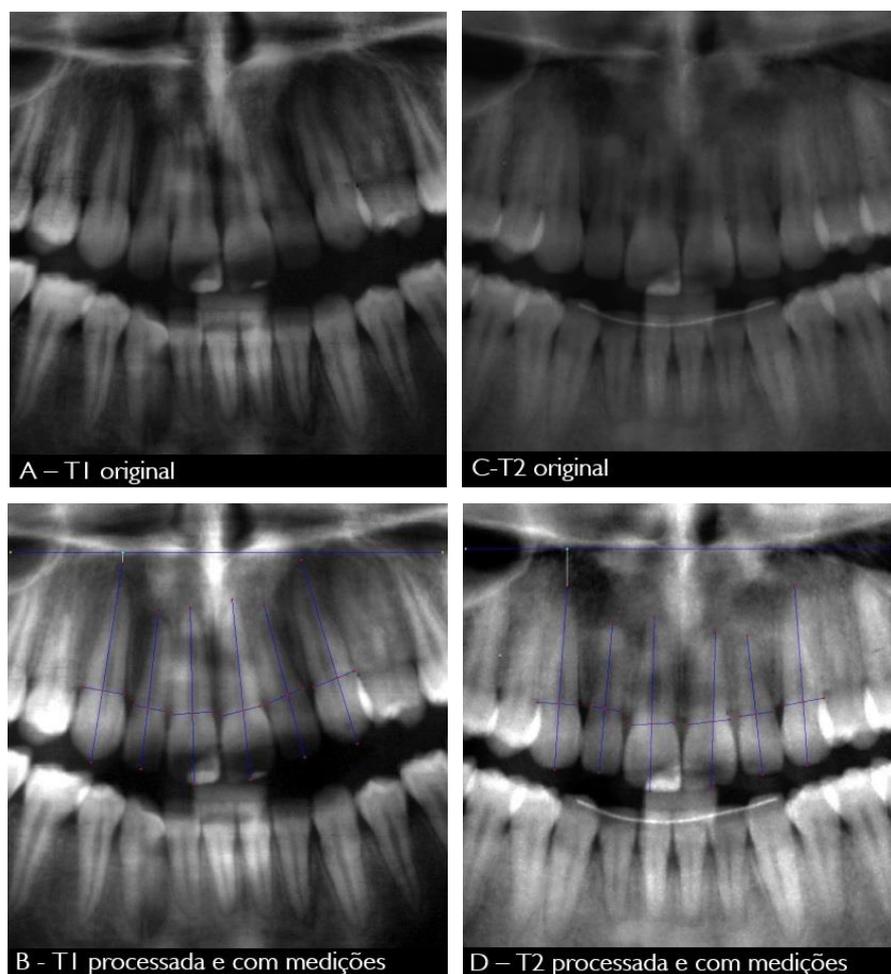
Para garantir a qualidade da radiografia panorâmica, verificou-se o cumprimento dos critérios anteriormente definidos<sup>231, 239</sup>. As radiografias de todos os pacientes, relativas à fase pré (T1) e pós (T2) tratamento ortodôntico foram digitalizadas com a resolução de 300 dpi e 256 níveis de cinzentos, recorrendo a um *scanner* - Epson Expression 1680 Pro - e gravadas em formato TIFF (*Tagged Image File Format*). A observação destas imagens, para posterior mensuração das dimensões radiculares, foi efetuada num monitor Asus de 22 polegadas, para permitir uma melhor identificação dos pontos alvo.

Para determinar o padrão esquelético dos pacientes, foram efetuadas análises cefalométricas a partir de telerradiografias efetuadas antes do TO.

De forma a dispormos de um método normalizado, simples e o mais preciso possível para medir a RRAE, foi desenvolvido, especificamente para este trabalho, o protótipo de um software, designado por ARIAS (*Apical Resorption Image Analysis System*), em MATLAB, versão 7.12.0.635 (R2011a). A aplicação inclui três etapas: (1) pré-processamento de imagem, (2) seleção dos pontos de referência e (3) produção, registo de valores e cálculos<sup>267, 268</sup>.

A etapa de pré-processamento de imagem destinou-se a melhorar a qualidade das imagens radiográficas, de forma a aumentar o potencial de discriminação na área dos dentes a estudar. Com este intuito, selecionou-se uma área retangular (região de interesse), que incluiu só os quatro incisivos e os caninos superiores. Foram explorados vários tipos de filtros baseados na estatística da intensidade de imagens e também na combinação de algumas operações morfológicas matemáticas<sup>266, 269</sup> de forma a obter uma melhoria da imagem radiográfica.

Os filtros de imagem foram aplicados às radiografias originais T1 e T2 (Fig. 2.1 A e C respectivamente) dando origem a imagens digitalmente melhoradas na área a estudar. Iniciou-se com a aplicação das transformações morfológicas *top-hat* e *bottom-hat* para produzir as imagens T1 e T2 *top-hat* e *bottom-hat*; posteriormente, às imagens iniciais adicionaram-se as imagens *top-hat* e o resultado foi subtraído das *bottom-hat*, de modo a produzir as imagens T1 e T2 finais melhoradas (Fig. 2.1. B e D respectivamente), utilizadas para as medições.



**Figura 2.1.** Imagens iniciais de pré (A) e pós (C) tratamento e as mesmas imagens após aplicação de filtros pelo ARIAS (B e D respectivamente). As mensurações foram efetuadas nas imagens processadas.

A fórmula matemática das operações de pré-processamento de imagem é a seguinte:

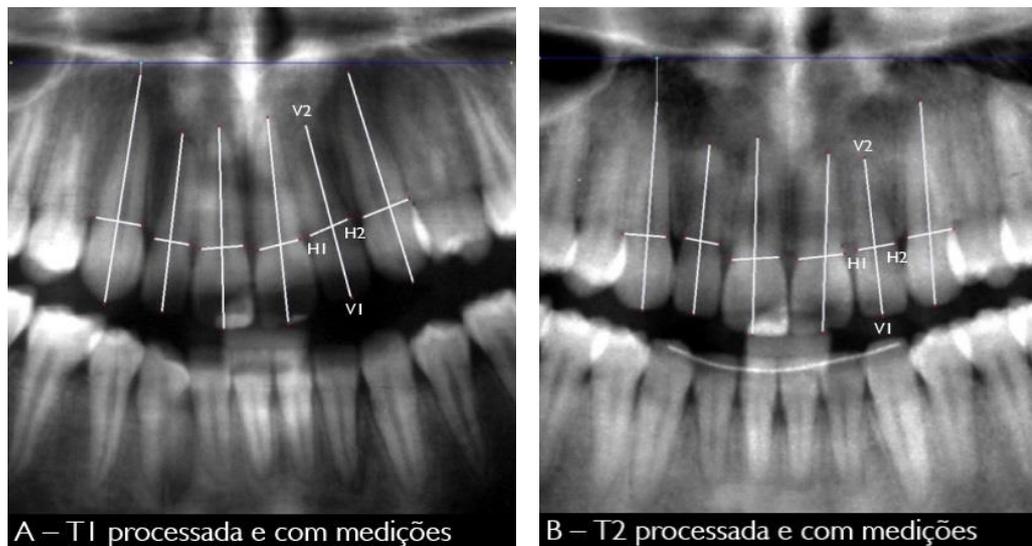
$$E=A - B, \quad \text{sendo } E \text{ a imagem melhorada}$$

$$A =O +T$$

$$B = \varphi(O) - O, \quad \text{sendo } B \text{ a imagem } \textit{bottom-hat}$$

$$T = O - \gamma(O), \quad \text{sendo } T \text{ a imagem } \textit{top-hat} \text{ e } O \text{ a imagem original (T1 ou T2)}$$

Na etapa seguinte, selecionaram-se manualmente quatro pontos em cada um dos seis dentes, criando uma geometria cruciforme: dois pontos nas extremidades verticais, correspondendo ao bordo incisal (V1) e ao ápice (V2) e dois pontos nas extremidades horizontais, referentes à junção amelo-cementária mesial (H1) e distal (H2), colineares com o ponto de interseção da raiz com a coroa. Desta forma, foram estabelecidos dois segmentos de reta e o ponto de interseção entre os segmentos vertical e horizontal, que permitiram avaliar os comprimentos da raiz e da coroa (Fig. 2.2 A e B).



**Figura 2.2.** Medição dos seis dentes antero-superiores na imagem inicial (T1) processada, A, e na imagem final (T2) processada, B.

V1- ponto vertical incisal; V2- Ponto vertical apical; H1- Ponto horizontal mesial; H2- Ponto horizontal distal.

Finalmente, geraram-se um conjunto de valores correspondentes aos comprimentos de - raiz inicial (R1), raiz final (R2), coroa inicial (C1), coroa final (C2) e raiz final corrigida (R2C) - que foram utilizados para calcular a percentagem de RRAE.

Considerando-se que durante o tratamento ortodôntico o comprimento da coroa não sofre alteração, a razão entre o comprimento da coroa inicial e o comprimento da coroa final,

C1/C2, determina o fator de ampliação do exame radiográfico. Para avaliar a reabsorção da raiz, em vez de se utilizar o resultado da subtração dos valores inicial e final, optou-se pela avaliação da percentagem de reabsorção radicular, %RRAE, corrigida pelo fator de ampliação da imagem.

Os seis dentes antero-superiores foram medidos utilizando o método de Linge e Linge<sup>17</sup>, modificado por Brezniak *et al.*<sup>263</sup>. A fórmula matemática utilizada para o cálculo da % de RRAE foi a seguinte:

$$\%RRAE = 1 - (R2C/R1) \times 100$$

(percentagem de reabsorção radicular apical externa)

Sendo:

$R2C = R2 \times FC$  R2C a raiz final corrigida

$FC = C1/C2$  FC o fator de correção da ampliação e C1 e C2 as dimensões iniciais e finais da coroa

$R2C/R1$  representa a proporção de raiz remanescente

O software ARIAS, além da relevante vantagem de aumentar o potencial de discriminação da área de interesse, associa o processamento matemático e o registo automático das medidas, evitando, desta forma, o esforço acrescido do operador no registo manual de todos os dados obtidos e na aplicação das fórmulas indicadas, para cada dente, em cada paciente. Tem ainda a mais-valia de eliminar os erros com origem na introdução e manuseamento de dados, uma vez que todos os parâmetros considerados ficam automaticamente registados e gravados num arquivo de Microsoft Excel, associado a cada paciente (Tabela 2.1).

No total, considerando as imagens de pré e pós-tratamento, para os 6 dentes dos 195 doentes, foram analisados 2340 dentes e 9360 pontos de referência.

**Tabela 2.1.** Valores resultantes das medições automáticas com a aplicação ARIAS, correspondentes ao paciente das figuras 2.1 e 2.2.

Dentes	T-1 Coroa (C)	T-1 Raiz (R)	T-2 Coroa (C2)	T-2 Raiz (R2)	FC	R2 Corrigida (R2C)	Raiz remanescente (R2C/R1)	% RRAE
13	63.64	122.33	58.22	109.37	1.09	119.56	0.98	2
12	52.47	88.81	52.24	82.50	1.00	82.85	0.93	7
11	62.03	101.07	62.00	101.01	1.00	101.06	1.00	0
21	64.28	103.48	62.01	82.02	1.04	85.03	0.82	18
22	59.91	85.87	55.33	72.44	1.08	78.44	0.91	9
23	61.68	112.27	59.14	107.30	1.04	111.92	1.00	0

FC- Fator de Correção; FC = C1/C2; T1 – imagem pré-TO; T2 – imagem pós-TO; R2C = R2 x FC

### 3.2. Fiabilidade do método de medição

Como forma de prevenir o erro inter-operador, todos os procedimentos de mensuração anteriormente referidos foram efetuados pelo mesmo operador, especialista em ortodontia pela Ordem dos Médicos Dentistas, no caso, a autora deste estudo. Para a análise do erro intra-operador, as OPT de 20 doentes, aleatoriamente selecionados, foram avaliadas duas vezes, num intervalo de 15 dias, e os valores de %RRAE obtidos foram submetidos a análise estatística (capítulo de resultados).

## 4 . Caracterização genotípica

### 4.1. Extração do DNA

Para a extração de DNA procedeu-se à colheita de células da mucosa jugal por ser um método de fácil aceitação por parte dos doentes. Após lavagem da boca com água durante 10 segundos, por três vezes, procedeu-se à recolha com zaragatoas esterilizadas, três por doente. A ponta da zaragatoa foi cortada e colocada num microtubo de 1.5 ml contendo 200  $\mu$ l água esterilizada. Depois de 30 minutos à temperatura ambiente, os tubos, contendo a ponta da zaragatoa, foram conservados a  $-20^{\circ}\text{C}$ . No laboratório, as amostras foram descongeladas a  $4-8^{\circ}\text{C}$  e centrifugadas a  $15000 \times g$  durante 3 minutos. Aspirou-se o sobrenadante deixando cerca de 50  $\mu$ l e adicionaram-se 150  $\mu$ l de uma suspensão de Chelex 100® a 10%. A mistura foi aquecida a  $56^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos, depois a  $100^{\circ}\text{C}$  durante 8 minutos e finalmente centrifugada a  $15000 \times g$  durante 5 minutos. O sobrenadante, cerca de 50  $\mu$ l, contendo o DNA, foi retirado e armazenado a  $-20^{\circ}\text{C}$ , e o tubo contendo a zaragatoa foi desprezado. Para cada doente conservou-se uma amostra, com o produto total de extração das três colheitas.

A Chelex 100® é um sal sódico de uma resina quelante e permutadora de iões frequentemente usado na extração do DNA para processamento forense. É incerto o papel desta resina na extração do DNA, sendo provável que quelando iões metálicos bivalentes, cofatores de Dnases ou quelando iões contidos em proteínas, impeça a degradação do DNA e purifique a mistura.

## 4.2. Quantificação do DNA

Procedeu-se à quantificação de DNA e avaliação do grau de pureza das amostras, por espectrofotometria, com leituras das absorvâncias nos comprimentos de onda 260/280 nm e 260/230 nm, considerando-se os valores entre 1.8 e 2.0 e entre 1.8 e 2.2 respetivamente, como critérios de grau de pureza adequado. Para este efeito, utilizou-se o espectrofotómetro Nanodrop ND-1000. As amostras com graus de pureza inferior a 1.7 que revelaram dificuldades na amplificação foram repurificadas com o *kit QIAamp DNA Mini Kit* (Qiagen) seguindo as instruções do fabricante.

## 4.3. Genotipagem por sequenciação

A sequenciação permite descrever a composição de uma sequência nucleotídica, o que a elege como a metodologia de referência, quer para confirmação de resultados quer para o estabelecimento de controlos internos quando se recorre a outras técnicas de genotipagem.

Neste trabalho, embora a identificação dos polimorfismos dos 4 genes selecionados tenha sido realizada pela metodologia de Reação de Polimerização em Cadeia (PCR) em tempo real (PCR-TR) com sondas *TaqMan* e por análise de *Restriction Fragment Length Polymorphisms* (RFLPs ou técnica de identificação de polimorfismos em comprimento de restrição), para cada protocolo, foram sequenciadas amostras dos doentes para obter controlos positivos representativos de cada genótipo. Nos casos de resultados duvidosos persistentes, as amostras foram sequenciadas. Os *primers*, as sondas e as temperaturas de emparelhamento ou *annealing* estão descritas na tabela 2.2.

Para a 1ª PCR da sequenciação foram utilizados os mesmos *primers* do protocolo de genotipagem específico ou foram desenhados novos *primers* recorrendo ao software *Beacon Designer* (Premier Biosoft). Para cada amplificação, num volume final de 25 µl, usaram-se cerca de 200 ng de DNA, 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub> (Nzytech), 200 µM de dNTPs (Biolabs), 0.2 µM de *primers* (Invitrogen), tampão 1x (Nzytech) e 0.03 unidades de *Taq* DNA polimerase (Nzytech). Para cada experiência, usaram-se 2 controlos de contaminação (controlos negativos), nos quais o DNA foi substituído pela água esterilizada usada na reação. Os protocolos de PCR incluíram uma desnaturação inicial de 5 minutos a 95°C, seguidos de 35 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos à temperatura de emparelhamento de cada par de *primers* (Tabela 2.2) e 30 segundos de extensão a 72°C, finalizando-se com 5 minutos de extensão a 72°C. Utilizou-se um termociclador "*Mycycler*" da Biorad.

**Tabela 2.2.** *Primers* e respectivas temperaturas de emparelhamento utilizadas na 1ª PCR

Gene	Primers	Temperatura
<i>TNFRSF11B</i> <sup>1</sup> (OPG)	5'GAG ACA TAT AACTTGAAC ACT TGG 3' 5'CAA AGG GCT ATT GGT ATC GG 3'	55°C
<i>TNFRSF11A</i> <sup>1</sup> (RANK)	5'GAC CGCAATCTCAGAGTAGC 3' 5'GCA CATCTATCAACCAACAGG 3'	55°C
<i>IL1B</i> <sup>2</sup>	5'CTC AGGTGTCCTCGAAGAAATCAA A 3' 5'GCT TTTTGTGCTGTGAGTCCCG 3'	60°C
<i>P2RX7</i> <sup>1</sup>	5'AAC GCATCTATCCAAGTC 3' 5'TCT TCC TGT AGT AGT ATT CG3'	54°C

1- Protocolo desenhado recorrendo ao programa Beacon Designer (Biorad); 2- Protocolo segundo Komman et al.<sup>77</sup>

Para verificar a existência de amplificação e a ausência de contaminação e de amplificação inespecífica (presença de uma única banda), as amostras submetidas a PCR foram corridas numa eletroforese em tina horizontal contendo TAE 1x, a 100 volts. Utilizou-se um gel de agarose a 2% (p/v) (1.2 g de agarose, 60 ml de TAE 1x e brometo de etídio a 0.5µg/ml. Em cada poço do gel, colocaram-se 5 µL da amostra amplificada e 1 µL de *loading buffer* tipo IV. Para a visualização das bandas recorreu-se a um transiluminador de ultra-violetas (Vilber Lourmat).

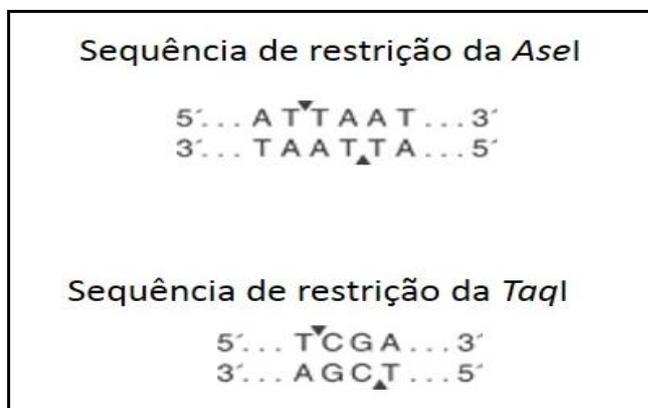
Os produtos amplificados foram purificados em coluna com o *kit Jet Quick PCR Product Purifications Spin kit/250* (Genome) para eliminação de excesso de *primers* e de sais e posteriormente eluídos em 30 µl de água ultrapura.

Na reação de sequenciação, para um total de 20 µl utilizaram-se: 1 µl do produto de PCR purificado, 2 µL de solução de terminadores (*BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing kit* da Applied Biosystems, que para além dos terminadores contém dNTPs, e DNA polimerase), tampão 1x, 1 µM do *primer* proximal da primeira PCR e água até perfazer o volume final. As condições da reação de sequenciação foram as seguintes: desnaturação inicial de 1 minuto a 96°C, seguida de 25 ciclos de desnaturação de 10 segundos a 96°C, emparelhamento de 5 segundos a 50°C e uma extensão de 4 minutos a 60°C. Utilizou-se um termociclador MyCycler (Biorad).

O produto da reação de sequenciação foi novamente purificado para remover o excesso de terminadores e de *primers*, com o *kit Auto Seq™ G-50 Dye Terminator Removal kit* (GE Healthcare). A eletroforese de sequenciação efetuou-se num equipamento *AbiPrism 3130 Genetic Analyser* (Applied Biosystems). As sequências obtidas foram analisadas recorrendo ao programa informático *Sequencing Analysis* (versão 5.2).

#### 4.4. Genotipagem dos polimorfismos dos genes *TNFRSF11B* e *IL1B*

A técnica de RFLPs é utilizada para detetar variações conhecidas, mutações ou polimorfismos, que interfiram com uma sequência de restrição de uma endonuclease. Estas enzimas, de origem bacteriana, reconhecem sequências palindrômicas específicas de DNA de cadeia dupla, que digerem, originando fragmentos que poderão ser depois separados e identificados por eletroforese. Esta técnica foi utilizada para identificar o SNP do gene da *IL1B* (rs1143634), seguindo um protocolo previamente descrito <sup>77</sup> e o SNP do gene da *OPG* (rs3102735), segundo protocolo criado no laboratório, recorrendo ao programa *Beacon Designer* (Biorad) para desenho dos *primers* (Fig. 2.3).



**Figura 2.3.** Sequências de restrição e pontos de quebra das endonucleases *AseI* e *TaqI* utilizadas na genotipagem por RFLP dos polimorfismos dos genes da *OPG* e da *IL1B*, respetivamente.

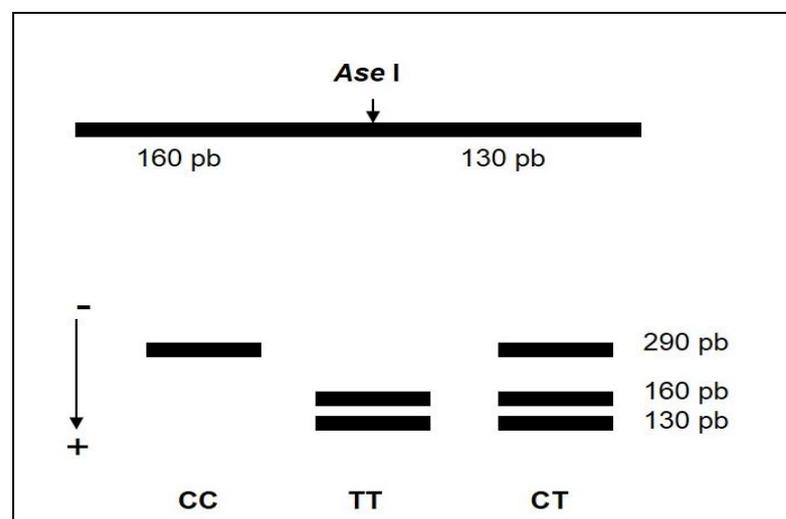
Para a reação de PCR, num volume total de 25  $\mu$ l, utilizaram-se: 200 ng de DNA, tampão 1x (Nzytech); 200  $\mu$ M de dNTPs (Biolabs); 1.5  $\mu$ M de  $MgCl_2$  (Nzytech); 0.2  $\mu$ M de cada *primer* (Invitrogen<sup>TM</sup>) e 0.03 unidades de Taq DNA polimerase (Nzytech). As amplificações foram realizadas sob as seguintes condições: uma desnaturação inicial de 10 minutos a 95°C, seguida 35 ciclos compreendendo uma desnaturação de 30 segundos a 95°C, emparelhamento dos *primers* de 30 segundos à respetiva temperatura e uma extensão de 30 segundos a 72°C, finalizando-se a reação com uma extensão de 10 minutos a 72°C. Utilizou-se o mesmo termociclador MyCycler (Biorad) anteriormente referido. Como controlos positivos utilizaram-se amostras previamente genotipadas por sequenciação, representativas dos três genótipos. Para cada experiência, usaram-se ainda 2 controlos de contaminação (controlos negativos), nos quais o DNA foi substituído pela água esterilizada usada na reação. Os *primers* e respetivas temperaturas de emparelhamento estão descritos na tabela 2.2.

Para verificar a presença de amplificação específica e a ausência de contaminação, realizou-se uma eletroforese horizontal em gel de agarose a 1% (p/v) nas condições

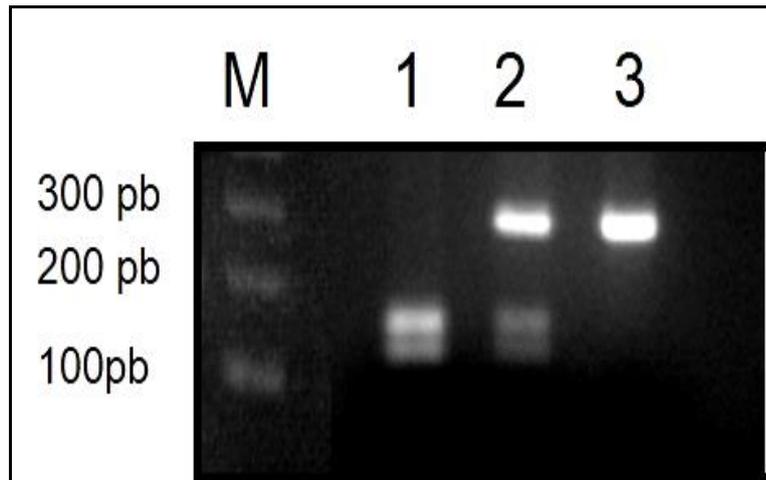
anteriormente descritas. As amostras amplificadas foram digeridas, utilizando, para um volume final de 12  $\mu$ l, 9  $\mu$ l de produto de PCR, 3 unidades da enzima de restrição *Ase*I ou *Taq*I, tampão 1x e água até perfazer o volume total. A incubação ocorreu durante a noite a 37°C para a enzima *Ase*I e a 65 °C para a enzima *Taq*I. Para a análise dos resultados, as amostras foram submetidas a uma eletroforese horizontal a 100 volts, num gel de agarose a 3% em TAE 1x, corado com brometo de etídio (0.5  $\mu$ g/ml). A exposição do gel a um transiluminador de UV permitiu a visualização do padrão de bandas.

Para a otimização inicial da digestão (quantidade de enzima e de produto de PCR), utilizaram-se amostras representativas dos 3 genótipos, previamente sequenciadas, as mesmas que serviram como controlos positivos.

Para o polimorfismo rs3102735 do gene da OPG amplificou-se um segmento de 290 pb que, na presença de homozigotia para a variante T (timina), é digerido pela enzima *Ase*I, originando fragmentos de 160 e 130 pb. Nas amostras com homozigotia para o alelo C (citosina), o alelo sem sequência de restrição, a ausência de digestão origina fragmentos com o comprimento inicial de 290 pb. As amostras dos heterozigotos identificam-se por um padrão com três bandas: uma banda de 290 pb correspondendo ao alelo C, e duas bandas de 160 e 130 pb com origem no alelo T (Fig. 2.4 e 2.5).

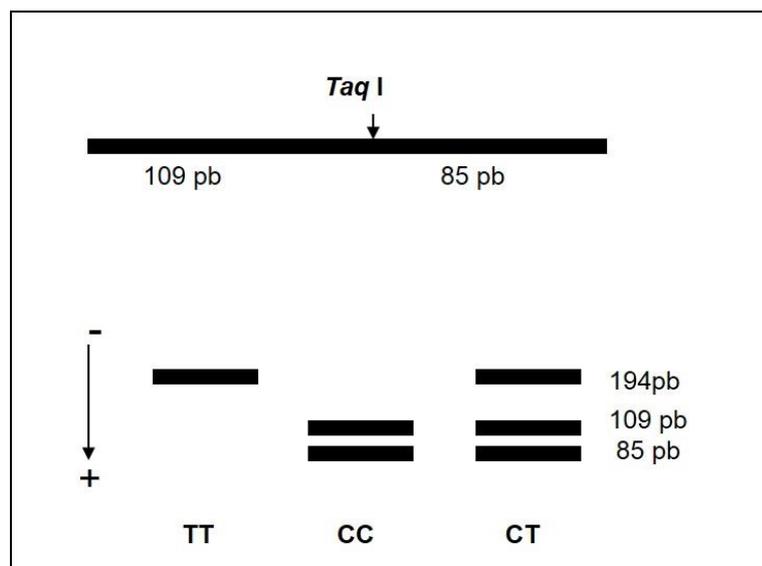


**Figura 2.4.** Esquema do padrão de migração eletroforético correspondente aos três genótipos do polimorfismo rs3102735 (OPG).

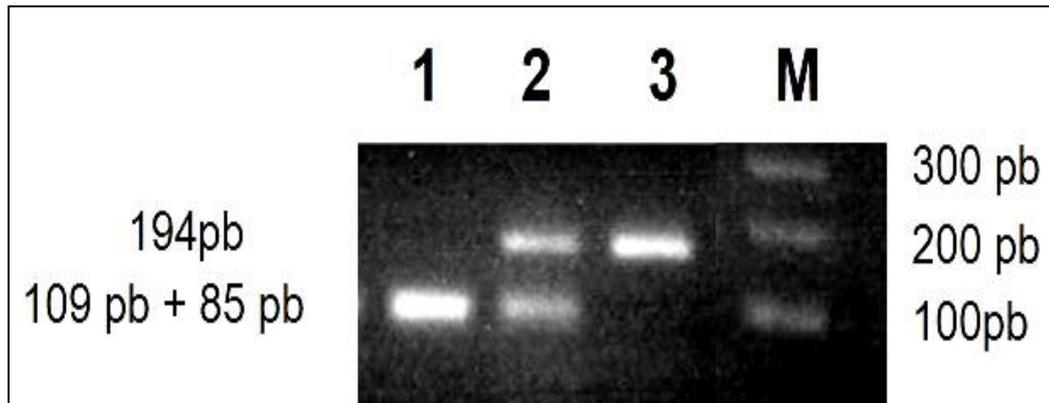


**Figura 2.5.** Resultado da eletroforese da técnica de PCR-RFLP utilizada para identificar o polimorfismo rs3102735 (OPG). M – marcador de peso molecular; 1 - homozigoto TT; 2 - heterozigoto TC; 3 - homozigoto CC.

Para o polimorfismo rs1143634 do gene da IL1B, amplificou-se um segmento de 194 pb que, na presença da variante C é digerido pela enzima *TaqI* originando fragmentos de 109 e 85 pb. O alelo com a variante T não contém a sequência de restrição, pelo que não é digerido e os fragmentos mantêm o comprimento inicial. O padrão de bandas obtido após eletroforese permite a fácil identificação dos homozigotos TT, com uma única banda correspondendo a 194 pb, dos homozigotos CC, com duas bandas correspondendo a fragmentos de 109 e 85 pb e dos heterozigotos CT, com um padrão de bandas misto (Fig. 2.6 e 2.7).



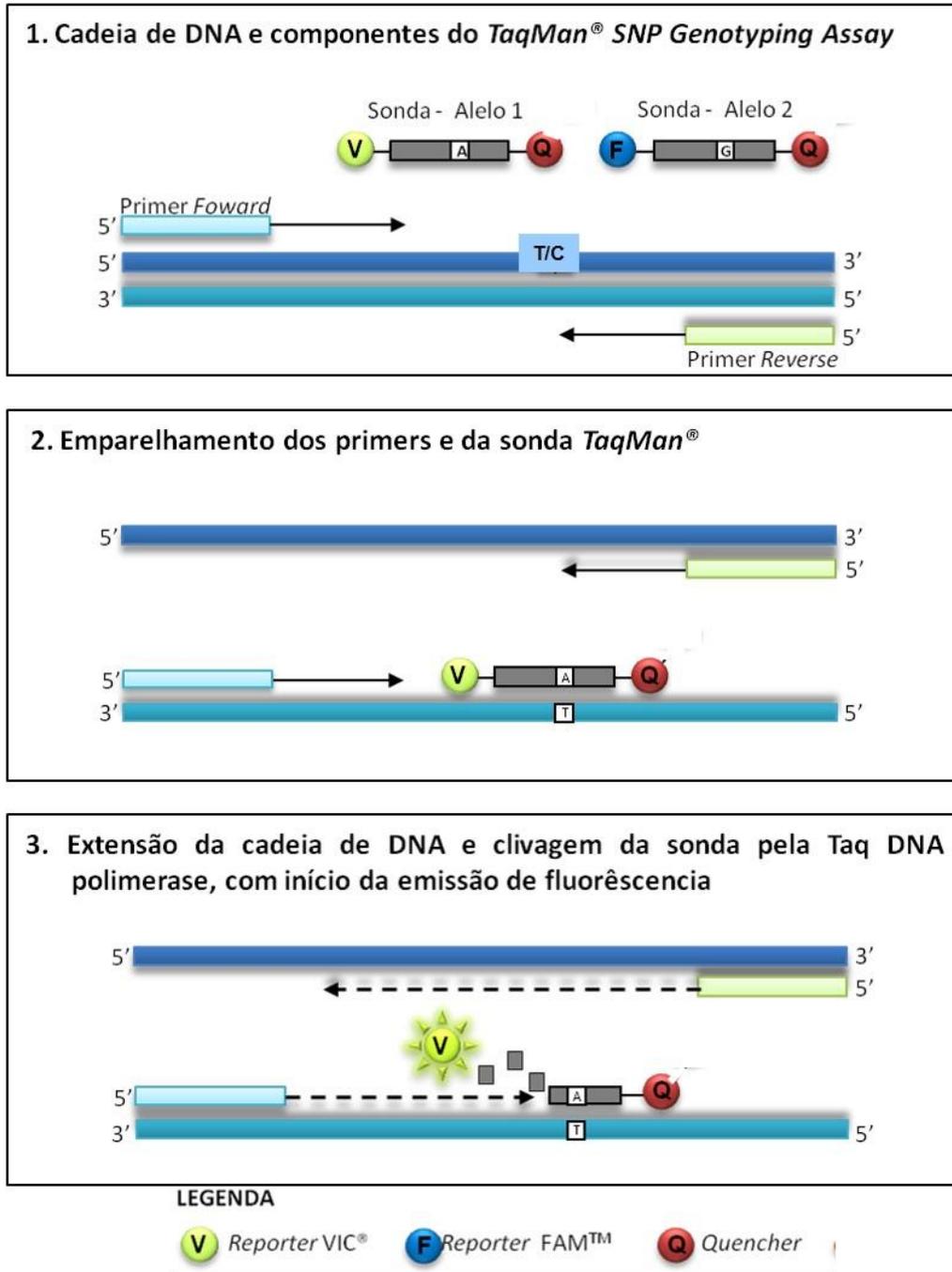
**Figura 2.6.** Esquema do padrão de migração eletroforético dos três genótipos do polimorfismo rs1143634 (IL1B).



**Figura 2.7.** Resultado da eletroforese da técnica de PCR-RFLP utilizada para identificar o polimorfismo rs1143634 (*IL1B*). 1 - homozigoto CC; 2 - heterozigoto CT; 3 -homozigoto TT; M – marcador de peso molecular.

#### 4.5. Genotipagem dos polimorfismos dos genes *P2RX7* e *TNFRSF11A*

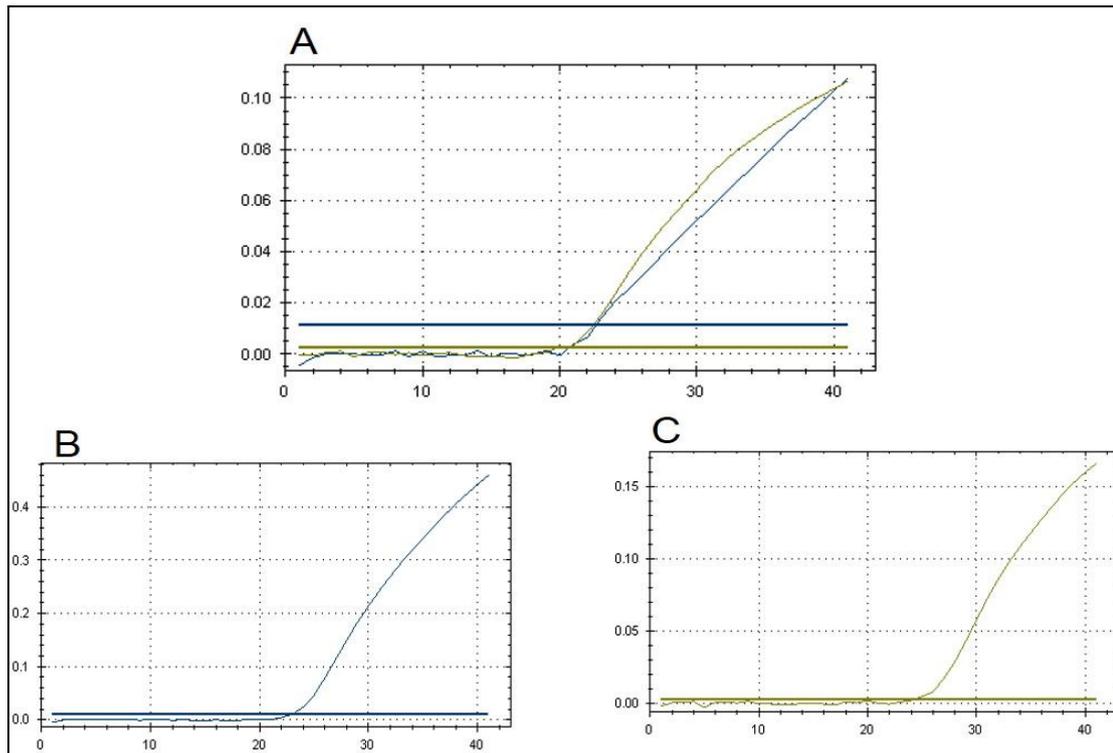
A PCR em tempo real é uma técnica que alia a capacidade de amplificação exponencial de sequências específicas, ao registo sequencial e cumulativo da quantidade de sequências que vão sendo amplificadas, recorrendo a diversos sistemas de marcação com sondas fluorescentes e ao tratamento dos dados por software próprio. Para a genotipagem dos polimorfismos dos genes *TNFRSF11A* (*RANK*) e *P2RX7*, recorreremos à PCR em tempo real com sondas TaqMan (Fig. 2.8). Nesta técnica, para além do par de *primers*, usam-se duas sondas que permitem identificar as duas variantes do SNP. Cada sonda consiste num oligonucleótido complementar à sequência a identificar, contendo um fluoróforo ligado covalentemente (*reporter*) na extremidade 5', que emite em comprimentos de onda diferentes para cada sonda, e na extremidade 3' um bloqueador (*quencher*) não fluorescente (NFQ). Enquanto o bloqueador estiver próximo de *reporter* (sondas íntegras) não há emissão de fluorescência por um efeito de tipo FRET (*Förster/Fluorescence Resonance Energy Transfer*). Na fase de emparelhamento da PCR, os *primers* e as sondas TaqMan hibridizam com as respetivas cadeias complementares. Durante a fase de extensão, a sonda é clivada pela atividade exonuclease de 5'- 3' da Taq DNA polimerase, permitindo a libertação do fluoróforo e a emissão de fluorescência. Assim, só haverá emissão e registo de uma determinada fluorescência se a sequência com a variante complementar a essa sonda estiver presente na amostra e se ocorrer amplificação. Este sistema tem uma maior sensibilidade do que o método de RFLPs ou mesmo do que a sequenciação, sendo muito útil para amostras com baixa concentração de DNA.



**Figura 2.8.** Atuação da sonda TaqMan.

**Nota:** Nos protocolos de discriminação alélica utilizam-se duas sondas, complementares às sequências dos dois alelos a identificar, marcadas com diferentes fluoróforos. Na fase de *annealing*, os *primers* e as sondas hibridizam com as sequências alvo complementares. Na extensão, a DNA polimerase cliva a extremidade 5' da sonda libertando o marcador fluorescente e há emissão de fluorescência. Adaptado de Koch<sup>270</sup>.

A genotipagem de cada amostra é efetuada através da determinação das fluorescências emitidas: homozigotia na presença de apenas um produto de amplificação, correspondente a um só fluoróforo específico, e heterozigotia na presença de dois produtos de amplificação, correspondentes aos dois fluoróforos (Fig. 2.9).



**Figura 2.9.** Discriminação alélica do polimorfismo rs1805034 do gene *TNFRSF11* (RANK) por PCR em tempo real. A- fluorescência proveniente das duas sondas correspondendo à presença de heterozigotia; B e C correspondem a amostras de homozigotos.

Como não há processamento do produto de PCR (não se realiza uma eletroforese), a probabilidade de contaminação é substancialmente reduzida. É igualmente um método muito útil para números elevados de amostras.

Para a genotipagem do SNP rs1718119 do gene *P2RX7* utilizou-se o *kit TaqMan® Pre-Designed SNP Genotyping Assays*, ref. C\_11704039\_10 (Applied Biosystem, New Jersey, USA), com sondas marcadas com VIC e FAM. A reação de PCR foi realizada num volume final de 15  $\mu$ l, contendo 1x iQ<sup>TM</sup>Supermix (Biorad *Laboratories*, contendo dNTPs, tampão e DNA polimerase), 0.375  $\mu$ l de *Taqman® SNP Genotyping Assay 40x* (Applied Biosystems, contendo os *primers*) e 10-30 ng de DNA genómico.

Utilizou-se o termociclador em tempo real CFX96 (Biorad). Em cada série de PCRs foram utilizados 2 controlos negativos e 3 controlos positivos de amostras representativas dos três genótipos, previamente estudadas por sequenciação. As condições de PCR foram as seguintes: uma pré-desnaturação inicial de 10 minutos a 95°C, seguindo-se 40 ciclos de 15 segundos a 92°C e um minuto a 60°C (emparelhamento dos *primers* e extensão). Os produtos amplificados foram analisados diretamente utilizando o software de discriminação alélica do instrumento e representados em formato de gráfico.

Para a genotipagem do SNP rs1805034 do gene *TNFRSF11*/RANK utilizou-se um protocolo previamente descrito<sup>217</sup>. Para um volume final de 12  $\mu$ l, utilizaram-se 1x iQ<sup>TM</sup>C Supermix

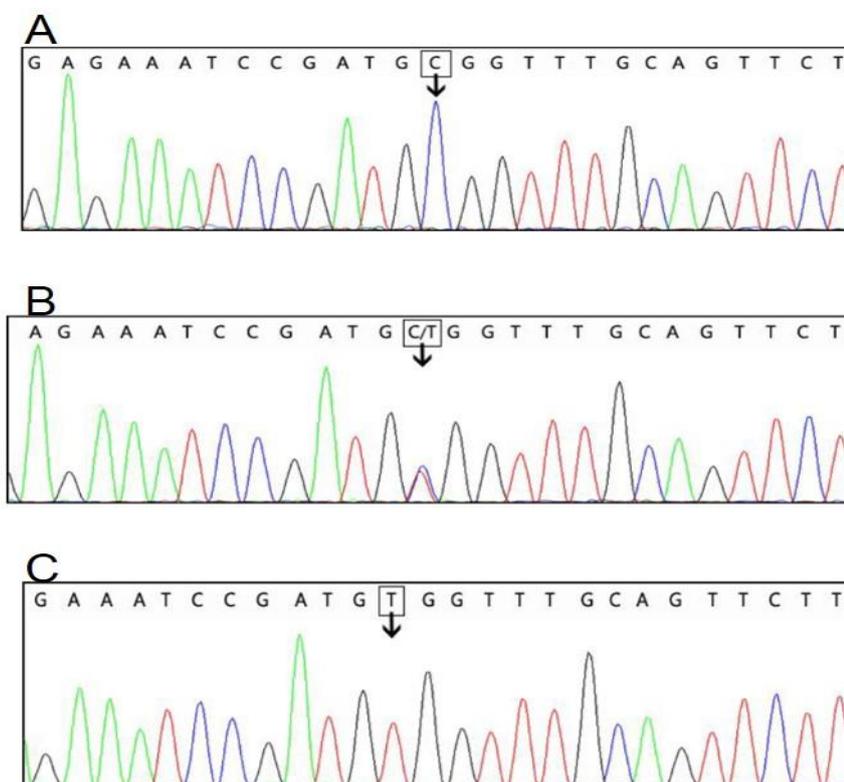
(Biorad *Laboratories*), 300 nM de *primer* proximal e distal, 300 nM de sonda para a variante C (marcada com TET), 400 nM de sonda para a variante T (marcada com FAM) e 10-30 ng de DNA genômico. Os *primers* e as sondas estão descritos na tabela 2.3.

**Tabela 2.3.** *Primers* e sondas usadas para a genotipagem do polimorfismo rs1805034

<i>Primers</i> e sondas	
<i>Primer</i> proximal:	5'AGAGTAGAACATCATGGGACAGAG 3'
<i>Primer</i> distal:	5'GTG GTT TTC TAG CTG GCA GAG A 3'
Sonda para a variante C	5'TAC <u>C</u> CCAAACGTCAA - 3'
Sonda para a variante T	5'TAC <u>T</u> CCAAACGTCAA - 3'

Utilizou-se o mesmo termociclador em tempo real CFX96 (Biorad) e o mesmo protocolo de temperaturas.

Em cada série de PCRs foram utilizados 2 controlos negativos e 3 controlos positivos de amostras representativas dos três genótipos, previamente estudadas por sequenciação (Fig. 2.10).



**Figura 2.10.** Identificação do polimorfismo rs1805034 do gene TNFRSF11 (RANK) por sequenciação. A – homocigoto para o alelo C; B – heterocigoto; C – homocigoto para o alelo T.

## 5 . Análise estatística

Para cada paciente foram analisadas nove variáveis clínicas e relacionadas com o TO, e os 4 SNPs selecionados. A interferência das variáveis com a suscetibilidade à RRAE foi avaliada por um modelo de regressão linear múltipla.

Para a análise de erro intra-operator usou-se o teste t de Student para amostras emparelhadas para a avaliação do erro sistemático e a fórmula de Dahlberg<sup>271</sup> para estimar o erro aleatório.

A análise comparativa de %RRAE dos dentes selecionados efectuou-se pelo teste ANOVA (*one-way repeated measurements ANOVA*) e testes *post-hoc*. Para avaliar a %RRAE de cada dente efectuaram-se os testes à normalidade de *Kolmogorov-Smirnov* e *Shapiro-Wilk*.

A fim de analisar globalmente os fenómenos de %RRAE para cada indivíduo e não apenas para cada dente de forma separada, avaliou-se o valor máximo de %RRAE observado nos seis dentes selecionados de cada paciente, variável designada por %RRAEmax. Para verificar se a distribuição do valor máximo de RRAE era homogénea entre os seis dentes recorreu-se ao teste de ajustamento do qui-quadrado. Usou-se o método de regressão de entrada faseada que sucessivamente adiciona e retira variáveis preditoras do modelo (opção mista *forward/backward* com as regras: probabilidade de entrada 0.05 e de remoção 0.10). Assim, criou-se um modelo de regressão linear múltipla, para explorar a relação entre o valor máximo de RRAE de cada paciente e as variáveis preditoras selecionadas. Utilizou-se o programa SPSS (versão 19.0, *IBM SPSS Statistics for Windows*, IBM Corp.).

O equilíbrio de Hardy-Weinberg foi verificado com o teste do qui-quadrado, considerando-se como estatisticamente significativo um valor de  $p < 0.05$ .

Uma análise de regressão multivariada preliminar foi realizada com os 212 pacientes inicialmente selecionados, para detetar valores em falta e valores atípicos multivariados (*outliers*). Foram eliminados 2 pacientes devido à falta de alguns valores da genotipagem e 15 pacientes devido à sua elevada influência (métrica de Cook maior que  $4/212 = 0.019$ ) ou a um comportamento *outlier* (valores residuais padronizados superior a 2 desvios-padrão). Por conseguinte, a secção de resultados refere-se à amostra final de apenas 195 pacientes.



### 3 - Resultados

---



### 1. Erro intra-operador

Para a análise do erro intra-operador, as ortopantomografias iniciais e finais de 20 pacientes, aleatoriamente selecionados, foram avaliadas duas vezes pela autora deste estudo, num intervalo de 15 dias, e os valores de percentagem de RRAE obtidos foram submetidos a análise estatística.

A avaliação do erro sistemático foi efetuada pelo teste t de Student para amostras emparelhadas e o erro aleatório foi estimado pela fórmula de Dahlberg<sup>271</sup>. Os resultados estão descritos na tabela 3.1.

**Tabela 3.1.** Resultados das avaliações do erro sistemático e do erro aleatório

Dente	1ª Medição		2ª Medição		t	p	Erro de Dahlberg
	Média	DP	Média	DP			
13	6.9	6.0	6.8	5.9	0.8100	0.4292	0.5
12	15.0	14.6	14.9	14.5	0.6600	0.5190	0.6
11	11.9	12.5	11.9	12.3	-0.1000	0.9206	0.9
21	13.4	16.7	13.4	16.2	0.0423	0.9667	1.0
22	12.6	8.6	12.2	8.4	1.3444	0.1946	0.8
23	7.9	8.3	8.2	8.6	-1.1932	0.2475	0.8

DP- desvio-padrão; t- teste t de Student para amostras emparelhadas.

**Nota:** Valores expressos em percentagem de reabsorção.

Relativamente ao erro sistemático, não se verificaram diferenças estatisticamente significativas em nenhum dente entre a primeira e a segunda avaliação ( $p > 0.05$ ). Quanto ao erro aleatório, as estimativas de Dahlberg são clinicamente toleráveis pois variam entre 0.5% e 1% de reabsorção, valores muito inferiores ao limite da normalidade proposto pelos diversos autores<sup>26, 28,</sup>

31, 61

## 2. Caracterização e comparação da reabsorção por dente

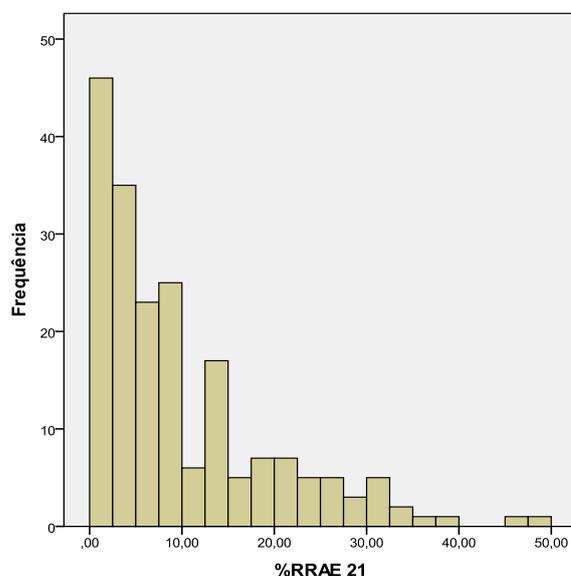
Após um tratamento estatístico preliminar para controlo de valores omissos, *outliers* multivariados e valores influentes, e após exclusão de amostras para as quais faltavam resultados de genotipagem, a amostra inicial de 212 pacientes foi reduzida para 195 pacientes<sup>272</sup>. Os resultados apresentados correspondem a esta amostra final. Na tabela 3.2 apresentam-se os resultados da %RRAE para cada um dos dentes em análise dos 195 indivíduos.

**Tabela 3.2.** Resultados da avaliação da %RRAE para cada dente (n = 195)

Parâmetro	Dentes avaliados						
	13	12	11	21	22	23	
Assimetria	1.7	0.9	1.5	1.5	1.0	1.3	
Média	8.0	11.5	9.5	9.9	10.2	8.3	
Desvio-padrão	6.9	8.6	8.2	9.6	8.1	7.2	
Máximo	47.7	37.0	42.1	49.7	37.0	35.4	
Percentil	25	2.8	4.8	3.5	2.7	3.5	2.9
	50	6.2	9.5	7.2	6.3	8.2	6.6
	75	11.1	17.5	13.9	13.8	15.0	11.3
	95	22.4	29.0	26.4	31.6	26.6	23.7

**Nota:** Valores expressos em %RRAE, exceto para o parâmetro assimetria que mede o afastamento em relação a uma distribuição simétrica (caso em que o parâmetro de assimetria seria aproximadamente zero).

O coeficiente de assimetria apresenta valores positivos em todos os dentes, sugerindo que a distribuição da reabsorção é assimétrica positiva. A título de exemplo, na figura 3.1, apresenta-se a distribuição da RRAE do dente 21, sendo os resultados para os outros dentes semelhantes.



**Figura 3.1.** Histograma relativo à %RRAE do dente 21

Os testes à normalidade de cada uma das distribuições confirmam a assimetria existente, rejeitando a hipótese destas seguirem uma distribuição Normal (Testes de Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk com  $p < 0.000$ ).

Como se pode verificar na tabela 3.2, a reabsorção média variou entre os 8% (dente 13) e os 11.5% (dente 12). O desvio-padrão da reabsorção foi elevado em todos os dentes, apresentando valores próximos dos valores da média. O dente 12 destacou-se por apresentar os valores mais elevados de reabsorção nas medidas de tendência central. Dos 195 indivíduos, metade apresentou uma reabsorção superior a 9.5% neste dente. Os 25% dos pacientes com valores mais elevados, percentil 75 (P75), apresentaram %RRAE superiores a 11.1% para o dente 13 e superiores a 17.5% para o dente 12, enquanto que para os 5% de pacientes com o máximo de reabsorção, percentil 95 (P95), os valores foram superiores a 22.4% para o dente 13 e da ordem dos 30% para os dentes 12 e 21 (Tabela 3.2). A variação de %RRAE do P25 para o P95 é de cerca de 8 a 9 vezes.

O recurso ao teste ANOVA (Tabela 3.3) de medidas repetidas mostrou que havia diferenças estatisticamente significativas entre a reabsorção média de cada tipo de dente (Teste ANOVA de medidas repetidas;  $F = 11.470$ , associado a  $p < 0.001$ , seja com o pressuposto da esfericidade ou com as respetivas correções).

**Tabela 3.3.** Teste ANOVA de medidas repetidas a um fator (reabsorção)

Fonte		Soma de quadrados Tipo III	gl	Média quadrado	F	Sig.
RRAE	Assumindo Esfericidade	0.284	5.000	0.057	11.470	0.000
	Greenhouse-Geisser	0.284	4.637	0.061	11.470	0.000
	Huynh-Feldt	0.284	4.754	0.060	11.470	0.000
	Limite inferior	0.284	1.000	0.284	11.470	0.001
Erro (RRAE)	Assumindo Esfericidade	5.223	1055.000	0.005		
	Greenhouse-Geisser	5.223	978.453	0.005		
	Huynh-Feldt	5.223	1003.137	0.005		
	Limite inferior	5.223	211.000	0.025		

gl – grau de liberdade

Os testes *Post hoc* (Tabela 3.4) mostraram que existiam diferenças significativas entre a RRAE dos dentes caninos e a RRAE dos dentes incisivos, mas não entre incisivos centrais e laterais.

**Tabela 3.4.** Testes Post hoc associados a ANOVA de medidas repetidas a um fator (reabsorção).

(I) RRAE	(J) RRAE	Diferença média (I-J)	DP	Sig. <sup>a</sup>	Intervalo de confiança de 95% para a diferença <sup>a</sup>	
					Limite inferior	Limite Superior
1	2	-.041*	.006	.000	-.060	-.022
	3	-.025*	.007	.003	-.044	-.005
	4	-.030*	.007	.000	-.051	-.009
	5	-.030*	.006	.000	-.049	-.011
	6	-.003	.006	1.000	-.022	.016
2	1	.041*	.006	.000	.022	.060
	3	.016	.006	.164	-.003	.035
	4	.011	.007	1.000	-.010	.032
	5	.011	.007	1.000	-.009	.031
	6	.038*	.007	.000	.017	.059
3	1	.025*	.007	.003	.005	.044
	2	-.016	.006	.164	-.035	.003
	4	-.005	.006	1.000	-.024	.013
	5	-.005	.007	1.000	-.026	.016
	6	.022	.008	.062	-.001	.044
4	1	.030*	.007	.000	.009	.051
	2	-.011	.007	1.000	-.032	.010
	3	.005	.006	1.000	-.013	.024
	5	.000	.008	1.000	-.022	.023
	6	.027*	.008	.006	.005	.050
5	1	.030*	.006	.000	.011	.049
	2	-.011	.007	1.000	-.031	.009
	3	.005	.007	1.000	-.016	.026
	4	.000	.008	1.000	-.023	.022
	6	.027*	.007	.001	.007	.047
6	1	.003	.006	1.000	-.016	.022
	2	-.038*	.007	.000	-.059	-.017
	3	-.022	.008	.062	-.044	.001
	4	-.027*	.008	.006	-.050	-.005
	5	-.027*	.007	.001	-.047	-.007

dente 13, código 1; dente 12, código 2; dente 11, código 3; dente 21, código 4; dente 22, código 5; dente 23, código 6 (Por imposição do SPSS os dentes estão codificados de forma sequencial).

**Notas:** Com base nas médias marginais estimadas \* A diferença média é significativa ao nível .05; **a.** Ajustamento para comparações múltiplas: Bonferroni. Valores expressos em proporção de RRAE

O gráfico de *box plots* da figura 3.2 permite comparar mais facilmente os valores de %RRAE obtidos para cada tipo de dente. Para cada dente, estão representados os valores referentes a: menor valor de reabsorção que não é um *outlier*; sendo zero em todos os dentes; percentil 25 (1º quartil), percentil 50 (2º quartil ou mediana), percentil 75 (3º quartil); maior valor de reabsorção que não é um *outlier*; *outliers* moderados, que se caracterizam por distarem do valor associado ao 3º quartil mais de 1.5 vezes a amplitude inter-quartil, sendo representados por círculos; *outliers* severos, que se caracterizam por distarem do valor associado ao 3º quartil mais de 3 vezes a amplitude inter-quartil, sendo representados por estrelas.

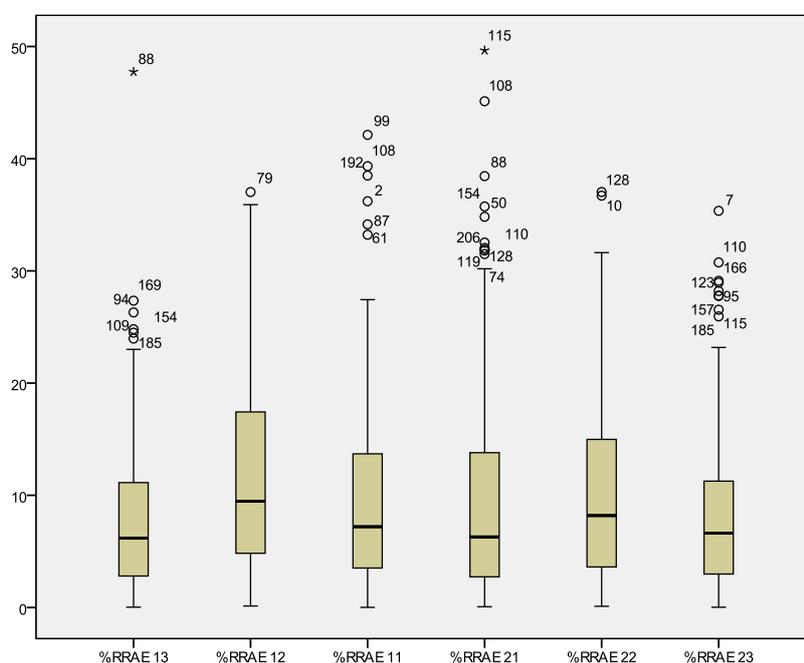


Figura 3.2. Percentagem de RRAE para cada dente sob a forma de *box plots*

O eixo dos Y representa a %RRAE. Círculos indicam *outliers* moderados; estrelas indicam *outliers* severos.  $n = 195$ . Na caixa retangular de cada *boxplot*, o 1º quartil corresponde ao limite inferior da caixa, o 2º quartil corresponde ao traço entre o limite inferior e superior da caixa e o 3º quartil corresponde ao valor do limite superior da caixa.

A configuração das *box plots* apresenta semelhanças entre pares de dentes simétricos: o dente 13 com o dente 23; o dente 12 com o dente 22; o dente 11 com o dente 21. Esta observação sugere que a reabsorção é simétrica em relação ao eixo que divide os dois quadrantes dentários.

Os dentes 13 e 23 apresentaram os valores mais baixos nos três quartis, sugerindo que estes são os dentes menos sujeitos ao fenómeno da reabsorção. Esta observação está de acordo com as diferenças observadas nos testes anteriores *Post hoc* da ANOVA (Tabela 3.4).

Os pacientes com valores de RRAE fora do usual, *outliers* severos, foram revistos para excluir a hipótese de erro de leitura ou introdução de valores. Tendo-se excluído essa hipótese, estes foram mantidos na base de dados.

### 3 . Caracterização da reabsorção por indivíduo

Considerou-se ser clinicamente relevante ter um indicador que refletisse a severidade global da RRAE por indivíduo<sup>268, 272</sup>. Face aos resultados expostos na secção anterior deste capítulo e ao facto da média ser muito sensível a valores extremos, este parâmetro não seria o ideal, pelo que se optou pela percentagem de reabsorção máxima observada nos seis dentes em cada indivíduo (%RRAEmax). As estatísticas de resumo desta variável encontram-se na tabela 3.5.

**Tabela 3.5.** Resultados da %RRAE máxima por indivíduo.

Parâmetro	Estatística	
Média	17.9	
IC de 95% para a média	Limite Inferior	16.5
	Limite Superior	19.2
Mediana	15.8	
Mínimo	1.9	
Máximo	49.7	
Assimetria	0.834	
Percentil 95	36.0	

IC – Intervalo de confiança.

**Nota:** Valores expressos em %RRAE, exceto para o parâmetro assimetria que mede o afastamento em relação a uma distribuição simétrica (caso em que o parâmetro de assimetria seria aproximadamente zero).

Como se observa na tabela 3.5, a média da %RRAEmax é de cerca de 18% e com uma confiança de 95% pode afirmar-se que a média populacional deste indicador global de reabsorção para o indivíduo está entre 16.5% e 19.2%.

A %RRAEmax também evidenciou um coeficiente de assimetria positivo, sugerindo que a sua distribuição não é simétrica, apresentando um enviesamento ligeiramente positivo, ou seja, concentra-se do lado esquerdo, com uma cauda mais acentuada para a direita. Nas distribuições assimétricas, a mediana é o representante mais usado da tendência central, sendo nesta amostra de cerca de 16%.

Na figura 3.3 apresenta-se o histograma da %RRAEmax. Os testes à normalidade desta distribuição, confirmam a assimetria existente, rejeitando a hipótese desta seguir uma distribuição Normal (Testes de Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk com  $p < 0.000$ ).

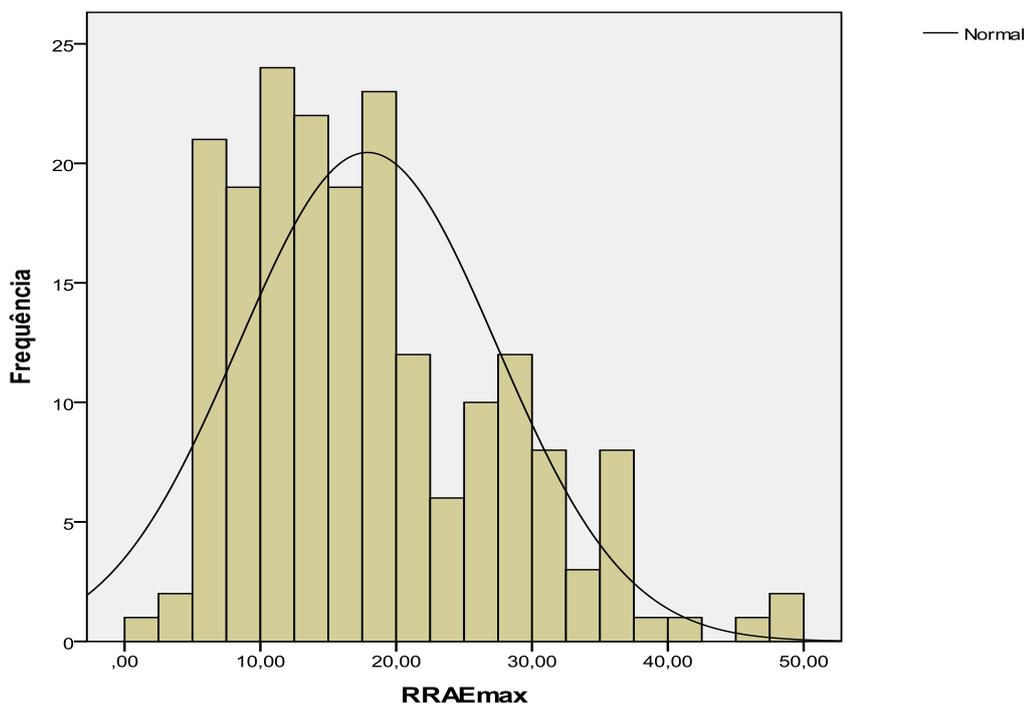


Figura 3.3. Histograma relativo à %RRAEmax

Quando se estuda a frequência de %RRAEmax por dente (Tabela 3.6) verifica-se, mais uma vez, que a distribuição não é homogênea pelos seis dentes. Apenas 19 indivíduos apresentaram a reabsorção máxima no dente 13, por contraste com o dente 12 e com o dente 22, que sofreram a reabsorção máxima em 49 e 42 indivíduos, respetivamente.

Tabela 3.6. Frequências dos dentes que correspondem à %RRAEmax

Dente	Frequência	
	n	%
13	19	9.7
12	49	25.1
11	22	11.3
21	31	15.9
22	42	21.5
23	32	16.4
Total	195	100,0

n – número de indivíduos;

O teste de ajustamento do Qui-Quadrado confirma a heterogeneidade, existindo evidência estatística para afirmar que a %RRAEmax não foi registada com igual frequência em todos os dentes ( $\chi^2 = 22.23$ ;  $gl = 5$ ;  $p = 0.005$ ). Estes resultados reforçam as observações da secção anterior deste capítulo, que assentavam nas medidas de tendência central (Tabela 3.6),

confirmando que os incisivos, em particular os laterais, dentes 12 e 22, são os mais suscetíveis ao fenómeno da reabsorção.

#### 4 . Modelo de previsão de suscetibilidade à RRAE

Nesta secção propõe-se um modelo de previsão de suscetibilidade à RRAE, baseado numa análise de regressão linear multivariada, considerando como a variável dependente do modelo a reabsorção máxima observada nos seis dentes (%RRAEmax)<sup>272</sup>.

##### 4.1. Variáveis independentes

As variáveis independentes, intrínsecas aos pacientes e relacionadas com o TO, consideradas e analisadas enquanto fatores de suscetibilidade para a RRAE foram as seguintes:

- Género – variável qualitativa nominal com a codificação 0 para o género masculino e 1 para o feminino;
- Idade – variável quantitativa discreta expressa em anos;
- Duração do tratamento - variável quantitativa discreta expressa em meses;
- Mordida Aberta Anterior (MAA) – variável qualitativa nominal com a codificação 0 para não e 1 para sim;
- Extração de pré-molares – variável qualitativa nominal com a codificação 0 para não e 1 para sim;
- Aparelho Hyrax - variável qualitativa nominal com a codificação 0 para não e 1 para sim;
- Interposição lingual - variável qualitativa nominal com a codificação 0 para não e 1 para sim;
- Padrão esquelético - variável qualitativa ordinal com 3 níveis. Foi tratada com duas variáveis binárias (Classe II Esquelética e Classe III Esquelética) tendo como referência a Classe I Esquelética;
- *Overjet* - variável quantitativa contínua expressa em milímetros;
- Polimorfismos dos genes *TNFRSF11A*, *TNFRSF11B*, *IL1B* e *P2RX7* – 4 variáveis qualitativas nominais com 3 categorias (duas para homozigotia e uma para heterozigotia). Foram tratadas com 8 variáveis binárias, sendo AA a categoria de referência para o polimorfismo do gene *P2RX7* e CC a categoria de referência para os polimorfismos dos restantes genes.

#### 4.1.1. Variáveis clínicas

A caracterização da amostra relativamente às variáveis estudadas encontra-se descrita na tabela 3.7. A idade média dos pacientes no início do TO era de cerca de 17 anos com um desvio-padrão de 7 anos e constatou-se uma prevalência de pacientes do género feminino.

A esmagadora maioria dos pacientes apresentaram padrão esquelético de classe I ou II, sendo que apenas 8.7% estavam incluídos na classe III, o que está de acordo com a tendência central para a raça caucasiana. O *overjet* médio foi de 4.24 mm com um desvio-padrão de 5.43 mm. Dos 195 pacientes, 28 apresentaram mordida aberta anterior e 58 interposição lingual. Cerca de 30% dos pacientes necessitaram de extração de 2 pré-molares superiores e apenas 7% dos pacientes usaram o aparelho de expansão maxilar – Hyrax.

A duração média dos tratamentos ortodônticos foi de 36 meses com um desvio-padrão de 10 meses.

**Tabela 3.7.** Caracterização da amostra relativamente aos fatores não genéticos (n=195).

Parâmetros	DP	n	%
<b>Características da amostra</b>			
Idade: Média – 17,24 anos	6.8 anos		
Género masculino		72	36.9 %
Género feminino		123	63.1 %
<b>Dados clínicos</b>			
Padrão esquelético			
Classe I		99	50.8 %
Classe II		79	40.5 %
Classe III		17	8.7 %
<i>Overjet</i> : Média – 3,57 mm	3,07 mm		
Mordida aberta anterior		28	14.4 %
Interposição lingual		58	29.7 %
<b>Dados do TO</b>			
Duração: Média 36 meses	10 meses		
Extração de pré-molares		58	29.7 %
Aparelho de expansão maxilar- Hyrax		14	7.2 %

DP – Desvio-padrão; n – número de indivíduos

#### 4.1.2. Variáveis genéticas

Na tabela 3.8 estão descritas as frequências alélicas e genotípicas encontradas na população. Os alelos mais frequentes são considerados os originais (*wild type*) e os mais raros, as variantes surgidas posteriormente na evolução da espécie humana. Os genótipos dos

homozigotos para a variante mais recente estão sub-representados, particularmente para o SNP rs3102735 do gene *TNFRSF11B*.

O equilíbrio de Hardy-Weinberg foi verificado para os 4 polimorfismos estudados ( $p > 0.05$ ) recorrendo ao teste de  $\chi^2$  com correção de *Yates*.

**Tabela 3.8.** Frequências genotípicas e alélicas dos 4 polimorfismos

rs1805034 ( <i>TNFRSF11A</i> )		rs3102735 ( <i>TNFRSF11B</i> )		rs1143634 ( <i>IL1B</i> )		rs1718119 ( <i>P2RX7</i> )	
Genótipo	n (Frequência)	Genótipo	n (Frequência)	Genótipo	n (Frequência)	Genótipo	n (Frequência)
TT	79 (0.405)	TT	147 (0.754)	CC	104 (0.533)	GG	84 (0.431)
CT	86 (0.441)	CT	43 (0.220)	CT	75 (0.385)	GA	89 (0.456)
CC	30 (0.154)	CC	5 (0.026)	TT	16 (0.082)	AA	22 (0.113)
<b>Alelo</b>	<b>Frequência</b>	<b>Alelo</b>	<b>Frequência</b>	<b>Alelo</b>	<b>Frequência</b>	<b>Alelo</b>	<b>Frequência</b>
T	0.626	T	0.864	C	0.726	G	0.659
C	0.374	C	0.136	T	0.274	A	0.341

n – número de indivíduos; *TNFRSF11B* – gene da OPG; *TNFRSF11A* – gene do RANK  
Frequência alélica = n° de alelos/ n° total de alelos para o *locus* nessa população.

**Nota:** Para um *locus* autossômico, o n° total de alelos é do dobro do n° de indivíduos da amostra. Por exemplo, para o alelo C do SNP do *IL1B*, teríamos  $(2 \times 104 + 75)/2 \times 195$

## 4.2. Modelo de regressão linear

Na elaboração do modelo de previsão de suscetibilidade à RRAE preferiu-se um modelo de regressão linear multivariado e preteriram-se a abordagem por regressão logística e as curvas de ROC, dado que não havia uma variável categórica de *outcome* clínico que se pudesse designar como referência. Os estudos até agora efetuados com regressão logística envolvem o uso de uma medida arbitrária de 2 mm de reabsorção radicular<sup>26, 28, 32, 61</sup>.

Para explorar a correlação entre a %RRAEmax por doente, variável dependente contínua, e as variáveis independentes anteriormente descritas, foi usado um modelo de regressão *stepwise* com a opção mista *forward/backward* que sucessivamente adiciona e elimina variáveis de acordo com dois critérios: probabilidade de entrada igual a 0.05 e probabilidade de remoção igual a  $0.10^{273, 274}$ .

A aplicação deste tipo de modelo requer a validação prévia dos seguintes pressupostos:

- 1 - dimensão da amostra suficiente em relação ao número de variáveis independentes;
- 2 - controlo de valores omissos, *outliers* multivariados e valores influentes;
- 3 - ausência de multicolinearidade e de singularidade;
- 4 - normalidade, linearidade, homocedasticidade e independência dos resíduos.

Relativamente aos pontos 1 e 2, como já foi referido anteriormente, o número de elementos, 195, resulta de um tratamento estatístico preliminar que foi aplicado tendo em vista o controlo de valores omissos, *outliers* multivariados e valores influentes. Desta forma, 2 indivíduos foram removidos devido à presença de valores omissos em alguma das variáveis genéticas; o controlo de *outliers* e valores influentes foi efectuado através de um modelo de regressão linear preliminar, envolvendo todas as variáveis independentes anteriormente referidas, do que resultou a exclusão de quinze indivíduos por apresentarem elevada influência (*Cook's D* superior a  $4/n=0.019$ ) ou comportamento de *outlier* multivariado (resíduos estandardizados superiores a dois desvios-padrão).

Há autores<sup>275</sup> a sugerir um mínimo de 5 observações por cada variável independente. Tendo sido usadas 18 variáveis independentes, seria necessário um mínimo de 90 indivíduos, pelo que uma amostra de 195 indivíduos poderá ser considerada adequada.

A ausência de multicolinearidade e de singularidade, ponto 3, foram validadas pelas métricas *Tolerance* e VIF. A tabela 3.9 apresenta os valores destas estatísticas, em cada iteração da regressão *stepwise*, para cada uma das variáveis incluídas no modelo.

A estimativa da *Tolerance* para cada variável incluída no modelo foi, em todos os casos, confortavelmente superior ao valor de referência de  $0.10^{274}$ . Do mesmo modo, a estimativa da VIF para cada variável incluída no modelo foi sempre inferior ao valor de referência de  $10^{274}$ . Assim, estas métricas sugerem que o pressuposto da ausência de multicolinearidade e de singularidade não é violado.

Como a regressão *stepwise* envolve um processo iterativo de competição entre todas as variáveis, foram também analisados os valores das estimativas da *Tolerance* e da VIF para as variáveis excluídas de cada modelo. Os valores obtidos também sugerem que o pressuposto da ausência de multicolinearidade e de singularidade não é violado (Anexo 6).

O critério da normalidade dos resíduos, ponto 4, foi averiguado através de um gráfico de probabilidade normal (Fig. 3.4). O gráfico sugere que não há grandes desvios em relação à normalidade dos resíduos, dado que os pontos representados estão razoavelmente distribuídos sobre a diagonal.

**Tabela 3.9.** Estatísticas de colinearidade para as variáveis incluídas no modelo por estágio da regressão *stepwise*

Modelo		<i>Tolerance</i>	VIF
1	(Constante)		
	Duração tratamento	1.000	1.000
2	(Constante)		
	Duração tratamento	.986	1.015
	Ap. Hyrax	.986	1.015
3	(Constante)		
	Duração tratamento	.985	1.015
	Ap. Hyrax	.972	1.029
	P2RX7GG	.986	1.015
4	(Constante)		
	Duração tratamento	.915	1.092
	Ap. Hyrax	.940	1.064
	P2RX7GG	.978	1.022
	Extração PM	.905	1.105
5	(Constante)		
	Duração tratamento	.910	1.099
	Ap. Hyrax	.925	1.081
	p2rx7GG	.960	1.041
	Extração PM	.903	1.107
	Género	.952	1.051

*Tolerance* – métrica usada para o diagnóstico de multicolinearidade; VIF- métrica usada para o diagnóstico de multicolinearidade.

**Nota:** Variável dependente: %RRAE máxima.

Os pressupostos linearidade, homocedasticidade e independência dos resíduos foram validadas através da análise da dispersão dos pontos cujas coordenadas são os valores preditos pelo modelo e os respectivos resíduos (Fig. 3.5). Como se pode observar na figura 3.5, a nuvem de pontos apresenta uma dispersão bem enquadrada no interior de uma forma retangular, sugerindo a linearidade e a homocedasticidade dos resíduos.

Relativamente ao pressuposto da independência dos resíduos, admitimos a sua validade dada a independência da RRAE entre pacientes.

O modelo de regressão *stepwise* com a opção mista *forward/backward* convergiu ao fim de cinco iterações (Anexo 6). No estágio final o modelo mostrou que as variáveis clínicas e genéticas (Tabela 3.10) selecionadas explicam 27% da variabilidade da %RRAEmax (ANOVA:  $F = 15.315$ ,  $p = 0.000$ ; coeficiente de determinação ajustado = 0.270,  $n = 195$ ).

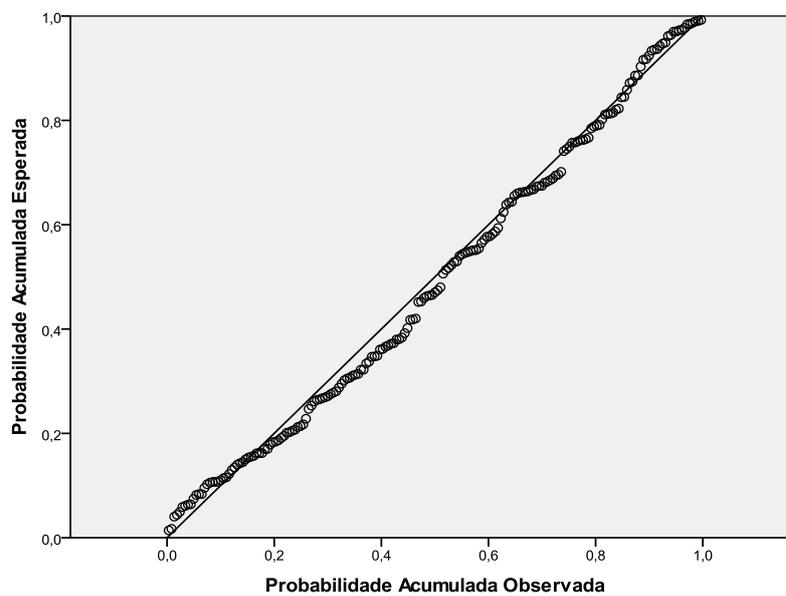


Figura 3.4. Gráfico de probabilidade normal dos resíduos de regressão estandarizados. Variável dependente: %RRAEmax

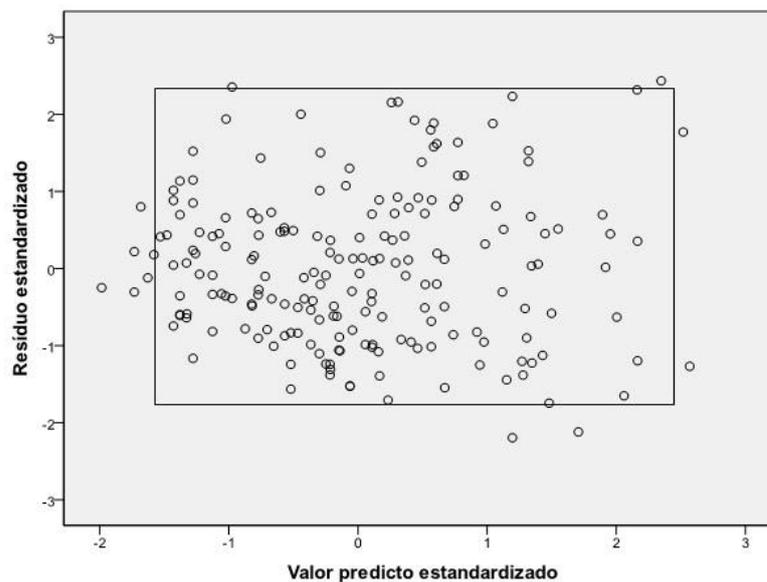


Figura 3.5. Gráfico de dispersão entre os valores preditos pelo modelo e os resíduos associados. Variável dependente: %RRAEmax

Tabela 3.10. Resultados do modelo de regressão linear múltipla <sup>a</sup>

Parâmetros	n	%	Coeficiente não <i>standard</i>		Coeficiente <i>standard</i>		$\rho$
			B	DP	Beta	t	
(Constante)			7.6	2.4		3.145	0.002
Feminino	123	63 %	-3.2	1.2	-0.162	-2.580	0.011
Duração do TO (meses)			0.3	0.1	0.275	4.270	0.000
Extração pré-molar	58	30 %	4.0	1.3	0.193	2.990	0.003
Aplicação Hyrax	14	7 %	8.4	2.3	0.230	3.599	0.000
<i>P2RX7</i> - GG (referência- AA)	84	43 %	3.1	1.2	0.162	2.595	0.010

**a** - Modelo de regressão linear múltipla tendo a %RRAEmax como variável dependente e todas as outras como variáveis independentes; B – valores de coeficientes não standardizados; DP – desvio padrão; Beta – valores de coeficientes standardizados.

As variáveis com uma contribuição significativa ( $p < 0.05$ ) para o modelo foram as seguintes: gênero ( $p < 0.05$ ), duração do tratamento ( $p < 0.001$ ), extração de pré-molares ( $p < 0.01$ ), aplicação Hyrax ( $p < 0.001$ ) e genótipo GG do SNP do gene *P2RX7* ( $p < 0.01$ ). Todas as outras variáveis foram excluídas do modelo pelo método *stepwise*.

A tabela 3.10 descreve a contribuição de cada variável incluída no modelo, assumindo que todas as outras permanecem constantes, constatando-se que, em média:

- Os valores de %RRAEmax para o gênero feminino foram 3.2% inferiores aos do sexo masculino (B = - 3.2);
- Cada mês adicional de tratamento representa um aumento de 0.3% (B = 0.3) da %RRAEmax;
- Os indivíduos com extração de pré-molares apresentam 4% mais de %RRAEmax (B=4.0);
- O uso do aparelho de expansão Hyrax incrementa a %RRAEmax em 8.4% (B = 8.4);
- A presença do genótipo GG do gene *P2RX7* está associada a um incremento de 3.1% de %RRAEmax (B = 3.1), relativamente aos outros genótipos deste gene para o SNP considerado.

Da tabela 3.10 pode-se extrair também a seguinte de equação que serve de modelo de predição da %RRAEmax:

$$\%RRAEmax = 7.6 - 3.2 \times \text{Género} + 0.3 \times \text{Duração} + 4 \times \text{Extração} + 8.4 \times \text{Hyrax} + 3.1 \times P2RX7_{GG}$$

Os valores a atribuir às variáveis independentes nesta equação, são os seguintes:

Género Feminino - 1

Género Masculino - 0

Duração do tratamento – N<sup>o</sup> de meses de TO previsto

Extração dos 2 pré-molares superiores - 1

Não extração dos 2 pré-molares superiores – 0

Aplicação de aparelho Hyrax – 1

Não aplicação de aparelho Hyrax – 0

*P2RX7*, genótipo GG – 1

*P2RX7*, genótipo AA ou GA - 0

#### 4.3. Duração do tratamento por estádios

Dada a relevância da variável tempo de tratamento e os resultados contraditórios apresentados pelos diferentes autores, analisou-se o comportamento da variável ao longo do tempo, para o que se definiram 4 estádios: 1) entre 1 e 24 meses; 2) entre 25 e 36 meses; 3) entre 37 e 48 meses e 4) mais de 48 meses. A variável estágio, ou intervalo de tempo (variável qualitativa ordinal), foi tratada com três variáveis binárias, tendo como referência o estágio de 1-24 meses.

Para testar a necessidade de diferentes coeficientes por estágio, foi realizada uma regressão linear múltipla sobre a %RRAEmax com 4 variáveis independentes: a duração do tratamento e as três variáveis binárias referentes aos estádios (mais detalhes no Anexo 6). Contudo, os resultados, descritos na tabela 3.11, mostraram que os coeficientes por estágio não eram significativos ( $p > 0.1$ ), pelo esta variável não foi integrada no modelo final. Verifica-se, pois, que a contribuição da variável duração do tratamento se mantém relativamente constante ao longo do tempo.

**Tabela 3.11.** Resultados do modelo de regressão linear múltipla para vários intervalos de duração do tratamento

Modelo I	Coeficiente não <i>standard</i>		Coeficiente <i>standard</i>		
	B	DP	Beta	t	p
(Constante)	5.6	4.0		1.393	0.165
Duração tratamento (meses)	0.4	0.2	0.456	2.401	0.017
Duração tratamento: 25-36 m	-2.7	2.8	-0.140	-0.938	0.350
Duração tratamento: 37-48 m	4.7	4.5	-0.223	-1.047	0.296
Duração tratamento: ≥ 49 m	-2.7	6.3	-0.097	-0.423	0.673

Modelo de regressão linear múltipla tendo a %RRAEmax como variável dependente e todas as outras como variáveis independentes; B – valores de coeficientes não estandardizados; DP – desvio padrão; Beta – valores de coeficientes estandardizados

#### 4.4. Epistasia entre os genes *IL1B* e *P2RX7*

Dada a interferência funcional entre as proteínas P2RX7 e IL1B anteriormente descritas, quer ao nível das células imunoinflamatórias quer o nível das células do osso alveolar, avaliou-se a existência de epistasia entre os polimorfismos estudados dos respetivos genes.

Para o SNP do gene *IL1B*, escolhemos o alelo C, habitualmente considerado a variante de risco, como alelo de base, e para o SNP do gene *P2RX7* selecionou-se o alelo A, ao qual é atribuído um ganho de função (Tabelas 3.12 e 3.13). Os cruzamentos CC-AA e CT-AA não foram considerados por estarem pouco representados na amostra (Tabela 3.12).

**Tabela 3.12.** Análise de epistasia entre os genes *IL1B* e *P2RX7*

Tipo	Frequência n	Frequência %
CC-AG	45	23.1 %
CC-AA	13	6.7 %
CT-AG	38	19.5 %
CT-AA	6	3,1 %

Foram realizados dois testes t-Student, um para testar a igualdade entre a média da %RRAEmax para o subgrupo CC-AG e a média da %RRAEmax para a população (Tabelas 3.13) e outro para testar a igualdade entre a média da %RRAEmax para o subgrupo CT-AG e a média da %RRAEmax para a população (Tabelas 3.14).

Os indivíduos com o cruzamento CC-AG apresentaram um valor médio de %RRAEmax inferior aos restantes (15.7 e 18.5% respetivamente), no entanto, o teste t-Student mostra que não há diferenças significativas ( $p > 0.05$ ) entre os valores médios da %RRAEmax para os indivíduos com o cruzamento CC-AG e a restante população (Tabelas 3.13).

**Tabela 3.13.** Resultados do teste t-Student para o subgrupo CC-AG

		Estatística de grupo				
Epistasia		n	Média	DP	Erro padrão	
%RRAEmax	restantes	150	18.5	9.7	0.8	
	CC-AG	45	15.7	8.4	1.2	

Teste t de amostras independentes										
		Teste de Levene		Teste-t para igualdade de médias						
		F	Sig.	t	gl	$p$ (bilateral)	diferença de médias	DP	IC 95% para a diferença	
									Inf.	Sup.
%RRAEmax	C1	0.708	0.401	1.761	193	0.080	2.8	1.6	-0.3	6.0
	C2			1.907	82.673	0.060	2.8	1.5	0.1	5.8

n – número de indivíduos; gl – grau de liberdade; DP – Desvio padrão; C1 - Assumindo variâncias iguais; C2 - Não assumindo variâncias iguais

Os indivíduos com o cruzamento CT-AG apresentaram um valor médio de %RRAEmax inferior aos restantes (16 e 18.3% respetivamente), no entanto, o teste t-Student também mostra que não há diferenças significativas ( $p > 0.05$ ) entre os valores médios da %RRAEmax para os indivíduos com o cruzamento CT-AG e a restante população (Tabelas 3.14).

Concluiu-se que a epistasia dos genes *IL1B* (alelo C) e *P2RX7* (alelo A) no mesmo indivíduo não se traduz em diferenças na suscetibilidade à RRAE. Assim, não se considerou a variável epistasia dos genes *IL1B* e *P2RX7* para o modelo final.

Tabela 3.14. Resultados do teste *t-Student* para o subgrupo CT-AG.

Estatística de grupo					
	Epistasia	n	Média	DP	Erro padrão
%RRAEmax	restantes	157	18.3	9.8	0.8
	CT-AG	38	16.0	8.0	1.3

Teste t de amostras independentes											
		Teste de Levene		Teste-t para igualdade de médias							
		F	Sig.	t	gl	p (bilateral)	diferença de médias	DP	IC 95% para a diferença		
										Inf.	Sup.
%RRAEmax	C1	6.926	0.009	1.356	193	0.177	2.3	1.7	-1.7	5.7	
	C2			1.535	66.773	0.129	2.3	1.5	-0.7	5.3	

n – número de indivíduos; gl – grau de liberdade; DP – Desvio padrão;; C1 - Assumindo variâncias iguais; C2 - Não assumindo variâncias iguais

## 4 - Discussão

---



A RRAE é uma das complicações iatrogênicas do tratamento ortodôntico. É um fenótipo complexo ou multifatorial, determinada por fatores de risco mecânicos e biológicos, incluindo a suscetibilidade genética. A definição precisa dos fatores envolvidos e a quantificação da sua contribuição não tem, contudo, sido fácil.

A identificação dos perfis moleculares de suscetibilidade à RRAE permite desvendar os mecanismos envolvidos e abre caminho à prevenção e ao planeamento mais personalizado do tratamento ortodôntico. No presente estudo, propusemo-nos estudar treze variáveis clínicas ou relacionadas com o TO e os polimorfismos de quatro genes candidatos, a fim de construir um modelo integrado, multifatorial, de suscetibilidade para a RRAE.

## I . Desenho do estudo

A necessidade de uma amostra que ultrapassasse os 100 doentes, dado o número de variáveis envolvidas e as suas características e os limites de tempo que urgia cumprir, pouco compatíveis com um seguimento prospetivo de cada doente de pelo menos 2 anos, motivaram a opção por um estudo retrospectivo e pela OPT como método de diagnóstico.

Da totalidade de processos inicialmente analisados, devido à aplicação rigorosa de todos os critérios de inclusão e à ausência de resposta de alguns pacientes, apenas 212 foram selecionados. Posteriormente, foram excluídos 2 pacientes por dificuldades na genotipagem e outros 15 por imperativo da análise estatística ficando a amostra final com 195 pacientes. Salientamos que dos estudos publicados de suscetibilidade genética à RRAE, a maioria analisa amostras com menos de 100 doentes, o que aumenta a probabilidade de falsos positivos e dificulta a identificação de variáveis genéticas de baixa penetrância. Este é um dos estudos de suscetibilidade genética à RRAE com maior número de dentes analisados.

Os dentes estudados foram selecionados por serem dos mais afetados pela patologia e dos menos expostos às limitações da OPT. A análise efetuada aos caninos, que, tanto quanto sabemos só foi anteriormente realizada por dois autores<sup>30, 116</sup>, exigiu que apenas fossem incluídos os doentes com desenvolvimento completo das raízes. Com base nos valores médios das tabelas de Nolla<sup>276</sup> para a calcificação dos dentes permanentes, o desenvolvimento dos caninos maxilares está no estágio 9 aos 13 anos e no estágio 10 aos 14 anos, tanto para o sexo feminino como masculino. As diferenças entre os 2 sexos para a calcificação dos dentes são menores do que para o desenvolvimento ósseo<sup>277</sup> citado por MOYERS<sup>278</sup>. As tabelas de calcificação apresentam valores médios e há sempre indivíduos com calcificação precoce ou tardia, ou seja, há uma grande variabilidade individual na idade dentária. Esta variabilidade na calcificação dos dentes permanentes é muito maior do que em geral se supõe, e a verdade é

que as tabelas mais conhecidas e difundidas do desenvolvimento dentário foram baseadas em estudos de amostras muito pequenas<sup>279</sup> citado por MOYERS<sup>278</sup>. Na amostra de pacientes analisada neste trabalho, tal como em toda a população, também há alguns pacientes com calcificação precoce.

Não obstante as vantagens reconhecidas da radiografia periapical, em estudos de investigação recentes sobre a RRAE induzida pelo tratamento ortodôntico, a OPT, associada ou não à telerradiografia de perfil da face, continua a ser frequentemente utilizada<sup>28, 30, 32, 261</sup>. Um dos principais motivos prende-se com o facto de ser universal, no exercício da ortodontia clínica, requisitar por rotina a radiografia panorâmica e a telerradiografia de perfil da face, dado que são ferramentas essenciais para o diagnóstico e planeamento do tratamento. Além disso, a OPT apresenta algumas vantagens quando comparada com a radiografia periapical, permitindo uma menor exposição à radiação, menor consumo de tempo e a visualização imediata de toda a dentição e estruturas adjacentes. Os estudos de avaliação da RRAE que recorrem à OPT incluem frequentemente mais dentes e amostras de maiores dimensões<sup>30, 61, 122, 209</sup>. Contudo, a utilidade da telerradiografia de perfil da face na deteção da reabsorção radicular é limitada pela sobreposição dos dentes e no caso da OPT pelo facto dos ápices radiculares poderem estar situados fora da zona focal<sup>236</sup>. As limitações das medições na OPT são o fator de ampliação e as distorções. Este exame pode sobrestimar a quantidade de perda radicular em aproximadamente 20%-35%<sup>234</sup>, mas este fator de ampliação é relativamente constante na dimensão vertical<sup>235, 237</sup>, precisamente o parâmetro mais importante na análise da RRAE<sup>240</sup>. Além disso, principalmente devido à distorção da imagem, a comparação de uma panorâmica com um *status* periapical revelou diferenças máximas nos incisivos inferiores, mas mínimas nos incisivos superiores<sup>234</sup>, justamente os dentes mais frequentemente afetados e avaliados no presente trabalho<sup>61</sup>.

Por sua vez, a radiografia periapical permite obter imagens com mais pomenor, menor distorção e com um fator de ampliação usualmente inferior a 5%<sup>238, 240</sup>. Há vários estudos recentes sobre a RRAE associada à ortodontia com este tipo de radiografia<sup>25, 26, 111, 116, 280, 281</sup> mas o número de dentes estudados raramente ultrapassa os quatro (os incisivos superiores) e o número de doentes é reduzido. Por outro lado, mesmo este exame foi já questionado como método ideal para a medição da raiz com precisão, devido a erros provocados pela variabilidade da forma do dente<sup>241</sup>.

A tomografia computadorizada de feixe cónico (TCFC) possibilita imagens 3D de elevada precisão (sub-milimétrica), permitindo evitar erros e aumentar a reprodutibilidade das medições<sup>247, 282</sup>, com muito menor exposição radiográfica que as técnicas convencionais 3D<sup>242, 243</sup>. Não fosse este acréscimo de dosagem de radiação e o seu elevado custo, comparativamente às radiografias convencionais em 2D, e a TCFC seria, provavelmente, o

método de diagnóstico ideal para a avaliação da RRAE. Estudos que comparam a TCFC com a radiografia periapical<sup>253, 283</sup> e com a OPT<sup>252</sup>, concluem que estes dois últimos exames radiográficos subestimam a quantidade de RRAE quando comparados com a TCFC. Como a OPT havia sido descrita como sobrestimando a reabsorção radicular, fica-se na dúvida sobre o tipo e valor do erro de diagnóstico inicialmente atribuído à OPT. Faltam estudos comparativos dos três métodos com amostras de dimensão suficiente, e sobretudo, que avaliem a evolução clínica, porque muito provavelmente, as reabsorções mínimas, não terão consequências na estabilidade dentária.

Neste estudo, para minimizar as limitações intrínsecas à OPT, foram tomadas várias precauções e adotadas metodologias específicas. As radiografias foram realizadas com o mesmo equipamento, um ortopantomógrafo *Gendex Orthoralix SD-2 CEPH*, com um fator de ampliação de 1.25:1. Os doentes com imagens que não cumpriam os critérios de qualidade, foram excluídos. Verificou-se sempre o posicionamento da cabeça, o fator de erro mais relevante associado às medições na OPT<sup>61, 284</sup>.

Estudos recentes demonstram que a combinação de processamento digital de imagens e de técnicas de inteligência artificial permitem o desenvolvimento de métodos novos e mais precisos para a análise de radiografias<sup>266</sup>. Atualmente a ortodontia é uma das especialidades da Medicina dentária em que as técnicas de processamento de imagem digital são cada vez mais úteis para o diagnóstico clínico e planeamento virtual do TO. O modo de medição utilizado pelos diferentes autores varia desde o recurso a softwares comerciais como ARARA<sup>26</sup> ou o Nemoceph<sup>32, 261</sup>, a medições manuais com um paquímetro de precisão de 0.1mm<sup>28</sup>. A implementação de um protótipo de *software* (ARIAS), especificamente desenvolvido para este trabalho, permitiu uma melhoria no grau de precisão e reprodutibilidade das medições nas radiografias panorâmicas digitais, simplificando o processo e evitando a introdução de erros humanos. O programa permite melhorar a qualidade da imagem e a facilidade e precisão com que se determinam os pontos para as medições, possibilita o registo dos valores, introduz o fator de correção com base na variação do comprimento da coroa entre a OPT inicial e a OPT final e ainda faz o cálculo automático da % de RRAE para cada dente do paciente.

As imagens foram todas analisadas pelo mesmo operador, especialista em ortodontia. O estudo de variabilidade intra-operador (teste t) não encontrou diferenças estatisticamente significativas entre a primeira e a segunda avaliação para qualquer um dos dentes estudados ( $p > 0.05$ ), pelo que podemos afirmar que a metodologia não apresenta erro sistemático. Relativamente ao erro aleatório, as estimativas de Dahlberg<sup>271</sup> são clinicamente toleráveis pois variam entre 0.5% e 1% de reabsorção.

As limitações da ortopantomografia foram igualmente minimizadas pelo método selecionado para calcular a RRAE, já anteriormente utilizado por outros autores<sup>26-28, 261</sup>. Trata-se do método de Linge e Linge<sup>17</sup> modificado por Brezniak *et al.*<sup>263</sup>, que permite compensar o fator de ampliação da OPT. A avaliação da RRAE foi efetuada pela % de RRAE, calculada a partir da razão entre as dimensões da raiz final corrigida e a raiz inicial (R2C/RI). A análise da RRAE como uma percentagem do comprimento da raiz inicial, em vez do uso de medições em valores absolutos (usualmente em milímetros) tem a vantagem de ser uma avaliação clínica mais realista do grau de redução da dimensão da raiz, uma vez que há variações nos comprimentos radiculares dos diversos dentes de uma população e entre diferentes populações. De facto, o mesmo valor de RRAE pode ser clinicamente mais ou menos significativo, dependendo da raiz ser menor ou maior. Embora a maioria dos autores avalie a RRAE pela diferença entre os valores iniciais e finais da raiz em milímetros, alguns também recorrem a valores percentuais. Há dois trabalhos<sup>2, 115</sup> em que a RRAE foi calculada inicialmente em milímetros e depois convertida em percentagem, usando a fórmula:  $(RI - R2)/RI \times 100$ . Gulden *et al.*<sup>30</sup> expressaram-na através da razão coroa/raiz, em %.

Para além da análise geral da suscetibilidade de cada dente para a %RRAE, considerou-se ser importante encontrar um parâmetro global que refletisse a gravidade clínica e simultaneamente a suscetibilidade individual para este fenótipo. Pelo facto da média (reabsorção média dos seis dentes analisados) ser muito sensível a valores extremos, e da mediana suavizar a severidade da reabsorção, concluiu-se que estes parâmetros não seriam os ideais. Em alternativa, optou-se, tal como fizeram Linge e Linge<sup>24</sup> e Al-Qawasmi *et al.*<sup>61</sup>, por escolher o dente com máximo valor de reabsorção de entre os seis dentes, como o indicador de RRAE para cada indivíduo. Contudo, enquanto os referidos autores avaliaram o valor máximo de RRAE de cada paciente em milímetros, neste trabalho optou-se pela %RRAEmax.

Neste trabalho optou-se por analisar a RRAE como uma variável contínua e não como variável discreta. Como já anteriormente referido, a maioria dos estudos tem considerado como limiar para a significância clínica de RRAE o valor de 2 milímetros<sup>61, 209</sup>. Contudo, este critério é apenas estatístico e a sua correlação clínica, nomeadamente com a excessiva mobilidade dentária, a necessidade de contenção ortodôntica com retentor fixo colado, ou mesmo a perda dentária, nunca foi comprovada. Dada a inexistência de critérios clínicos bem definidos, não se efetuaram estudos de regressão logística. Alguns, raros autores também optaram por uma análise de regressão linear<sup>113, 116</sup>.

## 2 . Valores de Reabsorção Radicular Apical Externa (RRAE)

A prevalência da RRAE associada ao tratamento ortodôntico é muito variável na literatura, dependendo dos métodos e critérios de diagnóstico utilizados e das características da amostra<sup>8</sup>, podendo ir de zero a 100 por cento<sup>12</sup>.

Avaliando cada um dos 6 dentes individualmente, a média da %RRAE encontrada variou entre 8% (dente 13) e 11.5% (dente 12), a mediana oscilou entre 6.2% (dente 13) e 9.5% (dente 12) e só 5% dos doentes (percentil 95) tiveram dentes com valores de %RRAE superiores a 22.4% (Tabela 3.2). Relativamente à %RRAEmax (%RRAE máxima por indivíduo), encontrámos uma média de 18% ( $\pm 9.5\%$ ), uma mediana de 16%, um valor mínimo de 1.9%, um máximo de 49.7% e um percentil 95 de 36%. A comparação com outros autores é dificultada pela diversidade de metodologias usadas. Dos autores, anteriormente referidos, que também usaram a RRAEmax, nenhum usou valores em percentagem, tendo um deles recorrido a radiografias periapicais<sup>24</sup> e o outro a OPT e a telerradiografia de perfil da face<sup>61</sup>. De qualquer modo, a reabsorção severa, para muitos autores definida como a perda radicular superior a 5 mm ou a que atinge mais de um terço do comprimento da raiz ( $>33\%$ ), tem sido descrita em 2-5% dos pacientes ortodônticos<sup>21, 174</sup>, valores próximos dos 36% que encontrámos para o percentil 95 (Tabela 3.5). A comparação dos resultados deste trabalho com os demais autores é possível se convertermos as medições em milímetros em % de RRAE usando os valores de referência para as dimensões das raízes dentárias<sup>285</sup>. Considerando, por exemplo, o incisivo central superior, o tamanho médio da raiz é de 16,5 mm, pelo que 5 mm de raiz correspondem a 30% do comprimento radicular.

À semelhança do que aconteceu em estudos anteriores<sup>19, 30, 61, 116, 122, 244</sup>, verificámos que os incisivos superiores foram os dentes que apresentaram maior grau de reabsorção, com diferenças estatisticamente significativas de RRAE em relação aos restantes dentes. A maior suscetibilidade à RRAE pode dever-se ao facto da extensão do movimento ortodôntico destes dentes ser usualmente maior do que na dentição restante, e das características estruturais da raiz dos incisivos, que na sua relação com o osso e o LP, tendem a transferir a maioria das forças para o ápice<sup>286</sup>.

Embora os resultados da avaliação da RRAE para cada dente dos 195 indivíduos não evidenciem diferenças significativas entre incisivos centrais e laterais (Tabela 3.2), ao analisarmos as frequências dos dentes correspondentes à %RRAEmax por indivíduo (Tabela 3.6), verificámos que os incisivos laterais estão mais frequentemente envolvidos do que os incisivos centrais.

Assim, os resultados obtidos neste trabalho e nos já previamente publicados não divergem significativamente, não obstante as diferenças metodológicas, como o tipo de exame imagiológico, OPT ou periapical, ou o método de avaliação da RRAE utilizados.

### 3 . Fatores não genéticos

Dos fatores analisados, os que revelaram ter uma contribuição significativa para a RRAE foram a duração do tratamento, o gênero, o uso de aparelho Hyrax, as extrações de pré-molares e a homozigotia para o alelo G do polimorfismo rs1718119 (gene *P2RX7*). No conjunto, estes fatores explicaram 27% da variabilidade fenotípica da amostra estudada. Vamos referir-nos a cada um dos fatores estudados, em particular, aos que se mostraram relevantes, iniciando pelos não genéticos.

O gênero já tinha sido anteriormente descrito como fator de suscetibilidade para a RRAE<sup>2, 68, 168</sup>, embora com resultados contraditórios. Baumrind *et al.*<sup>68</sup>, tal como no presente estudo, verificaram uma maior suscetibilidade para o gênero masculino, enquanto Kjaer<sup>68</sup> e Mohandesan *et al.*<sup>2</sup> identificaram o gênero feminino como o mais suscetível. Nos resultados aqui apresentados, os valores médios para o gênero feminino foram apenas 3 por cento inferiores aos do gênero masculino ( $p < 0.011$ ). A causa da variabilidade entre homens e mulheres não está esclarecida, podendo atribuir-se a diferenças dos perfis hormonais que se repercutam no metabolismo ósseo e na idade de maturação óssea ou a variações da resposta imunoinflamatória. A variação da exposição a fatores ambientais, como o tabaco, de uso frequente mesmo na adolescência, também não pode ser excluída. As discordâncias entre os resultados dos vários autores podem dever-se a diferenças metodológicas, a estratificação da população e à interferência de outros fatores como a variação genética entre populações.

Os resultados que descrevemos reforçam a relação direta, descrita por outros autores, entre a duração do tratamento e a probabilidade de ocorrência de RRAE<sup>2, 12, 19, 68, 111, 287</sup> e contrariam os resultados de outros, que não evidenciaram qualquer papel relevante para este fator<sup>24, 116</sup>. Em alguns casos, a discrepância de resultados poderá estar relacionada com o tempo de tratamento médio dos doentes. No presente trabalho, a média da duração do tratamento foi de 36 meses, com um desvio padrão de 10 meses; quanto aos autores que não encontraram qualquer correlação, na amostra de Mirabella e Artun<sup>116</sup> o período de tratamento foi mais curto, de 24 meses +/- 8 meses, mas no trabalho de Linge e Linge<sup>24</sup> foi mais longo, de 36 +/-16 meses.

Baumrind *et al.*<sup>68</sup> sugerem que, por cada ano de tratamento ortodôntico, ocorrem 0.38 mm de reabsorção radicular. No presente trabalho, encontrou-se um aumento médio de

reabsorção radicular de 0.3% por cada mês, o que equivale a 3.6% de acréscimo de RRAE por cada ano. Como usualmente um TO tem uma duração de cerca de 2 anos, é importante avaliar se o risco de RRAE é maior a partir deste período. Levander e Malmgren<sup>22</sup> dividiram os doentes em grupos, consoante a duração do tratamento tinha sido de um, dois, ou mais de dois anos, mas apenas concluíram que o tempo total se relacionava com a RRAE. Já Nanekrungsan *et al.*<sup>15</sup>, verificaram um aumento progressivo da incidência de % de RRAE a partir do início do 3º ano de tratamento. No nosso trabalho, dividindo os pacientes em 4 grupos, consoante o TO durou até 2 anos, entre 2 e 3 anos, entre 3 e 4 anos e mais de 4 anos, verificou-se que o risco era constante ao longo dos anos, com um aumento em média de 3,6% por cada ano adicional.

A aplicação de aparelho de expansão Hyrax revelou-se um fator de suscetibilidade à RRAE. Sempre que se aplicou este aparelho ele foi cimentado no início do tratamento de forma a obter a adequada dimensão transversal do maxilar o mais rapidamente possível e foi seguido um protocolo relativo à ativação e ao período de contenção. Os estudos até agora efetuados salientaram o facto de o aparelho Hyrax induzir reabsorção radicular sobretudo nos dentes de ancoragem, que são os molares e pré-molares<sup>130, 151-153, 288</sup>. A associação que identificámos entre a expansão maxilar rápida por aplicação de Hyrax e a RRAE dos incisivos maxilares, tanto quanto sabemos, só foi relatada em modelos animais<sup>154</sup>. Num dos raros estudos que relacionou a RRAE com o uso de expansores palatinos e em que não foi evidente qualquer correlação<sup>19</sup>, estudaram-se os incisivos centrais com radiografias cefalométricas, um tipo de exame com uma definição da região apical destes dentes inferior à da OPT. Um trabalho recente com a TCFC conclui que o aparelho Hyrax reduz o volume das raízes dos dentes posteriores de ancoragem, mas os restantes dentes não foram avaliados<sup>153</sup>.

Uma possível explicação para a associação que encontramos entre o uso de expansor palatino e a RRAE nos incisivos superiores é o facto de estes dentes poderem ter sido sujeitos a *tipping* durante a fase ativa e de contenção do aparelho Hyrax. No estudo em modelos animais de Vardimon *et al.*<sup>154</sup>, o *tipping* dos incisivos centrais deu-se preferencialmente por movimentação distal do ápice, enquanto a coroa se manteve estacionária, criando maior proximidade dos ápices de incisivos centrais e laterais, o que pode ter causado a reabsorção radicular. Há alguns estudos a sugerir que as raízes dos incisivos superiores sofrem reabsorção quando entram em contato próximo ou são movimentadas contra estruturas de grande densidade, como as coroas de caninos impactados<sup>262</sup> ou as corticais ósseas vestibulares<sup>289</sup> ou palatinas<sup>259</sup>. No nosso estudo retrospectivo este fator não pode ser avaliado. Além disso, nos pacientes a quem colocamos o aparelho Hyrax, não se verificaram diferenças de RRAE estatisticamente significativas entre os incisivos laterais e centrais, que foram os mais afetados.

Apesar de só se ter aplicado o aparelho de Expansão Maxilar Rápida, Hyrax, em 14 (7%) dos nossos pacientes, este fator apresentou um elevado significado estatístico ( $p$  de 0.000) e um coeficiente de regressão de 0.084, o que traduz um incremento de %RRAEmax na ordem dos 8% para os portadores deste aparelho. Por outro lado, como recorreremos a uma análise de regressão linear múltipla, as diferenças encontradas nos pacientes com aplicação de Hyrax não podem ser explicadas pela interferência de outras variáveis estudadas como por exemplo a idade, duração do tratamento ou as extrações de pré-molares. Relativamente à extração dos pré-molares superiores, este procedimento só foi aplicado a um dos 14 pacientes com aplicação de Hyrax. Dada a importância clínica deste fator e o número escasso de pacientes envolvidos, será necessário confirmar estes resultados em amostras de maiores dimensões.

Os pacientes cujo plano de tratamento envolveu a extração de pré-molares superiores apresentaram maior percentagem de RRAE, que se traduziu num aumento de %RRAEmax de 4% ( $p = 0.003$ ). Estes resultados estão de acordo com as conclusões de estudos recentes<sup>2, 19, 287</sup>, embora em desacordo com alguns relatos anteriores<sup>68, 110</sup>. A associação pode explicar-se pelo facto de que no TO realizado após a extração de pré-molares, os caninos e os incisivos serem expostos a uma maior retração, de vários milímetros, especialmente nos casos de grande protrusão incisiva (devido ao *overjet* aumentado). Verificou-se, por exemplo, que nos casos com extração dos 4 pré-molares ocorre mais RRAE do que nos casos sem extração ou com extração apenas dos dois primeiros pré-molares maxilares<sup>19</sup>. Assim, o aumento de RRAE pode estar relacionado com a distância a que os incisivos e caninos são movidos ou com o uso comum de arcos retangulares com torque elevado e com o facto de muitos casos de extração terem um tratamento mais prolongado.

De entre os fatores analisados, alguns não tiveram uma contribuição significativa para a ocorrência de RRAE, pelo que não foram incluídos no modelo de regressão múltipla.

Embora teoricamente os pacientes com maior idade possam ser mais suscetíveis à ocorrência RRAE por apresentarem o terço apical da raiz mais fortemente ancorado, o que poderá contribuir para uma maior pressão local, a verdade é que com a exceção de poucos estudos<sup>19, 115, 164</sup>, a maioria dos autores, tal como no presente trabalho, não encontra associação entre a reabsorção e a idade cronológica<sup>2, 12, 31, 57, 68, 122, 170, 172</sup>.

Linge e Linge<sup>17</sup>, num estudo de referência nesta área, associam o mau hábito de interposição lingual à incidência de RRAE. Em indivíduos com hábitos parafuncionais, como o bruxismo ou com mordida aberta anterior concomitante com interposição lingual, está descrita a ocorrência de RRAE mesmo sem TO<sup>290</sup>. É possível que a interposição lingual, muitas vezes associada a mordida aberta anterior, e as forças ortodônticas possam ter um efeito aditivo ou interagir com a suscetibilidade individual e determinar o desenvolvimento de RRAE. A ação da

pressão atípica da língua sobre os dentes anteriores, verificada em 29.7% dos pacientes do presente estudo, não evidenciou associação com o aumento de suscetibilidade à RRAE.

Segundo Beck e Harris<sup>34</sup> o grau de mordida aberta anterior estaria correlacionado com a gravidade da RRAE dos primeiros molares maxilares e mandibulares devido à necessidade de maior intrusão destes dentes. Como já anteriormente referido, está descrita a associação entre RRAE nos incisivos centrais maxilares, mordida aberta anterior e existência de pressão atípica da língua e interposição lingual entre as arcadas dentárias por longos períodos. A força crônica e intermitente da língua sobre os dentes anteriores, poderia desencadear ou manter a mordida aberta anterior<sup>176, 177</sup>. Motokawa *et al.*<sup>291</sup> encontraram uma correlação entre a reabsorção radicular e casos de mordida aberta, especialmente nos dentes hipofuncionais. Na nossa amostra, a mordida aberta anterior não se mostrou um fator de suscetibilidade à RRAE. De salientar que dos 28 pacientes com mordida aberta anterior, 12 (37,5%) foram submetidos à extração de pré-molares superiores.

O grau de movimento dentário induzido pelo tratamento ortodôntico foi sempre considerado como determinante para a ocorrência de RRAE. Há autores que lhe atribuíram uma contribuição de 10% a um terço para a variabilidade da RRAE encontrada nos pacientes submetidos a TO<sup>17, 68, 259</sup>. Dada a natureza retrospectiva deste trabalho, não foi possível quantificar diretamente o grau de movimento dentário. Este fator é aliás de muito difícil quantificação e a sua avaliação é frequentemente indireta. Mais fácil, porque mais objetiva, é a avaliação das variáveis que influenciam o grau de movimento dentário, como sejam a extração prévia dos pré-molares, já anteriormente discutida, a má oclusão esquelética, o *overjet* e o *overbite*.

Relativamente ao tipo de má oclusão esquelética (classe I, II ou III) os resultados da literatura são relativamente unânimes ao concluir que não há padrões esqueléticos imunes à RRAE<sup>68, 115</sup>. Brin *et al.*<sup>111</sup> verificaram uma associação positiva, mas esse estudo foi efetuado exclusivamente em pacientes com má oclusão de classe II e *overjet* maior que 7 mm. No presente estudo, o padrão esquelético menos frequente foi o de classe III, presente em 8.7% dos pacientes, como é usual na raça caucasiana, tendo a classe II incluído 40.5% dos pacientes. Não se verificou associação entre qualquer um dos padrões esqueléticos e a RRAE.

Quanto ao *overbite* sabe-se que quanto maior é o seu valor, maior será a necessidade de intrusão incisiva e maior a probabilidade de reabsorção radicular destes dentes<sup>34</sup>. Contudo, não se avaliou este fator.

De entre os estudos publicados, alguns descrevem uma associação significativa entre a presença de um *overjet* considerável e a ocorrência de RRAE nos incisivos maxilares. A justificação é semelhante à da extração dos pré-molares, dado que nestes casos muitas vezes o *overjet* está aumentado<sup>34, 122</sup>. Nos nossos pacientes, o *overjet* médio no início do TO foi de

3,57 mm com um desvio padrão de 3,07 mm, mas não se constatou que esta variável fosse preditiva de RRAE, o que poderá dever-se ao facto dos valores médios estarem dentro dos parâmetros normais e de termos uma percentagem baixa de doentes com *overjet* considerável. Contudo, Nanekrungsan *et al.*<sup>115</sup> num estudo de 181 indivíduos em que avaliaram os quatro incisivos superiores, apesar de só terem 26% dos dentes com um *overjet* entre 4 e 6 mm e 16% dos dentes com um valor superior a 6 mm, encontraram associação positiva entre o *overjet* e a RRAE. Contudo, no grupo com *overjet* inferior a 1 mm, a % RRAE por dente foi igual à do grupo com *overjet* entre 4 e 6 mm. A justificação pode residir na existência de outros fatores que aumentaram a suscetibilidade nos casos de elevado *overjet* e não ao próprio *overjet*. Noutro estudo de 138 pacientes com relação positiva ente RRAE e *overjet*, o valor desta variável era de 9 +/- 2mm e os pacientes eram todos de classe II<sup>111</sup>. Aqui, ao contrário do caso anterior, a associação poderá explicar-se pelo elevado *overjet*.

De entre os fatores etiológicos que não avaliámos diretamente, há alguns fatores mecânicos muito importantes no desenvolvimento da RRAE, como é o caso da magnitude da força aplicada ao dente e o tipo de movimento induzido. Contudo, como sabemos, há uma grande dificuldade na avaliação fidedigna destes parâmetros, que ainda é maior quando se pretende avaliar a sua resultante por área radicular, mesmo recorrendo a instrumentos específicos. Para estudar corretamente estes fatores, controlando todas as outras variáveis intervenientes, os modelos animais, nomeadamente os que recorrem a análise de elementos finitos são a melhor abordagem, embora a extrapolação para humanos não seja linear e possa induzir a erros. Em amostras de pacientes, só os estudos prospetivos permitem algum rigor na avaliação dos fatores mecânicos.

#### 4 . Fatores genéticos

A contribuição dos fatores mecânicos para a suscetibilidade à RRAE foi estimada em cerca de 25%<sup>34, 35</sup>, pensando-se que os restantes 75% estarão dependentes de fatores intrínsecos ao paciente, nomeadamente de fatores genéticos. A contribuição do perfil genético individual foi sugerida pela primeira vez em 1975<sup>167</sup> e algumas das estimativas de herdabilidade em investigações com pares de irmãos<sup>61, 122</sup> e com gémeos<sup>207</sup> resultaram em valores bastante elevados, entre os 50% os 84%, se bem que não para todos os dentes. Estão descritas diferenças étnicas, com uma menor incidência de RRAE nos asiáticos comparativamente aos caucasianos, o que se poderá dever quer a fatores genéticos quer a fatores ambientais<sup>210</sup>. Modelos animais permitem estudos com controlo dos fatores ambientais e da heterogeneidade genética que complicam os estudos genéticos em humanos. A variação na

gravidade da RRAE entre diferentes estirpes de ratos também apoia a ideia de que a RRAE é controlada a nível genético, envolvendo múltiplos genes<sup>15</sup>. No conjunto, os dados são compatíveis com um modelo de fenótipo complexo, multifatorial, dependente de múltiplas variantes genéticas e de fatores não genéticos. Este conceito é importante para perceber que, ao contrário dos fenótipos monogénicos, para a RRAE não haverá testes genéticos preditivos, apenas de maior ou menor suscetibilidade, dado que, individualmente, cada variante genética terá, em princípio, uma baixa penetrância, isto é, um pequeno efeito. Por outro lado, o risco de recorrência nas famílias será baixo, inferior a 25% para irmãos e inferior a 100% para gémeos monozigóticos.

A base molecular da variabilidade genética são os polimorfismos do DNA que determinam a existência de alterações quantitativas ou qualitativas do proteoma. Atualmente, um dos objetivos primordiais das ciências médicas é a identificação de perfis de polimorfismos associados à suscetibilidade genética e aos fenótipos complexos. Este conhecimento iria contribuir, não só para uma melhor compreensão da etiopatogenia destas doenças, mas sobretudo para encontrar marcadores de diagnóstico e de prognóstico que fundamentem as opções terapêuticas e para identificar novos alvos moleculares para terapêuticas dirigidas.

Uma das abordagens para a identificação dos genes de suscetibilidade a estes fenótipos, e a única que tem sido utilizada na RRAE, consiste na realização de estudos de associação com genes candidatos. Estes genes são selecionados por terem alguma relação funcional com o fenótipo, o que pressupõe o conhecimento dos fenómenos moleculares envolvidos na RRAE.

Durante o movimento ortodôntico, a compressão do ligamento periodontal induz uma redução do fluxo sanguíneo, com conseqüente destruição dos tecidos, o que desencadeia a libertação de mediadores e a atração de células imunoinflamatórias. Cria-se assim um microambiente favorável à remodelação do periodonto e da raiz, fenómeno essencial para a adaptação das estruturas à nova arquitetura da arcada dentária e à sua estabilização. A RRAE ocorre por desequilíbrio destes fenómenos.

Os grandes atores da remodelação do periodonto e da raiz, e portanto da RRAE, são as células imunoinflamatórias e as células com capacidade de formação e de destruição quer do osso alveolar, osteoclastos e osteoblastos, quer das estruturas dentárias, os odontoclastos, odontoblastos e cementoblastos. Há ainda a considerar células com capacidade de transdiferenciação numa destas populações celulares, algumas habitualmente já presentes nos tecidos locais e outras recém-chegadas pela corrente sanguínea. Esta população celular complexa liberta mediadores moleculares que, por ligação a recetores, vão induzir a ativação/inibição delas próprias (via autócrina) e das células vizinhas (via parácrina). Do equilíbrio destas vias de sinalização se decide do predomínio dos fenómenos de síntese ou de

lise e destruição. Todos os genes que codificam as moléculas envolvidas são genes candidatos para a RRAE induzida pelo TO e muitos têm já sido estudados.

A visão clássica, mecanicista da RRAE, apoiada por resultados moleculares iniciais, explica todos os fenómenos da RRAE com base na reabsorção deficiente do osso alveolar, por insuficiente ativação dos osteoclastos e conseqüente acréscimo do stress mecânico sobre a raiz. Contudo, como veremos, muitos dos resultados sugerem que a remodelação da raiz não é apenas um fenómeno secundário, mas pode ser diretamente induzida pelos mediadores moleculares libertados.

A IL1B é um dos mediadores da remodelação óssea com maiores evidências de participação na RRAE e os polimorfismos no gene que a codifica foram dos primeiros fatores de suscetibilidade genética a serem propostos. A IL1B é uma citocina libertada por células imunoinflamatórias, capaz de ativar os osteoclastos e de induzir a reabsorção óssea. Níveis aumentados desta citocina foram inicialmente descritos no fluido crevicular gengival de doentes com periodontite crónica, na qual também ocorre perda de osso alveolar<sup>77</sup> e posteriormente também detetados nos pacientes submetidos a tratamento ortodôntico<sup>36, 74-76, 292</sup>. Estes factos e a evidência de que ratos *knock-out* para o gene *IL1B* desenvolviam mais RRAE do que os ratos *wild-type*<sup>81</sup>, levaram ao conceito de que a reabsorção radicular ocorria por défice de reabsorção do osso alveolar.

Um polimorfismo do gene da IL1B, o SNP rs1143634, tem sido frequentemente descrito como estando relacionado com a RRAE<sup>26, 31, 61</sup> e com a periodontite<sup>293, 294</sup>. Embora se trate de uma variante sinónima, alguns estudos *in vivo* e *in vitro* sugerem que o alelo C, também designado de alelo 1, se associa a baixos níveis de IL1B<sup>212</sup> e o alelo T, ou alelo 2, a níveis aumentados<sup>213</sup>. Estes resultados estariam de acordo com os estudos de epidemiologia genética que associam o alelo T a risco de periodontite e aumento de reabsorção do osso alveolar<sup>77</sup> e o alelo C a risco de RRAE, pelo fenómeno oposto<sup>26, 27, 61</sup>. Num estudo de Al-Qawasmi *et al.*<sup>61</sup> o SNP rs1143634 foi mesmo implicado em 15% da variabilidade da RRAE em incisivos centrais maxilares.

As variantes sinónimas são quase sempre inócuas mas podem ser funcionais por criarem um novo local de *splicing* ou por interferirem com a estabilidade do RNA ou com a taxa de tradução da proteína. No caso do SNP do gene *IL1B*, um dos dois últimos mecanismos poderá estar envolvido.

No presente estudo, tal como sucedeu com outros autores<sup>28, 30, 210</sup>, não conseguimos confirmar que o polimorfismo rs1143634 se associasse à ocorrência de RRAE. Embora o alelo C seja geralmente considerado o alelo de risco, num estudo clínico recente em dentes endodontizados<sup>31</sup> o alelo T, foi identificado como sendo o de maior risco, com particular aumento da predisposição genética para os homozigotos (*odds ratio*: 11.59; *p*= 0.006; IC:

95%), quando comparados com os homozigotos ou os heterozigotos para o alelo C. Curioso, é o facto de os mesmos autores, num outro estudo<sup>27</sup> com dentes vitais e numa população da mesma origem, terem verificado uma associação com o alelo C deste polimorfismo (*odds ratio*: 3.47;  $p= 0.027$ ; IC: 95%). Aliás, as divergências de resultados são igualmente comuns nos estudos da periodontite.

Variações das frequências alélicas e genóticas para o polimorfismo rs1143634 do gene *IL1B* entre diferentes populações não são raras e podem justificar a diversidade de resultados entre amostras de diferentes etnias<sup>210</sup>. Contudo, as frequências da nossa amostra e as descritas para outras populações europeias caucasianas num estudo recente<sup>210</sup> são muito semelhantes (só diferem em 2%) e não explicam a discrepância de resultados. Estas divergências são frequentes quando se estudam os fenótipos complexos e podem dever-se à contribuição, variável com a população, de múltiplos polimorfismos cuja expressão pode ser interdependente. Diferenças nos critérios de seleção dos pacientes e na metodologia de diagnóstico são também comuns. Outra explicação reside nas dimensões das amostras estudadas, frequentemente muito reduzidas, com menos de 100 doentes<sup>26-28, 31, 32</sup> o que favorece as falsas associações. Há ainda a considerar que o significado funcional do polimorfismo permite dúvidas: por um lado, alguns autores não conseguiram provar a variação dos níveis de síntese da proteína pelos alelos de risco<sup>214, 215</sup>, por outro lado, os estudos *in vitro* publicados analisam linfócitos de doentes e não foi efetuado nenhum estudo funcional em sistemas de expressão génica controlada, que fizesse prova da funcionalidade da variante.

Os genes da *IL1B*, da *IL1A* e do antagonista do recetor da *IL1*, o *IL1RN*, localizam-se numa região de 430 kb no braço longo do cromossoma 2. A *IL1B* partilha funções com a *IL1A* e o seu efeito é antagonizado pelo antagonista do recetor da *IL1B*, pelo que alguns autores avaliam conjuntamente a influência e interação de polimorfismos dos três genes. Por exemplo, Gulden *et al.*<sup>30</sup> encontraram uma correlação entre a RRAE e o polimorfismo rs1800587(-889C>t) do gene *IL1A* mas não para o rs1143634 do gene *IL1B*. É possível que numa amostra de maiores dimensões os resultados tivessem sido idênticos para os dois polimorfismos dado que estes foram descritos como estando em forte desequilíbrio de ligação alélica<sup>295</sup>. Já Linhartova *et al.*<sup>28</sup>, num estudo efetuado em pacientes da República Checa e recorrendo à OPT e a radiografias laterais cefalométricas, só encontraram associação para uma variante VNTR (*Varial Number of Tandem Repeats*) do intrão 2 do gene *IL1RN*. Estudos recentes<sup>27, 32</sup> identificaram um outro polimorfismo do gene *IL1RN*, o rs419598, como sendo de suscetibilidade à RRAE.

No presente trabalho não avaliámos os polimorfismos dos genes *IL1A* e *IL1RN*. O SNP da *IL1A* pareceu-nos menos importante por estar em desequilíbrio de ligação com o rs1143634 do gene da *IL1B* e também porque a *IL1A* tem menor atividade ao nível do

metabolismo ósseo<sup>72</sup> e as suas variantes funcionais terão, em princípio, menor repercussão do que as da IL1B. A avaliação de polimorfismos do gene *ILRN* parece-nos interessante, sobretudo para verificar um possível efeito de epistasia e será futuramente realizada.

O sistema RANK/RANKL/OPG está envolvido na regulação do metabolismo ósseo. A interação RANKL/RANK estimula a diferenciação e ativação dos osteoclastos, induzindo a perda óssea<sup>71</sup>, efeito contrariado pela proteína OPG, que impede esta interação por ligação competitiva com RANKL<sup>88, 90, 296</sup>. Algumas variantes dos genes que codificam estas proteínas têm sido frequentemente associadas a diferentes fenótipos osteoarticulares, quer multifatoriais como a osteoporose ou a artrite reumatoide, quer monogénicos como a doença de Paget.

Múltiplas evidências sugerem que estas moléculas estão envolvidas nos fenómenos de remodelação óssea e da raiz induzidos pelas forças ortodônticas. Níveis elevados de RANKL e baixos níveis de OPG foram associados a maior facilidade de movimento dentário<sup>92, 93, 297</sup> e, paralelamente, à presença de periodontite<sup>98</sup>, dois fenómenos relacionados com reabsorção do osso alveolar.

Os genes que codificam estas proteínas são naturalmente genes candidatos de RRAE, embora seja difícil encontrar estudos que analisem esta associação. Neste trabalho analisámos o papel dos polimorfismos rs3102735 do gene *TNFRSF11B* (OPG) e rs1805034 do gene *TNFRSF11A* (RANK) mas não houve evidência de qualquer associação estatisticamente significativa.

O SNP do gene da OPG está localizado na região reguladora, podendo interferir quantitativamente com a síntese de proteína. A variante guanina (G) foi associada a uma menor densidade mineral óssea ou a maior frequência de fraturas em diferentes localizações ósseas<sup>221, 222, 298</sup>. Desconhecemos a existência de estudos de associação com a RRAE. Na nossa amostra, o alelo C teve uma frequência baixa, de apenas 0.136, o que pode ter contribuído para a falta de significado estatístico.

O SNP estudado do gene do RANK, é uma variante *missense*, com possíveis efeitos qualitativos sobre a função da proteína e, tal como no caso da OPG, há estudos que o relacionam com patologia osteoarticular<sup>91, 217, 218</sup>. Relativamente à RRAE, há apenas um estudo familiar que a associa um polimorfismo próximo do locus do RANK<sup>209</sup>.

A dificuldade em evidenciar uma associação entre a RRAE e estes polimorfismos pode estar relacionada com o facto do sistema RANK/RANKL/OPG poder exercer uma dupla função de remodelação tecidual, com efeitos aparentemente contraditórios, ao nível do osso alveolar e da raiz dentária.

De facto, há vários estudos que localizam estas moléculas não só nos osteoclastos mas também em células dentárias como os odontoblastos, odontoclastos, fibroblastos da polpa e do ligamento periodontal<sup>86</sup> e cementoblastos<sup>47</sup>. Mesmos os recetores da IL1 são

expressos em muitas células, e não só nos osteoclastos e seus precursores, e nas experiências de Diercke *et al.*<sup>47</sup> cementoblastos estimulados por IL1B expressaram RANKL e OPG. Sabe-se igualmente que odontoclastos e osteoclastos apresentam semelhanças funcionais<sup>40</sup> e que ambas se diferenciam a partir de células progenitoras circulantes, muitas das quais expressam o recetor RANK<sup>299</sup>. Há ainda evidências de que as células tronco das duas estruturas, osso e dente, têm capacidade de transdiferenciação<sup>48-51</sup>.

Yamaguchi *et al.*<sup>95</sup> descrevem um aumento significativo de RANKL e redução de OPG nas células do ligamento periodontal humano em casos de reabsorção radicular severa sustenta a hipótese de que o efeito destes mediadores sobre a raiz pode ser direto, e não apenas secundário a uma deficiente reabsorção do osso alveolar. Se assim fosse, na presença de RRAE, os níveis de RANKL estariam mais baixos e os de OPG mais elevados.

No conjunto, os resultados sugerem a existência de um processo de regulação comum à reabsorção dos tecidos mineralizados do osso e do dente. Diferentes mecanismos, aparentemente antagônicos podem estar em jogo: se a via de sinalização induz apenas a reabsorção óssea, o aumento da razão RANK/OPG favorece a reabsorção do osso alveolar por estimulação da osteoclastogênese e diminui o risco de RRAE ao criar menor tensão sobre o ápice radicular; se a via induz a reabsorção radicular por diferenciação e ativação de odontoclastos, então o aumento da razão RANK/OPG sinaliza risco para a RRAE. É provável que os dois fenómenos ocorram, mas não sejam simultâneos, ou que estejam dependentes de variações quantitativas, difíceis de avaliar, da expressão dos recetores ou de diferenças entre osteoclastos e odontoclastos nas vias de transdução de sinal intracelulares. O pleno esclarecimento sobre a atuação destas moléculas teria utilidade clínica, uma vez que a avaliação das concentrações destas moléculas no líquido crevicular pode ter valor prognóstico e sugerir novas terapêuticas dirigidas.

A complexidade destes fenómenos, em que a mesma molécula se associa a consequências diferentes, dependendo do momento de atuação, das células acessíveis e do equilíbrio entre diferentes moléculas, justifica a dificuldade em estabelecer relações causa/efeito e genótipo/ fenótipo, assim como a frequente discrepância de resultados.

O recetor P2X7 (P2RX7) é um canal iónico dependente de ATP e expressa-se nos osteoblastos, osteoclastos, osteócitos<sup>99, 100, 300</sup> em células do sistema imunitário e muitas outras. O P2RX7 foi igualmente identificado em células do ligamento periodontal de dentes sujeitos a forças ortodônticas<sup>103</sup>. A nível dos ossos longos é-lhe atribuído um efeito pró-osteogénico, pela ativação dos osteoblastos e indução da apoptose dos osteoclastos, nomeadamente em ossos submetidos a tensão mecânica, o que foi comprovado inclusivamente com modelos *knock-out*<sup>100, 104, 105, 301, 302</sup>.

Ao nível das células imunoinflamatórias, como macrófagos, neutrófilos e linfócitos, a expressão do P2RX7 parece regular e limitar os fenómenos inflamatórios ao promover a remoção de tecidos necróticos e apoptóticos<sup>107</sup>. Nestas células, a ativação do recetor induz a libertação de mediadores inflamatórios, entre os quais a IL1B e IL1A. Esta dualidade de funções, ao nível das células ósseas e inflamatórias, tomam o gene deste recetor purinérgico num candidato preferencial à suscetibilidade à RRAE.

O gene *P2RX7* tem vários polimorfismos *missense* com consequências na função do recetor. Algumas variantes com perda ou ganho de função foram já associadas a patologias como leucemias linfocíticas crónicas familiares, dor crónica, doenças psiquiátricas, osteoporose e risco de fratura, entre várias outras<sup>102</sup>. Neste trabalho analisámos o SNP com ganho de função, rs1718119 (G>A), corresponde à variante *missense* Ala348Thr. As alterações da permeabilidade do poro membranar criado pela ativação do P2RX7 associadas a esta variante foram comprovadas por estudos funcionais *in vitro*<sup>226, 227</sup>.

Na amostra estudada, verificou-se que o genótipo GG, presente em 43% dos pacientes, correspondente a uma menor atividade do recetor relativamente aos genótipos AG e AA, se associava a aumento de risco estatisticamente significativo ( $p < 0.01$ ) para a suscetibilidade à RRAE. No modelo de regressão linear, o valor de B (coeficiente não estandardizado) para os homocigotos GG é de 0.03, correspondente a um aumento de risco de 3% relativamente ao genótipo de menor risco AA. Do mesmo modo, podemos concluir que a variante com aumento de função protege da ocorrência de RRAE. De entre os vários SNPs do gene *P2RX7*, este foi selecionado por ter significado funcional e porque ambos os alelos eram frequentes na população, tendo o alelo mais raro uma frequência de 0.34. Teria sido interessante verificar se o resultado seria reproduzível ou até mais evidente para variantes nulas, mas dado as suas baixas frequências na população caucasiana, teria sido necessário um estudo com uma amostra de muito maiores dimensões.

Tendo em conta apenas o efeito pró-osteogénico do P2RX7 e o mecanismo da RRAE centrado na menor reabsorção do osso alveolar, o alelo de risco deveria ser o A, associado a um aumento de função da proteína. Contudo, os nossos resultados apontam no sentido inverso. Um resultado paralelo foi descrito por Vécilli *et al.*<sup>103</sup>, que num estudo com ratos *knock-out* para o *P2RX7* verificaram um aumento de RRAE induzida por tratamento ortodôntico. Nos animais sem expressão do P2RX7, havia maior concentração de macrófagos e hialinização mais extensa do ligamento periodontal. A explicação pode residir no efeito da ativação do recetor sobre a libertação de IL1B pelas células imunoinflamatórias<sup>106, 227</sup>.

A necrose e lise celular que ocorrem ao nível do ligamento periodontal submetido às forças ortodônticas, poderiam levar à libertação de ATP, com consequente ativação do recetor P2RX7 das células imunoinflamatórias atraídas ao local, que libertariam IL1B. A IL1B,

por sua vez, ativaria os osteoclastos, quer diretamente, quer por indução do sistema RANK/RANKL<sup>94</sup>, favorecendo a remodelação do osso alveolar.

Assim, é possível que num microambiente inflamatório, ao contrário do que ocorreria nos ossos longos sob tensão, o efeito da ativação do P2RX7 ao nível das células imunes, induzindo a libertação de IL1B, se sobreponha ao efeito da estimulação direta do recetor ao nível dos osteoclastos. Neste caso, as consequências da ausência ou menor capacidade funcional do P2RX7 seriam sobreponíveis às do défice funcional da IL1B, dificultando a reabsorção do osso alveolar e impondo maior pressão sobre as estruturas dentárias. Outra possível explicação poderá residir em eventuais diferenças do metabolismo e das vias de sinalização entre o osso alveolar e os ossos longos, os únicos para os quais verdadeiramente estão comprovados os efeitos pró-osteogénicos do P2RX7. Finalmente, e em paralelo com o que descrevemos para o sistema RANK/RANKL/OPG, pouco se sabe da expressão deste recetor purinérgico em células como os odontoblastos, cementoblastos e odontoclastos, desconhecendo-se se interfere ou não diretamente com a remodelação das estruturas dentárias. A apoiar um efeito predominantemente não ósseo do P2RX7, Viecilli *et al.*<sup>103</sup> no seu modelo *knock-out*, não evidenciou qualquer efeito estatisticamente significativo sobre a osteogénese do osso alveolar nem sobre a facilidade do movimento dentário. Um achado importante neste modelo animal de RRAE é que a diferença entre ratos *knock-out* e *wild type* só se verificava para forças > 10KPa o que reforça a necessidade do uso clínico das forças mínimas necessárias, sobretudo para pacientes com um genótipo de risco.

É habitual considerarem-se quatro requisitos para comprovar a associação doença / polimorfismo: (1) o polimorfismo do gene deve influenciar o produto do gene; (2) o enviesamento da amostra deve ser controlado; (3) a existência de fatores externos, como o tabagismo e a classe socio-económica devem ser controlados e (4) o produto do gene afetado deve fazer parte da etiopatogenia da doença. No estudo aqui apresentado, poderão existir algumas reservas no ponto 3, dada a dificuldade em controlar todos os fatores externos possíveis. Quanto ao significado funcional do polimorfismo e à relação da proteína com a fisiopatologia da doença, foram sobejamente demonstrados. A análise da variável RRAE por regressão linear limita a interferência dos outros fatores avaliados. Contudo será essencial verificar os resultados com amostras de maiores dimensões.

Dada a possível interdependência funcional entre o P2RX7 e a IL1B, analisámos a existência de epistasia associando os polimorfismos dos dois genes, mas não se verificou qualquer efeito das combinações de genótipos sobre o risco de RRAE.

## 5 . A RRAE como fenótipo complexo

No modelo proposto que resultou das variáveis analisadas, a contribuição da variável genética identificada é de apenas 3.1%, dentro dos 27% explicados pelo modelo, pouco acrescentando à contribuição dos outros fatores. É verdade que apenas 4 polimorfismos foram estudados, de entre as dezenas a centenas que eventualmente estarão envolvidos. Contudo, a experiência dos últimos dez anos com estudos de associação de tipo GWA, nos quais se avaliam milhares de polimorfismos, confirma quão difícil é a identificação dos *loci* de suscetibilidade a fenótipos complexos<sup>303-305</sup>. Para doenças como a diabetes *mellitus*, após vários projetos de GWA de grandes consórcios internacionais, e milhões de euros dispendidos, as várias dezenas de polimorfismos identificados apenas explicam cerca de 5 a 10% da variabilidade fenotípica e eventualmente 10 a 20% da variabilidade genética (herdabilidade), sendo a restante porção conhecida como “*the missing heritability*”<sup>306</sup>. De um modo geral, para estas doenças, o *odd ratio* dos *loci* implicados varia de 0.5 a 1 para os que determinam uma diminuição do risco, e de 1 a 2 para os associados a aumento do risco. Aliás, a maioria das vezes, conclui-se que para a previsão da suscetibilidade à doença, a determinação do perfil genético pouco acrescenta à avaliação clínica dos fatores de risco, neste caso o índice de massa corporal e os antecedentes familiares.

Esta dificuldade em estabelecer uma correlação genótipo/fenótipo advém sobretudo da natureza poligénica e multifatorial destas patologias. Aparentemente o número de variantes genéticas implicadas é muito superior ao esperado, e a escassa contribuição para o fenótipo dificulta a sua identificação mesmo recorrendo a estudos de milhares de indivíduos e à sofisticada tecnologia disponível. Acresce que dada a complexidade das vias moleculares envolvidas e as múltiplas interações entre as moléculas, o peso de cada variante muda de acordo com o contexto criado pelas restantes variantes e pelas condições do meio, existindo um número indeterminado de combinações possíveis.

Não obstante estas dificuldades, os estudos de tipo GWA serão, no momento, a metodologia mais adequada para a identificação dos *loci* de suscetibilidade aos fenótipos complexos. Eles têm permitido conhecer melhor a causa da variabilidade interindividual e os mecanismos moleculares das doenças, revelando padrões comuns a identidades clínicas aparentemente diferentes, sugerindo novos alvos terapêuticos e, ocasionalmente, identificando variantes com algum potencial clínico como no caso de polimorfismos funcionais da apolipoproteína E (APOE), conhecidos marcadores de risco para a doença de Alzheimer, doença cardiovascular e menor longevidade.

Um outro mecanismo interferente é a epigenética<sup>306</sup>. A epigenética pode explicar algumas das alterações estáveis e duradouras da expressão génica induzidas por fatores do

meio externo, físicos, químicos e mesmo relacionais, e internos como sejam as hormonas. Sabe-se que estes mecanismos, que não interferem com o código genético, mas apenas com a sua leitura, como a metilação de bases de citosina, desacetilação das histonas e condensação da cromatina, estão dependentes da constituição de bases do DNA, logo, também são influenciadas pela variabilidade genética individual. A verdade é que a presença de um gene funcional não garante que a proteína seja sintetizada, se por exemplo ocorrer metilação da região reguladora, e uma variante genética que diminua a função da proteína pode ser compensada por um aumento da sua síntese por desmetilação da mesma região reguladora e consequente aumento da transcrição.

Embora este trabalho verse sobre a RRAE secundária ao TO, o problema clínico é a instabilidade dentária que se lhe poderá associar. Para este outro fenótipo, embora relacionado, é possível que possam convergir fatores adicionais, como a existência de periodontite ou as características mecânicas das proteínas de suporte do tecido conjuntivo. A verdade é que os poucos estudos existentes sobre o prognóstico a longo prazo dos dentes com evidência de RRAE sugerem a interferência de outros fatores para além da dimensão da raiz restante<sup>23</sup>.

## 6 . Aplicação clínica

Na prática clínica, o conhecimento dos fatores que interferem na suscetibilidade à RRAE permite uma abordagem mais personalizada do doente na fase pré, pós e durante o TO. A experiência de cerca de uma década de investigação tem demonstrado que os modelos mais úteis para avaliar a suscetibilidade às doenças complexas ou multifatoriais são modelos que integram variáveis clínicas e genéticas.

Previamente ao TO torna-se necessário informar sobre o risco de ocorrência de RRAE e obter um consentimento informado por escrito. O risco atribuído ao perfil genético não é ainda suficientemente conhecido para justificar a genotipagem, pelo que a avaliação indireta pela clínica deve prevalecer. Como para qualquer fenótipo complexo, a existência de antecedentes familiares é importante, aumentando o risco com o número de familiares afetados e a gravidade do fenótipo nesses familiares.

A dificuldade na realização de meta-análises e de estudos multicêntricos não tem permitido que se chegue a conclusões definitivas sobre os fatores a ter em conta na avaliação do risco de RRAE. O modelo estatístico encontrado neste trabalho ( $\%RRAE_{max} = 7.6 - 3.2 * \text{Género} + 0.3 * \text{Duração} + 4 * \text{Extração} + 8.4 * \text{Hyrax} + 3.1 * \text{P2RX7}_{GG}$ ) necessita de

validação posterior, mas pode ser um instrumento de orientação para a avaliação do risco de RRAE e planeamento do tratamento.

Numa aplicação do modelo a 2 pacientes com menos ou mais fatores de risco, teríamos:

-para uma paciente do género feminino, com 2 anos de tratamento (24 meses), sem aparelho Hyrax, sem extração de pré-molares e com genótipo AA para o polimorfismo rs1718119 do gene *P2RX7*: % RRAEmax = 11.6

- para um paciente do género masculino, com 3 anos de tratamento (36 meses), com aparelho Hyrax, com extração de pré-molares e com genótipo GG para o polimorfismo rs1718119 do gene *P2RX7*: % RRAEmax = 33.9

Estes valores correspondem a um risco máximo por paciente, constituindo uma estimativa que, embora imprecisa visto que o modelo explica menos de 1/3 da variabilidade de fenótipo, é a possível.

Já no decurso do tratamento, na presença de fatores de risco prévios como a existência de antecedentes familiares, será mais seguro aumentar o intervalo entre as consultas de controlo para ajustamento das forças<sup>307</sup> e evitar a exposição aos fatores de risco relacionados com o tratamento (extração de pré-molares ou prolongamento do tratamento).

A vigilância dos dentes mais expostos à RRAE com periapicais de 6 em 6 meses tem sido preconizada por alguns autores e permite uma maior segurança na implementação do plano de tratamento<sup>11, 23, 138</sup>. No entanto, convém lembrar que os raios X expõem o organismo a um efeito cumulativo da radiação ionizante e a abordagem e decisão nestas circunstâncias, tal como referido para a TCFC, deve seguir o princípio ALARA (“*as low as reasonably achievable*”), efetuando o menor número possível de radiografias na fase pré e pós-tratamento.

Caso se detete RRAE, o nível das forças deve ser reduzido. Uma possível abordagem consiste em nos 3 meses seguintes suspender as forças na arcada dentária afetada e só proceder a aplicação de forças na não afetada<sup>138</sup>. Se a RRAE detetada for grave ou evoluir num exame radiológico subsequente, há que discutir com o paciente as hipóteses de tratamentos alternativos que reduzam o tempo do TO, como sejam a realização de desgastes interproximais ao invés de extrações, soluções protéticas para fecho de espaços, libertação de alguns dentes dos arcos ativos ou a contenção precoce dos dentes com reabsorção<sup>60</sup>. Mais uma vez se salienta que não há estudos prospetivos que validem os protocolos de *follow-up* sugeridos, que se baseiam sobretudo no conhecimento dos fenómenos biológicos envolvidos e no bom senso clínico.

Independentemente da existência ou não de fatores de risco, a documentação do final de tratamento com radiografias é imperativa e permite a deteção da RRAE. Os pacientes

---

e/ou pais, devem ser informados deste facto. Esta informação pode vir a ser útil num eventual tratamento ortodôntico de irmãos ou filhos<sup>7, 122</sup>. Após o TO, todos os dentes que sofreram RRAE grave devem ser sistematicamente sujeitos a *follow-up* clínico e radiográfico, até que ocorra estabilização da raiz<sup>23</sup>. Contudo, se tal não ocorrer, o tratamento endodôntico com hidróxido de cálcio pode ser considerado<sup>308</sup>.

Independentemente da severidade da RRAE imagiológica, para a decisão clínica de vigiar ou recorrer a contenções fixas, o fator decisivo é o grau de estabilidade dentária. É possível que a intensa investigação em curso sobre os mecanismos moleculares e mecânicos envolvidos no TO venham a sugerir atuações mais fundamentadas e novas possibilidades de terapêuticas complementares.

No futuro, de acordo com a conveniência clínica e o perfil individual de risco de RRAE, o tratamento poderá ser mais personalizado e incluir medicação<sup>141, 193</sup> ou outros procedimentos específicos como o uso de laser de baixa energia<sup>96, 309</sup> que possam interferir no movimento dentário. Desta forma poderá ser possível controlar a velocidade da movimento dentário, evitar eventuais desconfortos, interferir no tempo de tratamento e ainda diminuir o risco de ocorrência de reabsorções radiculares.



## 5 - Conclusões e perspectivas futuras

---



## Conclusões

Para a avaliação da suscetibilidade a fenótipos complexos, os modelos deverão integrar variáveis genéticas e não genéticas, de modo a refletir o seu caráter multifatorial. Foi o que pretendemos com este trabalho, onde foi avaliada a contribuição de vários fatores, genéticos, clínicos e relacionados com o tratamento, para o desenvolvimento da reabsorção radicular apical externa induzida pelo tratamento ortodôntico.

Este é o primeiro estudo a analisar a suscetibilidade associada a este fenótipo recorrendo a um modelo de regressão linear múltipla, que também explora a contribuição de polimorfismos genéticos.

Entre as principais contribuições deste estudo, incluímos:

1- A implementação de um software de tratamento de imagem – ARIAS – especificamente desenvolvido para este trabalho, que permitiu uma melhoria no grau de precisão e reprodutibilidade das medições nas radiografias panorâmicas digitais, simplificando significativamente o processo de medição (quando comparado à medição com calibradores manuais) e de cálculo da RRAE.

2- O método utilizado para calcular e avaliar a RRAE, e o recurso a um parâmetro global, capaz de refletir a gravidade clínica e, simultaneamente, a suscetibilidade individual para este fenótipo, a %RRAEmax. Este método permitiu minimizar os erros inerentes à imagem da OPT.

3- A confirmação de que os incisivos superiores, sobretudo os laterais, apresentam maior suscetibilidade à RRAE do que os caninos e de que cerca de 5% dos pacientes sofrem uma redução da dimensão da raiz da ordem dos 30%.

4- A análise da suscetibilidade à RRAE recorrendo a um modelo de regressão linear múltipla, o que obvia a necessidade de estabelecer um limiar de normalidade artificial e possibilita futuras utilizações na avaliação clínica do paciente e planeamento personalizado do tratamento.

5- A identificação de cinco variáveis que no conjunto explicam 27% da variabilidade do fenótipo: duração do tratamento, género, utilização de aparelho Hyrax, extrações de pré-molares e homozigotia para o alelo G do polimorfismo rs1718119 (gene *P2RX7*). Este é o primeiro trabalho que associa este SNP à suscetibilidade à RRAE. A presença do genótipo GG associou-se a um incremento médio de 3% de RRAE máxima, dos 27% explicáveis pelo modelo. A associação da utilização de aparelho expensor maxilar tipo Hyrax com a RRAE nos dentes maxilares anteriores também ainda não tinha sido descrita em estudos clínicos.

6- A verificação de que a influência do fator duração do tratamento é constante ao longo do tempo e não aumenta nos tratamentos mais prolongados.

7- A verificação de que os polimorfismos, rs1143634 do gene *IL1B*, rs3102735 do gene *TNFRSF11B* (OPG) e rs1805034 do gene *TNFRSF11A* (RANK) não parecem ter um papel relevante na suscetibilidade à RRAE em populações com características genéticas e clínicas semelhantes à da amostra estudada; O mesmo se constatou para fatores como a idade de início do tratamento, mordida aberta anterior, interposição lingual, padrão esquelético e *overjet*.

8- A descrição das frequências alélicas e genotípicas destes polimorfismos na população portuguesa, com utilidade para diferentes áreas da medicina.

9- A proposta de que os fenómenos biológicos e moleculares da RRAE não sejam apenas secundários à maior ou menor remodelação do osso alveolar, mas que ambas as estruturas, raiz e osso, partilhem mediadores moleculares e células remodeladoras, numa mútua interdependência, de cujo equilíbrio dependerá o resultado anatomo-funcional final das estruturas.

10- A proposta de um modelo de avaliação da suscetibilidade do paciente à RRAE, que quantifica a %RRAEmax a partir das variáveis identificadas como sendo significativas,

$$\%RRAEmax = 7.6 - 3.2 * \text{Género} + 0.3 * \text{Duração} + 4 * \text{Extração} + 8.4 * \text{Hyrax} + 3.1 * P2RX7_{GG}$$

Este trabalho apresenta algumas limitações, em grande parte inerentes ao facto de se tratar de um estudo retrospectivo, como sejam o exame de diagnóstico imagiológico utilizado, a ortopantomografia, o recurso a informação do processo clínico e a pequena dimensão da amostra. Os fatores de erro da OPT foram devidamente considerados e minimizados pela metodologia adotada, tal como foi descrito nos capítulos anteriores. Uma amostra de maiores dimensões (apesar de esta ser uma das maiores de entre as referenciadas nos estudos genéticos de RRAE) permitiria uma maior confiança no grau de significado estatístico dos resultados obtidos.

### **Perspetivas futuras**

Todo o projeto de investigação, sobretudo quando concluído, é um ponto de começo, sugerindo e desvendando novas questões e diferentes abordagens.

No futuro, pensamos ser essencial proceder a estudos clínicos prospetivos e randomizados e com uma amostra de maiores dimensões. Os estudos multicêntricos seriam os ideais não fosse a variabilidade e a complexidade do tratamento ortodôntico.

○ recurso a métodos imagiológicos mais precisos, como a Tomografia Computorizada de Feixe Cónico, e a comparação das várias metodologias permitiria não só uma melhor aferição dos fatores etiológicos como também concluir pela seleção e escalonamento dos exames numa perspetiva clínica.

Um seguimento a longo prazo, alguns anos para além da conclusão do tratamento, com a verificação da ocorrência da indesejada instabilidade dentária que imponha soluções de recurso, está ainda por fazer. Só assim será possível encontrar uma definição mais objetiva e clinicamente útil de RRAE.

A identificação de outros *loci* de suscetibilidade à RRAE poderá beneficiar da seleção de uma população com situações de RRAE mais grave e com baixa exposição a fatores de risco não genéticos.

○ recurso a modelos de culturas celulares e estudos histológicos, baseados em modelos animais, poderão contribuir para aprofundar os mecanismos moleculares envolvidos e avaliar a proposta interdependência e partilha de mediadores e de vias de transdução de sinal entre os diferentes tipos de células envolvidos na RRAE.

Quanto ao modelo proposto, ele terá de ser validado na prática clínica.







## Resumo

A reabsorção radicular apical externa (RRAE) associada ao tratamento ortodôntico constitui a seqüela clínica e o efeito adverso indesejável mais frequente em ortodontia. Trata-se de um fenótipo complexo, determinado por fatores biológicos intrínsecos ao paciente, incluindo múltiplas variantes genéticas, e por fatores extrínsecos, como sejam as forças mecânicas aplicadas. Resulta em perda permanente da estrutura dentária mais apical e, embora raramente grave, pode afetar a longevidade do dente. Atualmente não existem critérios padronizados para o diagnóstico imagiológico com comprovada correlação clínica.

O conhecimento dos mecanismos moleculares envolvidos permite uma maior compreensão dos fatores desencadeantes e pode contribuir para o planeamento personalizado do tratamento e prevenção da RRAE. Polimorfismos de genes que codificam as proteínas envolvidas na remodelação do osso alveolar e da raiz têm sido sugeridos como fator de suscetibilidade.

Neste trabalho pretendeu-se estudar o papel de treze fatores clínicos e relacionados com o tratamento e de quatro polimorfismos de genes candidatos, com o objetivo de propor um modelo multifatorial integrado capaz de prever a reabsorção radicular apical externa.

O estudo retrospectivo incluiu 195 pacientes tratados com aparelhos ortodônticos fixos, segundo o protocolo estandardizado, 72 do sexo masculino e 123 do sexo feminino, com uma idade média de 17.24 anos ( $DP \pm 6,8$ ). O tempo médio de tratamento foi de 36 meses ( $DP \pm 10$ ). A reabsorção radicular apical externa foi avaliada e medida nos 4 incisivos e nos 2 caninos do maxilar superior, utilizando ortopantomografias obtidas antes e depois do tratamento, num total de 2544 dentes medidos. Desenvolveu-se um software específico que permite otimizar o processamento de imagem, registar os dados e efetuar, de forma automática, os cálculos da percentagem de reabsorção radicular. Recorrendo a um modelo de

regressão linear múltipla, em que a variável dependente foi a porcentagem de reabsorção radicular máxima registada para cada paciente (% RRAEmax ), avaliou-se a contribuição de variáveis genéticas, clínicas e relacionadas com o tratamento. A genotipagem dos quatro polimorfismos (rs1718119 do gene *P2RX7*, rs1143634 do gene *IL1B*, rs3102735 do *TNFRSF11B*, o gene que codifica a OPG, e rs1805034 do *TNFRSF11A*, o gene que codifica o RANK) foi realizada pelas técnicas de RFLP, PCR em tempo real com sondas TaqMan e sequenciação. Para evitar o erro inter-operador, todos os procedimentos de medição foram realizadas pelo mesmo operador. Para a análise do erro intra-operador, as ortopantomografias de 20 doentes, aleatoriamente selecionados, foram avaliadas duas vezes, no intervalo de 15 dias e os valores de %RRAEmax obtidos foram analisados pelo teste t de Student para amostras emparelhadas (para o erro sistemático) e pela fórmula de Dahlberg (para o erro aleatório).

Os dentes mais frequentemente afetados foram os incisivos superiores. Verificou-se o equilíbrio de Hardy - Weinberg para os quatro polimorfismos. A análise do erro médio intra- operador confirmou a fiabilidade do método ( $p > 0.05$  no teste t de Student e 0.5 a 1% no teste de Dahlberg). Cinco variáveis clínicas e genéticas explicaram 27 % da variabilidade de %RRAEmax (ANOVA :  $F = 15.315$  ,  $p = 0.000$  ; coeficiente de determinação ajustado = 0.270,  $n = 195$ ). As variáveis com contribuição única mais significativa para o modelo foram: o género ( $p < 0.05$ ), duração do tratamento ( $p < 0.001$ ), extração de pré-molares ( $p < 0.01$ ), aparelho Hyrax ( $p < 0.001$ ) e genótipo GG do polimorfismo rs1718119 do gene *P2RX7* ( $p < 0.01$ ). Outras variáveis, como idade, *overjet*, interposição lingual, mordida aberta anterior, padrão esquelético e os outros polimorfismos tiveram menor contribuição. Fatores como os antecedentes familiares, patologias associadas ou medicação sistémica estavam pouco representados na amostra pelo que não puderam ser avaliados.

Este estudo permitiu identificar variáveis clínicas, relacionadas com o tratamento e genéticas, que podem explicar cerca de 30% da variabilidade da RRAE dos pacientes submetidos a tratamento ortodôntico. Este é o primeiro estudo clínico que identifica e destaca o *P2RX7*, que codifica um canal iónico dependente do ATP envolvido em vias de mecanotransdução de sinal no tecido ósseo, como um possível fator de suscetibilidade à reabsorção radicular apical externa. O impacto limitado destas 5 variáveis na reabsorção radicular sugere a existência de outros, provavelmente múltiplos, fatores de baixa penetrância.





## Abstract

Orthodontic-induced external apical root resorption (RRAE) is the most common clinical sequel and undesirable side effect of orthodontics. It is a complex phenotype, being determined either by biological patient intrinsic factors including multiple genetic variables and external factors as mechanical forces.

Although rarely serious, it results in permanent loss of the most apical dental structure and can affect the dentition longevity. Currently, there are no standardized imaging criteria for diagnosis with proven relation to clinical outcome. Delineation of molecular profiles of RRAE would unravel the mechanisms involved and facilitate prevention and more personalized orthodontic treatment planning. Polymorphisms of genes encoding proteins involved in alveolar bone and root remodeling have been implicated in root resorption etiology.

We proposed to study the role of thirteen clinical and treatment related factors and four polymorphisms of candidate genes to RRAE susceptibility, in order to obtain a multifactorial integrative model able to predict this complication.

This retrospective study included 195 patients treated with multi-bracket appliances, 72 males and 123 females, with an average age of 17.24 years ( $SD\pm 6.8$ ). The average treatment time was of 36 months ( $SD\pm 10$ ). Root resorption was measured in the four maxillary incisors and maxillary canines using before and after treatment panoramic radiographs, in a total of 2544 measured teeth. A design-to-purpose software was developed to optimize image processing and data collection. Using a multiple linear regression model, where the dependent variable was the maximum % of root resorption for each patient (%RRAEmax), the contribution of genetic, clinical and the treatment variables were assessed. Genotyping of the 4 polymorphisms (rs1718119 from *P2RX7* gene, rs1143634 from *IL1B*

gene, rs3102735 from *TNFRSF11B*, the gene encoding OPG, and rs1805034 from *TNFRSF11A*, the gene encoding RANK) was performed by RFLP and real time TaqMan assays and sequencing. To prevent inter-observer error, all the measurement procedures were carried out by the same operator. The intra-observer error analysis was conducted by both the Student's *t*-test for paired samples (for systematic error) and the Dahlberg formula (for random error).

The most frequently affected teeth were maxillary incisors. Hardy-Weinberg equilibrium was verified for all four polymorphisms. The analysis of intra-observer mean error confirmed the reliability of the method ( $p > 0.05$  in Student's *t* test and 0.5% to 1% in Dahlberg test). Five clinical and genetic variables explained 27% of the %RRAEmax variability (ANOVA:  $F = 15.315$ ,  $p = 0.000$ ; adjusted determination coefficient = 0.270,  $n = 195$ ).

The variables with more significant unique contribution to the model were: gender ( $p < 0.05$ ), treatment duration ( $p < 0.001$ ), premolar extractions ( $p < 0.01$ ), Hyrax appliance ( $p < 0.001$ ) and GG genotype of rs1718119 from *P2RX7* gene ( $p < 0.01$ ). Other variables, such as age, *overjet*, tongue thrust, anterior open bite, skeletal pattern and the other polymorphisms had minor contributions.

This study allowed to identify clinical, treatment and genetic variables that can explain about 30% of RRAE variability between patients submitted to orthodontic treatment. This is the first clinical study that identifies and highlight the *P2RX7*, a gene codifying an ATP-dependent ionic channel involved in mechano-transduction pathways of bone cells, as a possible susceptibility factor to RRAE. The limited impact of these 5 variables in root resorption suggests the existence of other, probably multiple, low penetrance factors.

## 8 - Bibliografia

---



1. Dougherty HL. The effect of mechanical forces upon the mandibular buccal segments during orthodontic treatment. *American journal of orthodontics*. 1968;54(2):83-103.
2. 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;29(2):134-9.
3. Wahl N. Orthodontics in 3 millennia. Chapter 5: The American Board of Orthodontics, Albert Ketcham, and early 20th-century appliances. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2005;128(4):535-40.
4. Bakland LK. Root resorption. *Dental clinics of North America*. 1992;36(2):491-507.
5. Harris EF, Hassankiadeh S, Harris JT. Maxillary incisor crown-root relationships in different angle malocclusions. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 1993;103(1):48-53.
6. Andreasen JO. External root resorption: its implication in dental traumatology, paedodontics, periodontics, orthodontics and endodontics. *Int Endod J* 1985;18(2):109-18.
7. Brezniak N, Wasserstein A. Orthodontically induced inflammatory root resorption. Part II: The clinical aspects. *The Angle orthodontist*. 2002;72(2):180-4.
8. Brezniak N, Wasserstein A. Orthodontically induced inflammatory root resorption. Part I: The basic science aspects. *The Angle orthodontist*. 2002;72(2):175-9.
9. Melsen B. Tissue reaction to orthodontic tooth movement--a new paradigm. *Eur J Orthod*. 2001;23(6):671-81.
10. Parker RJ, Harris EF. Directions of orthodontic tooth movements associated with external apical root resorption of the maxillary central incisor. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 1998;114(6):677-83.
11. Levander E, Bajka R, Malmgren O. Early radiographic diagnosis of apical root resorption during orthodontic treatment: a study of maxillary incisors. *Eur J Orthod*. 1998;20(1):57-63.
12. Brezniak N, Wasserstein A. Root resorption after orthodontic treatment: Part I. Literature review. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 1993;103(1):62-6.
13. Owman-Moll P, Kurol J, Lundgren D. Continuous versus interrupted continuous orthodontic force related to early tooth movement and root resorption. *The Angle orthodontist*. 1995;65(6):395-401; discussion -2.
14. Blake M, Woodside DG, Pharoah MJ. A radiographic comparison of apical root resorption after orthodontic treatment with the edgewise and Speed appliances. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 1995;108(1):76-84.
15. Brezniak N, Wasserstein A. Root resorption after orthodontic treatment: Part 2. Literature review. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 1993;103(2):138-46.
16. 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.
17. Linge L, Linge BO. Patient characteristics and treatment variables associated with apical root resorption during orthodontic treatment. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 1991;99(1):35-43.
18. Rudolph C. A comparative study in root resorption in permanent teeth. *J Am Dent Assoc*. 1936(23):822-6.
19. Sameshima GT, Sinclair PM. Predicting and preventing root resorption: Part II. Treatment factors. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2001;119(5):511-5.
20. Sameshima GT, Sinclair PM. Predicting and preventing root resorption: Part I. Diagnostic factors. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2001;119(5):505-10.
21. Killiany DM. Root resorption caused by orthodontic treatment: an evidence-based review of literature. *Semin Orthod*. 1999;5(2):128-33.

22. Levander E, Malmgren O. Evaluation of the risk of root resorption during orthodontic treatment: a study of upper incisors. *Eur J Orthod.* 1988;10(1):30-8.
23. Levander E, Malmgren O. Long-term follow-up of maxillary incisors with severe apical root resorption. *Eur J Orthod.* 2000;22(1):85-92.
24. Linge BO, Linge L. Apical root resorption in upper anterior teeth. *Eur J Orthod.* 1983;5(3):173-83.
25. Mavragani M, Boe OE, Wisth PJ, Selvig KA. Changes in root length during orthodontic treatment: advantages for immature teeth. *Eur J Orthod.* 2002;24(1):91-7.
26. 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;136(4):542-6.
27. Iglesias-Linares A, Yanez-Vico R, Ballesta-Mudarra S, Ortiz-Ariza E, Ortega-Rivera H, Mendoza-Mendoza A, et al. Postorthodontic external root resorption is associated with IL1 receptor antagonist gene variations. *Oral diseases.* 2012;18(2):198-205.
28. Linhartova P, Cernochova P, Izakovicova Holla L. IL1 gene polymorphisms in relation to external apical root resorption concurrent with orthodontia. *Oral diseases.* 2013;19(3):262-70.
29. 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;137(4):462-76; discussion 12A.
30. 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;70(1):20-38.
31. 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;38(3):283-7.
32. Iglesias-Linares A, Yanez-Vico RM, Ballesta-Mudarra S, Ortiz-Ariza E, Mendoza-Mendoza A, Perea-Perez E, et al. Interleukin 1 receptor antagonist (IL1RN) genetic variations condition post-orthodontic external root resorption in endodontically-treated teeth. *Histol Histopathol.* 2013;28(6):767-73.
33. Jacobson O. Clinical significance of root resorption. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 1952(38):687-96.
34. Beck BW, Harris EF. Apical root resorption in orthodontically treated subjects: analysis of edgewise and light wire mechanics. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 1994;105(4):350-61.
35. Spence T. A prospective study of apical root resorption during orthodontic treatment and into retention [thesis]. Memphis: University of Tennessee; 2000.
36. Davidovitch Z. Tooth movement. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1991;2(4):411-50.
37. Katchburian E, Arana V. Periodonto. *Histologia e Embriologia Oral Texto - Atlas.* São Paulo: Panamericana; 1999.
38. Mabuchi R, Matsuzaka K, Shimono M. Cell proliferation and cell death in periodontal ligaments during orthodontic tooth movement. *J Periodontal Res.* 2002;37(2):118-24.
39. Pereira S. Perdas celulares no movimento dentário experimental - Estudo da apoptose. Tese de Dissertação de Mestrado em Ortodontia. Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra. 2004.
40. Sahara N, Okafuji N, Toyoki A, Ashizawa Y, Deguchi T, Suzuki K. Odontoclastic resorption of the superficial nonmineralized layer of predentine in the shedding of human deciduous teeth. *Cell Tissue Res.* 1994;277(1):19-26.
41. Oshiro T, Shibasaki Y, Martin TJ, Sasaki T. Immunolocalization of vacuolar-type H<sup>+</sup>-ATPase, cathepsin K, matrix metalloproteinase-9, and receptor activator of NFkappaB ligand in odontoclasts during physiological root resorption of human deciduous teeth. *Anat Rec.* 2001;264(3):305-11.

- 42.Sasaki T. Differentiation and functions of osteoclasts and odontoclasts in mineralized tissue resorption. *Microsc Res Tech.* 2003;61(6):483-95.
- 43.Sveen OB, Hawes RR. Differentiation of new odontoblasts and dentine bridge formation in rat molar teeth after tooth grinding. *Arch Oral Biol.* 1968;13(12):1399-409.
- 44.Heys DR, Fitzgerald M, Heys RJ, Chiego DJ, Jr. Healing of primate dental pulps capped with Teflon. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1990;69(2):227-37.
- 45.Handa K, Saito M, Yamauchi M, Kiyono T, Sato S, Teranaka T, et al. Cementum matrix formation in vivo by cultured dental follicle cells. *Bone.* 2002;31(5):606-11.
- 46.Zeichner-David M, Oishi K, Su Z, Zakartchenko V, Chen LS, Arzate H, et al. Role of Hertwig's epithelial root sheath cells in tooth root development. *Dev Dyn.* 2003;228(4):651-63.
- 47.Diercke K, Konig A, Kohl A, Lux CJ, Erber R. Human primary cementoblasts respond to combined IL-1beta stimulation and compression with an impaired BSP and CEMP-1 expression. *Eur J Cell Biol.* 2012;91(5):402-12.
- 48.Hoz L, Romo E, Zeichner-David M, Sanz M, Nunez J, Gaitan L, et al. Cementum protein 1 (CEMPI) induces differentiation by human periodontal ligament cells under three-dimensional culture conditions. *Cell Biol Int.* 2012;36(2):129-36.
- 49.Bai Y, Bai Y, Matsuzaka K, Hashimoto S, Kokubu E, Wang X, et al. Formation of bone-like tissue by dental follicle cells co-cultured with dental papilla cells. *Cell Tissue Res.* 2010;342(2):221-31.
- 50.Jung HS, Lee DS, Lee JH, Park SJ, Lee G, Seo BM, et al. Directing the differentiation of human dental follicle cells into cementoblasts and/or osteoblasts by a combination of HERS and pulp cells. *J Mol Histol.* 2011;42(3):227-35.
- 51.Tsukamoto-Tanaka H, Ikegame M, Takagi R, Harada H, Ohshima H. Histochemical and immunocytochemical study of hard tissue formation in dental pulp during the healing process in rat molars after tooth replantation. *Cell Tissue Res.* 2006;325(2):219-29.
- 52.Cattaneo PM, Dalstra M, Melsen B. Strains in periodontal ligament and alveolar bone associated with orthodontic tooth movement analyzed by finite element. *Orthod Craniofac Res.* 2009;12(2):120-8.
- 53.Viecilli RF, Katona TR, Chen J, Hartsfield JK, Jr., Roberts WE. Three-dimensional mechanical environment of orthodontic tooth movement and root resorption. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2008;133(6):791 e11-26.
- 54.Rygh P. Ultrastructural cellular reactions in pressure zones of rat molar periodontium incident to orthodontic tooth movement. *Acta Odontol Scand.* 1972;30(5):575-93.
- 55.Rygh P. Ultrastructural changes in pressure zones of human periodontium incident to orthodontic tooth movement. *Acta Odontol Scand.* 1973;31(2):109-22.
- 56.von Böhl M, Kuijpers-Jagtman A. Hyalinization during orthodontic tooth movement: a systematic review on tissue reactions. *Eur J Orthod.* 2009;31(1):30-6.
- 57.Owman-Moll P, Kurol J. Root resorption pattern during orthodontic tooth movement in adolescents. *Biological Mechanisms of Tooth Eruption, Resorption and Replacement by Implants.* Boston, Mass: Harvard Society for the Advancement in Orthodontics; 1998.
- 58.Maltha JC, van Leeuwen EJ, Dijkman GE, Kuijpers-Jagtman AM. Incidence and severity of root resorption in orthodontically moved premolars in dogs. *Orthod Craniofac Res.* 2004;7(2):115-21.
- 59.Owman-Moll P, Kurol J, Lundgren D. Effects of a doubled orthodontic force magnitude on tooth movement and root resorptions. An inter-individual study in adolescents. *Eur J Orthod.* 1996;18(2):141-50.
- 60.Kokich VG. Orthodontic and nonorthodontic root resorption: their impact on clinical dental practice. *J Dent Educ.* 2008;72(8):895-902.

61. 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;123(3):242-52.
62. Kvam E. Scanning electron microscopy of tissue changes on the pressure surface of human premolars following tooth movement. *Scand J Dent Res.* 1972;80(5):357-68.
63. Proffit WR. The biologic basis of orthodontic therapy. *Contemporary Orthodontics*. 5th ed. St Louis: Elsevier Mosby; 2013. p. 278-311.
64. Roberts W, Al-Qawasmi R, Hartsfield JK, Jr., K. Biomechanics of root resorption, in *Orthodontics*. Tokyo: Quintessence Publishing Company; 2004. p. 84-90.
65. Consolaro A, Martins-Ortiz M. Hereditariedade e suscetibilidade à reabsorção radicular em Ortodontia não se fundamentam: erros metodológicos e interpretativos repetidamente publicados podem gerar falsas verdades. *Rev Dent Press Ortodon Ortop Facial* 2004;9(2):146-57.
66. Henry JL, Weinmann JP. The pattern of resorption and repair of human cementum. *J Am Dent Assoc.* 1951;42(3):270-90.
67. Harris E. Root Resorption During Orthodontic Therapy. *Semin Orthod.* 2000(6):183-94.
68. Baumrind S, Korn EL, Boyd RL. Apical root resorption in orthodontically treated adults. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 1996;110(3):311-20.
69. Davidovitch Z, Nicolay OF, Ngan PW, Shanfeld JL. Neurotransmitters, cytokines, and the control of alveolar bone remodeling in orthodontics. *Dental clinics of North America.* 1988;32(3):411-35.
70. Baylink DJ, Finkelman RD, Mohan S. Growth factors to stimulate bone formation. *J Bone Miner Res.* 1993;8 Suppl 2:S565-72.
71. Yamaguchi M. RANK/RANKL/OPG during orthodontic tooth movement. *Orthod Craniofac Res.* 2009;12(2):113-9.
72. Dinarello CA. Interleukin-1 and its biologically related cytokines. *Adv Immunol.* 1989;44:153-205.
73. Arend WP. Interleukin 1 receptor antagonist. A new member of the interleukin 1 family. *J Clin Invest.* 1991;88(5):1445-51.
74. 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;75(1):562-7.
75. Nakaya H, Oates TW, Hoang AM, Kamoi K, Cochran DL. Effects of interleukin-1 beta on matrix metalloproteinase-3 levels in human periodontal ligament cells. *J Periodontol.* 1997;68(6):517-23.
76. Iwasaki LR, Haack JE, Nickel JC, Reinhardt RA, Petro TM. Human interleukin-1 beta and interleukin-1 receptor antagonist secretion and velocity of tooth movement. *Arch Oral Biol.* 2001;46(2):185-9.
77. Komman KS, Crane A, Wang HY, di Giovine FS, Newman MG, Pirk FW, et al. The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 1997;24(1):72-7.
78. Stein JM, Smeets R, Reichert S, Chrobot J, Fickl S, Stanzel S, et al. The role of the composite interleukin-1 genotype in the association between periodontitis and acute myocardial infarction. *J Periodontol.* 2009;80(7):1095-102.
79. Lamster IB, Novak MJ. Host mediators in gingival crevicular fluid: implications for the pathogenesis of periodontal disease. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1992;3(1-2):31-60.
80. Mogi M, Otogoto J, Ota N, Inagaki H, Minami M, Kojima K. Interleukin 1 beta, interleukin 6, beta 2-microglobulin, and transforming growth factor-alpha in gingival crevicular fluid from human periodontal disease. *Arch Oral Biol.* 1999;44(6):535-9.
81. Al-Qawasmi RA, Hartsfield JK, Hartsfield JK, Jr., Everett ET, Weaver MR, Foroud TM, et al. Root resorption associated with orthodontic force in IL-1Beta knockout mouse. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2004;4(4):383-5.

82. Alhashimi N, Frithiof L, Brudvik P, Bakhiat M. Orthodontic tooth movement and de novo synthesis of proinflammatory cytokines. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2001;119(3):307-12.
83. Kudo O, Sabokbar A, Pocock A, Itonaga I, Fujikawa Y, Athanasou NA. Interleukin-6 and interleukin-11 support human osteoclast formation by a RANKL-independent mechanism. *Bone.* 2003;32(1):1-7.
84. Krishnan V, Davidovitch Z. Cellular, molecular, and tissue-level reactions to orthodontic force. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2006;129(4):469 e1-32.
85. Tyrovola JB, Spyropoulos MN, Makou M, Perrea D. Root resorption and the OPG/RANKL/RANK system: a mini review. *J Oral Sci.* 2008;50(4):367-76.
86. Lossdorfer S, Gotz W, Jager A. Immunohistochemical localization of receptor activator of nuclear factor kappaB (RANK) and its ligand (RANKL) in human deciduous teeth. *Calcif Tissue Int.* 2002;71(1):45-52.
87. Li J, Sarosi I, Yan X, Morony S, Capparelli C, Tan H, et al. RANK is the intrinsic hematopoietic cell surface receptor that controls osteoclastogenesis and regulation of bone mass and calcium metabolism. *Proc Natl Acad Sci* 2000;97(4):1566-71.
88. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Luthy R, et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell.* 1997;89(2):309-19.
89. Oshiro T, Shiotani A, Shibasaki Y, Sasaki T. Osteoclast induction in periodontal tissue during experimental movement of incisors in osteoprotegerin-deficient mice. *Anat Rec.* 2002;266(4):218-25.
90. Boyce BF, Xing L. The RANKL/RANK/OPG pathway. *Curr Osteoporos Rep.* 2007;5(3):98-104.
91. Chung PY, Beyens G, Riches PL, Van Wesenbeeck L, de Freitas F, Jennes K, et al. Genetic variation in the TNFRSF11A gene encoding RANK is associated with susceptibility to Paget's disease of bone. *J Bone Miner Res.* 2010;25(12):2592-605.
92. Nishijima Y, Yamaguchi M, Kojima T, Aihara N, Nakajima R, Kasai K. Levels of RANKL and OPG in gingival crevicular fluid during orthodontic tooth movement and effect of compression force on releases from periodontal ligament cells in vitro. *Orthod Craniofac Res.* 2006;9(2):63-70.
93. Kanzaki H, Chiba M, Arai K, Takahashi I, Haruyama N, Nishimura M, et al. Local RANKL gene transfer to the periodontal tissue accelerates orthodontic tooth movement. *Gene Ther.* 2006;13(8):678-85.
94. Nakao K, Goto T, Gunjigake KK, Konoo T, Kobayashi S, Yamaguchi K. Intermittent force induces high RANKL expression in human periodontal ligament cells. *J Dent Res.* 2007;86(7):623-8.
95. Yamaguchi M, Aihara N, Kojima T, Kasai K. RANKL increase in compressed periodontal ligament cells from root resorption. *J Dent Res.* 2006;85(8):751-6.
96. Fujita S, Yamaguchi M, Utsunomiya T, Yamamoto H, Kasai K. Low-energy laser stimulates tooth movement velocity via expression of RANK and RANKL. *Orthod Craniofac Res.* 2008;11(3):143-55.
97. Liu D, Xu JK, Figliomeni L, Huang L, Pavlos NJ, Rogers M, et al. Expression of RANKL and OPG mRNA in periodontal disease: possible involvement in bone destruction. *Int J Mol Med.* 2003;11(1):17-21.
98. Mogi M, Otagoto J, Ota N, Togari A. Differential expression of RANKL and osteoprotegerin in gingival crevicular fluid of patients with periodontitis. *J Dent Res.* 2004;83(2):166-9.
99. Li J, Liu D, Ke HZ, Duncan RL, Turner CH. The P2X7 nucleotide receptor mediates skeletal mechanotransduction. *J Biol Chem.* 2005;280(52):42952-9.
100. Grol MW, Panupinthu N, Korcok J, Sims SM, Dixon SJ. Expression, signaling, and function of P2X7 receptors in bone. *Purinergic Signal.* 2009;5(2):205-21.
101. Jorgensen NR, Husted LB, Skarratt KK, Stokes L, Tofteng CL, Kvist T, et al. Single-nucleotide polymorphisms in the P2X7 receptor gene are associated with post-menopausal bone loss and vertebral fractures. *Eur J Hum Genet.* 2012;20(6):675-81.

- 102.Jiang LH, Baldwin JM, Roger S, Baldwin SA. Insights into the Molecular Mechanisms Underlying Mammalian P2X7 Receptor Functions and Contributions in Diseases, Revealed by Structural Modeling and Single Nucleotide Polymorphisms. *Front Pharmacol.* 2013;4:55.
- 103.Viecilli RF, Katona TR, Chen J, Hartsfield JK, Jr., Roberts WE. Orthodontic mechanotransduction and the role of the P2X7 receptor. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2009;135(6):694 e1-16; discussion -5.
- 104.Gartland A, Skarratt KK, Hocking LJ, Parsons C, Stokes L, Jorgensen NR, et al. Polymorphisms in the P2X7 receptor gene are associated with low lumbar spine bone mineral density and accelerated bone loss in post-menopausal women. *Eur J Hum Genet.* 2012;20(5):559-64.
- 105.Ke HZ, Qi H, Weidema AF, Zhang Q, Panupinthu N, Crawford DT, et al. Deletion of the P2X7 nucleotide receptor reveals its regulatory roles in bone formation and resorption. *Mol Endocrinol.* 2003;17(7):1356-67.
- 106.Ferrari D, Pizzirani C, Adinolfi E, Lemoli RM, Curti A, Idzko M, et al. The P2X7 receptor: a key player in IL-1 processing and release. *J Immunol.* 2006;176(7):3877-83.
- 107.Lister MF, Sharkey J, Sawatzky DA, Hodgkiss JP, Davidson DJ, Rossi AG, et al. The role of the purinergic P2X7 receptor in inflammation. *J Inflamm (Lond).* 2007;4:5.
- 108.Zahrowski J, Jeske A. Apical root resorption is associated with comprehensive orthodontic treatment but not clearly dependent on prior tooth characteristics or orthodontic techniques. *J Am Dent Assoc.* 2011;142(1):66-8.
- 109.Reitan K. Initial tissue behavior during apical root resorption. *The Angle orthodontist.* 1974;44(1):68-82.
- 110.McFadden WM, Engstrom C, Engstrom H, Anholm JM. A study of the relationship between incisor intrusion and root shortening. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 1989;96(5):390-6.
- 111.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;124(2):151-6.
- 112.Segal GR, Schiffman PH, Tuncay OC. Meta analysis of the treatment-related factors of external apical root resorption. *Orthod Craniofac Res.* 2004;7(2):71-8.
- 113.Jiang RP, McDonald JP, Fu MK. Root resorption before and after orthodontic treatment: a clinical study of contributory factors. *Eur J Orthod.* 2010;32(6):693-7.
- 114.Liou EJ, Chang PM. Apical root resorption in orthodontic patients with en-masse maxillary anterior retraction and intrusion with miniscrews. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2010;137(2):207-12.
- 115.Nanekrungsan K, Patanapom V, Janhom A, Korwanich N. External apical root resorption in maxillary incisors in orthodontic patients: associated factors and radiographic evaluation. *Imaging Sci Dent.* 2012;42(3):147-54.
- 116.Mirabella AD, Artun J. Risk factors for apical root resorption of maxillary anterior teeth in adult orthodontic patients. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 1995;108(1):48-55.
- 117.Artun J, Van 't Hullenaar R, Doppel D, Kuijpers-Jagtman AM. Identification of orthodontic patients at risk of severe apical root resorption. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2009;135(4):448-55.
- 118.Fox N. Longer orthodontic treatment may result in greater external apical root resorption. *Evid Based Dent.* 2005;6(1):21.
- 119.Burstone C. The biophysics of bone remodeling during orthodontics- optimal force considerations. *The Biology of Tooth Movement.* Boca Raton, Fla: CRC Press; 1989. p. 321-34.
- 120.Oppenheim A. Human tissue response to orthodontic intervention of short and long duration. *Am J Orthod Oral Surg.* 1942(28):263-301.
- 121.Reitan K. Clinical and histologic observations on tooth movement during and after orthodontic treatment. *Am J Orthod.* 1967;53(10):721-45.

- 122.Harris EF, Kineret SE, Tolley EA. A heritable component for external apical root resorption in patients treated orthodontically. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 1997;111(3):301-9.
- 123.Reitan K. Effects of force magnitude and direction of tooth movement on different alveolar bone types. *The Angle orthodontist.* 1964(34):244-55.
- 124.Birgit Thilander PR, Kaare Reitan. *Tissue Reactions in Orthodontics. Orthodontics current principles and technics.* 4th ed. St. Louis: Mosby; 2005. p. 145-219.
- 125.Ren Y, Maltha JC, Kuijpers-Jagtman AM. Optimum force magnitude for orthodontic tooth movement: a systematic literature review. *The Angle orthodontist.* 2003;73(1):86-92.
- 126.Reitan K. Some factors determining the evaluation of forces in orthodontics. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 1957(43):32-45.
- 127.Rygh P. Orthodontic root resorption studied by electron microscopy. *The Angle orthodontist.* 1977;47(1):1-16.
- 128.Harry MR, Sims MR. Root resorption in bicuspid intrusion. A scanning electron microscope study. *The Angle orthodontist.* 1982;52(3):235-58.
- 129.Owman-Moll P, Kurol J. The early reparative process of orthodontically induced root resorption in adolescents--location and type of tissue. *Eur J Orthod.* 1998;20(6):727-32.
- 130.Vardimon AD, Graber TM, Voss LR, Lenke J. Determinants controlling iatrogenic external root resorption and repair during and after palatal expansion. *The Angle orthodontist.* 1991;61(2):113-22; discussion 23-4.
- 131.Chan EK, Darendeliler MA, Petocz P, Jones AS. A new method for volumetric measurement of orthodontically induced root resorption craters. *Eur J Oral Sci.* 2004;112(2):134-9.
- 132.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;129(4):504-10.
- 133.Barbagallo LJ, Jones AS, Petocz P, Darendeliler MA. Physical properties of root cementum: Part 10. Comparison of the effects of invisible removable thermoplastic appliances with light and heavy orthodontic forces on premolar cementum. A microcomputed-tomography study. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2008;133(2):218-27.
- 134.Kurol J, Franke P, Lundgren D, Owman-Moll P. Force magnitude applied by orthodontists. An inter- and intra-individual study. *Eur J Orthod.* 1996;18(1):69-75.
- 135.Brudvik P, Rygh P. Root resorption beneath the main hyalinized zone. *Eur J Orthod.* 1994;16(4):249-63.
- 136.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;110(3):303-10.
- 137.Acar A, Canyurek U, Kocaaga M, Erverdi N. Continuous vs. discontinuous force application and root resorption. *The Angle orthodontist.* 1999;69(2):159-63; discussion 63-4.
- 138.Levander E, Malmgren O, Eliasson S. Evaluation of root resorption in relation to two orthodontic treatment regimes. A clinical experimental study. *Eur J Orthod.* 1994;16(3):223-8.
- 139.Maltha J. Discontinuous forces cause less extensive root resorption than continuous forces. *Eur J Orthod* 1996(18).
- 140.Weiland F. Constant versus dissipating forces in orthodontics: the effect on initial tooth movement and root resorption. *Eur J Orthod.* 2003;25(4):335-42.
- 141.Abuabara A. Biomechanical aspects of external root resorption in orthodontic therapy. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2007;12(8):E610-3.

- 142.Casa MA, Faltin RM, Faltin K, Sander FG, Arana-Chavez VE. Root resorptions in upper first premolars after application of continuous torque moment. Intra-individual study. *J Orofac Orthop.* 2001;62(4):285-95.
- 143.Steiner GG, Pearson JK, Ainamo J. Changes of the marginal periodontium as a result of labial tooth movement in monkeys. *J Periodontol.* 1981;52(6):314-20.
- 144.Thilander B, Nyman S, Karring T, Magnusson I. Bone regeneration in alveolar bone dehiscences related to orthodontic tooth movements. *Eur J Orthod.* 1983;5(2):105-14.
- 145.Han G, Huang S, Von den Hoff JW, Zeng X, Kuijpers-Jagtman AM. Root resorption after orthodontic intrusion and extrusion: an intraindividual study. *The Angle orthodontist.* 2005;75(6):912-8.
- 146.Kaley J, Phillips C. Factors related to root resorption in edgewise practice. *The Angle orthodontist.* 1991;61(2):125-32.
- 147.Faltin RM, Faltin K, Sander FG, Arana-Chavez VE. Ultrastructure of cementum and periodontal ligament after continuous intrusion in humans: a transmission electron microscopy study. *Eur J Orthod.* 2001;23(1):35-49.
- 148.Costopoulos G, Nanda R. An evaluation of root resorption incident to orthodontic intrusion. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 1996;109(5):543-8.
- 149.Ketcham A. A preliminary report of an investigation of apical root resorption of permanent teeth. *Int J Orthod* 1927(13):97-127.
- 150.Boyd RL. Complex orthodontic treatment using a new protocol for the Invisalign appliance. *J Clin Orthod.* 2007;41(9):525-47.
- 151.Odenrick L, Karlander EL, Pierce A, Kretschmar U. Surface resorption following two forms of rapid maxillary expansion. *Eur J Orthod.* 1991;13(4):264-70.
- 152.Kittel PW, Sampson WJ. RME-induced root resorption and repair: a computerised 3-D reconstruction. *Aust Orthod J.* 1994;13(3):144-51.
- 153.Baysal A, Karadede I, Hekimoglu S, Ucar F, Ozer T, Veli I, et al. Evaluation of root resorption following rapid maxillary expansion using cone-beam computed tomography. *The Angle orthodontist.* 2012;82(3):488-94.
- 154.Vardimon AD, Levy T, Weinreb M. Maxillary incisor root resorption after rapid palatal expansion in *Felis catus*. *Eur J Oral Sci.* 2005;113(1):41-6.
- 155.Matteini C, Mommaerts MY. Posterior transpalatal distraction with pterygoid disjunction: a short-term model study. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2001;120(5):498-502.
- 156.Hansen L, Tausche E, Hietschold V, Hotan T, Lagravere M, Harzer W. Skeletally-anchored rapid maxillary expansion using the Dresden Distractor. *J Orofac Orthop.* 2007;68(2):148-58.
- 157.Gunbay T, Akay MC, Gunbay S, Aras A, Koyuncu BO, Sezer B. Transpalatal distraction using bone-borne distractor: clinical observations and dental and skeletal changes. *J Oral Maxillofac Surg.* 2008;66(12):2503-14.
- 158.McNab S, Battistutta D, Taverne A, Symons AL. External apical root resorption following orthodontic treatment. *The Angle orthodontist.* 2000;70(3):227-32.
- 159.Malmgren O, Goldson L, Hill C, Orwin A, Petrini L, Lundberg M. Root resorption after orthodontic treatment of traumatized teeth. *Am J Orthod.* 1982;82(6):487-91.
- 160.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;134(5):646-51.
- 161.Scott P, DiBiase AT, Sherriff M, Cobourne MT. Alignment efficiency of Damon3 self-ligating and conventional orthodontic bracket systems: a randomized clinical trial. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2008;134(4):470 e1-8.

- 162.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;118(3):262-73.
- 163.Bishara SE, Vonwald L, Jakobsen JR. Changes in root length from early to mid-adulthood: resorption or apposition? *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 1999;115(5):563-8.
- 164.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;22(6):665-74.
- 165.Birgit Thilander PR, Kaare Reitan. Tissue Reactions in Orthodontics. *Orthodontics Current Principles and Techniques.* Third ed. St. Louis, Missouri: Mosby; 2000. p. 117-92.
- 166.Spurrier SW, Hall SH, Joondeph DR, Shapiro PA, Riedel RA. A comparison of apical root resorption during orthodontic treatment in endodontically treated and vital teeth. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 1990;97(2):130-4.
- 167.Newman WG. Possible etiologic factors in external root resorption. *Am J Orthod.* 1975;67(5):522-39.
- 168.Kjaer I. Morphological characteristics of dentitions developing excessive root resorption during orthodontic treatment. *Eur J Orthod.* 1995;17(1):25-34.
- 169.Stenvik A, Mjor IA. Pulp and dentine reactions to experimental tooth intrusion. A histologic study of the initial changes. *Am J Orthod.* 1970;57(4):370-85.
- 170.Hendrix I, Carels C, Kuijpers-Jagtman AM, Van THM. A radiographic study of posterior apical root resorption in orthodontic patients. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 1994;105(4):345-9.
- 171.Mattison GD, Delivanis HP, Delivanis PD, Johns PI. Orthodontic root resorption of vital and endodontically treated teeth. *J Endod.* 1984;10(8):354-8.
- 172.Owman-Moll P, Kurol J, Lundgren D. Repair of orthodontically induced root resorption in adolescents. *The Angle orthodontist.* 1995;65(6):403-8; discussion 9-10.
- 173.Hamilton RS, Gutmann JL. Endodontic-orthodontic relationships: a review of integrated treatment planning challenges. *Int Endod J.* 1999;32(5):343-60.
- 174.Taithongchai R, Sookkom K, Killiany DM. Facial and dentoalveolar structure and the prediction of apical root shortening. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 1996;110(3):296-302.
- 175.Andreasen JO, Andreasen FM. Root resorption following traumatic dental injuries. *Proc Finn Dent Soc.* 1992;88 Suppl 1:95-114.
- 176.Newman W. Possible etiologic factors in external root resorption during orthodontic treatment. *Eur J Orthod.* 1983(5):195-8.
- 177.Harris EF, Butler ML. Patterns of incisor root resorption before and after orthodontic correction in cases with anterior open bites. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 1992;101(2):112-9.
- 178.Baden. E. Environmental pathology of the teeth. Gorlin RJ, Goodman HM, editors *Thoma's Oral Pathology.* 6th ed. St. Louis: Mosby; 1970.
- 179.Harris EF, Robinson QC, Woods MA. An analysis of causes of apical root resorption in patients not treated orthodontically. *Quintessence Int.* 1993;24(6):417-28.
- 180.Francischone T, Consolaro A. Reabsorções dentárias e alterações ósseas no trabeculado maxilar podem ter origem sistêmica? Uma abordagem clínica e diagnóstica. *Rev Dental Press Ortodon Ortop Facial* 2002(7):43-9.
- 181.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;116(5):545-51.

- 182.Owman-Moll P, Kurol J. Root resorption after orthodontic treatment in high- and low-risk patients: analysis of allergy as a possible predisposing factor. *Eur J Orthod.* 2000;22(6):657-63.
- 183.Nishioka M, Ioi H, Nakata S, Nakasima A, Counts A. Root resorption and immune system factors in the Japanese. *The Angle orthodontist.* 2006;76(1):103-8.
- 184.Verna C, Dalstra M, Melsen B. Bone turnover rate in rats does not influence root resorption induced by orthodontic treatment. *Eur J Orthod.* 2003;25(4):359-63.
- 185.Lindskog S, Blomlof L, Hammarstrom L. Comparative effects of parathyroid hormone on osteoblasts and cementoblasts. *J Clin Periodontol.* 1987;14(7):386-9.
- 186.Ong CK, Walsh LJ, Harbrow D, Taverne AA, Symons AL. Orthodontic tooth movement in the prednisolone-treated rat. *The Angle orthodontist.* 2000;70(2):118-25.
- 187.Gonzales C, Hotokezaka H, Matsuo K, Shibazaki T, Yozgatian JH, Darendeliler MA, et al. Effects of steroidal and nonsteroidal drugs on tooth movement and root resorption in the rat molar. *The Angle orthodontist.* 2009;79(4):715-26.
- 188.Shirazi M, Dehpour AR, Jafari F. The effect of thyroid hormone on orthodontic tooth movement in rats. *J Clin Pediatr Dent.* 1999;23(3):259-64.
- 189.Lotwala RB, Greenlee GM, Ott SM, Hall SH, Huang GJ. Bisphosphonates as a risk factor for adverse orthodontic outcomes: a retrospective cohort study. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2012;142(5):625-34 e3.
- 190.Krieger E, d'Hoedt B, Scheller H, Jacobs C, Walter C, Wehrbein H. [Orthodontic treatment of patients medicated with bisphosphonates-a clinical case report]. *J Orofac Orthop.* 2013;74(1):28-39.
- 191.Igarashi K, Adachi H, Mitani H, Shinoda H. Inhibitory effect of the topical administration of a bisphosphonate (risedronate) on root resorption incident to orthodontic tooth movement in rats. *J Dent Res.* 1996;75(9):1644-9.
- 192.Alatli I, Hellsing E, Hammarstrom L. Orthodontically induced root resorption in rat molars after 1-hydroxyethylidene-1,1-bisphosphonate injection. *Acta Odontol Scand.* 1996;54(2):102-8.
- 193.Tyrovola JB, Spyropoulos MN. Effects of drugs and systemic factors on orthodontic treatment. *Quintessence Int.* 2001;32(5):365-71.
- 194.Collins MK, Sinclair PM. The local use of vitamin D to increase the rate of orthodontic tooth movement. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 1988;94(4):278-84.
- 195.Pereira A. Avaliação microscópica da influência de anticoncepcional e gravidez na movimentação dentária induzida, em especial nos fenômenos da reabsorção dentária [Mestrado]. Faculdade de Odontologia de Bauru: Universidade de São Paulo; 1995.
- 196.Vasconcelos M. Análise morfológica comparativa do periodonto de sustentação submetido a forças biologicamente excessivas em ratas adultas sem e sob o uso de anticoncepcionais e em ratas prenhas. Faculdade de Odontologia de Bauru: Universidade de São Paulo; 1996.
- 197.Ramos L, Consolaro A. A influência de medicamentos na movimentação ortodôntica - Uma análise crítica da literatura. *R Dental Press Ortodon Ortop Facial.* 2005(10):122-30.
- 198.Consolaro A. Medicamentos versus Ortodontia. *R Dental Press Ortodon Ortop Facial.* 2003(2):100.
- 199.Brookes AJ. The essence of SNPs. *Gene.* 1999;234(2):177-86.
- 200.Nakamura Y. DNA variations in human and medical genetics: 25 years of my experience. *J Hum Genet.* 2009;54(1):1-8.
- 201.Weber JL, May PE. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am J Hum Genet.* 1989;44(3):388-96.
- 202.Tabor HK, Risch NJ, Myers RM. Candidate-gene approaches for studying complex genetic traits: practical considerations. *Nat Rev Genet.* 2002;3(5):391-7.

203. Estivill X, Armengol L. Copy number variants and common disorders: filling the gaps and exploring complexity in genome-wide association studies. *PLoS Genet.* 2007;3(10):1787-99.
204. Healy DG. Case-control studies in the genomic era: a clinician's guide. *Lancet Neurol.* 2006;5(8):701-7.
205. Abass S, Hartsfield J. Investigation of Genetic Factors Affecting Complex Traits Using External Apical Root Resorption as a Model. *Semin Orthod* 2008;14:115-24.
206. van Dongen J, Slagboom PE, Draisma HH, Martin NG, Boomsma DI. The continuing value of twin studies in the omics era. *Nature reviews Genetics.* 2012;13(9):640-53.
207. Ngan DC, Kharbanda OP, Byloff FK, Darendeliler MA. The genetic contribution to orthodontic root resorption: a retrospective twin study. *Aust Orthod J.* 2004;20(1):1-9.
208. National Human Genome Research Institute. Genome-wide Association Studies. <http://www.genome.gov/200195232009>.
209. Al-Qawasmi RA, Hartsfield JK, Jr., Everett ET, Flury L, Liu L, Foroud TM, et al. Genetic predisposition to external apical root resorption in orthodontic patients: linkage of chromosome-18 marker. *J Dent Res.* 2003;82(5):356-60.
210. Tomoyasu Y, Yamaguchi T, Tajima A, Inoue I, Maki K. External Apical Root Resorption and the Interleukin-1B Gene Polymorphism in Japanese Population. *Orthodontic Waves.* 2009(68):152-7.
211. 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;142(3):339-47.
212. 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;22(6):396-402.
213. Iwasaki LR, Gibson CS, Crouch LD, Marx DB, Pandey JP, Nickel JC. Speed of tooth movement is related to stress and IL-1 gene polymorphisms. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2006;130(6):698 e1-9.
214. Gore EA, Sanders JJ, Pandey JP, Palesch Y, Galbraith GM. Interleukin-1 beta+3953 allele 2: association with disease status in adult periodontitis. *J Clin Periodontol.* 1998;25(10):781-5.
215. Galbraith GM, Hendley TM, Sanders JJ, Palesch Y, Pandey JP. Polymorphic cytokine genotypes as markers of disease severity in adult periodontitis. *J Clin Periodontol.* 1999;26(11):705-9.
216. Rossi M, Whitcomb S, Lindemann R. Interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha production by human monocytes cultured with L-thyroxine and thyrocalcitonin: relation to severe root shortening. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 1996;110(4):399-404.
217. Malik MH, Bayat A, Jury F, Ollier WE, Kay PR. Genetic susceptibility to hip arthroplasty failure--association with the RANK/OPG pathway. *Int Orthop.* 2006;30(3):177-81.
218. Assmann G, Pfoehler C, Simon P, Pfreundschuh M, Tilgen W, Wiczorek S. Genetic variations in the genes encoding receptor activator nuclear factor kappa B (RANK), receptor activator nuclear factor kappa B ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG) in patients with psoriasis and psoriatic arthritis: a case-control study. *J Dermatol.* 2011;38(6):519-23.
219. Roshandel D, Holliday KL, Pye SR, Ward KA, Boonen S, Vanderschueren D, et al. Influence of polymorphisms in the RANKL/RANK/OPG signaling pathway on volumetric bone mineral density and bone geometry at the forearm in men. *Calcif Tissue Int.* 2011;89(6):446-55.
220. Langdahl BL, Carstens M, Stenkjaer L, Eriksen EF. Polymorphisms in the osteoprotegerin gene are associated with osteoporotic fractures. *J Bone Miner Res.* 2002;17(7):1245-55.
221. Jorgensen HL, Kusk P, Madsen B, Fenger M, Lauritzen JB. Serum osteoprotegerin (OPG) and the A163G polymorphism in the OPG promoter region are related to peripheral measures of bone mass and fracture odds ratios. *J Bone Miner Metab.* 2004;22(2):132-8.

- 222.Takacs I, Lazary A, Kosa JP, Kiss J, Balla B, Nagy Z, et al. Allelic variations of RANKL/OPG signaling system are related to bone mineral density and in vivo gene expression. *Eur J Endocrinol.* 2010;162(2):423-31.
- 223.Ohlendorff SD, Tofteng CL, Jensen JE, Petersen S, Civitelli R, Fenger M, et al. Single nucleotide polymorphisms in the P2X7 gene are associated to fracture risk and to effect of estrogen treatment. *Pharmacogenet Genomics.* 2007;17(7):555-67.
- 224.North RA. Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol Rev.* 2002;82(4):1013-67.
- 225.Kawate T, Michel JC, Birdsong WT, Gouaux E. Crystal structure of the ATP-gated P2X(4) ion channel in the closed state. *Nature.* 2009;460(7255):592-8.
- 226.Bradley HJ, Baldwin JM, Goli GR, Johnson B, Zou J, Sivaprasadarao A, et al. Residues 155 and 348 contribute to the determination of P2X7 receptor function via distinct mechanisms revealed by single-nucleotide polymorphisms. *J Biol Chem.* 2011;286(10):8176-87.
- 227.Stokes L, Fuller SJ, Sluyter R, Skarratt KK, Gu BJ, Wiley JS. Two haplotypes of the P2X(7) receptor containing the Ala-348 to Thr polymorphism exhibit a gain-of-function effect and enhanced interleukin-1beta secretion. *FASEB J.* 2010;24(8):2916-27.
- 228.Beertsen W, Van den Bos T. Alkaline phosphatase induces the deposition of calcified layers in relation to dentin: an in vitro study to mimic the formation of afibrillar acellular cementum. *J Dent Res.* 1991;70(3):176-81.
- 229.Le J, Vilcek J. Tumor necrosis factor and interleukin 1: cytokines with multiple overlapping biological activities. *Lab Invest.* 1987;56(3):234-48.
- 230.Lowney JJ, Norton LA, Shafer DM, Rossomando EF. Orthodontic forces increase tumor necrosis factor alpha in the human gingival sulcus. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 1995;108(5):519-24.
- 231.Pasler FA. *Radiology (Color Atlas of Dental Medicine)*. 1st ed: Thieme; 1993.
- 232.Whaites E. *Radiografia Panorâmica (tomografia panorâmica dentária). Princípios de Radiologia Odontológica.* Rio de Janeiro: Elsevier; 2009. p. 159-76.
- 233.Moore WS. Successful panoramic radiography, KODAK Dental Radiography Series. The Academy of Dental Therapeutics and Stomatology. ([donline.chattanooga.state.edu/studyaids/xray/pan.pdf](http://donline.chattanooga.state.edu/studyaids/xray/pan.pdf)).
- 234.Sameshima GT, Asgarifar KO. Assessment of root resorption and root shape: periapical vs panoramic films. *The Angle orthodontist.* 2001;71(3):185-9.
- 235.Larheim TA, Svanaes DB. Reproducibility of rotational panoramic radiography: mandibular linear dimensions and angles. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 1986;90(1):45-51.
- 236.Leach HA, Ireland AJ, Whaites EJ. Radiographic diagnosis of root resorption in relation to orthodontics. *Br Dent J.* 2001;190(1):16-22.
- 237.Wyatt DL, Farman AG, Orbell GM, Silveira AM, Scarfe WC. Accuracy of dimensional and angular measurements from panoramic and lateral oblique radiographs. *Dento maxillo facial radiology.* 1995;24(4):225-31.
- 238.Larheim TA, Eggen S. Determination of tooth length with a standardized paralleling technique and calibrated radiographic measuring film. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1979;48(4):374-8.
- 239.Serman NH, B., Singer, S. High-Quality Panoramic Radiographs: Tips and Tricks: *Dentistry Today*; 2002. Available from: <http://www.dentistrytoday.com/radiography/1752>.
- 240.Gher ME, Richardson AC. The accuracy of dental radiographic techniques used for evaluation of implant fixture placement. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 1995;15(3):268-83.
- 241.Katona TR. Flaws in root resorption assessment algorithms: role of tooth shape. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2006;130(6):698 e19-27.

- 242.Silva MA, Wolf U, Heinicke F, Bumann A, Visser H, Hirsch E. Cone-beam computed tomography for routine orthodontic treatment planning: a radiation dose evaluation. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2008;133(5):640 e1-5.
- 243.American Academy of O, Radiology. Clinical recommendations regarding use of cone beam computed tomography in orthodontics. [corrected]. Position statement by the American Academy of Oral and Maxillofacial Radiology. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2013;116(2):238-57.
- 244.Lund H, Grondahl K, Hansen K, Grondahl HG. Apical root resorption during orthodontic treatment. A prospective study using cone beam CT. *The Angle orthodontist.* 2012;82(3):480-7.
- 245.Berco M, Rigali PH, Jr., Miner RM, DeLuca S, Anderson NK, Will LA. Accuracy and reliability of linear cephalometric measurements from cone-beam computed tomography scans of a dry human skull. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2009;136(1):17 e1-9; discussion -8.
- 246.Damstra J, Fourie Z, Huddleston Slater JJ, Ren Y. Reliability and the smallest detectable difference of measurements on 3-dimensional cone-beam computed tomography images. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2011;140(3):e107-14.
- 247.Moshfeghi M, Tavakoli MA, Hosseini ET, Hosseini AT, Hosseini IT. Analysis of linear measurement accuracy obtained by cone beam computed tomography (CBCT-NewTom VG). *Dent Res J (Isfahan).* 2012;9(Suppl 1):S57-62.
- 248.Mah JK, Huang JC, Choo H. Practical applications of cone-beam computed tomography in orthodontics. *J Am Dent Assoc.* 2010;141 Suppl 3:7S-13S.
- 249.Kapila S, Conley RS, Harrell WE, Jr. The current status of cone beam computed tomography imaging in orthodontics. *Dento maxillo facial radiology.* 2011;40(1):24-34.
- 250.Halazonetis DJ. Cone-beam computed tomography is not the imaging technique of choice for comprehensive orthodontic assessment. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2012;141(4):403, 5, 7 passim.
- 251.Ludlow JB, Davies-Ludlow LE, Brooks SL, Howerton WB. Dosimetry of 3 CBCT devices for oral and maxillofacial radiology: CB Mercuray, NewTom 3G and i-CAT. *Dento maxillo facial radiology.* 2006;35(4):219-26.
- 252.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;135(4):434-7.
- 253.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. *The Angle orthodontist.* 2013;83(2):189-95.
- 254.Sharpe W, Reed B, Subtelny JD, Polson A. Orthodontic relapse, apical root resorption, and crestal alveolar bone levels. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 1987;91(3):252-8.
- 255.Harris EF, Boggan BW, Wheeler DA. Apical root resorption in patients treated with comprehensive orthodontics. *J Tenn Dent Assoc.* 2001;81(1):30-3.
- 256.Copeland S, Green LJ. Root resorption in maxillary central incisors following active orthodontic treatment. *Am J Orthod.* 1986;89(1):51-5.
- 257.Harris EF, Baker WC. Loss of root length and crestal bone height before and during treatment in adolescent and adult orthodontic patients. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 1990;98(5):463-9.
- 258.Katsaros C, Berg R. Anterior open bite malocclusion: a follow-up study of orthodontic treatment effects. *Eur J Orthod.* 1993;15(4):273-80.
- 259.Horiuchi A, Hotokezaka H, Kobayashi K. Correlation between cortical plate proximity and apical root resorption. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 1998;114(3):311-8.
- 260.Taner T, Ciger S, Sencift Y. Evaluation of apical root resorption following extraction therapy in subjects with Class I and Class II malocclusions. *Eur J Orthod.* 1999;21(5):491-6.

261. Iglesias-Linares A, Yanez-Vico RM, Ballesta S, Ortiz-Ariza E, Mendoza-Mendoza A, Perea E, et al. Interleukin 1 gene cluster SNPs (rs1800587, rs1143634) influences post-orthodontic root resorption in endodontic and their contralateral vital control teeth differently. *Int Endod J*. 2012;45(11):1018-26.
262. Brusveen EM, Brudvik P, Boe OE, Mavragani M. Apical root resorption of incisors after orthodontic treatment of impacted maxillary canines: a radiographic study. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2012;141(4):427-35.
263. Brezniak N, Goren S, Zoizner R, Dinbar A, Arad A, Wasserstein A, et al. A comparison of three methods to accurately measure root length. *The Angle orthodontist*. 2004;74(6):786-91.
264. Greenberg MS, Glick M. *Burket's Oral Medicine Diagnosis & Treatment*. 10th ed: B C Decker Inc; 2003. 35-49 p.
265. Heo MS, Lee SS, Lee KH, Choi HM, Choi SC, Park TW. Quantitative analysis of apical root resorption by means of digital subtraction radiography. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2001;91(3):369-73.
266. Pratt WK. *Digital Image Processing: PIKS Scientific Inside*. 3rd ed. New York: John Wiley & Sons; 2001.
267. Alves S, Posada N, López M. A practical and robust image processing method for evaluating the external apical root resorption. In: João Manuel R.S. Tavares RMNJ, editor. *Computational Vision and Medical Image Processing: VipIMAGE* CRC Press; 2011.
268. Pereira SA, Lavado N, Lopez M, Abreu J, Silva H. A clinical risk prediction model of orthodontic-induced external apical root resorption. *Rev Port Estomatol Med Dent Cir Maxilofac*. 2014; Aceite e em fase de publicação.
269. Soille P. *Morphological Image Analysis*. Berlin: Springer-Verlag; 1999.
270. Koch WH. Technology platforms for pharmacogenomic diagnostic assays. *Nat Rev Drug Discov*. 2004;3(9):749-61.
271. Houston WJ. The analysis of errors in orthodontic measurements. *Am J Orthod*. 1983;83(5):382-90.
272. Pereira S, Lavado N, Nogueira L, Lopez M, Abreu J, Silva H. Polymorphisms of genes encoding P2X7R, IL-1B, OPG and RANK in orthodontic-induced apical root resorption. *Oral diseases*. 2013; doi:10.1111/odi.12185.
273. Maroco J. *Análise Estatística – com utilização do SPSS*. Lisboa: Silabo; 2003.
274. Pallant J. *SPSS Survival Manual*. Australia: Allen & Unwin; 2005.
275. Tabachnick B. *Using multivariate statistics* 4th ed. New York: HarperCollins; 2001.
276. Nolla C. The development of permanent teeth. *J Dent Child*. 1960(27):254-66.
277. Gam SM, Lewis AB, Koski K, Polacheck DL. The sex difference in tooth calcification. *J Dent Res*. 1958;37(3):561-7.
278. Moyers R. Development of the dentition and the occlusion. *Handbook of Orthodontics*. 4th ed: Mosby, Incorporated 1991. p. 99-146.
279. Gam SM, Lewis AB, Polacheck DL. Variability of tooth formation. *J Dent Res*. 1959;38(1):135-48.
280. Levander E, Malmgren O, Stenback K. Apical root resorption during orthodontic treatment of patients with multiple aplasia: a study of maxillary incisors. *Eur J Orthod*. 1998;20(4):427-34.
281. Kawashima-Ichinomiya R YM, Tanimoto Y, Asano M, Yamada K, Nakajima R. External Apical Root Resorption and The Release of Interleukin-6 in the Gingival Crevicular Fluid Induced by a Self-Ligating System. *Open Journal of Stomatology*. 2012(2):116-21.
282. Baumgaertel S, Palomo JM, Palomo L, Hans MG. Reliability and accuracy of cone-beam computed tomography dental measurements. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2009;136(1):19-25.

283. 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;137(4 Suppl):S100-8.
284. Stramotas S, Geenty JP, Petocz P, Darendeliler MA. Accuracy of linear and angular measurements on panoramic radiographs taken at various positions in vitro. *Eur J Orthod.* 2002;24(1):43-52.
285. Ash MJ. The permanent maxillary incisors. *Wheeler's Dental anatomy, physiology and occlusion.* 7th ed. Philadelphia, PA: WB Saunders Company; 1993. p. 128-49.
286. English H. External apical root resorption as a consequence of orthodontic treatment. *J N Z Soc Periodontol.* 2001(86):17-23.
287. Motokawa M, Sasamoto T, Kaku M, Kawata T, Matsuda Y, Terao A, et al. Association between root resorption incident to orthodontic treatment and treatment factors. *Eur J Orthod.* 2012;34(3):350-6.
288. Vardimon AD, Graber TM, Pitaru S. [The causes of and repair procedures in external root resorption following palatal suture expansion with magnetic and conventional dilators. Experimental animal research on *Macaca fascicularis* monkeys]. *Fortschr Kieferorthop.* 1991;52(4):193-203.
289. Hall A. Upper incisor root resorption during stage II of the Begg technique: two case reports. *Br J Orthod.* 1978;5(1):47-50.
290. Hartsfield JK, Jr. Pathways in external apical root resorption associated with orthodontia. *Orthod Craniofac Res.* 2009;12(3):236-42.
291. Motokawa M, Terao A, Kaku M, Kawata T, Gonzales C, Darendeliler MA, et al. Open bite as a risk factor for orthodontic root resorption. *Eur J Orthod.* 2013;35(6):790-5.
292. Tzannetou S, Efstratiadis S, Nicolay O, Grbic J, Lamster I. Interleukin-1 beta and beta-glucuronidase in gingival crevicular fluid from molars during rapid palatal expansion. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 1999;115(6):686-96.
293. Schulz S, Stein JM, Altermann W, Klapproth J, Zimmermann U, Reichert Y, et al. Single nucleotide polymorphisms in interleukin-1 gene cluster and subgingival colonization with *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in patients with aggressive periodontitis. *Hum Immunol.* 2011;72(10):940-6.
294. Amaya MP, Criado L, Blanco B, Gomez M, Torres O, Florez L, et al. Polymorphisms of pro-inflammatory cytokine genes and the risk for acute suppurative or chronic nonsuppurative apical periodontitis in a Colombian population. *Int Endod J.* 2013;46(1):71-8.
295. Cullup H, Middleton PG, Duggan G, Conn JS, Dickinson AM. Environmental factors and not genotype influence the plasma level of interleukin-1 receptor antagonist in normal individuals. *Clin Exp Immunol.* 2004;137(2):351-8.
296. Honma M, Ikebuchi Y, Kariya Y, Suzuki H. Regulatory Mechanisms of RANKL Presentation to Osteoclast Precursors. *Curr Osteoporos Rep.* 2014.
297. Kanzaki H, Chiba M, Takahashi I, Haruyama N, Nishimura M, Mitani H. Local OPG gene transfer to periodontal tissue inhibits orthodontic tooth movement. *J Dent Res.* 2004;83(12):920-5.
298. Piedra M, Garcia-Unzueta MT, Berja A, Paule B, Lavin BA, Valero C, et al. "Single nucleotide polymorphisms of the OPG/RANKL system genes in primary hyperparathyroidism and their relationship with bone mineral density". *BMC Med Genet.* 2011;12:168.
299. Atkins GJ, Kostakis P, Vincent C, Farrugia AN, Houchins JP, Findlay DM, et al. RANK Expression as a cell surface marker of human osteoclast precursors in peripheral blood, bone marrow, and giant cell tumors of bone. *J Bone Miner Res.* 2006;21(9):1339-49.
300. Jiang R, Taly A, Grutter T. Moving through the gate in ATP-activated P2X receptors. *Trends Biochem Sci.* 2013;38(1):20-9.
301. Wesselius A, Bours MJ, Agrawal A, Gartland A, Dagnelie PC, Schwarz P, et al. Role of purinergic receptor polymorphisms in human bone. *Front Biosci (Landmark Ed).* 2011;16:2572-85.

- 302.Wesselius A, Bours MJ, Henriksen Z, Syberg S, Petersen S, Schwarz P, et al. Association of P2X7 receptor polymorphisms with bone mineral density and osteoporosis risk in a cohort of Dutch fracture patients. *Osteoporos Int.* 2013;24(4):1235-46.
- 303.Lango H, Weedon MN. What will whole genome searches for susceptibility genes for common complex disease offer to clinical practice? *J Intern Med.* 2008;263(1):16-27.
- 304.Duncan EL, Brown MA. Mapping genes for osteoporosis--old dogs and new tricks. *Bone.* 2010;46(5):1219-25.
- 305.Hirschhorn JN, Gajdos ZK. Genome-wide association studies: results from the first few years and potential implications for clinical medicine. *Annu Rev Med.* 2011;62:11-24.
- 306.Dröng AW, Lindgren CM, McCarthy MI. The genetic and epigenetic basis of type 2 diabetes and obesity. *Clin Pharmacol Ther.* 2012;92(6):707-15.
- 307.King G. Effect of timing of orthodontic appliance reactivation on osteoclast and root resorption. *Biological Mechanisms of Tooth Eruption, Resorption and Replacement by Implants.* Boston, Mass: Harvard Society for the Advancement of Orthodontics; 1998. p. 451-8.
- 308.Pizzo G, Licata ME, Guiglia R, Giuliana G. Root resorption and orthodontic treatment. Review of the literature. *Minerva Stomatol.* 2007;56(1-2):31-44.
- 309.Yamaguchi M, Hayashi M, Fujita S, Yoshida T, Utsunomiya T, Yamamoto H, et al. Low-energy laser irradiation facilitates the velocity of tooth movement and the expressions of matrix metalloproteinase-9, cathepsin K, and alpha(v) beta(3) integrin in rats. *Eur J Orthod.* 2010;32(2):131-9.





## I . Lista de abreviaturas e símbolos

A nomenclatura usada para os genes está de acordo com a *HUGO gene nomenclature committee*.

\* – Símbolo colocado após a sigla do gene, representando um alelo

2D – Duas dimensões

3D – Três dimensões

3' – Extremidade de sequência nucleotídica com o hidroxilo do carbono 3 da pentose livre

5' – Extremidade de sequência nucleotídica com o fosfato do carbono 5 da pentose livre

Ala – Aminoácido alanina

Ap – Aparelho ortodôntico

Arg – Aminoácido arginina

Asn – Aminoácido asparagina

cN – Centínewtons

CNV (*Copy number variation*) – Polimorfismo constituído pela variação do número de cópias de uma sequência do genoma, habitualmente com extensão superior a 1Kb

DNA (ou ADN) – Ácido desoxirribonucleico

dNTPs – Desoxinucleotídeos trifosfatados

dp – Desvio padrão

fig – Figura

Freq – Frequência

g – Grama

- Gln – Aminoácido glutamina  
Glu – Aminoácido ácido glutâmico ou glutamato  
GWA – Genome Wide Association  
His – Aminoácido histidina  
IC – Intervalo de confiança  
IL1 – Interleucina 1  
IL1A – Interleucina 1A  
IL1B – Interleucina 1B  
IL1RN – Recetor antagonista da IL1  
*IL1A* – Gene da interleucina 1A  
*IL1B* – Gene da interleucina 1B  
*IL1RN* – Gene do recetor antagonista da IL1  
Ile – Aminoácido isoleucina  
Kb – 1000 pb  
M – Molar  
MAA – Mordida aberta anterior  
mg – Miligrama  
MgCl<sub>2</sub> – Cloreto de magnésio  
mL – Mililitro  
mM – Milimolar  
n – Número de indivíduos  
ng – Nanograma  
OPT – Ortopantomografia  
OPG – Osteoprotegerina  
OR (*Odds ratio*) – Termo estatístico que traduz o risco conferido por uma determinada condição; > 1 risco aumentado, < 1 risco diminuído, = 1 risco idêntico  
P2X7R – Recetor purinérgico P2X7  
*P2RX7* (*Purinergic receptor P2X7*) – Gene que codifica o recetor purinérgico P2X7  
PCR (*Polymerase Chain Reaction*) – Reação de polimerização em cadeia  
pb – Pares de bases  
PM – Pré-molares  
RANK (*Receptor Activator of Nuclear Factor kappa-B*) – Recetor de ativação do fator nuclear kB  
RANKL (*Receptor Activator of Nuclear Factor kappa-B ligand*) – Ligando do recetor de ativação do fator nuclear kB

RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) – Polimorfismo em comprimento de fragmentos de restrição

RRAE – Reabsorção radicular apical externa

RRAEmax – Reabsorção radicular apical externa máxima, observada nos seis dentes antero-superiores do paciente, que é o indicador de reabsorção radicular para o indivíduo

Rx – Exame imagiológico recorrendo a radiação de tipo Röntgen

SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) – Polimorfismo constituído pela substituição de uma única base

TAE – Tampão Tris-Acetato-EDTA

TaqDNA polimerase – Polimerase do DNA termorresistente derivada do *Thermus aquaticus*

TCFC – Tomografia computadorizada de feixe cónico

Thr – Aminoácido treonina

*TNF* (*Tumor Necrosis Factor*) – Gene que codifica o fator de necrose tumoral alfa

*TNFRSF11* (*Tumor Necrosis Factor Ligand Superfamily, member 11*) – Gene que codifica o RANKL

*TNFRSF11A* (*Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily, member 11A*) – Gene que codifica o recetor de membrana RANK

*TNFRSF11B* (*Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily, member 11B*) – Gene que codifica a proteína osteoprotegerina (OPG)

TO – Tratamento ortodôntico

Tyr – Aminoácido tirosina

UV – Ultra-violeta

μL – Microlitro

μM – Micromolar

$\chi^2$  – Qui-quadrado

ϕX174/HaeIII – Plasmídeo ϕ X174 digerido com a enzima de restrição nº 3 com origem na *Haemophilus aegyptius*, utilizado como marcador de peso molécula

## 2 . Glossário

Explicam-se aqui alguns termos de áreas científicas específicas. Algumas palavras e expressões foram utilizadas na língua inglesa, uma vez que são de difícil tradução e de uso comum na linguagem científica corrente.

## 2.1. Glossário de Genética

**Alelo** – Forma alternativa de um gene. Refere-se a uma de duas ou mais variantes que numa população podem ocorrer num determinado *locus*. Em cada indivíduo, um dos alelos é de origem paterna, o outro de origem materna. Os alelos podem ser diferentes, por exemplo, devido ao polimorfismo de um nucleótido.

**Apoptose** – Processo de morte celular programada, sem fenómenos inflamatórios ou cicatriciais associados.

**Cadeia antisense** – Cadeia do DNA complementar à sense, a partir da qual ocorre a transcrição de um gene (sendo o mRNA sintetizado por complementaridade com a cadeia antisense, a sua sequência vai corresponder à da cadeia sense).

**Cadeia sense** – Cadeia do DNA cuja sequência de nucleótidos corresponde à sequência de aminoácidos de determinado gene.

**Concordância** – Facto de 2 familiares expressarem o mesmo fenótipo.

**Desequilíbrio de ligação alélica** – Ocorrência de uma associação estatística entre alelos (variantes genéticas, habitualmente polimorfismos) de *loci* da mesma região cromossómica, com uma frequência superior à que seria de esperar tendo em conta as frequências individuais de cada alelo. Pensa-se que estas associações específicas de alelos teriam sido preservadas por seleção durante a evolução da espécie humana. Estando próximos e segregando em conjunto, a identificação de apenas alguns destes polimorfismos fornece informação suficiente para inferir sobre os restantes polimorfismos da mesma região cromossómica.

**Enzimas de restrição** – Enzimas (endonucleases) de origem bacteriana que fragmentam o DNA através da hidrólise das ligações internas de fosfato. A especificidade é dada pela sequência de nucleótidos que a enzima reconhece (sequência de restrição), ocorrendo digestão do DNA sempre que a encontra.

**Epigenético (Efeito)** – Refere-se a alterações num fenótipo, por variação quantitativa da expressão génica, que não resultam de uma modificação na sequência do DNA do genoma da célula, mas de um padrão de modificações do DNA e cromatina que incluem a metilação de citosinas, modificações das caudas das histonas e a compactação da cromatina. Este padrão de modificações epigenéticas é estável e transmissível nas mitoses, embora seja reversível e sensível a modificações do meio interno e externo.

**Epistasia** – Modulação da expressão de um gene por acção de outro gene.

**Expressão génica** – Diz respeito aos acontecimentos que conduzem à manifestação funcional de um gene.

**Expressividade variável** – Traduz diferenças quantitativas na expressão de um gene, podendo a expressão do carácter variar de pouco acentuada a grave.

**Frameshift** – Mutação de sequência codificante que envolve a inserção ou deleção de nucleótidos, geralmente num número não múltiplo de 3, interferindo com a sequência dos codões (há desvio da grelha de leitura).

**Gene candidato** – Gene que se considera estar associado a determinado carácter ou doença, no decorrer de estudos moleculares, face às funções da proteína que codifica.

**Hardy-Weinberg (Lei)** – Princípio fundamental da genética de populações: “A proporção das frequências alélicas e genóticas de uma população permanecem constantes de geração em geração, se o acasalamento for aleatório e se não ocorrerem neomutações, seleção e migração.”

**Hereditabilidade** – Proporção do efeito fenotípico (variabilidade do fenótipo) atribuível à variação do genótipo. Resulta do efeito aditivo da expressão dos genes envolvidos mais o efeito interactivo (epistasia). É característica de uma determinada população, num determinado momento.

**Heterozigotia** – Condição em que ocorrem dois alelos diferentes num determinado locus de um par de cromossomas homólogos.

**Homozigotia** – Condição em que ocorrem dois alelos idênticos num determinado locus de um par de cromossomas homólogos.

**Locus** – local onde se encontra uma determinada sequência de DNA num cromossoma (plural-/*loc*).

**Missense** – Mutação em que a alteração de um simples nucleótido causa a substituição de um aminoácido por outro diferente na proteína resultante. Esta substituição pode alterar ou não a função da proteína e pode constituir um polimorfismo ou uma mutação patogénica.

**Nonsense** – Mutação em que a alteração de um simples nucleótido leva ao aparecimento de um codão stop prematuro, do que resulta frequentemente uma proteína mais curta.

**Penetrância** – Probabilidade de expressão de um determinado genótipo (número de pessoas com o fenótipo/número de pessoas com o genótipo).

**Primer ou sequência iniciadora** – Oligodesoximibonucleótido utilizado em reacções de PCR para iniciar a polimerização.

**RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*)** – Polimorfismo em comprimento de fragmentos de restrição. Designa variantes genéticas localizadas em sequências específicas do DNA, sequências de restrição, reconhecidas e degradadas por enzimas de origem bacteriana, as endonucleases de restrição. A variante genética RFLP pode criar ou eliminar uma

sequência de restrição, fazendo variar o número e o comprimento de fragmentos obtidos aquando da digestão de DNA por uma endonuclease específica.

**Sonda** – Sequência de ácidos nucleicos (DNA ou RNA) marcada (por exemplo por complexação com fluoróforo) que serve para identificar determinadas sequências de DNA, às quais se liga por complementaridade (hibridação).

**Splicing** – Processamento do RNA mensageiro, por remoção de sequências intrónicas.

## 2.2. Glossário de Estatística

**Homocedasticidade dos resíduos** – É um dos pressupostos da regressão linear. Significa que para todos os valores preditos, a variância dos resíduos é constante.

**Independência dos resíduos** – É um dos pressupostos da regressão linear. Significa que a magnitude de um resíduo não influencia a magnitude do resíduo seguinte.

**Linearidade dos resíduos** – É um dos indicadores de que a relação entre a variável dependente e as variáveis independentes pode ser não-linear. É analisado através da dispersão dos pontos cujas coordenadas são os valores preditos pelo modelo e os respetivos resíduos.

**Multicolinearidade e singularidade** – A regressão linear múltipla não funciona bem para dados com estas duas características. Ambas se referem à relação entre as variáveis independentes. Existe multicolinearidade quando pares de variáveis independentes apresentam valores de correlação linear elevados (superiores a 0.9). A singularidade ocorre quando uma variável independente é na verdade uma combinação linear de outras variáveis independentes. Assim, um dos pressupostos da regressão linear é a ausência de multicolinearidade e de singularidade.

**Outliers** – A regressão linear múltipla é muito sensível à presença de *outliers*. Estes são detetados no modelo resultante da regressão por apresentarem resíduos estandardizados com valores acima de 3 ou abaixo de -3. Assim, um dos pressupostos da regressão linear é a ausência de *outliers*.

**Resíduo** – Para um dado indivíduo, é o valor da diferença entre o valor predito pelo modelo para a variável dependente e o valor da variável dependente efetivamente observado.

**Tolerance** – Métrica usada para o diagnóstico de multicolinearidade.

**VIF** – Métrica usada para o diagnóstico de multicolinearidade.

### 3 . Consentimento informado do paciente

#### Consentimento Informado

**Projecto:** Reabsorção radicular apical externa associada ao tratamento ortodôntico: factores de susceptibilidade genéticos, biológicos e mecânicos

#### Informação

A reabsorção radicular consiste na redução do comprimento da raiz do dente. Há vários estudos a referir que os pacientes com tratamento ortodôntico (aparelho de correcção dos dentes) estão sujeitos a sofrer reabsorção das raízes dos dentes, embora ela também possa ocorrer na ausência deste tratamento.

Os factores envolvidos podem estar relacionados com características do próprio paciente como é o caso da influência genética.

Solicitamos a sua colaboração para a realização de um projecto de investigação que tem como objectivo avaliar a reabsorção das raízes no tratamento ortodôntico e analisar se há factores de risco genéticos que predispõem para esta situação. Neste projecto só irão participar pacientes que fizeram tratamento ortodôntico, com ou sem reabsorção das raízes no final do tratamento.

Se pretender colaborar, será colhido 1ml de saliva que se utilizará para estudo genético (DNA). Serão também registados alguns dados do processo clínico como sexo, idade, hábitos tabágicos ou a existência de doenças crónicas. Os Rx que realizou antes e no final do tratamento serão avaliados para medir as raízes dos dentes.

As amostras e os inquéritos são anónimos e serão identificados apenas por um número de código. As amostras de saliva serão utilizadas apenas para fins científicos e só irão ser guardadas durante o decorrer do projecto.

Não haverá qualquer remuneração pela participação no projecto e em qualquer momento pode decidir suspender a sua colaboração.

Os resultados do projecto não lhe serão comunicados.

**Projecto:** Reabsorção radicular apical externa associada ao tratamento ortodôntico: factores de susceptibilidade genéticos, biológicos e mecânicos

#### Consentimento

Conforme a “Declaração de Helsínquia” da Associação Médica Mundial (Helsínquia 1964 com actualizações de Tóquio, 1975; Veneza, 1983; Hong Kong, 1989; Sommerset West, 1996; Edimburgo, 2000).

Eu, abaixo assinado, \_\_\_\_\_  
entendi a explicação que me foi fornecida pelo  
\_\_\_\_\_ (nome do Médico Dentista) sobre o  
estudo que se pretende realizar, tendo-me sido dada a oportunidade de fazer as perguntas que julguei necessárias. Foi-me também prestada informação e explicados os objectivos deste estudo.

Além disso, foi-me comunicado que tenho direito de me recusar a participar ou desistir deste estudo, a qualquer momento.

Autorizo a recolha de saliva para estudo genético e a recolha de dados do meu processo clínico. Esta informação será tratada como estritamente confidencial e não cairá no domínio público.

Aceito participar neste estudo segundo as condições propostas e a minha participação é inteiramente voluntária.

Declaro que compreendi a informação prestada e que pretendo colaborar.

O Paciente:

\_\_\_\_\_ data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

O Médico:

\_\_\_\_\_ data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

## 4 . Autorização da Comissão de Ética da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra



FMUC FACULDADE DE MEDICINA  
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

**FMUC | Ethics Committee**

Of. Ref<sup>a</sup> **012-CE-2013**

Date **04/April/2013**

### TO WHOM IT MAY CONCERN

**Subject: Institutional Review Board|IRB (Ethics Committee) Approval.**

**Principal Investigator: Sónia Margarida Alves Pereira**

**Approval date: 09/Setember/2010**

The Institutional Review Board/IRB (Ethics Committee) of the Medical School of the University of Coimbra has approved the research project entitled "**External apical root resorption associated with orthodontic treatment: genetic, biologic and mechanic susceptibility factors**".

The Ethics Committee President,

João Pedroso de Lima MD PhD

GC

SERVIÇOS TÉCNICOS DE APOIO À GESTÃO - STAG • COMISSÃO DE ÉTICA

Pólo das Ciências da Saúde • Unidade Central

Azinhaga de Santa Comba, Celas, 3000-354 COIMBRA • PORTUGAL  
Tel.: +351 239 857 707 (Ext. 542707) | Fax: +351 239 823 236

E-mail: [comissaetica@fmed.uc.pt](mailto:comissaetica@fmed.uc.pt) | [www.fmeduc.pt](http://www.fmeduc.pt)

## 5 . Inquérito clínico

Projeto RRAE

A preencher pelo investigador

**Classificação:** Controlo  RRAE

Código: \_\_\_\_\_

Nome de quem recolheu a informação	Data

A preencher pelo Doente

Doente em contenção de tratamento ortodôntico

Data de Nascimento: \_\_\_\_\_

Hábitos de Tabagismo: \_\_\_\_\_

Antecedentes Pessoais:

Doença Periodontal

Hipotiroidismo

Hipertiroidismo

Hiperpatiroidismo

Traumatismos dentários prévios: Dentes: \_\_\_\_\_

Outros \_\_\_\_\_

Antecedentes familiares: \_\_\_\_\_

Medicação realizada durante o tratamento ortodôntico:

Corticosteróides

Anti-inflamatórios não esteróides

Bifosfonatos

Outros \_\_\_\_\_

## 6 . Dados estatísticos

*Output do SPSS:* relevância da inclusão no modelo da duração do tratamento por estádios

Tabela A. Modelo Sumário

Modelo	R	R Quadrado	R Quadrado ajustado	Erro Padrão
I	.387 <sup>a</sup>	.149	.131	.0886018

a. Preditores: (Constante), Duração tratamento:  $\geq 49$  m, Duração tratamento: 37-48 m, Duração tratamento: 25-36 m, Duração tratamento (meses)

Tabela B. ANOVA<sup>b</sup>

Modelo I	Soma de Quadrados	df	Média de Quadrados	F	<i>p</i>
Regressão	.262	4	.065	8.343	.000 <sup>a</sup>
Residual	1.492	190	.008		
Total	1.754	194			

a. Preditores: (Constante), Duração tratamento:  $\geq 49$  m, Duração tratamento: 37-48 m, Duração tratamento: 25-36 m, Duração tratamento (meses)

b. Variável dependente: RRAE máxima

*Output* do SPSS: verificação dos pressupostos do modelo de regressão linear: multicolinearidade e singularidade.

Tabela C. Variáveis excluídas

Modelo	Estatística de colinearidade		
	<i>Tolerance</i>	VIF	Valor mínimo de <i>Tolerance</i>
Sexo	.992	1.008	.992
Idade à data do TO	.997	1.003	.997
MAA	.974	1.027	.974
Extração PM	.940	1.064	.940
Ap. Hyrax	.986	1.015	.986
Interposição lingual	.978	1.022	.978
Overjet	.997	1.003	.997
Classe II Esquelética	.945	1.059	.945
1 Classe III Esquelética	.996	1.004	.996
P2RX7AG	1.000	1.000	1.000
P2RX7GG	.999	1.001	.999
RANK CT	.997	1.003	.997
RANK TT	.999	1.002	.999
OPG CT	.986	1.015	.986
OPG TT	.981	1.019	.981
ILIBCT	.997	1.003	.997
ILIBTT	1.000	1.000	1.000
Sexo	.970	1.030	.964
Idade à data do TO	.995	1.005	.982
MAA	.930	1.075	.930
Extração PM	.911	1.097	.911
Interposição lingual	.956	1.046	.956
Overjet	.996	1.004	.982
Classe II Esquelética	.944	1.059	.931
2 Classe III Esquelética	.960	1.041	.950
P2RX7AG	.996	1.004	.982
P2RX7GG	.986	1.015	.972
RANKCT	.995	1.005	.983
RANK TT	.990	1.010	.978
OPGCT	.985	1.015	.972
OPG TT	.981	1.019	.967
ILIBCT	.994	1.006	.982
ILIBTT	1.000	1.000	.985

Modelo	Estatística de colinearidade		
	<i>Tolerance</i>	VIF	Valor mínimo de <i>Tolerance</i>
Sexo	.953	1.049	.953
Idade à data do TO	.991	1.009	.970
MAA	.927	1.079	.927
Extração PM	.905	1.105	.905
Interposição lingual	.956	1.046	.950
Overjet	.988	1.012	.970
Classe II Esquelética	.927	1.079	.927
3 Classe III Esquelética	.959	1.043	.939
P2RX7AG	.362	2.763	.358
RANKCT	.992	1.008	.971
RANKTT	.990	1.010	.965
OPG CT	.974	1.027	.972
OPG TT	.975	1.025	.967
ILIBCT	.992	1.008	.968
ILIBTT	1.000	1.000	.972
Sexo	.952	1.051	.903
Idade à data do TO	.990	1.010	.903
MAA	.921	1.086	.896
Interposição lingual	.929	1.076	.880
Overjet	.986	1.014	.903
Classe II Esquelética	.904	1.107	.881
4 Classe III Esquelética	.958	1.044	.904
p2rx7AG	.356	2.808	.356
rank CT	.992	1.009	.904
rank TT	.980	1.021	.895
opg CT	.966	1.035	.898
opg TT	.962	1.040	.892
ILIBCT	.986	1.014	.899
ILIBTT	.986	1.014	.893
Idade à data do TO	.966	1.035	.902
MAA	.920	1.087	.885
Interposição lingual	.917	1.090	.879
Overjet	.986	1.014	.901
Classell Esquelética	.903	1.108	.877
Classe III Esquelética	.950	1.053	.893
5 P2RX7AG	.355	2.813	.352
RANK CT	.988	1.013	.903
RANK TT	.976	1.025	.894
OPG CT	.966	1.035	.896
OPG TT	.962	1.040	.890
ILIBCT	.977	1.024	.897
ILIBTT	.980	1.021	.892

1. Preditores no Modelo: (Constante), Duração tratamento (meses)

2. Preditores no Modelo: (Constante), Duração tratamento (meses), Ap. Hyrax

3. Preditores no Modelo: (Constante), Duração tratamento (meses), Ap. Hyrax, P2RX7GG

4. Preditores no Modelo: (Constante), Duração tratamento (meses), Ap. Hyrax, P2RX7GG, Extração PM

5. Preditores no Modelo: (Constante), Duração tratamento (meses), Ap. Hyrax, P2RX7GG, Extração PM, Sexo

**Nota:** Variável dependente %RRAEmax

*Output* do SPSS: modelo de regressão linear.

Tabela D. Modelo Sumário

Modelo	R	R Quadrado	R Quadrado Ajustado	Erro Padrão
1	.369 <sup>a</sup>	.136	.131	.0886096
2	.439 <sup>b</sup>	.193	.184	.0858673
3	.482 <sup>c</sup>	.232	.220	.0839699
4	.513 <sup>d</sup>	.263	.248	.0824585
5	.537 <sup>e</sup>	.288	.270	.0812576

1. Preditores no Modelo: (Constante), Duração tratamento (meses)

2. Preditores no Modelo: (Constante), Duração tratamento (meses), Ap. Hyrax

3. Preditores no Modelo: (Constante), Duração tratamento (meses), Ap. Hyrax, P2RX7GG

4. Preditores no Modelo: (Constante), Duração tratamento (meses), Ap. Hyrax, P2RX7GG, Extração PM

5. Preditores no Modelo: (Constante), Duração tratamento (meses), Ap. Hyrax, P2RX7GG, Extração PM, Sexo

**Nota:** Variável dependente %RRAEmax

Tabela E. ANOVA

Modelo	Soma de quadrados	gl	Média de quadrados	F	p
Regressão	.238	1	.238	30.333	.000 <sup>a</sup>
1 Residual	1.515	193	.008		
Total	1.754	194			
Regressão	.338	2	.169	22.913	.000 <sup>b</sup>
2 Residual	1.416	192	.007		
Total	1.754	194			
Regressão	.407	3	.136	19.232	.000 <sup>c</sup>
3 Residual	1.347	191	.007		
Total	1.754	194			
Regressão	.462	4	.115	16.974	.000 <sup>d</sup>
4 Residual	1.292	190	.007		
Total	1.754	194			
Regressão	.506	5	.101	15.315	.000 <sup>e</sup>
5 Residual	1.248	189	.007		
Total	1.754	194			

1. Preditores no Modelo: (Constante), Duração tratamento (meses)

2. Preditores no Modelo: (Constante), Duração tratamento (meses), Ap. Hyrax

3. Preditores no Modelo: (Constante), Duração tratamento (meses), Ap. Hyrax, P2RX7GG

4. Preditores no Modelo: (Constante), Duração tratamento (meses), Ap. Hyrax, P2RX7GG, Extração PM

5. Preditores no Modelo: (Constante), Duração tratamento (meses), Ap. Hyrax, P2RX7GG, Extração PM, Sexo

**Nota:** Variável dependente %RRAEmax

Tabela F. Coeficientes

Modelo	Coeficientes não estandardizados		Coeficientes estandardizados	t	p	
	B	DP	Beta			
1	(Constante)	.056	.023	2.404	.017	
	Duração tratamento (meses)	.003	.001	.369	5.508	.000
2	(Constante)	.059	.023	2.625	.009	
	Duração tratamento (meses)	.003	.001	.340	5.200	.000
	Ap. Hyrax	.088	.024	.240	3.678	.000
3	(Constante)	.044	.023	1.965	.051	
	Duração tratamento (meses)	.003	.001	.337	5.270	.000
	Ap. Hyrax	.080	.024	.217	3.371	.001
	P2RX7GG	.038	.012	.200	3.126	.002
4	(Constante)	.050	.022	2.235	.027	
	Duração tratamento (meses)	.003	.001	.287	4.416	.000
	Ap. Hyrax	.092	.024	.250	3.893	.000
	P2RX7GG	.035	.012	.184	2.930	.004
	Extração PM	.039	.014	.186	2.840	.005
5	(Constante)	.076	.024	3.145	.002	
	Duração tratamento (meses)	.003	.001	.275	4.270	.000
	Ap. Hyrax	.084	.023	.230	3.599	.000
	P2RX7GG	.031	.012	.162	2.595	.010
	Extração PM	.040	.013	.193	2.990	.003
	Sexo	-.032	.012	-.162	-2.580	.011

1. Preditores no Modelo: (Constante), Duração tratamento (meses)

2. Preditores no Modelo: (Constante), Duração tratamento (meses), Ap. Hyrax

3. Preditores no Modelo: (Constante), Duração tratamento (meses), Ap. Hyrax, P2RX7GG

4. Preditores no Modelo: (Constante), Duração tratamento (meses), Ap. Hyrax, P2RX7GG, Extração PM

5. Preditores no Modelo: (Constante), Duração tratamento (meses), Ap. Hyrax, P2RX7GG, Extração PM, Sexo

Nota: Variável dependente %RRAEmax

## 7 . Índice de tabelas

Tabela 1.1. Classificação etiológica das reabsorções radiculares <sup>4</sup> .....	7
Tabela 1.2. Genes e polimorfismos investigados como fatores de suscetibilidade à RRAE.....	38
Tabela 1.3. Genes e SNPs estudados.....	39
Tabela 2.1. Valores resultantes das medições automáticas com a aplicação ARIAS, correspondentes ao paciente das figuras 2.1 e 2.2.....	60
Tabela 2.2. <i>Primers</i> e respectivas temperaturas de emparelhamento utilizadas na 1ª PCR.....	63
Tabela 2.3. <i>Primers</i> e sondas usadas para a genotipagem do polimorfismo rs1805034.....	70
Tabela 3.1. Resultados das avaliações do erro sistemático e do erro aleatório.....	75
Tabela 3.2. Resultados da avaliação da %RRAE para cada dente (n = 195).....	76
Tabela 3.3. Teste ANOVA de medidas repetidas a um fator (reabsorção).....	77
Tabela 3.4. Testes Post hoc associados a ANOVA de medidas repetidas a um fator (reabsorção).....	78
Tabela 3.5. Resultados da %RRAE máxima por indivíduo.....	80
Tabela 3.6. Frequências dos dentes que correspondem à %RRAEmax.....	81
Tabela 3.7. Caracterização da amostra relativamente aos fatores não genéticos (n=195).....	83
Tabela 3.8. Frequências genotípicas e alélicas dos 4 polimorfismos.....	84
Tabela 3.9. Estatísticas de colinearidade para as variáveis incluídas no modelo por estágio da regressão <i>stepwise</i> .....	86
Tabela 3.10. Resultados do modelo de regressão linear múltipla <sup>a</sup> .....	88
Tabela 3.11. Resultados do modelo de regressão linear múltipla para vários intervalos de duração do tratamento.....	90
Tabela 3.12. Análise de epistasia entre os genes <i>IL1B</i> e <i>P2RX7</i> .....	90
Tabela 3.13. Resultados do teste t-Student para o subgrupo CC-AG.....	91
Tabela 3.14. Resultados do teste <i>t-Student</i> para o subgrupo CT-AG.....	92

## 8 . Índice de Figuras

<b>Figura 1.1.</b> Exemplos de diagnóstico radiológico de reabsorção radicular apical externa (A) e de reabsorção radicular interna associada a reabsorção radicular apical externa (B).....	6
<b>Figura 1.2.</b> Esquema do dente e periodonto de sustentação. Polpa (1), dentina (2), cimento (3), ligamento periodontal (4), osso alveolar (5). .....	10
<b>Figura 1.3.</b> Imagem histológica da raiz dentária e do periodonto de sustentação <sup>39</sup> . Imagem proveniente da tese de mestrado da autora: Giemsa, 100x no original. Polpa (1), dentina (2), cimento celular (3), ligamento periodontal (4), osso alveolar (5).....	11
<b>Figura 1.4.</b> Progressão da reabsorção radicular apical externa (A-D), quando o dente é submetido a forças ortodônticas (representadas pela seta vermelha e azul). Adaptado de Roberts <i>et al.</i> <sup>64</sup> .....	14
<b>Figura 1.5.</b> Mecanismos envolvidos na resposta da raiz e periodonto às forças ortodônticas. Adaptado de Consolaro <i>et al.</i> <sup>65</sup> .....	15
<b>Figura 1.6.</b> Localização próxima, em 2q13 (cromossoma 2, braço longo, banda 1, sub-banda 3) dos genes da família da IL1, <i>IL1A</i> , <i>IL1B</i> e <i>IL1RN</i> . A região inclui aproximadamente 300 Kb.....	17
<b>Figura 1.7.</b> Atuação do sistema RANK/RANKL/OPG, da IL1B e do P2x7R ao nível da remodelação óssea e da raiz. Dada a interdependência funcional das moléculas, a repercussão ao nível da reabsorção da raiz é difícil de prever e vai depender do equilíbrio estabelecido.....	17
<b>Figura 1.8.</b> Fatores que determinam os fenótipos mendelianos, ditos “monogênicos”. Adaptado de Abass <i>et al.</i> <sup>205</sup> .....	34
<b>Figura 1.9.</b> Fatores que determinam os fenótipos complexos ou multifatoriais. Adaptado de Abass <i>et al.</i> <sup>205</sup> .....	35
<b>Figura 1.10.</b> Modelo proposto para a interferência do SNP rs1143634 do gene da IL1B na RRAE.....	40
<b>Figura 1.11.</b> Esquema representativo da Zona focal. Fonte: William S. Moore <sup>233</sup> .....	44
<b>Figura 1.12.</b> Imagens de ortopantomografia: (A) respeitando os critérios de qualidade e (B) sem critérios de qualidade. ....	46
<b>Figura 1.13.</b> Classificação dos níveis de reabsorção radicular durante o tratamento ortodôntico, sugerida por Levander e Malmgren <sup>22</sup> . ....	49
<b>Figura 1.14.</b> Pontos de referência para avaliação de RRAE. V- Junção amelo-cementária vestibular; M - Junção amelo-cementária mediana.....	50

<b>Figura 2.1.</b> Imagens iniciais de pré (A) e pós (C) tratamento e as mesmas imagens após aplicação de filtros pelo ARIAS (B e D respectivamente). As mensurações foram efetuadas nas imagens processadas.....	58
<b>Figura 2.2.</b> Medição dos seis dentes antero-superiores na imagem inicial (T1) processada, A, e na imagem final (T2) processada, B.....	59
<b>Figura 2.3.</b> Sequências de restrição e pontos de quebra das endonucleases <i>AseI</i> e <i>TaqI</i> utilizadas na genotipagem por RFLP dos polimorfismos dos genes da OPG e da IL1B, respectivamente.....	64
<b>Figura 2.4.</b> Esquema do padrão de migração eletroforético correspondente aos três genótipos do polimorfismo rs3102735 (OPG).....	65
<b>Figura 2.5.</b> Resultado da eletroforese da técnica de PCR-RFLP utilizada para identificar o polimorfismo rs3102735 (OPG). M – marcador de peso molecular; 1 - homozigoto TT; 2 - heterozigoto TC; 3 - homozigoto CC.....	66
<b>Figura 2.6.</b> Esquema do padrão de migração eletroforético dos três genótipos do polimorfismo rs1143634 ( <i>IL1B</i> ).....	66
<b>Figura 2.7.</b> Resultado da eletroforese da técnica de PCR-RFLP utilizada para identificar o polimorfismo rs1143634 ( <i>IL1B</i> ). 1 - homozigoto CC; 2 - heterozigoto CT; 3 - homozigoto TT; M – marcador de peso molecular.....	67
<b>Figura 2.8.</b> Atuação da sonda TaqMan.....	68
<b>Figura 2.9.</b> Discriminação alélica do polimorfismo rs1805034 do gene <i>TNFRSF11</i> (RANK) por PCR em tempo real. A- fluorescência proveniente das duas sondas correspondendo à presença de heterozigotia; B e C correspondem a amostras de homozigotos.....	69
<b>Figura 2.10.</b> Identificação do polimorfismo rs1805034 do gene <i>TNFRSF11</i> (RANK) por sequenciação. A – homozigoto para o alelo C; B – heterozigoto; C – homozigoto para o alelo T.....	70
<b>Figura 3.1.</b> Histograma relativo à %RRAE do dente 21.....	76
<b>Figura 3.2.</b> Percentagem de RRAE para cada dente sob a forma de <i>box plots</i> .....	79
<b>Figura 3.3.</b> Histograma relativo à %RRAEmax.....	81
<b>Figura 3.4.</b> Gráfico de probabilidade normal dos resíduos de regressão estandardizados. Variável dependente: %RRAEmax.....	87
<b>Figura 3.5.</b> Gráfico de dispersão entre os valores preditos pelo modelo e os resíduos associados. Variável dependente: %RRAEmax.....	87







## Índice

Sumário	1
<b>I - Introdução</b>	<b>3</b>
1 . Reabsorção Radicular Apical Externa	5
2 . Mecanismos celulares e moleculares	9
2.1. Células e estruturas intervenientes	9
2.2. Mecanismos biológicos	12
2.3. Mediadores moleculares	16
3 . Fatores de risco	20
3.1. Fatores de risco relacionados com o tratamento ortodôntico	20
3.1.1. Duração de tratamento	20
3.1.2. Deslocamento apical	21
3.1.3. Características das forças aplicadas	21
3.1.3.1. Magnitude da força	22
3.1.3.2. Intervalo de aplicação da força	23
3.1.3.3. Forças contínuas / descontínuas	23
3.1.4. Direção do movimento dentário	25
3.1.5. Tipo de aparelho	25
3.1.6. Técnica de tratamento	26
3.2. Fatores de risco relacionados com o paciente	26
3.2.1. Idade	27
3.2.2. Género	27
3.2.3. Características da raiz	27
3.2.3.1. Morfologia radicular	28
3.2.3.2. Rizogénese incompleta	28
3.2.3.3. Dentes com tratamento endodôntico	28
3.2.3.4. Existência de RRAE prévia ao tratamento ortodôntico	28
3.2.4. Traumatismo dentário	29
3.2.5. Maus hábitos orais / Mordida aberta anterior	29
3.2.6. Severidade e tipo de má oclusão	29
3.2.7. Saúde oral	30
3.2.8. Condição sistémica do paciente	30
3.2.9. Efeito de certos fármacos	31
3.3. Suscetibilidade genética	32

3.3.1. Polimorfismos do DNA	32
3.3.2. Fenótipos complexos	34
3.3.3. Estudos de associação	36
3.4. Genes de suscetibilidade para a reabsorção radicular	37
3.4.1. Polimorfismo rs1143634 do gene <i>IL1B</i>	39
3.4.2. Polimorfismo rs1805034 do gene <i>TNFRSF11A</i>	41
3.4.3. Polimorfismo rs3102735 do gene <i>TNFRSF11B</i>	41
3.4.4. Polimorfismo rs1718119 do gene <i>P2RX7</i>	42
3.4.5. Outros polimorfismos	43
4. Diagnóstico imagiológico	43
4.1. Ortopantomografia	44
4.2. Radiografia Periapical	46
4.3. Novas técnicas de imagiologia	47
4.4. Medição da RRAE em radiografias	48
5. Objetivos	51
<b>2 - Materiais e métodos</b>	<b>53</b>
1. Desenho do estudo	55
2. População	55
3. Avaliação da RRAE	57
3.1. Avaliação das ortopantomografias	57
3.2. Fiabilidade do método de medição	61
4. Caracterização genotípica	61
4.1. Extração do DNA	61
4.2. Quantificação do DNA	62
4.3. Genotipagem por sequenciação	62
4.4. Genotipagem dos polimorfismos dos genes <i>TNFRSF11B</i> e <i>IL1B</i>	64
4.5. Genotipagem dos polimorfismos dos genes <i>P2RX7</i> e <i>TNFRSF11A</i>	67
5. Análise estatística	71
<b>3 - Resultados</b>	<b>73</b>
1. Erro intra-operador	75
2. Caracterização e comparação da reabsorção por dente	76
3. Caracterização da reabsorção por indivíduo	80
4. Modelo de previsão de suscetibilidade à RRAE	82
4.1. Variáveis independentes	82
4.1.1. Variáveis clínicas	83
4.1.2. Variáveis genéticas	83
4.2. Modelo de regressão linear	84
4.3. Duração do tratamento por estádios	89
4.4. Epistasia entre os genes <i>IL1B</i> e <i>P2RX7</i>	90

---

<b>4 - Discussão</b>	93
1 . Desenho do estudo	95
2 . Valores de Reabsorção Radicular Apical Externa (RRAE)	99
3 . Fatores não genéticos	100
4 . Fatores genéticos	104
5 . A RRAE como fenótipo complexo	112
6 . Aplicação clínica	113
<b>5 - Conclusões e perspectivas futuras</b>	117
<b>6 - Resumo</b>	123
<b>7 - Abstract</b>	127
<b>8 - Bibliografia</b>	131
<b>9 - Anexos</b>	149
1 . Lista de abreviaturas e símbolos	151
2 . Glossário	153
2.1. Glossário de Genética	154
2.2. Glossário de Estatística	156
3 . Consentimento informado do paciente	157
4 . Autorização da Comissão de Ética da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra	160
5 . Inquérito clínico	161
6 . Dados estatísticos	162
7 . Índice de tabelas	167
8 . Índice de Figuras	168
<b>10 - Índice</b>	171