UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

INFLUÊNCIA DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS EM GENES DO PROCESSO DE REMODELAÇÃO ÓSSEA NA LESÃO PERIAPICAL

IGOR BASSI FERREIRA PETEAN

Ribeirão Preto

2017

IGOR BASSI FERREIRA PETEAN

INFLUÊNCIA DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS EM GENES DO PROCESSO DE REMODELAÇÃO ÓSSEA NA LESÃO PERIAPICAL

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do Título de Mestre em Ciências, junto ao Programa de Odontologia Restauradora com Área de Concentração em Endodontia.

Orientador: *Prof. Dr. Manoel D. de Sousa Neto*

Ribeirão Preto

2017

AUTORIZAÇÃO PARA REPRODUÇÃO

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo ou pesquisa, desde que citada a fonte.

Assinatura do autor: _____

Data: ____/____/ 2017.

FICHA CATALOGRÁFICA

Petean, Igor Bassi Ferreira

Influência de polimorfismos genéticos em genes do processo de remodelação óssea na lesão periapical. Ribeirão Preto, 2017.

62 p.: il.; 30 cm

Dissertação de mestrado, apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FORP-USP). Área de concentração: Odontologia Restauradora-Endodontia.

Orientador: Prof. Dr. Manoel Damião de Sousa Neto

1. Lesão periapical. 2. Remodelação óssea. 3. Polimorfismos Genéticos

PETEAN, I. B. F. **Influência de polimorfismos genéticos em genes do processo de remodelação óssea na lesão periapical**. 2017. 62 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. Manoel Damião de Sousa Neto (Orientador)
Instituição: Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP
Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____
Instituição: _____
Julgamento: _____
Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____
Instituição: _____
Julgamento: _____
Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____
Instituição: _____
Julgamento: _____
Assinatura: _____

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Pesquisa em Endodontia do Departamento de Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, e no Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

DEDICATÓRIA

A **Deus**, que constantemente está ao meu lado, iluminando meus passos, me guiando no dia a dia. Deus é quem nos ampara e nos cria oportunidades para o crescimento como ser humano. “Deus é meu amigo, ele quem cuida de mim”.

Ao meu pai, **Valdenir Petean**, exemplo de garra e força. Obrigado por toda sua bondade, apoio e preocupação com meu futuro. Todas as minhas vitórias são suas. Sei o quão se sente orgulhoso em cada uma delas. Seu incentivo foi fundamental.

À minha mãe, **Cátia Bassi Ferreira Petean**, mais do que minha mãe, minha melhor amiga, meu exemplo de força e de cuidado. Nossa conexão é eterna. Suas palavras, incentivo e amor são fundamentais em minha vida. Minhas conquistas sempre serão suas. Obrigado por todo carinho, pelos ensinamentos, por toda sua força e amor.

Ao meu irmão, **Iago Bassi Ferreira Petean**, meu companheiro diário, meu grande amigo. Obrigado pelo apoio e pelo orgulho que sentimos um do outro, o qual nos motiva diariamente em nossas conquistas.

Todo meu amor, carinho e admiração por cada um de vocês. Espero um dia retribuir tudo que fizeram por mim.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Manoel Damião de Sousa Neto**, exemplo de determinação, inteligência, dedicação e perseverança. Meu reconhecimento e gratidão por todas as palavras, ensinamentos, conselhos e críticas, fundamentais para meu crescimento. Muito obrigado por todas as oportunidades oferecidas e pelo voto de confiança em cada uma delas. Minha gratidão por todo apoio e colaboração em minha formação intelectual.

À **Profa. Dra. Erika Calvano Kuchler**, por quem tenho admiração por sua competência e inteligência. Obrigado pelos ensinamentos, conversas, conselhos e principalmente por todo o apoio neste trabalho. Minha gratidão por todo o conhecimento compartilhado.

Ao **Prof. Dr. Leonardo dos Santos Antunes**, da Universidade Federal Fluminense do Rio de Janeiro, por todo auxílio e colaboração na execução dessa pesquisa.

Ao **Prof. Dr. Manoel Damião de Sousa Neto** e às alunas **Isadora Mello Vilarinho Soares**, **Fabiane Carneiro Lopes**, **Vanessa Lessa** e **Keila de Almeida Franceschini**, do Programa de Pós-Graduação em Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, pela colaboração no desenvolvimento e manutenção do banco de dados dos atendimentos realizados na Clínica de Endodontia da FORP-USP, base para o desenvolvimento desse trabalho.

Aos professores da disciplina de Endodontia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, **Prof. Dr. Antonio Miranda da Cruz Filho**, **Prof. Dr. Ricardo Gariba Silva**, **Prof. Dr. Luiz Paschoal Vansan** e **Prof. Dr. Ricardo Novak Savioli**, por todos os ensinamentos e experiências clinicas e científicas compartilhadas.

Ao **Prof. Dr. Jesus Djalma Pécora**, maior exemplo de pesquisador. Minha gratidão pelos ensinamentos compartilhados, conselhos de ciência e de vida. Minha admiração por sua sabedoria.

Aos professores do Departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, **Profa. Dra. Léa Assed Bezerra da Silva**, **Profa. Dra. Raquel Assed Bezerra Segato** e **Prof. Dr.**

Paulo Nelson Filho, por todos os ensinamentos desde a iniciação científica, por todas as oportunidades e caminhos abertos. Obrigado por viabilizarem a execução deste trabalho.

Ao **Prof. Dr. Francisco Wanderley Garcia de Paula e Silva**, por despertar em mim o interesse em fazer ciência, por me ensinar a dar os primeiros passos nessa caminhada e pelo apoio constante nos diferentes momentos de minha vida. Muito obrigado por todo conhecimento compartilhado. Meu agradecimento e admiração por sua inteligência, competência e dedicação.

À técnica **Nilza Letícia Magalhães**, do Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, pelo auxílio, experiência e alegria durante a execução desse trabalho.

Ao funcionário **Carlos Feitosa dos Santos**, pela dedicação e disponibilidade em auxiliar. Obrigado por todos os lembretes, conversas e apoio.

Ao funcionário **Reginaldo Santana da Silva**, pela companhia diária, incentivo e disponibilidade.

Aos funcionários **Frederico Augusto Farias**, **Luiza Godoi Pitol**, **Maria Amália Vlesti de Oliveira**, **Maria Izabel Miguel** e **Rosângela Angelini**, pelo convívio e solicitude.

À **Isadora Mello Vilarinho Soares**, pelo apoio e incentivo. Exemplo de dedicação e força de vontade. Meu reconhecimento e gratidão por sua colaboração no desenvolvimento desse trabalho, pelo conhecimento compartilhado e pela amizade construída.

À **Larissa Ernesto Pereira** e **Bruno Monguilhot Crozeta**, pela amizade, conhecimento compartilhado e incentivo durante essa caminhada. Aos amigos **Fabiane Carneiro Lopes**, **Graziela Bianchi Leoni**, **Jardel Francisco Mazzi Chaves**, **Rodrigo Dantas Pereira e Luis Eduardo de Sousa Flamini**, pelos ensinamentos científicos e profissionais, apoio e inspiração desde o inicio.

Aos amigos do Programa de Pós-Graduação em Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, em especial a **Fernanda Plotegher**, **Alessandro Lamira**, **Amanda Buosi Biagi**, **Ariane Fernandez**, **Barbara Jobim**, **Caroline Cristina Borges**, **Daniel Filizolla**, **Fabiana de Góes Paiola**, **Fillipe Mendes Silva**, **Kleber Carvalho**, **Isabela Lima de Mendonça**, **Júlia Adornes Gallas**, **Patrícia Escobar**, **Paulo André Yamin**, **Rafael Verardino de Camargo**, **Rafael Souza Assis**, **Reinaldo Dias Neto**, **Shelyn Akari Yamakami**, **Thaís Oliveira** e **Vicente Fretes**, pela convivência, conhecimentos e experiências compartilhados.

Aos amigos do Programa de Pós-Graduação em Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, em especial à **Daniela Silva Barroso de Araújo**, **Daniele Lucca Longo** e **Fernanda Regina Ribeiro dos Santos**, por todos ensinamentos e exemplos transmitidos.

Ao **CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico**, pela bolsa de estudos outorgada.

À **FAPESP - Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo** (2015/06866-5), pelo auxílio concedido.

À **Universidade de São Paulo** e à **Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo**, por tudo que me proporcionou desde o início de minha formação profissional, propiciando o privilégio e honra de fazer parte do grupo discente da unidade.

À toda **minha família** e à **Deus**, por estarem ao meu lado em mais esta conquista.

A todos que de alguma forma estiveram ao meu lado em minha caminhada até aqui e no desenvolvimento desse trabalho.

RESUMO

PETEAN, I. B. F. **Influência de polimorfismos genéticos em genes do processo de remodelação óssea na lesão periapical**. 2017. 62 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Fatores microbianos, mecânicos e intrínsecos ao hospedeiro são os responsáveis pelo insucesso endodôntico e necessidade de reintervenção. Polimorfismos genéticos são diferenças na sequência do DNA humano que influenciam na susceptibilidade do organismo frente a doenças e nas suas respostas ao meio ambiente. O objetivo do presente estudo foi investigar o envolvimento de aspectos moleculares e clínicos na resposta do hospedeiro frente ao tratamento endodôntico, por meio da análise da expressão e frequência de polimorfismos dos genes reguladores do processo de remodelação óssea em pacientes submetidos ao tratamento endodôntico. Pacientes que apresentaram necrose pulpar e lesão periapical instalada no momento do tratamento endodôntico foram chamados para consulta de acompanhamento. Foram incluídos no presente estudo 150 pacientes, que apresentaram tratamento concluído há no mínimo um ano antes da consulta de acompanhamento. Desse total, 64 pacientes apresentaram sinais e sintomas clínicos/radiográficos indicativos de lesões periapicais persistentes, e 86 indivíduos apresentaram reparação da lesão. No momento do acompanhamento, foram coletas amostras de saliva dos pacientes como fonte de DNA genômico, o qual foi extraído a partir do *pellet* de células sedimentado e genotipado para *RANK* (rs3826620), *RANKL* (rs9594738) e *OPG* (rs2073618) por PCR em tempo real. A frequência dos genótipos e alelos foi avaliada por meio da razão de chance (odds ratio), teste do qui-quadrado ou teste exato de Fisher, utilizando os softwares Epi Info 3.5.2 e Graphpad Prism. O tempo de acompanhamento após o tratamento foi utilizado como covariável na análise de regressão logística múltipla para cada um dos polimorfismos. O nível de significância estabelecido foi de 5%. Foi observada associação na distribuição dos alelos do polimorfismo em *RANK* entre os grupos ($p=0,04$). No polimorfismo em *RANKL*, a distribuição dos genótipos apresentou diferença estatisticamente significante entre os grupos ($p=0,05$). O tempo de acompanhamento esteve associado aos casos de lesões periapicais persistentes para cada um dos polimorfismos analisados ($p<0,05$), sendo que na análise ajustada pelo tempo como covariável, os polimorfismos rs3826620 em *RANK* ($p=0.02$) e rs9594738 em *RANKL* ($p=0.03$) continuaram associados a lesões periapicais persistentes. O polimorfismo rs2073618 em *OPG* não foi associado a distribuição dos grupos em nenhuma das análises ($p>0,05$). Conclui-se que polimorfismos em *RANK* e *RANKL* estão associados ao risco do desenvolvimento de lesões periapicais persistentes.

Palavras chaves: lesão periapical, remodelação óssea, polimorfismos genéticos.

ABSTRACT

PETEAN, I. B. F. **Influence of genetic polymorphisms in bone remodeling genes on apical periodontitis**. 2017. 62 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Microbial, mechanical and related to host response factors are responsible for endodontic failure and requirement for reintervention. Genetic polymorphisms are differences in the sequence of human DNA that influence in the susceptibility to diseases and host response to the environment. The aim of this study was to evaluate the association between molecular and clinical aspects in the host response to root canal therapy (RCT), by analyzing the expression and frequency of polymorphisms of genes regulating the bone remodeling process in patients submitted to endodontic treatment. Patients that presented pulp necrosis and apical periodontitis at the time of RCT, with at least 1 year of follow-up after RCT were recalled. Sixty-four subjects with signs/symptoms of PAP and 86 subjects with root canal–treated teeth exhibiting healthy perirradicular tissues (healed) were included. At the time of follow-up visit, saliva samples from patients were collected as a source of genomic DNA, which was extracted from the *pellet* of sedimented cells and used for *RANK* (rs3826620), *RANKL* (rs9594738) and *OPG* (rs2073618) genotyping by real-time PCR. Genotype and allele frequencies were compared by chi-square test or Fisher's exact tests and odds ratio was implemented, using Epi Info 3.5.2 and Graphpad Prism. A logistic regression analysis was also performed using time of follow-up as co-variate. All tests were performed with an established alpha of 0.05. An association between allele distribution and the polymorphism in *RANK* was observed. Subjects that carry the allele T had a lower risk to have PAP ($p=0.04$). In *RANKL* polymorphism, the genotype distribution was statistically significant different between PAP and healed groups ($p=0.05$). Time of follow-up was associated with PAP ($p<0.05$). In the logistic regression analysis using time as a co-variant, *RANK* rs3826620 ($p=0.02$) and *RANKL* rs9594738 ($p=0.03$) were associated with PAP. The polymorphism rs2073618 in *OPG* was not associated with PAP ($p>0.05$). We conclude that polymorphisms in *RANK* and *RANKL* are associated with the risk of developing persistent periapical lesions.

Key-words: apical periodontitits,bone remodeling process, genetic polymorphisms.

SUMÁRIO

Introdução.....01

Proposição.....09

Materiais e Método.....13

Resultados.....25

Discussão.....31

Conclusões.....39

Referências.....43

Apêndice.....57

Anexos

INTRODUÇÃO

A cárie dentária é uma infecção localizada, destrutiva e progressiva do esmalte e da dentina, que se não tratada, pode resultar em implicações na polpa do dente (COHEN e HARGREAVES, 2007). A polpa dental é um tecido que apresenta capacidade de defesa diante estímulos pró-inflamatórios advindos das lesões de cárie, por meio da diminuição da permeabilidade dentinária ou pela deposição de tecido mineralizado na busca de isolar o agente agressor (LEE et al., 2006; PAULA-SILVA et al., 2009; HARGREAVES e COHEN, 2011). Quando essa defesa é vencida, a polpa dental se torna contaminada por micro-organismos e o tecido pulpar sofre processo de necrose, progredindo para o desenvolvimento da lesão periapical (MARTÓN e KISS, 2000; COHEN e HARGREAVES, 2007).

A lesão periapical consiste em resposta imunoinflamatória localizada frente aos micro-organismos advindos dos canais radiculares contaminados em direção aos tecidos apicais e periapicais, o que leva a reabsorção óssea e dentária (LIAPATAS et al., 2003; KABAK et al., 2005; NAIR, 2006). Trata-se de uma lesão caracterizada por um infiltrado inflamatório misto, formado por neutrófilos, linfócitos T e B, plasmócitos, macrófagos e células dendríticas, com prevalência celular de acordo com estágio da doença (STASHENKO, 1998; LIAPATAS et al., 2003; MARTÓN e KISS, 2014; CALISKAN et al., 2016).

Visando o reparo da lesão periapical, se faz necessária a eliminação ou redução dos micro-organismos presentes no sistema de canais radiculares, a qual é alcançada por meio do preparo biomecânico, uso de soluções irrigantes e medicação intracanal, obturação dos canais, seguido do processo restaurador, o qual permite o restabelecimento da função do elemento dental (SIQUEIRA e ROCAS, 2008; ITO et al., 2011; SILVA et al., 2012; CRAVEIRO et al., 2015; ALVES et al., 2016; PEDRO et al., 2016).

Com relação às taxas de sucesso do tratamento endodôntico, os números variam entre 66 e 90% dos casos, sendo relacionados principalmente com fatores microbianos, fatores mecânicos e com a qualidade do tratamento endodôntico e do protocolo restaurador, os quais têm influência direta sobre o prognóstico do dente, sobretudo nos casos de alterações periapicais (WU et al., 2009; SETZER et al., 2011; ZUOLO et al., 2012; CRAVEIRO et al., 2015; EYUBOGLU et al., 2016; KANG et al., 2016; PEDRO et al., 2016; HE et al., 2017).

Sendo a lesão periapical uma doença multifatorial (STASHENKO et al., 1992), outros fatores além dos relacionados ao tratamento endodôntico e restaurador, incluem uma abordagem acerca da microbiologia e de características intrínsecas ao hospedeiro, seja por sua capacidade de defesa em resposta ao agente contaminante, seja por sua capacidade de reparo após a remoção do mesmo (SIQUEIRA e ROÇAS, 2008; ALVES et al., 2016; KHALIGHINEJAD et al., 2016; HUSSEIN et al., 2016). Nesse sentido, a relação entre resistência do hospedeiro *versus* virulência dos micro-organismos tem impacto direto no desenvolvimento e no reparo das doenças (ABBAS et al., 2008).

A liberação de citocinas e mediadores pró e anti-inflamatórios sinalizam as funções de defesa e reparo do organismo. As citocinas funcionam como mensageiros e representam uma família de glicoproteínas que coordenam processos biológicos, como desenvolvimento embrionário, imunidade, hematopoiese e reparo (ALEXANDER, 2002; ALEXANDER e HILTON, 2004; LARSEN e ROPKE, 2002). Na lesão periapical, as citocinas anti-inflamatórias são responsáveis por coordenar a atividade das células inflamatórias e de reparo, tais como macrófagos e leucócitos. Já as citocinas pró-inflamatórias estimulam o processo de reabsorção e inibem a neoformação óssea (STASHENKO, 1990; SILVA et al., 2007; GRAVES et al., 2011).

Estudos *in vivo* com animais *knockout*, confirmam a relação entre a expressão de citocinas anti e pró-inflamatórias associadas à progressão da lesão periapical e indução da osteoclastogênese (DA SILVA et al., 2012; BEZERRA DA SILVA et al., 2014; DE OLIVEIRA et al., 2015).

O processo de reabsorção óssea é controlado principalmente pela via de sinalização RANK/RANKL/OPG, considerados reguladores do processo de remodelação óssea (BOYLE, 2003; LERNER, 2004; BOYCE e XING, 2008). O ligante fator nuclear kappa B (RANKL) é mediador solúvel, membro da família do fator de necrose tumoral, sintetizado por osteoblastos, células do estroma da medula óssea e células endoteliais. Embora haja uma expressão fisiológica de RANKL, essa é uma molécula abundantemente produzida por linfócitos T ao longo de processos inflamatórios (BOYLE, 2003). Além disso, RANKL é o mediador responsável pela ligação ao fator nuclear kappa B (RANK), receptor expresso na superfície de osteoclastos e seus progenitores, macrófagos presentes na medula óssea que após essa ligação recebem o estímulo a maturação e conversão em osteoclastos ativos. A osteoprotegerina (OPG) é o receptor solúvel secretado por osteoblastos através de estímulos anabólicos, o qual compete com RANK na ligação ao mediador RANKL, impedindo assim esta ligação, de modo a inibir a osteoclastogênese (ALLISTON e DERYNCK, 2002; BOYLE 2003; LERNER, 2004; KIKUTA et al., 2013; LIU e PENG, 2013).

Estudos confirmam a interação entre esses moduladores e o desenvolvimento, progressão e reparo da lesão periapical (KAWASHIMA et al., 2007; SILVA et al., 2007; MENEZES et al., 2008; GRAVES et al., 2011; ARMADA et al., 2015; ESTRELA et al., 2016; PAULA-SILVA et al., 2016; CARNEIRO et al., 2017). O desequilíbrio na expressão de RANKL e OPG em condições inflamatórias, como da lesão periapical

onde há aumento na atividade de RANKL e diminuição da atividade regulatória de OPG, tem como resultado uma osteoclastogênese exacerbada e consequente reabsorção óssea (MENEZES et al., 2008; GRAVES et al., 2011).

No entanto, nem todos os indivíduos apresentam a mesma resposta fenotípica, bem como a expressão gênica frente a determinado estímulo e tratamento. Isso ocorre devido às diferenças na sequência do DNA humano, que influenciam na susceptibilidade do organismo frente a doenças e nas suas respostas ao meio ambiente, diferenças as quais são consideradas normais e que quando encontradas em mais de 1% da população recebem a denominação de polimorfismos genéticos (BROOKES, 1999; SACHIDANANDAM, 2001).

O tipo mais comum de polimorfismo é o que envolve um nucleotídeo, chamado de polimorfismo de nucleotídeo único, polimorfismo de transição ou SNPs (*single nucleotide polymorphisms*), onde ocorre a substituição de um nucleotídeo por outro, ocorrendo a troca de um par de bases, podendo ainda assim afetar a expressão de proteínas, a estrutura e a função de um gene (TAKASHIBA e NARUISHI, 2006). A maioria dos SNPs ocorre em espaços intergênicos ou em componentes não codificadores de genes, portanto não apresentam repercussão funcional. Porém, os SNPs também podem ocorrer em regiões promotoras, codificadoras ou regulatórias do genoma, afetando assim a expressão gênica, bem como podem influenciar na estabilidade do RNAm e na eficiência do processo de tradução. Dessa forma, polimorfismos genéticos podem alterar a síntese de uma proteína e também a função celular, o que pode ter íntima relação com a patogênese das alterações periapicais (SCHORK et al., 2000; WAN et al., 2001; ARKO et al., 2002; KINANE e HART, 2003; TAKASHIBA e NARUISHI, 2006; YOSHIE et al., 2007; SIQUEIRA et al., 2011).

A interação entre sinais moleculares, influência genética e sinais clínicos ainda não foi completamente elucidada. Nos últimos anos, têm sido evidenciadas interações entre polimorfismos genéticos e o desenvolvimento, progressão e reparo da lesão periapical em genes ligados aos processos de inflamação e do metabolismo ósseo, como *IL-1β, IL-6, IL-8, IL-10, FcγRIIIa, TNF, RANK, RANKL, OPG, MMP1, MMP2, MMP3 e MMP8* (SIQUEIRA et al., 2009; SIQUEIRA et al., 2011; MORSANI et al., 2011; MENEZES-SILVA et al., 2012; AMAYA et al., 2013; DILL et al., 2015; EVROSIMOVSKA et al., 2015; MAHESHWARI et al., 2016; TROMBONE et al., 2016). No entanto, estes estudos ainda são controversos em alguns pontos, sendo limitados por variáveis metodológicas e amostrais, do ponto de vista da doença, do tratamento e também de fatores étnicos e individuais (HOFFMANN et al., 2002; AMINOSHARIAE e KULILD, 2015).

Além disso, poucos estudos relatam a associação entre polimorfismos genéticos e lesões periapicais persistentes (SIQUEIRA et al., 2009; MORSANI et al., 2011; SIQUEIRA et al., 2011; ROCAS et al., 2014), sendo que essa associação ainda não foi determinada com relação às variações em genes reguladores do processo de remodelação óssea, fundamental ao reparo. Desta forma, tornam-se necessários mais estudos na área, visando-se o entendimento sobre a influência de variações polimórficas na lesão periapical, principalmente no caso de lesões persistentes (AMINOSHARIAE e KULILD, 2015).

Com relação às variedades polimórficas de *RANK, RANKL e OPG*, estudos na área médica demonstram associação com doenças inflamatórias, densidade mineral óssea, risco de fraturas ósseas atraumáticas, susceptibilidade à doença óssea de Paget, osteoporose e câncer (CHUNG et al., 2010; ROSHANDEL et al., 2010; TAKACS et al., 2010; NEY et al., 2013; TU et al., 2015; ZOFKOVA et al., 2015;

MITCHELL et al., 2016). Na área odontológica, estudos avaliaram a influência de polimorfismos genéticos em *RANK, RANKL e OPG* na doença periodontal e no insucesso de implantes (SOEDARSONO et al., 2006; BAIONI et al., 2008; RIBEIRO et al., 2017) e variações em *RANK e OPG* foram avaliadas com relação a sua associação com reabsorção dentária (PEREIRA et al., 2014).

Considerando que os índices de insucesso endodôntico em casos de lesões periapicais persistentes possam estar associados a fatores microbianos, fatores do tratamento endodôntico e do protocolo restaurador, e possam também ter relação com características do hospedeiro, torna-se necessário o conhecimento de fatores relacionados à genética do indivíduo. Portanto, torna-se oportuno investigar as relações e os impactos de polimorfismos genéticos em *RANK, RANKL e OPG* na suscetibilidade a lesões periapicais persistentes, uma vez que essas variações nos genes reguladores no processo de remodelação óssea possam estar ligadas ao desenvolvimento dessas lesões.

PROPOSIÇÃO

Objetivo geral:

A proposta do presente estudo foi investigar o envolvimento de aspectos moleculares e clínicos na resposta do hospedeiro frente ao tratamento endodôntico, por meio da análise da expressão e frequência de polimorfismos dos genes reguladores do processo de remodelação óssea (*RANK*, *RANKL* e *OPG*) em pacientes submetidos ao tratamento endodôntico.

Objetivos específicos:

1. Associação com variáveis que possam influenciar nos desfechos observados nos casos de lesões periapicais persistentes após a realização de tratamento endodôntico.
2. Análise da associação de polimorfismos dos genes reguladores do processo de remodelação óssea (*RANK*, *RANKL* e *OPG*) com a resposta do hospedeiro frente à terapia endodôntica.
3. Análise da interação entre polimorfismos dos genes reguladores do processo de remodelação óssea (*RANK*, *RANKL* e *OPG*) e o tempo de acompanhamento dos casos de lesões periapicais após a realização de tratamento endodôntico.

MATERIAIS E MÉTODO

1. Aspectos Éticos

O presente estudo foi revisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (CEP/FORP-USP), pelo parecer n° 2.323.266 e CAAE n° 74708517.7.0000.5419 (Anexo 1); e também pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal Fluminense (CEP/FM-UFF), pelo parecer n° 1.029.674 e CAAE n° 37717414.0.0000.5243 (Anexo 2). Os pacientes foram convidados para acompanhamento do caso e coleta dos dados, momento onde foi realizada uma explicação sobre o conteúdo da pesquisa, bem como esclarecimento dos objetivos do estudo e sua importância para o meio científico. A autorização do participante da pesquisa foi obtida na forma de consentimento pós-informação com assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexos 3 e 4).

2. Casuística

O universo amostral foi constituído por 1218 pacientes que foram submetidos ao tratamento endodôntico na Clínica de Endodontia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto durante os últimos cinco anos, momento em que foi iniciado o desenvolvimento de um banco de dados com as informações de saúde e do tratamento prestado a todos os pacientes atendidos na clinica de Endodontia da FORP-USP, banco esse que permitiu o acompanhamento clínico e radiográfico desses pacientes. Além disso, o universo amostral incluiu 500 pacientes atendidos na Clínica de Endodontia da Universidade Federal Fluminense e Centro Odontológico Integrado Nova Friburgo, nos últimos nove anos. Ambas instituições estão localizadas na região sudeste do Brasil, a região mais rica do país (IBGE, 2010). Esse grupo de

pacientes apresentou idade variando entre 16 e 83 anos de idade. Com relação ao tratamento, o universo amostral incluía casos com ausência e casos com presença de lesão periapical instalada no momento do tratamento. Todos os pacientes foram chamados para acompanhamento clinico e radiográfico e coleta de saliva. Posteriormente, os pacientes foram então submetidos aos critérios de inclusão e exclusão deste estudo.

3. Critérios de elegibilidade da amostra

De acordo com os critérios de inclusão desse estudo foram selecionados pacientes que apresentavam necrose pulpar e lesão periapical instalada no momento do tratamento endodôntico, sendo esse tratamento finalizado a no mínimo um ano antes da consulta de acompanhamento, conforme metodologia previamente estabelecida (SIQUEIRA et al., 2009; MORSANI et al., 2011; SIQUEIRA et al., 2011; RÔÇAS et al., 2014).

Já com relação aos critérios de exclusão, pacientes que apresentaram tratamento endodôntico e/ou restaurador insatisfatórios (obturação com mais de 2 mm aquém do ápice radiográfico; sobreobturação; instrumentos fraturados; porosidade; canais não obturados; ausência de selamento coronário ou restaurações com infiltração marginal), fratura do elemento dental, indivíduos portadores de alguma síndrome e/ou imunologicamente comprometidos, bem como pacientes que não assinaram o TCLE autorizando a participação na pesquisa ou não compareceram para acompanhamento do caso foram considerados inelegíveis para este estudo.

Dessa forma, a população final avaliada nesse estudo foi composta por 150 indivíduos (109 mulheres e 41 homens), sendo que na consulta de acompanhamento

foram preenchidas fichas com informações referentes à anamnese e dados sócio-demográficos de cada um dos pacientes (Anexo 5).

4. Delineamento do estudo

4.1. Avaliação de parâmetros clínicos e radiográficos

No momento do retorno para acompanhamento, foram realizados exame clínico e anotação dos dados referentes ao tratamento endodôntico para todos os indivíduos (Anexos 6).

As imagens radiográficas periapicais do momento do final do tratamento e do estado atual do paciente no momento do acompanhamento foram utilizadas para comparação e determinação da saúde periapical em cada um dos momentos. A avaliação foi realizada por um único operador, após calibração intra-examinador (Kappa > 0,8). De acordo com o momento das consultas, as radiografias foram realizadas pela técnica convencional ou digital. Para a técnica radiográfica convencional, as imagens foram obtidas por meio da técnica da bissetriz, utilizando filmes radiográficos periapicais (Ultraspeed DF-58, Eastman Kodak Co. Rochester, NY), quilovoltagem de 70 kV e 0,4 segundos de exposição aos raios-x, processados manualmente em um tempo padronizado de acordo com a temperatura. Posteriormente, as imagens foram digitalizadas por meio do aparelho SmileArt associado ao software TPC Soft Image (TPC Dental, City of Industry, CA, EUA). Já na técnica digital, foi utilizado o sistema FONA® CDRelite (Schick CDRelite, FONA® - DDM, representante Brasil) associado ao aparelho radiográfico convencional (Dabi Atlante D700, Ribeirão Preto, SP, Brasil), seguindo os mesmos parâmetros da técnica convencional para obtenção das imagens.

Baseada nos sinais clínicos e radiográficos, a distribuição dos casos ocorreu a partir da avaliação da saúde periapical após o tratamento endodôntico, conforme a presença de uma ou mais condições de acordo com os seguintes critérios previamente estabelecidos (MORSANI et al., 2011) (Tabela 1):

Tabela 1. Critérios utilizados para determinação da saúde periapical após o tratamento endodôntico.

Critérios para reparação da lesão	Critérios para lesão periapical persistente
Resolução completa da lesão em um intervalo mínimo de um ano após o tratamento	Ausência de cura da lesão radiograficamente
Ausência de destruição tecidual evidente	Lesão periapical radiograficamente preexistente, em tamanho próximo ou maior ao inicial
Ausência de perda de função	Tratamento completo há mais de um ano, com presença de sinais e/ou sintomas de doença
Ausência de dor, edema e fístula	Presença de sinais e/ou sintomas clínicos de desordem periapical (Ex: dor, edema ou fístula)

Dessa forma, após submissão aos critérios de elegibilidade e conforme as características observadas após o tratamento endodôntico, a população do estudo foi dividida em dois grupos: Reparação da lesão x Lesão periapical persistente, conforme ilustrado na Figura 1:

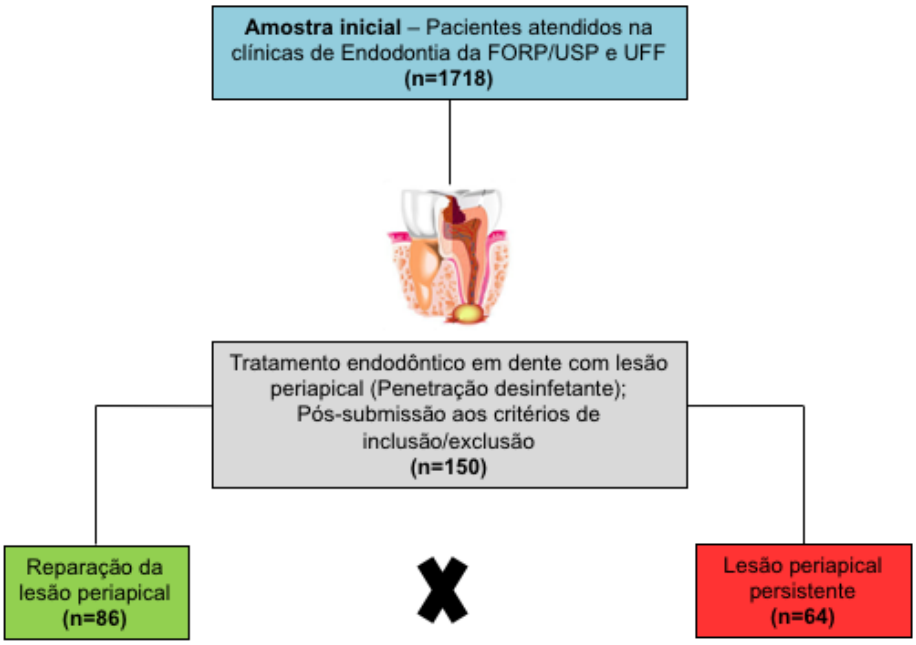

Figura 1. Fluxograma dos grupos experimentais, de acordo com os critérios clínicos e radiográficos para determinação da saúde periapical após o tratamento endodôntico.

4.2. Coleta de material biológico

Durante a consulta de acompanhamento, após autorização pelo paciente, amostras de saliva foram coletadas como fonte de DNA genômico. Para a coleta, os indivíduos que receberam tratamento endodôntico, realizaram um bochecho com 5mL de solução salina 5% durante 1 minuto, e todo o volume do bochecho foi acondicionado em tubos para centrífuga de 15 mL (Corning Inc., Corning, NY, EUA) e mantidos em geladeira, conforme ilustrado na Figura 2.A.

Esse material foi levado ao laboratório de Biologia Molecular e Celular do Departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo (FORP-USP).

4.3. Extração do DNA

Cada tubo contendo a coleta de saliva foi então centrifugado a 550 g durante 10 minutos para sedimentação do *pellet* de células. O sobrenadante foi descartado em hipoclorito de sódio de 2,5% e o *pellet* ressuspendido em 1mL de tampão de extração (Tris-HCl 10mM, pH 7.8; EDTA 5mM; SDS 0.5%). A seguir, a amostra foi transferida para um tubo eppendorf de 1,5mL e então congelada a -20º C até o momento da extração do DNA.

Posteriormente, as amostras foram descongeladas e incubadas com 100ng/mL [4µL de Proteinase K (Fungal, Invitrogen Laboratories, Cat nº25530-015) à 25mg/mL] em banho-maria a 56ºC overnight e então submetidas a processos de precipitação utilizando-se 400µL de solução de acetato de amônio a 10M. A seguir, todos os tubos foram agitados manualmente por 5 minutos, centrifugados por 15 minutos (12000 rpm) e o sobrenadante dividido em dois tubos eppendorf de 700µL cada. O mesmo volume

de álcool isopropílico gelado (700µL) foi adicionado em cada tubo e agitado vigorosamente.

A formação de "nuvem de DNA" foi observada em cada tubo de todas as alíquotas que foram centrifugadas por 20 minutos com 12000 rpm a 40ºC, conforme ilustrado na Figura 2.B. O sobrenadante foi então descartado com cuidado para não deslocar o *pellet* de DNA e 1mL de etanol 70% gelado foi adicionado para posterior centrifugação por 15 minutos com 12000 rpm a 40ºC. Posteriormente o sobrenadante foi descartado e o tubo ficou aberto e emborcado em papel para secar por pelo menos 30 minutos para evaporação do excesso de etanol 70%. O *pellet* de DNA foi ressuspendido em 50 µL de tampão de extração (TE) e congelado a -20ºC. A pureza e quantificação do DNA foram determinadas por meio de um espectrofotômetro (Nanodrop 1000; Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA) conforme ilustrado na figura 2.C e os dados tabulados conforme Apêndice 1. Esse protocolo de extração do DNA seguiu metodologia previamente estabelecida (KUCHLER et al., 2012).

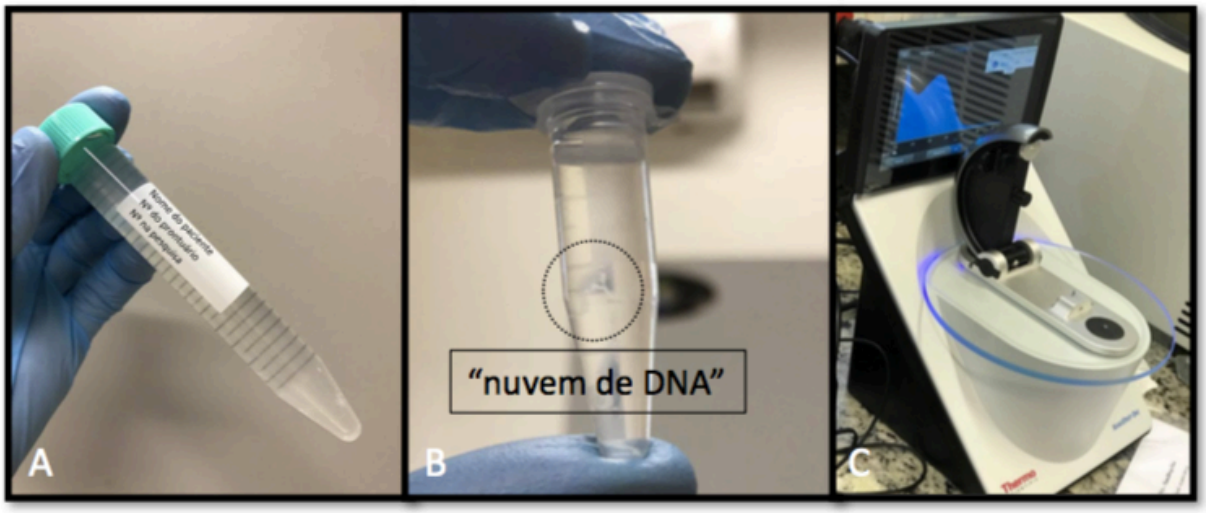

Figura 2. A – Tubos Falcon utilizados para armazenamento das amostras de saliva dos pacientes. B – Formação da "nuvem" de DNA após o processo de extração. C – Espectrofotômetro Nanodrop 1000, utilizado para determinação da pureza e quantificação do DNA.

4.4. Seleção dos Polimorfismos Genéticos e Genotipagem por PCR em tempo real

Para a avaliação das variações genéticas foram utilizados polimorfismos em genes reguladores do processo de remodelação óssea (*RANK*, *RANKL* e *OPG*), sendo selecionados polimorfismos que se classificam como potencialmente funcionais, por potencialmente influenciarem a expressão gênica.

Foram utilizados os bancos de dados dbSNP do NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=snp) e as variações polimórficas dos genes *RANK*, *RANKL* e *OPG* foram selecionadas e avaliadas com auxílio do banco de dados da Universidade da Califórnia, Santa Cruz (USCS Genome Bioinformatics - https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway), onde foi verificada a frequência de genótipos e alelos.

Devido aos dados do HapMap Project e dbSNP serem derivados de populações não-brasileiras, os genótipos gerados nesse estudo puderam ser utilizados para uma análise da distribuição dos polimorfismos na nossa população.

As características dos genes e seus respectivos polimorfismos a serem analisados estão descritas a seguir (Tabela 2):

Tabela 2. Características dos polimorfismos selecionados (Fonte: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/; http://genome.ucsc.edu/; http://www.thermofisher.com/).

Gene	Cromossomo	*Locus*	Polimorfismos	Consequência funcional	Troca de bases	Global MAF
RANK	Chr. 18	18q21.33	rs3826620	intron variant	G/**T**	0.349
RANKL	Chr. 13	13q14.11	rs9594738	unknown	**C**/T	0.284
OPG	Chr. 8	8q24.12	rs2073618	missense, upstream variant	C/**G**	0.333

*Alelo em negrito indica o alelo ancestral. Global MAF é a frequência do menor alelo na população global.

Os polimorfismos foram genotipados por PCR usando o método Taqman (RANADE et al., 2001). A interpretação dos dados foi realizada com auxílio do software fornecido pela Applied Biosystems (Foster City, CA, USA) para discriminação alélica, conforme representado na Figura 3.A.

As amplificações foram realizadas no termociclador StepOnePlus Real Time PCR System fornecido pela Applied Biosystems (Foster City-Califórnia-USA) (Figura 3.B). Na análise de Taqman, duas sondas (VIC e FAM) foram utilizadas no ensaio de discriminação alélica, onde cada sonda anelou com a variante polimórfica específica. Durante o PCR, primers se hibridizaram com a sequência alvo do DNA. Essa reação resultou na liberação de fluorescência específica de cada sonda e essa fluorescência foi capturada e mensurada pelo termociclador como consequência da amplificação do DNA alvo.

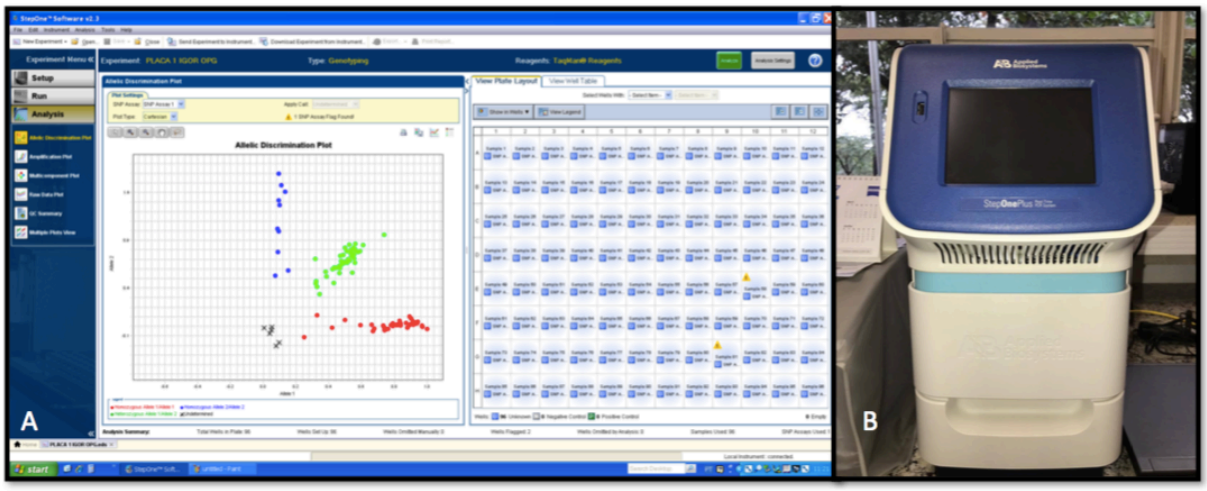

Figura 3. A - Representação típica da discriminação alélica de um polimorfismo. B - Aparelho termociclador StepOnePlus Real Time PCR, utilizado para a genotipagem.

Todas as reações de PCR foram realizadas com um volume final de 3,4 µL (4ng de DNA, 2,5µL de Taqman PCR master mix, 0,075 de sonda e água qsp). Os reagentes foram fornecidos pela Applied Biosystems (Foster City-Califórnia-USA). A

condição de ciclo do PCR utilizada foi: 95°C por 10minutos, seguido por 40 ciclos de amplificação de 92°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto.

4.5. Análise estatística

Para a análise estatística de genética epidemiológica foram utilizados os softwares Epi Info 3.5.2 e Prism Graphpad 5.0 (Graph-Pad, San Diego, CA, USA). Diferenças na idade foram analisadas por meio de teste T. Para as comparações de gênero, raça, condição médica e hábitos entre os indivíduos dos grupos, foram utilizados o teste do qui-quadrado ou teste exato de Fisher. Para avaliar se algum grupo esteve associado com algum perfil alélico e/ou genotípico no modelo convencional, dominante ou recessivo foram utilizados a razão de chance (odds ratio), o teste do qui-quadrado ou teste exato de Fisher. O tempo de acompanhamento foi utilizado como covariável no modelo de regressão logística para cada um dos polimorfismos. Para garantir que a população deste estudo fosse representativa desta mesma população em maior escala, o equilíbrio de Hardy-Weinberg foi avaliado com o teste do qui-quadrado para cada polimorfismo, onde foi observado que a população estava em equilíbrio genético. O nível de significância utilizado foi de 5% para todas as análises.

RESULTADOS

Análise das características observadas nos grupos de estudo

A população do presente estudo foi constituída por 150 indivíduos, dos quais 64 pacientes (42,7%) foram categorizados como "Lesão periapical persistente" e 86 pacientes (57,3%), como "Reparação da lesão". As características sócio-demográficas, condições médicas e hábitos de saúde observadas em cada um dos grupos estão descritas na Tabela 3.

O tempo de acompanhamento dos casos variou entre 12 e 72 meses após a conclusão do tratamento endodôntico. A média de idade dos indivíduos foi de 46,7 ± 13,5 anos. Cinquenta e cinco pacientes apresentaram alguma alteração médica, incluindo diabetes, hipertensão e outras condições que podiam atuar como modificadores da doença. Vinte e três pacientes reportaram ser fumantes. Nenhuma das características avaliadas apresentou diferença estatisticamente significante entre os grupos (p>0,05).

Tabela 3. Distribuição das características observadas entre os indivíduos dos grupos de estudo.

Característica	Total de indivíduos (n=150)	Lesão Periapical Persistente (n=64)	Reparação da lesão (n=86)	p
Média de idade ± Desvio padrão	46,7 (13.5)	45,6 (13,2)	47,7 (13,7)	0,42*
Gênero				
Homem (%)	109 (72,7)	44(40,4)	65 (59,6)	0,35**
Mulher (%)	41 (27,3)	20 (48,8)	21 (51,2)	
Raça				
Branco (%)	68 (45,3)	30 (44,1)	38 (55,9)	
Pardo (%)	59 (39,3)	25 (42,4)	34 (57,6)	0,91**
Negro (%)	23 (15,3)	9 (39,1)	14 (60,9)	
Alteração médica				
Sim (%)	55 (36,7)	26 (47,3)	29 (52,7)	0,38**
Não (%)	95 (63,3)	38 (40,0)	57 (60,0)	
Fumante				
Sim (%)	23 (15,3)	13 (56,5)	10 (43,5)	0,10**
Não (%)	127 (84,7)	49 (38,6)	78 (61,4)	

*Teste-T; **Teste do qui-quadrado.

Análise dos polimorfismos genéticos

A frequência genotípica e a distribuição dos alelos entre os grupos categorizados como “Lesão periapical persistente” (LPP) e “Reparação da lesão” (RL) está demonstrada na Tabela 4.

Foi encontrada associação entre a distribuição alélica no polimorfismo rs3826620 em *RANK* (p=0.04). Em indivíduos que apresentaram o alelo T houve um menor risco a lesões periapicais persistentes (p=0.04; OR 0.60, IC 0.36-0.99). Já no polimorfismo rs9594738 em *RANKL*, a diferença entre os grupos “lesão periapical persistente” e “reparação da lesão” ocorreu na distribuição genotípica (p=0.05) (Tabela 4).

Na análise do modelo dominante e recessivo, indivíduos que possuíam duas cópias do alelo T (TT X GT+GG), no polimorfismo rs3826620 em RANK, apresentaram menor risco a lesões periapicais persistentes (p=0.02; OR 0.19, IC 0.04-0.92). Já para o polimorfismo rs9594738 em RANKL, apresentar pelo menos um alelo T (CT+TT X CC) diminuiu o risco ao desenvolvimento de lesões periapicais persistentes (p=0.02; OR 0.46, IC 0.23-0.91).

Não houve associação entre o polimorfismo rs2073618 em OPG com nenhum dos grupos avaliados em nenhuma das análises realizadas (p>0,05).

Tabela 4. Distribuição dos genótipos e alelos dos polimorfismos em RANK, RANKL e OPG entre os grupos de estudo.

Gene (Polimorfismo)	Grupo	Genótipo n (%)				Alelo n (%)			
		TT	**GT**	**GG**	**p***	**T**	**G**	**p***	**OR (IC 95%)**
RANK (rs3826620)	**LPP**	2 (3,1)	29 (45,3)	33 (51,6)	0,06	33 (25,8)	95 (74,2)	**0,04**	0,60 (0,36-0,99)
	RL	12 (14,0)	39 (45,3)	35 (40,7)		63 (36,6)	109 (63,4)		
		TT	**CT**	**CC**	**p***	**T**	**C**	**p***	**OR (IC 95%)**
RANKL (rs9594738)	**LPP**	12 (18,8)	21 (32,8)	31 (48,4)	**0,05**	45 (35,1)	83 (64,9)	0,11	0,68 (0,42-1,10)
	RL	16 (18,8)	43 (50,6)	26 (30,6)		75 (44,1)	95 (55,9)		
		CC	**CG**	**GG**	**p***	**C**	**G**	**p***	**OR (IC 95%)**
OPG (rs2073618)	**LPP**	4 (6,3)	38 (60,3)	21 (33,3)	0,15	46 (36,5)	80 (63,5)	0,66	0,90 (0,56-1,44)
	RL	13 (15,1)	41 (47,7)	31 (37,2)		67 (39,0)	105 (61,0)		

*Teste do qui-quadrado. Números em negrito representam diferença estatisticamente significante ($p \leq 0,05$); OR indica a odds-ratio e IC representa o intervalo de confiança.

Influência do tempo de acompanhamento nos polimorfismos genéticos e na distribuição dos grupos

O tempo de acompanhamento foi associado com lesões periapicais persistentes em todos os polimorfismos analisados ($p>0,05$) (Tabela 5).

Ao utilizar-se o tempo como covariável, o polimorfismo rs3826620 em RANK e o polimorfismo rs9594738 em RANKL continuaram associados com lesões periapicais persistentes ($p=0,02$ e $p=0,03$, respectivamente). O modelo de regressão logística para os polimorfismos em RANK, RANKL e OPG, utilizando o tempo de acompanhamento como covariável, está apresentado na Tabela 6.

Tabela 5. Análise de regressão logística múltipla para os polimorfismos em RANK, RANKL e OPG para o tempo de acompanhamento.

Gene (Polimorfismo)	p*	OR (IC 95%)
RANK (rs3826620)	**0,01**	0,97 (0,95-0,99)
RANKL (rs9594738)	**0,03**	0,97 (0,95-0,99)
OPG (rs2073618)	**0,01**	0,97 (0,95-0,99)

*Números em negrito representam diferença estatisticamente significante ($p \leq 0,05$); OR indica a odds-ratio e IC representa o intervalo de confiança.

Tabela 6. Análise de regressão logística múltipla para os polimorfismos em RANK, RANKL e OPG.

Gene (Polimorfismo)	Referência	Genótipo	p	OR (IC 95%)
RANK (rs3826620)	GG	GT	0,67	0,86 (0,43-1,72)
		TT	**0,02**	0,16 (0,03-0,81)
RANKL (rs9594738)	CC	CT	**0,03**	0,43 (0,20-0,92)
		TT	0,47	0,71 (0,28-1,81)
OPG (rs2073618)	GG	CG	0,33	1,42 (0,69-2,93)
		CC	0,18	0,42 (0,11-1,51)

*Números em negrito representam diferença estatisticamente significante ($p \leq 0,05$); OR indica a odds-ratio e IC representa o intervalo de confiança.

DISCUSSÃO

Polimorfismos genéticos são modificadores biológicos de cada individuo que podem desencadear diferentes respostas imunes, quando desafiado por infestações microbianas, como no caso da lesão periapical (AMINOSHARIE E KULILD, 2015). Dessa forma, a influência genética pode ajudar a explicar a predisposição a determinadas doenças, diferentes decursos para uma mesma doença e diferentes respostas a um mesmo tratamento em diferentes indivíduos (KORMAN, 2003; SIQUEIRA et al., 2011).

Nos últimos anos, a análise da associação entre polimorfismos genéticos e a expressão de moléculas envolvidas nos processos de inflamação e de ativação celular tem sido realizada por meio de metodologias que incluem a utilização de enzimas de restrição para detecção dos polimorfismos, DNA *arrays*, PCR (Reação em cadeia da polimerase) por eletroforese em gel de agarose, PCR em tempo real e PCR associado ao Sistema Taqman (RANADE et al., 2001; HIRATA et al., 2006), a qual foi selecionada para análise no presente estudo.

Nessa análise, observou-se associação entre polimorfismos genéticos em *RANK* e *RANKL* com lesões periapicais persistentes, ao contrário do estudo de DILL et al. (2015) onde não houve associação entre outros polimorfismos em *RANK* (rs35589394), *RANKL* (rs12721445) e *OPG* (rs1131380) com a lesão periapical. Cabe salientar que DILL et al. (2015) avaliaram essa associação na susceptibilidade ao desenvolvimento de lesões periapicais em pacientes com lesões de cárie profunda, e no presente estudo essa associação foi avaliada com relação ao reparo das lesões periapicais após o tratamento endodôntico.

Além disso, a influência de polimorfismos genéticos em outros genes, como *FcγRIIA*, *FcγRIIIB*, *IL-1A*, *IL-1β*, *FcγRIIIa*, *CD14* e *TLR4* foram avaliadas com relação a progressão e resposta ao tratamento da lesão periapical, sendo encontrada

associação apenas para os genes *FcγRIIA*, *FcγRIIIB* e *IL-1β* (SIQUEIRA et al., 2009; MORSANI et al., 2011; SIQUEIRA et al., 2011; ROÇAS et al., 2014).

O papel dos osteoblastos e osteoclastos, bem como a influência da via de sinalização RANK/RANKL/OPG no desenvolvimento, progressão e resposta ao tratamento da lesão periapical já está estabelecido com relação à expressão gênica e de proteínas (GRAVES et al., 2011; PAULA-SILVA et al., 2016; ESTRELA et al., 2016; CARNEIRO et al., 2017). No entanto, os achados desse estudo reforçam a influência de polimorfismos genéticos no processo de reparo.

Nesse sentido, foi observada associação entre a distribuição dos alelos no polimorfismo rs3826620 em *RANK* entre os grupos de estudo (p=0,04). Indivíduos que carreavam duas cópias do alelo T apresentaram menor risco ao desenvolvimento de lesões periapicais persistentes (p=0.02; OR 0.19, IC 0.04-0.92). Essa associação entre polimorfismos em *RANK* e doenças inflamatórias já foi observada em estudos prévios: TU et al. (2015) relataram associação entre o polimorfismo rs7239261 e a densidade mineral óssea; múltiplas variações (rs4941125; rs12458117; rs17069901) em *RANK* foram associados a renovação de marcadores do metabolismo ósseo em homens (ROSHANDEL et al., 2010). Já a influência do polimorfismo rs3826620, o mesmo utilizado nesse estudo, foi avaliada com relação a associação com obesidade e reabsorção óssea, idade da menstruação e da menopausa em mulheres, no entanto não esteve associado à obesidade e reabsorção óssea (ZHAO et al., 2006; LU et al., 2010; PAN et al., 2012).

Sendo RANK fundamental para o processo de remodelação óssea e tendo em vista a associação encontrada nesse estudo para o polimorfismo em *RANK* e as demais variações em *RANK* já avaliadas, pode-se especular que *RANK* seja um gene pleiotrópico para o desenvolvimento de lesões periapicais persistentes, onde essas

variações possam interferir no risco ao desenvolvimento dessas lesões (ZHAO et al., 2006).

Já está estabelecido que *RANKL* aumenta a produção, atividade e sobrevivência dos osteoclastos (BOYLE, 2003; LERNER, 2004; BOYCE E XING, 2008), nesse sentido, o presente estudo sugere que o polimorfismo rs9594738 em *RANKL* está associado ao menor risco do desenvolvimento de lesões periapicais persistentes (p=0,05). Indivíduos que tiveram pelo menos um alelo T na composição de seu genótipo apresentaram menor risco ao desenvolvimento dessas lesões (p=0.02; OR 0.46, CI 0.23-0.91). ZHANG et al. (2011) reportaram que cinco variações em *RANKL*, incluindo a variação rs9594738, apresentaram o menor alelo como fator protetor a fraturas osteoporóticas. PATERNOSTER et al. (2010) concluíram em uma meta-análise que três variações em *RANKL*, incluindo rs9594738, foram associadas com a densidade mineral óssea, bem como definiram *RANKL* como um *locus* contendo variações associadas a densidade mineral óssea que fornece subsídios para o mecanismo regulatório da via de sinalização RANK/RANKL/OPG no metabolismo ósseo.

Os resultados para o polimorfismo genético em *RANKL* são consistentes com outros trabalhos que relataram a associação entre essas variações em *RANKL*, incluindo a variação rs9594738 utilizada nesse estudo, com o processo de remodelação óssea (ZHANG et al., 2011; YOSKOVITZ et al., 2013).

Em relação ao polimorfismo genético em OPG, não houve associação entre a variação rs2073618 e o desenvolvimento de lesões periapicais persistentes, analogamente, dados da literatura demonstram não haver associação entre esse polimorfismo com a doença periodontal (BAIONI et al., 2008). A variação Asn-Asn (genótipo GG) no polimorfismo rs2073618 em OPG foi associado ao menor nível

sérico de OPG em comparação à variação Lys-Lys (genótipo CC) em estudos relacionados a densidade mineral óssea, bem como ao processo de renovação de marcadores do metabolismo ósseo (ZHAO et al., 2005; ROSHANDEL et al., 2011). Apesar de não ter sido observada associação nessa variação em *OPG* nesse estudo, observa-se a influência de polimorfismos genéticos nos genes *RANK*, *RANKL* e *OPG* com o processo de remodelação óssea (ZHAO et al., 2005; ROSHANDEL et al., 2010; ZHANG et al., 2011; ROSHANDEL et al., 2011; YOSKOVITZ et al., 2013; TU et al., 2015), podendo assim estar associados à lesão periapical, como foi confirmado nesse estudo.

Na análise da resposta ao tratamento endodôntico, principalmente nos casos de lesões periapicais, o tempo de acompanhamento é determinante na resposta observada em cada hospedeiro, e no presente estudo esteve associado a lesões periapicais persistentes para todos os polimorfismos avaliados ($p<0,05$). Embora tenha sido estabelecido o tempo mínimo de 1 ano para análise dos casos e categorização dos grupos, conforme metodologia prévia (SIQUEIRA et al., 2009; MORSANI et al., 2011; SIQUEIRA et al., 2011; RÔÇAS et al., 2014), foi implementada uma análise de regressão logística múltipla utilizando o tempo de acompanhamento como uma covariável para os polimorfismos em *RANK*, *RANKL* e *OPG*. A decisão da implementação dessa análise ocorreu devido ao fato da Associação Americana de Endodontia recomendar o período mínimo de 5 anos após o tratamento endodôntico para categorizar uma lesão periapical como persistente (SJOGREN, 1990; AAE, 2014). Além disso, os guias da Sociedade Europeia de Endodontia preconizam o período mínimo de 4 anos para o diagnostico de lesões periapicais persistentes (ESE, 2006), sendo que nesse estudo, o tempo de acompanhamento variou entre 1 e 6 anos após o tratamento endodôntico. Apesar disso, na análise desempenhada os

polimorfismos em *RANK* e *RANKL* continuaram associados ao risco do desenvolvimento de lesões periapicais persistentes, independente do tempo de acompanhamento do caso.

A literatura evidencia a associação do uso de bisfosfonatos, hábitos de fumo e doenças sistêmicas como diabetes, doenças cardiovasculares, doenças renais crônicas, desordens sanguíneas e alterações na densidade mineral óssea com alterações periapicais e resultados do tratamento endodôntico, o que não foi observado no presente estudo (KHALIGHINEJAD et al., 2016; PIRAS et al., 2017; BERLIN-BRONER et al., 2017; AMINOSHARIAE et al., 2017). Embora a influência de polimorfismos genéticos na resposta ao tratamento possa ser observada, a lesão periapical trata-se de uma doença multifatorial, sendo que a causa do desenvolvimento de lesões periapicais persistentes não pode ser atribuída exclusivamente à falha imunológica decorrente da genética (SIQUEIRA et al., 2009).

Cumpre salientar que em relação ao tratamento endodôntico, foram utilizados protocolos similares de acesso, preparo e obturação dos canais radiculares, e casos que não atendiam as características de qualidade do tratamento foram excluídos conforme critérios de inclusão e exclusão detalhados nos materiais e método. Outras particularidades do tratamento como uso de medicação intracanal, seleção do cimento obturador e protocolo restaurador são aspectos que estão intimamente ligados aos resultados do tratamento e que podem influenciar no reparo de alterações periapicais (ROÇAS et al., 2014; CHUGAL et al., 2016; EYUBOGLU et al., 2016; HUSSEIN et al., 2016; PEDRO et al., 2016; KHALIGHINEJAD et al., 2017; BORGES SILVA et al., 2017).

Os genes avaliados constituem a base da modulação do processo de remodelação óssea na lesão periapical, sendo que no presente estudo suas variações

genéticas estiveram associadas ao reparo. Novos estudos tornam-se necessários para replicação dos resultados observados, bem como avaliação de outras variações genéticas associadas à lesão periapical, além de estudos longitudinais para confirmar que marcadores genéticos podem influenciar na resposta ao tratamento da lesão periapical, podendo assim exercer papel no planejamento e execução dos procedimentos clínicos e seus prognósticos.

CONCLUSÕES

Assim, com base na metodologia empregada e nos resultados obtidos neste estudo, é lícito concluir que:

1. Idade, gênero, raça, condição médica e hábitos de fumo não resultaram em diferenças com relação a resposta frente à terapia endodôntica.
2. Os polimorfismos genéticos rs3826620 em *RANK* e rs9594738 em *RANKL* estão associados como fator de proteção ao desenvolvimento de lesões periapicais persistentes após o tratamento endodôntico.
3. O tempo de acompanhamento está associado à saúde periapical observada após a terapia endodôntica. Ao utilizar-se o tempo de acompanhamento como uma covariável, os polimorfismos genéticos rs3826620 e rs9594738 em *RANK* e *RANKL* continuam associados a lesões periapicais persistentes.
4. Polimorfismos genéticos em genes do processo de remodelação óssea podem ser marcadores biológicos para lesões periapicais persistentes após o tratamento endodôntico.

REFERÊNCIAS

AAE. **Endodontics: Colleagues for Excellence Summer**. In: The Treatment of Traumatic Dental Injuries. 2014.

ABBAS, AK; LICHTMAN, AH; PILLAI, S; FARIAS, AS. **Imunologia celular e molecular**. 6 ed. Rio de Janeiro: Editora Elsevier; 2008.

ALEXANDER, W.S. Suppressors of cytokine signalling (SOCS) in the immune system. **Nat Rev Immunol**, v. 2, n. 6, p. 410-416, 2002.

ALEXANDER, W.S., HILTON, D.J. The role of suppressors of cytokine signaling (SOCS) proteins in regulation of the immune response. **Annu Rev Immunol**, v. 22, n., p. 503-529, 2004.

ALLISTON, T., DERYNCK, R. Medicine: interfering with bone remodelling. **Nature**, v. 416, n. 6882, p. 686-687, 2002.

ALVES, F.R.; ANDRADE-JUNIOR, C.V.; MARCELIANO-ALVES, M.F.; PEREZ, A.R.; ROCAS, I.N.; VERSIANI, M.A., et al. Adjunctive Steps for Disinfection of the Mandibular Molar Root Canal System: A Correlative Bacteriologic, Micro-Computed Tomography, and Cryopulverization Approach. **J Endod**, v. 42, n. 11, p. 1667-1672, 2016.

AMAYA, M.P.; 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**, v. 46, n. 1, p. 71-78, 2013.

AMINOSHARIAE, A., KULILD, J.C. Association of Functional Gene Polymorphism with Apical Periodontitis. **J Endod**, v. 41, n. 7, p. 999-1007, 2015.

AMINOSHARIAE, A.; KULILD, J.C.; MICKEL, A., FOUAD, A.F. Association between Systemic Diseases and Endodontic Outcome: A Systematic Review. **J Endod**, v. 43, n. 4, p. 514-519, 2017.

ARKO, B.; PREZELJ, J.; KOMEL, R.; KOCIJANCIC, A.; HUDLER, P., MARC, J. Sequence variations in the osteoprotegerin gene promoter in patients with postmenopausal osteoporosis. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 87, n. 9, p. 4080-4084, 2002.

ARMADA, L.; MAROTTA PDOS, S.; PIRES, F.R., SIQUEIRA, J.F., JR. Expression and Distribution of Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa B, Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa B Ligand, and Osteoprotegerin in Periradicular Cysts. **J Endod**, v. 41, n. 8, p. 1281-1287, 2015.

BAIONI, C.S.; DE SOUZA, C.M.; RIBEIRO BRAOSI, A.P.; LUCZYSZYN, S.M.; DIAS DA SILVA, M.A.; IGNACIO, S.A., et al. Analysis of the association of polymorphism in the osteoprotegerin gene with susceptibility to chronic kidney disease and periodontitis. **J Periodontal Res**, v. 43, n. 5, p. 578-584, 2008.

BERLIN-BRONER, Y.; FEBBRAIO, M., LEVIN, L. Association between apical periodontitis and cardiovascular diseases: a systematic review of the literature. **Int Endod J**, v. 50, n. 9, p. 847-859, 2017.

BEZERRA DA SILVA, R.A.; NELSON-FILHO, P.; LUCISANO, M.P.; DE ROSSI, A.; DE QUEIROZ, A.M., BEZERRA DA SILVA, L.A. MyD88 knockout mice develop initial enlarged periapical lesions with increased numbers of neutrophils. **Int Endod J**, v. 47, n. 7, p. 675-686, 2014.

BORGES SILVA, E.A.; GUIMARAES, L.S.; KUCHLER, E.C.; ANTUNES, L.A.A., ANTUNES, L.S. Evaluation of Effect of Foraminal Enlargement of Necrotic Teeth on Postoperative Symptoms: A Systematic Review and Meta-analysis. **J Endod**, v. 43, n. 12, p. 1969-1977, 2017.

BOYCE, B.F., XING, L. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. **Arch Biochem Biophys**, v. 473, n. 2, p. 139-146, 2008.

BOYLE, W.J.; SIMONET, W.S., LACEY, D.L. Osteoclast differentiation and activation. **Nature**, v. 423, n. 6937, p. 337-342, 2003.

BROOKES, A.J. The essence of SNPs. **Gene**, v. 234, n. 2, p. 177-186, 1999.

CALISKAN, M.K.; KAVAL, M.E.; TEKIN, U., UNAL, T. Radiographic and histological evaluation of persistent periapical lesions associated with endodontic failures after apical microsurgery. **Int Endod J**, v. 49, n. 11, p. 1011-1019, 2016.

CARNEIRO, E.; PAROLIN, A.B.; WICHNIESKI, C.; ROSA, E.A.; SILVA NETO, U.X.; WESTPHALEN, V.P., et al. Expression levels of the receptor activator of NF-kappaB ligand and osteoprotegerin and the number of gram-negative bacteria in symptomatic and asymptomatic periapical lesions. **Arch Oral Biol**, v. 73, n., p. 166-171, 2017.

CHUGAL, N.; MALLYA, S.M.; KAHLER, B., LIN, L.M. Endodontic Treatment Outcomes. **Dent Clin North Am**, v. 61, n. 1, p. 59-80, 2017.

CHUNG, P.Y.; BEYENS, G.; RICHES, P.L.; 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**, v. 25, n. 12, p. 2592-2605, 2010.

COHEN, S; HARGREAVES, KM. **Caminhos da Polpa**. 10 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.

CRAVEIRO, M.A.; FONTANA, C.E.; DE MARTIN, A.S., BUENO, C.E. Influence of coronal restoration and root canal filling quality on periapical status: clinical and radiographic evaluation. **J Endod**, v. 41, n. 6, p. 836-840, 2015.

DA SILVA, R.A.; FERREIRA, P.D.; DE ROSSI, A.; NELSON-FILHO, P., SILVA, L.A. Toll-like receptor 2 knockout mice showed increased periapical lesion size and osteoclast number. **J Endod**, v. 38, n. 6, p. 803-813, 2012.

DE OLIVEIRA, K.M.; DA SILVA, R.A.; DE ROSSI, A.; FUKADA, S.Y.; FERES, M.; NELSON-FILHO, P., et al. Absence of interleukin 22 affects the oral microbiota and the progression of induced periapical lesions in murine teeth. **Int Endod J**, v. 48, n. 1, p. 46-59, 2015.

DILL, A.; LETRA, A.; CHAVES DE SOUZA, L.; YADLAPATI, M.; BIGUETTI, C.C.; GARLET, G.P., et al. Analysis of multiple cytokine polymorphisms in individuals with untreated deep carious lesions reveals IL1B (rs1143643) as a susceptibility factor for periapical lesion development. **J Endod**, v. 41, n. 2, p. 197-200, 2015.

ESTRELA, C.; DECURCIO DDE, A.; SILVA, J.A.; BATISTA, A.C.; DE SOUZA LIMA, N.C.; DE FREITAS SILVA, B.S., et al. Immune-Inflammatory Cell Profile and Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa B Ligand/Osteoprotegerin Expression in Persistent Apical Periodontitis after Root Canal Retreatment Failure. **J Endod**, v. 42, n. 3, p. 439-446, 2016.

EVROSIMOVSKA, B.; DIMOVA, C.; POPOVSKA, L., ZABOKOVA-BILBILOVA, E. Matrix Matalloproteinase-8 Gene Polymorphism in Chronic Periapical Lesions. **Pril (Makedon Akad Nauk Umet Odd Med Nauki)**, v. 36, n. 2, p. 217-224, 2015.

EYUBOGLU, T.F.; OLCAY, K., OZCAN, M. A clinical study on single-visit root canal retreatments on consecutive 173 patients: frequency of periapical complications and clinical success rate. **Clin Oral Investig**, v., n., p., 2016.

GRAVES, D.T.; OATES, T., GARLET, G.P. Review of osteoimmunology and the host response in endodontic and periodontal lesions. **J Oral Microbiol**, v. 3, n., p., 2011.

HE, J.; WHITE, R.K.; WHITE, C.A.; SCHWEITZER, J.L., WOODMANSEY, K.F. Clinical and Patient-centered Outcomes of Nonsurgical Root Canal Retreatment in First Molars Using Contemporary Techniques. **J Endod**, v. 43, n. 2, p. 231-237, 2017.

HIRATA, M.H.; TAVARES, V.; HIRATA, R.D.C. From **Molecular Biology to Medicine: methods commonly used in pharmacogenetics**. Medicina (Ribeirão Preto); v. 39, n. 4, p.522-534, 2006.

HOFFMANN, S.C.; STANLEY, E.M.; COX, E.D.; DIMERCURIO, B.S.; KOZIOL, D.E.; HARLAN, D.M., et al. Ethnicity greatly influences cytokine gene polymorphism distribution. **Am J Transplant**, v. 2, n. 6, p. 560-567, 2002.

HUSSEIN, F.E.; LIEW, A.K.; RAMLEE, R.A.; ABDULLAH, D., CHONG, B.S. Factors Associated with Apical Periodontitis: A Multilevel Analysis. **J Endod**, v. 42, n. 10, p. 1441-1445, 2016.

IBGE (2010) **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatistica**. In: http://www.ibge.gov.br/home/mapa_site/mapa_site.php#geociencias. Acesso em 28/11/2017.

ITO, I.Y.; JUNIOR, F.M.; PAULA-SILVA, F.W.; DA SILVA, L.A.; LEONARDO, M.R., NELSON-FILHO, P. Microbial culture and checkerboard DNA-DNA hybridization assessment of bacteria in root canals of primary teeth pre- and post-endodontic therapy with a calcium hydroxide/chlorhexidine paste. **Int J Paediatr Dent**, v. 21, n. 5, p. 353-360, 2011.

KABAK, S.L.; KABAK, Y.S., ANISCHENKO, S.L. Light microscopic study of periapical lesions associated with asymptomatic apical periodontitis. **Ann Anat**, v. 187, n. 2, p. 185-194, 2005.

KANG, S.H.; KIM, B.S., KIM, Y. Cracked Teeth: Distribution, Characteristics, and Survival after Root Canal Treatment. **J Endod**, v. 42, n. 4, p. 557-562, 2016.

KAWASHIMA, N.; SUZUKI, N.; YANG, G.; OHI, C.; OKUHARA, S.; NAKANO-KAWANISHI, H., et al. Kinetics of RANKL, RANK and OPG expressions in experimentally induced rat periapical lesions. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 103, n. 5, p. 707-711, 2007.

KHALIGHINEJAD, N.; AMINOSHARIAE, A.; KULILD, J.C.; WANG, J., MICKEL, A. The Influence of Periodontal Status on Endodontically Treated Teeth: 9-year Survival Analysis. **J Endod**, v. 43, n. 11, p. 1781-1785, 2017.

KHALIGHINEJAD, N.; AMINOSHARIAE, M.R.; AMINOSHARIAE, A.; KULILD, J.C.; MICKEL, A., FOUAD, A.F. Association between Systemic Diseases and Apical Periodontitis. **J Endod**, v. 42, n. 10, p. 1427-1434, 2016.

KIKUTA, J.; WADA, Y.; KOWADA, T.; WANG, Z.; SUN-WADA, G.H.; NISHIYAMA, I., et al. Dynamic visualization of RANKL and Th17-mediated osteoclast function. **J Clin Invest**, v. 123, n. 2, p. 866-873, 2013.

KINANE, D.F., HART, T.C. Genes and gene polymorphisms associated with periodontal disease. **Crit Rev Oral Biol Med**, v. 14, n. 6, p. 430-449, 2003.

KORNMAN KS. **Genetics and periodontal diseases**. In: Wilson TG Jr, Kornman KS, eds. Fundamentals of periodontics. 2nd ed. Chicago: Quintessence Publishing Co; 2003.

KUCHLER, E.C.; TANNURE, P.N.; FALAGAN-LOTSCH, P.; LOPES, T.S.; GRANJEIRO, J.M., AMORIM, L.M. Buccal cells DNA extraction to obtain high quality human genomic DNA suitable for polymorphism genotyping by PCR-RFLP and Real-Time PCR. **J Appl Oral Sci**, v. 20, n. 4, p. 467-471, 2012.

LARSEN, L., ROPKE, C. Suppressors of cytokine signalling: SOCS. **APMIS**, v. 110, n. 12, p. 833-844, 2002.

LEE, Y.L.; LIU, J.; CLARKSON, B.H.; LIN, C.P.; GODOVIKOVA, V., RITCHIE, H.H. Dentin-pulp complex responses to carious lesions. **Caries Res**, v. 40, n. 3, p. 256-264, 2006.

LERNER, U.H. New Molecules in the Tumor Necrosis Factor Ligand and Receptor Superfamilies with Importance for Physiological and Pathological Bone Resorption. **Crit Rev Oral Biol Med**, v. 15, n. 2, p. 64-81, 2004.

LIAPATAS, S.; NAKOU, M., RONTOGIANNI, D. Inflammatory infiltrate of chronic periradicular lesions: an immunohistochemical study. **Int Endod J**, v. 36, n. 7, p. 464-471, 2003.

LIU, L., PENG, B. The expression of macrophage migration inhibitory factor is correlated with receptor activator of nuclear factor kappa B ligand in induced rat periapical lesions. **J Endod**, v. 39, n. 8, p. 984-989, 2013.

LU, Y.; LIU, P.; RECKER, R.R.; DENG, H.W., DVORNYK, V. TNFRSF11A and TNFSF11 are associated with age at menarche and natural menopause in white women. **Menopause**, v. 17, n. 5, p. 1048-1054, 2010.

MAHESHWARI, K.; SILVA, R.M.; GUAJARDO-MORALES, L.; GARLET, G.P.; VIEIRA, A.R., LETRA, A. Heat Shock 70 Protein Genes and Genetic Susceptibility to Apical Periodontitis. **J Endod**, v. 42, n. 10, p. 1467-1471, 2016.

MARTON, I.J., KISS, C. Overlapping protective and destructive regulatory pathways in apical periodontitis. **J Endod**, v. 40, n. 2, p. 155-163, 2014.

MARTON, I.J., KISS, C. Protective and destructive immune reactions in apical periodontitis. **Oral Microbiol Immunol**, v. 15, n. 3, p. 139-150, 2000.

MENEZES-SILVA, R.; KHALIQ, S.; DEELEY, K.; LETRA, A., VIEIRA, A.R. Genetic susceptibility to periapical disease: conditional contribution of MMP2 and MMP3 genes to the development of periapical lesions and healing response. **J Endod**, v. 38, n. 5, p. 604-607, 2012.

MENEZES, R.; GARLET, T.P.; LETRA, A.; BRAMANTE, C.M.; CAMPANELLI, A.P.; FIGUEIRA RDE, C., et al. Differential patterns of receptor activator of nuclear factor kappa B ligand/osteoprotegerin expression in human periapical granulomas: possible association with progressive or stable nature of the lesions. **J Endod**, v. 34, n. 8, p. 932-938, 2008.

MITCHELL, J.A.; CHESI, A.; ELCI, O.; MCCORMACK, S.E.; ROY, S.M.; KALKWARF, H.J., et al. Genetic Risk Scores Implicated in Adult Bone Fragility Associate With Pediatric Bone Density. **J Bone Miner Res**, v. 31, n. 4, p. 789-795, 2016.

MORSANI, J.M.; AMINOSHARIAE, A.; HAN, Y.W.; MONTAGNESE, T.A., MICKEL, A. Genetic predisposition to persistent apical periodontitis. **J Endod**, v. 37, n. 4, p. 455-459, 2011.

NAIR, P.N. On the causes of persistent apical periodontitis: a review. **Int Endod J**, v. 39, n. 4, p. 249-281, 2006.

NEY, J.T.; JUHASZ-BOESS, I.; GRUENHAGE, F.; GRAEBER, S.; BOHLE, R.M.; PFREUNDSCHUH, M., et al. Genetic polymorphism of the OPG gene associated with breast cancer. **BMC Cancer**, v. 13, n., p. 40, 2013.

PAN, R.; LIU, Y.Z.; DENG, H.W., DVORNYK, V. Association analyses suggest the effects of RANK and RANKL on age at menarche in Chinese women. **Climacteric**, v. 15, n. 1, p. 75-81, 2012.

PATERNOSTER, L.; LORENTZON, M.; VANDENPUT, L.; KARLSSON, M.K.; LJUNGGREN, O.; KINDMARK, A., et al. Genome-wide association meta-analysis of cortical bone mineral density unravels allelic heterogeneity at the RANKL locus and potential pleiotropic effects on bone. **PLoS Genet**, v. 6, n. 11, p. e1001217, 2010.

PAULA-SILVA, F.W.; GHOSH, A.; SILVA, L.A., KAPILA, Y.L. TNF-alpha promotes an odontoblastic phenotype in dental pulp cells. **J Dent Res**, v. 88, n. 4, p. 339-344, 2009.

PAULA-SILVA, F.W.; PETEAN, I.B.; DA SILVA, L.A., FACCIOLI, L.H. Dual Role of 5-Lipoxygenase in Osteoclastogenesis in Bacterial-induced Apical Periodontitis. **J Endod**, v. 42, n. 3, p. 447-454, 2016.

PEDRO, F.M.; MARQUES, A.; PEREIRA, T.M.; BANDECA, M.C.; LIMA, S.; KUGA, M.C., et al. Status of Endodontic Treatment and the Correlations to the Quality of Root Canal Filling and Coronal Restoration. **J Contemp Dent Pract**, v. 17, n. 10, p. 830-836, 2016.

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 Dis**, v. 20, n. 7, p. 659-667, 2014.

PIRAS, V.; USAI, P.; MEZZENA, S.; SUSNIK, M.; IDEO, F.; SCHIRRU, E., et al. Prevalence of Apical Periodontitis in Patients with Inflammatory Bowel Diseases: A Retrospective Clinical Study. **J Endod**, v. 43, n. 3, p. 389-394, 2017.

Quality guidelines for endodontic treatment: consensus report of the European Society of Endodontology. **Int Endod J**, v. 39, n. 12, p. 921-930, 2006.

RANADE, K.; CHANG, M.S.; TING, C.T.; PEI, D.; HSIAO, C.F.; OLIVIER, M., et al. High-throughput genotyping with single nucleotide polymorphisms. **Genome Res**, v. 11, n. 7, p. 1262-1268, 2001.

RIBEIRO, R.; MELO, R.; TORTAMANO NETO, P.; VAJGEL, A.; SOUZA, P.R., CIMOES, R. Polymorphisms of Il-10 (-1082) and RANKL (-438) Genes and the Failure of Dental Implants. **Int J Dent**, v. 2017, n., p. 3901368, 2017.

ROCAS, I.N.; SIQUEIRA, J.F., JR.; DEL AGUILA, C.A.; PROVENZANO, J.C.; GUILHERME, B.P., GONCALVES, L.S. Polymorphism of the CD14 and TLR4 genes and post-treatment apical periodontitis. **J Endod**, v. 40, n. 2, p. 168-172, 2014.

ROSHANDEL, D.; HOLLIDAY, K.L.; PYE, S.R.; BOONEN, S.; BORGHS, H.; VANDERSCHUEREN, D., et al. Genetic variation in the RANKL/RANK/OPG signaling pathway is associated with bone turnover and bone mineral density in men. **J Bone Miner Res**, v. 25, n. 8, p. 1830-1838, 2010.

ROSHANDEL, D.; HOLLIDAY, K.L.; PYE, S.R.; WARD, K.A.; 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**, v. 89, n. 6, p. 446-455, 2011.

SACHIDANANDAM, R.; WEISSMAN, D.; SCHMIDT, S.C.; KAKOL, J.M.; STEIN, L.D.; MARTH, G., et al. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. **Nature**, v. 409, n. 6822, p. 928-933, 2001.

SCHORK, N.J.; FALLIN, D., LANCHBURY, J.S. Single nucleotide polymorphisms and the future of genetic epidemiology. **Clin Genet**, v. 58, n. 4, p. 250-264, 2000.

SETZER, F.C.; BOYER, K.R.; JEPPSON, J.R.; KARABUCAK, B., KIM, S. Long-term prognosis of endodontically treated teeth: a retrospective analysis of preoperative factors in molars. **J Endod**, v. 37, n. 1, p. 21-25, 2011.

SILVA, L.A.; NOVAES, A.B., JR.; DE OLIVEIRA, R.R.; NELSON-FILHO, P.; SANTAMARIA, M., JR., SILVA, R.A. Antimicrobial photodynamic therapy for the treatment of teeth with apical periodontitis: a histopathological evaluation. **J Endod**, v. 38, n. 3, p. 360-366, 2012.

SILVA, T.A.; GARLET, G.P.; FUKADA, S.Y.; SILVA, J.S., CUNHA, F.Q. Chemokines in oral inflammatory diseases: apical periodontitis and periodontal disease. **J Dent Res**, v. 86, n. 4, p. 306-319, 2007.

SIQUEIRA, J.F. Jr. **The defense: host-pathogen interactions and immune response**. In: Siqueira JF Jr, ed. Treatment of Endodontic Infections, 1st ed. London: Quintes- sence Publishing; 2011.

SIQUEIRA, J.F., JR., ROCAS, I.N. Clinical implications and microbiology of bacterial persistence after treatment procedures. **J Endod**, v. 34, n. 11, p. 1291-1301 e1293, 2008.

SIQUEIRA, J.F., JR.; ROCAS, I.N.; PROVENZANO, J.C., GUILHERME, B.P. Polymorphism of the FcgammaRIIIa gene and post-treatment apical periodontitis. **J Endod**, v. 37, n. 10, p. 1345-1348, 2011.

SIQUEIRA, J.F., JR.; ROCAS, I.N.; PROVENZANO, J.C.; DAIBERT, F.K.; SILVA, M.G., LIMA, K.C. Relationship between Fcgamma receptor and interleukin-1 gene polymorphisms and post-treatment apical periodontitis. **J Endod**, v. 35, n. 9, p. 1186-1192, 2009.

SJOGREN, U.; HAGGLUND, B.; SUNDQVIST, G., WING, K. Factors affecting the long-term results of endodontic treatment. **J Endod**, v. 16, n. 10, p. 498-504, 1990.

SOEDARSONO, N.; RABELLO, D.; KAMEI, H.; FUMA, D.; ISHIHARA, Y.; SUZUKI, M., et al. Evaluation of RANK/RANKL/OPG gene polymorphisms in aggressive periodontitis. **J Periodontal Res**, v. 41, n. 5, p. 397-404, 2006.

STASHENKO, P. Role of immune cytokines in the pathogenesis of periapical lesions. **Endod Dent Traumatol**, v. 6, n. 3, p. 89-96, 1990.

STASHENKO, P.; TELES, R., D'SOUZA, R. Periapical inflammatory responses and their modulation. **Crit Rev Oral Biol Med**, v. 9, n. 4, p. 498-521, 1998.

STASHENKO, P.; YU, S.M., WANG, C.Y. Kinetics of immune cell and bone resorptive responses to endodontic infections. **J Endod**, v. 18, n. 9, p. 422-426, 1992.

TAKACS, I.; LAZARY, A.; KOSA, J.P.; 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**, v. 162, n. 2, p. 423-431, 2010.

TAKASHIBA, S., NARUISHI, K. Gene polymorphisms in periodontal health and disease. **Periodontol 2000**, v. 40, n., p. 94-106, 2006.

TROMBONE, A.P.; CAVALLA, F.; SILVEIRA, E.M.; ANDREO, C.B.; FRANCISCONI, C.F.; FONSECA, A.C., et al. MMP1-1607 polymorphism increases the risk for periapical lesion development through the upregulation MMP-1 expression in association with pro-inflammatory milieu elements. **J Appl Oral Sci**, v. 24, n. 4, p. 366-375, 2016.

TU, P.; DUAN, P.; ZHANG, R.S.; XU, D.B.; WANG, Y.; WU, H.P., et al. Polymorphisms in genes in the RANKL/RANK/OPG pathway are associated with bone mineral density at different skeletal sites in post-menopausal women. **Osteoporos Int**, v. 26, n. 1, p. 179-185, 2015.

WAN, M.; SHI, X.; FENG, X., CAO, X. Transcriptional mechanisms of bone morphogenetic protein-induced osteoprotegrin gene expression. **J Biol Chem**, v. 276, n. 13, p. 10119-10125, 2001.

WU, M.K.; SHEMESH, H., WESSELINK, P.R. Limitations of previously published systematic reviews evaluating the outcome of endodontic treatment. **Int Endod J**, v. 42, n. 8, p. 656-666, 2009.

YOSHIE, H.; KOBAYASHI, T.; TAI, H., GALICIA, J.C. The role of genetic polymorphisms in periodontitis. **Periodontol 2000**, v. 43, n., p. 102-132, 2007.

YOSKOVITZ, G.; GARCIA-GIRALT, N.; RODRIGUEZ-SANZ, M.; URREIZTI, R.; GUERRI, R.; ARINO-BALLESTER, S., et al. Analyses of RANK and RANKL in the post-GWAS context: functional evidence of vitamin D stimulation through a RANKL distal region. **J Bone Miner Res**, v. 28, n. 12, p. 2550-2560, 2013.

ZHANG, Y.P.; LIU, Y.Z.; GUO, Y.; LIU, X.G.; XU, X.H.; GUO, Y.F., et al. Pathway-based association analyses identified TRAIL pathway for osteoporotic fractures. **PLoS One**, v. 6, n. 7, p. e21835, 2011.

ZHAO, H.Y.; LIU, J.M.; NING, G.; ZHAO, Y.J.; ZHANG, L.Z.; SUN, L.H., et al. The influence of Lys3Asn polymorphism in the osteoprotegerin gene on bone mineral density in Chinese postmenopausal women. **Osteoporos Int**, v. 16, n. 12, p. 1519-1524, 2005.

ZHAO, L.J.; GUO, Y.F.; XIONG, D.H.; XIAO, P.; RECKER, R.R., DENG, H.W. Is a gene important for bone resorption a candidate for obesity? An association and linkage study on the RANK (receptor activator of nuclear factor-kappaB) gene in a large Caucasian sample. **Hum Genet**, v. 120, n. 4, p. 561-570, 2006.

ZOFKOVA, I.; NEMCIKOVA, P., KUKLIK, M. Polymorphisms associated with low bone mass and high risk of atraumatic fracture. **Physiol Res**, v. 64, n. 5, p. 621-631, 2015.

ZUOLO, ML; KHERLAKIAN, D; MELLO-JR, JE; CARVALHO, MCC; FAGUNDES, MIRC. **Reintervenção em Endodontia**. 2 ed. Editora Santos, 2012.

APÊNDICE

Apêndice 1. Dados da análise em espectrofotômetro Nanodrop 1000 referentes a determinação da pureza e quantificação do DNA extraído de cada uma das amostras.

N° da amostra	Concentração DNA (ng/uL)	A260/A280	A260/A230
3	234,869	2.087	2.334
7	36,841	1.937	1.915
15	52,982	1.913	1.906
18	29,464	1.941	1.789
20	78,008	1.912	1.969
24	65,835	2.064	2.124
25	185,839	1.904	1.860
40	93,534	1.907	2.186
44	93,636	1.895	2.160
45	92,263	1.909	2.040
46	82,735	2.040	2.165
50	74,683	1.834	1.391
51	20,401	2.153	1.722
52	108,516	1.836	1.443
53	12,776	2.415	0.058
57	25,628	1.980	0.073
59	26,5	2.266	0.079
60	54,131	2.015	0.157
61	13,315	2.095	1.071
62	2,098	16.248	0.275
68	22,733	2.327	0.067
72	24,447	2.014	1.214
73	12,454	2.042	0.586
74	183,142	1.679	0.899
76	9,391	2.351	1.289
78	9,672	1.887	0.619
82	4,773	2.552	0.543
84	9,499	1.711	0.467
87	6,703	3.182	0.030
92	83,055	1.866	0.152
93	14,233	1.756	0.614
95	72,143	2.095	0.206
98	12,049	1.984	0.623
99	17,268	1.828	0.074
101	9,263	1.979	0.527
109	41,762	1.756	0.109
110	8,403	1.861	0.381
111	15,145	1.658	0.480
112	17,691	2.062	1.765
113	18,384	2.087	1.452
114	41,451	1.945	1.493
119	15,416	1.939	2.220
120	39,445	1.948	1.937
121	11,78	1.788	0.257
122	20,687	2.217	2.143
123	19,238	2.035	1.918
125	32,271	2.158	0.144

N° da amostra	Concentração DNA (ng/uL)	A260/A280	A260/A230
128	4,854	2.441	0.584
129	75,595	1.709	0.811
130	47,773	1.931	2.133
132	12,1	2.039	0.848
134	15,765	2.031	1.412
136	14,622	2.151	1.992
137	2,056	3.623	0.293
139	39,21	2.139	0.135
141	175,126	1.875	0.450
143	73,725	1.497	0.611
145	21,028	2.003	1.809
154	17,73	1.987	2.013
156	31,855	2.069	2.022
157	108,236	1.987	2.067
165	17,287	2.071	1.539
166	1,628	7.790	0.249
167	18,088	2.065	1.574
168	1,055	0.961	0.622
169	11,855	2.010	0.220
171	2,579	1.781	0.999
172	12,685	2.093	0.782
174	20,901	2.116	1.665
175	18,661	2.066	1.888
177	20,169	2.387	0.064
180	57,537	1.864	1.746
182	3,809	3.848	0.632
183	9,781	2.401	1.111
184	13,667	2.850	0.053
186	3,113	2.860	0.317
187	32,824	1.998	0.131
188	2,31	3.718	0.241
190	17,589	1.998	1.112
192	16,794	2.376	0.073
193	54,755	1.961	0.215
194	14,057	2.464	0.062
195	9,369	3.007	0.042
197	6,194	1.865	0.417
199	7,624	4.195	0.035
200	168,044	1.952	2.166
201	60,068	1.914	1.990
202	2,717	2.435	0.261
209	340,286	2.018	2.164
210	32,75	2.014	1.913
213	727,565	1.511	0.546
214	464,388	1.970	2.130
216	71,331	1.839	1.732
218	6,833	2.055	1.895
219	561,766	1.908	2.273
220	54,916	1.936	2.152
221	259,373	1.864	1.962
222	159,394	1.919	2.068
223	75,179	1.944	2.033

N° da amostra	Concentração DNA (ng/uL)	A260/A280	A260/A230
224	125,299	1.859	2.198
225	361,653	1.862	2.187
227	520,823	1.910	1.808
228	22,652	2.008	2.222
229	105,882	1.883	2.176
230	232,283	1.801	1.277
UFF1	186,148	1.959	2.108
UFF2	139,752	1.718	1.243
UFF3	145,605	1.760	1.621
UFF4	75,873	1.807	1.580
UFF5	161,305	1.811	1.601
UFF6	94,172	1.805	1.524
UFF7	69,62	1.792	1.694
UFF8	18,293	1.386	0.655
UFF9	86,476	1.868	1.404
UFF10	91,919	1.821	1.541
UFF11	434,538	2.038	1.962
UFF12	161,385	1.974	1.862
UFF13	672,411	2.017	2.075
UFF14	427,362	2.039	2.135
UFF15	175,326	1.970	1.965
UFF16	87,191	1.952	1.749
UFF17	16,987	1.407	0.715
UFF18	71,936	1.884	1.574
UFF19	353,757	1.869	2.116
UFF20	213,965	1.750	1.137
UFF21	68,911	1.873	1.678
UFF22	192,212	1.921	1.906
UFF23	98,042	1.908	1.585
UFF24	129,099	1.755	1.533
UFF25	199,704	1.971	1.881
UFF26	36,822	1.540	0.857
UFF27	191,835	1.940	1.794
UFF28	241,11	1.866	1.728
UFF29	33,367	1.782	1.202
UFF30	64,136	1.720	1.291
UFF31	69,397	1.828	1.462
UFF32	47,213	1.667	1.015
UFF33	170,679	1.764	1.644
UFF34	48,736	1.654	1.046
UFF35	78,245	1.650	1.164
UFF36	26,468	1.526	0.966
UFF37	67,016	1.671	1.139
UFF38	166,235	1.775	1.451
UFF39	48,099	1.669	1.187
UFF40	168,017	1.927	1.629
UFF41	134,231	1.849	1.310
UFF42	101,44	1.838	1.539
UFF43	123,545	1.747	1.479
UFF44	36,682	1.656	1.157
UFF45	20,446	1.675	1.114
UFF46	251,899	2.025	2.079

N° da amostra	Concentração DNA (ng/uL)	A260/A280	A260/A230
UFF47	200,533	1.813	1.929
UFF48	201,717	2.029	1.989
UFF49	118,957	1.818	1.886
UFF50	78,947	1.669	1.310
UFF51	67,684	1.885	1.644
UFF52	45,177	1.684	1.021
UFF53	56,902	1.864	1.594
UFF54	93,652	1.820	1.655
UFF55	76,07	1.812	1.519
UFF56	75,448	1.739	1.959
UFF57	91,86	1.864	1.834

ANEXOS

Anexo 1. Folha de aprovação do projeto de pesquisa pela Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (CEP/FORP-USP), da Universidade de São Paulo (USP). Processo n° 2.323.266.

USP - FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO DA USP - FORP/USP

Plataforma Brasil

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Expressão gênica e Polimorfismos genéticos envolvidos na resposta de humanos ao tratamento endodôntico
Pesquisador: Daniela Silva Barroso de Oliveira
Área Temática:
Versão: 1
CAAE: 74708517.7.0000.5419
Instituição Proponente: Universidade de Sao Paulo
Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.323.266

Apresentação do Projeto:
Os pesquisadores informaram que a amostra do estudo consisitirá de 300 pacientes atendidos na disciplina de Endodontia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. O paciente deverá apresentar pelo menos um dente permanente com necessidade de terapia pulpar radical e serão excluídos do estudo os pacientes portadores de alguma síndrome ou sistemicamente comprometidos.
Para todos os indivíduos serão preenchidas fichas com informações referentes à anamnese, ao exame clínico intrabucal e dados sócio
demográficos. As imagens radiográficas periapicais realizadas serão aquelas necessárias para a execução da técnica e proservação do tratamento
para auxiliar na determinação de sucesso e insucesso. Serão considerados como sucesso os casos em que houver regressão das lesões
perirradiculares, ausência de reabsorção radicular interna e/ou externa, e ausência de sintomatologia dolorosa, fístula ou edema.
Amostras de saliva serão coletadas como fonte de DNA genômico seguindo protocolo previamente publicado (Küchler et al.; 2012)

Endereço: Avenida do Café s/nº
Bairro: Monte Alegre **CEP:** 14.040-904
UF: SP **Município:** RIBEIRAO PRETO
Telefone: (16)3315-0483 **Fax:** (16)3315-4102 **E-mail:** cep@forp.usp.br

USP - FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO DA USP - FORP/USP

Continuação do Parecer: 2.323.288

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar os aspectos moleculares e clínicos envolvidos na resposta do hospedeiro às diferentes terapias pulpares.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Não existem riscos eminentes para o paciente. Apenas o desconforto da realização do bochecho para a coleta de saliva.

Benefícios:

No contexto da Biologia molecular e da Genética, este estudo possibilitará o conhecimento e esclarecimento de diversos fatores moleculares
relacionados a resposta do hospedeiro em relação ao tratamento endodôntico, o que terá impacto na terapia endodôntica aplicada à clínica no
futuro

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto está apresentado de forma correta, cumpre todas as normativas estabelecidas pelo CEP da FORP/USP e CONEP.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Aprovado.

Recomendações:

Aprovado.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado

Considerações Finais a critério do CEP:

Aprovado conforme deliberado na 208ªReunião Ordinária do CEP/FORP/USP, em 04/10/2017.

Situação do Parecer:
Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

RIBEIRAO PRETO, 09 de Outubro de 2017

Assinado por:
Simone Cecilio Hallak Regalo
(Coordenador)

Anexo 2. Folha de aprovação do projeto de pesquisa pela Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal Fluminense (CEP/FM-UFF). Processo n° 1.029.674.

FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE/ FM/ UFF/ HU

Plataforma Brasil

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliações de polimorfismos genéticos relacionados a alterações da polpa dentária

Pesquisador: Leonardo dos Santos Antunes
Área Temática: Genética Humana:
(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);
Versão: 2
CAAE: 37717414.0.0000.5243
Instituição Proponente: Faculdade de odontologia
Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.029.674
Data da Relatoria: 05/02/2015

Apresentação do Projeto:
A infecção bacteriana na polpa dentária induz uma resposta inflamatória que não sendo tratada determina a sua destruição e, consequentemente, a contaminação do sistema de canais radiculares e túbulos dentinários, desencadeando, por sua vez, infecção no periodonto apical. Diversas evidências biológicas sugerem que os genes das metaloproteinases da matriz (MMPs), responsáveis pela remodelação e degradação da matriz extracelular, estão entre os possíveis genes candidatos ao estudo dos processos infecciosos no periodonto apical. Animais knockout para TLR2, MyO88 e IL22 apresentaram uma alteração no tamanho da lesão periapical, demonstrando que esses genes também seriam candidatos à modular a resposta do hospedeiro a alterações periapicais. Os genes do sistema RNAK/RANKL, as TNFalfas, as HBDs, os fatores de crescimento (TGFs, EGFs, FGF, VEGFs e seus receptores) são genes envolvidos na regulação da resposta imune do hospedeiro e também poderiam contribuir para elucidar os diversos fatores envolvidos nas alterações pulpares.
A amostra constituirá de 500 pacientes a partir de 01 ano atendidos nas clínicas da Universidade Federal Fluminense e na COINF (Centro Odontológico Integrado Nova Friburgo). Serão convidados a participar da pesquisa os pacientes que se encontrarem em tratamento nas clínicas da Faculdade

Endereço: Rua Marquês de Paraná, 303 4° Andar
Bairro: Centro **CEP:** 24.030-210
UF: RJ **Município:** NITEROI
Telefone: (21)2629-9189 **Fax:** (21)2629-9189 **E-mail:** etica@vm.uff.br

FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE/ FM/ UFF/ HU

Continuação do Parecer: 1.029.674

de Odontologia da Universidade Federal Fluminense e na COINF.

Critério de inclusão

O paciente deverá apresentar pelo menos um dente decíduo ou permanente com terapia pulpar conservadora ou radical:

Critério de exclusão

Pacientes portadores de alguma síndrome, sistemicamente comprometidos e biologicamente relacionados serão considerados inelegíveis.

Para todos os indivíduos serão preenchidas fichas com informações referentes à anamnese, ao exame clínico e dados sócio-demográficos. As imagens radiográficas periapicais de antes e após o tratamento serão utilizadas para determinação de sucesso e insucesso. Amostras de saliva serão coletadas como fonte de DNA genômico seguindo protocolos previamente publicados (Kuchler et. al.; 2012). Os indivíduos realizarão um bochecho com 5mL de solução salina 5% durante 1 minuto, após o qual todo o volume do bochecho será acondicionado em tubos para centrífuga de

15 mL (Corning Inc., Corning, NY, EUA) e mantido em geladeira. Esse material será levado ao laboratório de Biologia Molecular e Celular da Unidade de Pesquisa Clínica

(UPC) do Hospital Antonio Pedro (UFF). Tecido pulpar e de lesões periapicais também serão coletados para a avaliação da expressão gênica. Esses tecidos serão mantidos em RNAlater até o momento do processamento da amostra para as etapas de Extração do DNA; Extração do RNA e microRNA; Seleção dos Polimorfismos Genéticos e Genotipagem por

PCR em tempo Real; PCR em Tempo Real Quantitativo.

Análise estatística

Testes paramétricos e/ou não paramétricos serão utilizados para a comparação entre os níveis de expressão entre os tecidos. Para a análise estatística de genética epidemiológica será utilizado o software Plink. Serão utilizados a razão de chance (odds ratio), o teste do qui-quadrado ou teste exato de Fisher para avaliar se algum grupo estão associados com algum perfil alélico e/ou genotípico no modelo convencional, dominante ou recessivo. A avaliação das interações gene-gene e gene-ambiente também serão realizadas. O equilíbrio de Hardy-Weinberg será avaliado com o teste do qui-quadrado para cada polimorfismo incluído nesse estudo. O nível de significância utilizado será o de 5%

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Estão adequados

Recomendações:

Sem recomendações adicionais

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências e/ou lista de inadequações

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

NITEROI, 20 de Abril de 2015

Assinado por:
ROSANGELA ARRABAL THOMAZ
(Coordenador)

Anexo 3. Carta de informação ao participante da pesquisa.

Título do Projeto de Pesquisa: "Análise de polimorfismos genéticos associados à lesão periapical".

Responsáveis pela pesquisa: Mestrando Igor Bassi Ferreira Petean, Doutoranda Isadora Vilarinho Soares e Prof. Dr. Manoel Damião de Sousa Neto.

Objetivos da Pesquisa: A presente pesquisa tem como objetivo investigar o envolvimento de aspectos moleculares e clínicos na resposta do hospedeiro frente ao tratamento endodôntico, por meio da análise de polimorfismos genéticos em pacientes submetidos à terapia endodôntica.

Justificativa: No contexto da Bioengenharia e da Genética, o conhecimento dos fatores moleculares terá impacto na terapia endodôntica do futuro.

Procedimentos que serão realizados durante a pesquisa:

Procedimentos Preliminares - Durante a anamnese serão coletados dados sócio-demográficos, ambientais e culturais do participante da pesquisa e seu cuidador/responsável. Informações referentes aos hábitos de higiene bucal (escovação dentária, uso de fio dental), uso/exposição a fluoretos (uso de dentifrício fluoretado e uso de enxaguatório bucal com flúor) e dieta também serão coletados. Além do que também serão coletadas informações referentes ao tratamento endodôntico realizado e o prognóstico do mesmo. **Protocolo Clínico:** Será realizado exame clínico sob luz artificial, utilizando-se espelho bucal plano nº 5 e sonda exploradora. As amostras de saliva serão coletadas como fonte de DNA. Os participantes realizarão um bochecho com 5 mL de solução salina durante 1 minuto. Todo o volume do bochecho será acondicionado em tubos para centrífuga de 15 mL e mantido a -20°C. O material coletado será processado, armazenado e analisado no Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto.

Desconforto, riscos e benefícios esperados: O presente projeto não apresenta riscos por não apresentar procedimentos invasivos. Apenas um questionário e bochecho com solução fisiológica serão utilizados com os participantes. Por outro lado, a investigação proposta contribuirá para o conhecimento da associação de mecanismos moleculares frente a terapia endodôntica.

Acompanhamento e assistência: Todos os procedimentos serão acompanhados pelos pesquisadores. Além disso, os mesmos oferecerão a assistência necessária caso o participante tenha algum problema relacionado ao tratamento, durante a pesquisa.

Garantia de esclarecimentos: Os responsáveis legais pelos participantes têm a garantia de que receberão respostas a qualquer pergunta e esclarecimentos de qualquer dúvida antes, durante e após a realização da pesquisa. Ao convidado a participar da pesquisa, será preservado o direito de informação sobre a pesquisa e aos procedimentos aos quais será submetido, no limite de sua capacidade de compreensão. Qualquer problema relacionado à pesquisa deverá ser comunicado o mais breve possível à Igor Bassi Ferreira Petean pelo telefone (16) 98166-5039.

Retirada do consentimento: Os responsáveis legais pelos participantes da pesquisa têm a liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento, não sendo permitida a continuação da pesquisa sem que isso acarrete qualquer penalidade nem represálias de qualquer natureza.

Ressarcimento ou indenização: Há garantia de indenizações, caso ocorram danos diretos ou indiretos, imediatos ou tardios sofridos no decorrer da participação do participante. Os pesquisadores se comprometem a prestar assistência sendo os participantes da pesquisa acompanhados e tratados pelo pesquisador mesmo que não seja estabelecida, imediatamente, sua relação direta com a pesquisa. Apesar deste estudo oferecer risco mínimo a saúde geral do participante.

Garantia de Sigilo: Será mantido sigilo quanto à identidade de todos os participantes da pesquisa na divulgação e publicação dos dados da pesquisa.

Todas as informações contidas neste documento serão explicadas verbalmente, numa linguagem acessível ao participante da pesquisa e aos responsáveis.

Anexo 4. Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (De acordo com o Capítulo IV, itens 1 a 3 da Resolução 466/2012 – Conselho Nacional de Saúde)

Prezado participante,

Você está sendo convidado a participar da pesquisa "Análise de polimorfismos genéticos associados à lesão periapical" desenvolvida por Igor Bassi Ferreira Petean, mestrando de Endodontia no Programa de Pós-Graduação de Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FORP-USP), sob orientação do Prof. Dr. Manoel Damião de Sousa Neto.

O objetivo do estudo será: estudar os aspectos clínicos e moleculares envolvidos na resposta do hospedeiro à terapia endodôntica.

A pesquisa científica poderá ser publicada em jornais, revistas e/ou congressos científicos no país e no exterior. Os dados obtidos na pesquisa serão utilizados somente para a finalidade descrita no projeto, ou conforme sua autorização como responsável legal do participante da pesquisa, e além disso, serão armazenados em arquivos digitais, com acesso restrito aos responsáveis pela pesquisa. Ao final da pesquisa, todo material será mantido em arquivo, por pelo menos 5 anos, conforme Resolução 466/12 e orientações do CEP/ENSP.

Os responsáveis pelos participantes da pesquisa possuem liberdade de recusar o seu envolvimento, assim como de retirá-lo a qualquer momento, sem nenhuma penalização ou prejuízo. Há garantia de indenizações em caso de danos diretos ou indiretos, imediatos ou tardios sofridos no decorrer da participação na pesquisa. Os pesquisadores se comprometem a prestar assistência, sendo os participantes acompanhados e tratados pelo pesquisador, apesar desse estudo, oferecer risco mínimo a saúde geral do participante da pesquisa.

Será mantido sigilo quanto à identidade de todos os participantes na divulgação e publicação dos dados da pesquisa.

A pesquisa só poderá ser interrompida após análise e manifestação, por parte do Comitê de Ética Institucional que a aprovou. A descontinuidade poderá ser imediata em casos de justificada urgência em benefício de seus participantes.

Esse documento foi elaborado em 2 (duas) vias de igual teor, devendo ser rubricado em todas as suas páginas e assinado na última página pelo pesquisador responsável e pelo participante da pesquisa, ficando uma via com o pesquisador responsável e outra com o participante da pesquisa ou seu responsável.

O responsável pelo participante da pesquisa terá um tempo de 72h para assinar o termo de consentimento, para refletir (pensar), consultando (perguntando), se necessário, seus familiares ou outras pessoas que possam ajudá-lo na tomada de decisão livre e esclarecida.

Os responsáveis pelos participantes da pesquisa poderão entrar em contato com o pesquisador responsável por meio do endereço Av. do Café, S/N, Monte Alegre, 14040-904, Ribeirão Preto, SP. Qualquer reclamação e ou insatisfação por parte dos participantes no decorrer da pesquisa poderá ser informada a Secretária do Comitê de Ética em Pesquisa da FORP Marcela Scatolin Calache, pelo telefone (16) 3602- 0493. Horário de atendimento: das 8h às 12h, de segunda a sexta-feira, desde que se identifique, seu nome será mantido em anonimato.

Declaro que fui devidamente esclarecido (a) (de forma oral e escrita) e estou ciente (certo) de que esta pesquisa tem como pesquisador responsável o mestrando Igor Bassi Ferreira Petean (16) 98166-5039 e o pesquisador orientador Prof. Dr. Manoel Damião de Sousa Neto. Assino este documento de livre e espontânea vontade, estando ciente (certo) do seu conteúdo.

Eu, _____,
responsável por _____,
autorizo a coleta de saliva do participante, bem como seu depósito, armazenamento e utilização do material biológico e coleta de dados para esta pesquisa ou sua utilização futura para outras pesquisas. O uso da mesma amostra estará condicionado à apresentação de um novo projeto de pesquisa a ser analisado e aprovado pelo Sistema CEP/CONEP e terei que assinar outro termo de consentimento (TCLE) específico, caso queira participar de um novo estudo. Declaro que li, compreendi e concordo com o presente Termo e, por isso, assino este documento.

_____ _____

Igor Bassi Ferreira Petean **Prof. Dr. Manoel D. Sousa Neto**

_____

Assinatura do(a) responsável legal pelo(a) participante da pesquisa

CPF: _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _

RG: _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _

Anexo 5. Ficha de dados pessoais do paciente e anamnese.

Número de Prontuário (PA/RG):		
Sexo: □ **M** □ **F**		
Data de nascimento:		
Idade:		
Etnia:		
Profissão:		
Peso:		
Altura:		
IMC:		
Está sob tratamento médico atualmente?	□ SIM	□ NÃO
Faz uso de algum medicamento?	□ SIM (Se sim, quais?)	□ NÃO
Possui algum tipo de alergia?	□ SIM (Se sim, qual?)	□ NÃO
Já realizou alguma cirurgia?	□ SIM (Se sim, qual?)	□ NÃO
Possui algum problema de cicatrização?	□ SIM (Se sim, qual?)	□ NÃO
Tem ou teve febre reumática?	□ SIM	□ NÃO
Possui algum problema cardíaco?	□ SIM (Se sim, qual?)	□ NÃO
Possui algum problema renal?	□ SIM (Se sim, qual?)	□ NÃO
Possui algum problema gastrointestinal?	□ SIM (Se sim, qual?)	□ NÃO
Possui algum problema respiratório?	□ SIM (Se sim, qual?)	□ NÃO
Possui algum problema endócrino?	□ SIM (Se sim, qual?)	□ NÃO
Tem diabetes?	□ SIM (Se sim, qual?)	□ NÃO
Possui hipertensão?	□ SIM	□ NÃO
Possui algum problema neurológico?	□ SIM (Se sim, qual?)	□ NÃO
Possui algum distúrbio sanguíneo?	□ SIM (Se sim, qual?)	□ NÃO
Possui dores ou algum problema nas articulações?	□ SIM (Se sim, qual?)	□ NÃO
Tem algum problema hepático?	□ SIM (Se sim, qual?)	□ NÃO
Sente dores na ATM?	□ SIM	□ NÃO
Possui alguma DST?	□ SIM (Se sim, qual?)	□ NÃO
É fumante?	□ SIM	□ NÃO
Possui alguma outra doença ou alteração sistêmica que não lhe foi perguntado?	□ SIM (Se sim, qual?)	□ NÃO

Anexo 6. Ficha de dados relacionados ao tratamento endodôntico.

Nome do operador que realizou tratamento e turma:		
Nome do operador do acompanhamento e turma:		
Dente:		
Diagnóstico:		
Plano de tratamento:		
Número de sessões:		
Data final do tratamento:		
Protocolo endodôntico utilizado:		
Qualidade do tratamento endodôntico:		
Raio-x ao final do tratamento:		
Já realizou algum acompanhamento?		
Achados Clínicos:		
Relata dor pós-operatória?	□ SIM	□ NÃO
Palpação	□ SIM	□ NÃO
Percussão Vertical	□ SIM	□ NÃO
Percussão Horizontal	□ SIM	□ NÃO
Dente está restaurado?	□ SIM	□ NÃO
Qual o material da restauração?		
Qual a qualidade do tratamento restaurador?		
Raio-x de acompanhamento:		