**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE CLÍNICA INFANTIL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOPEDIATRIA**

Marjorie Ayumi Omori

Avaliação do papel do estrógeno no crescimento e desenvolvimento da maxila e da mandíbula

Ribeirão Preto

2018

Marjorie Ayumi Omori

Avaliação do papel do estrógeno no crescimento e desenvolvimento da maxila e da mandíbula

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Programa: Odontopediatria

Área de Concentração: Odontopediatria

Orientadora: Professora Dra. Erika Calvano Küchler

Ribeirão Preto

2018

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

Omori, Marjorie Ayumi

Avaliação do papel do estrogênio no crescimento e desenvolvimento da maxila e da mandíbula. Ribeirão Preto, 2018.

114p.: il.; 30cm

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP – Área de Concentração: Odontopediatria.

Orientadora: Küchler, Erika Calvano

1. Estrogênio
2. Maxila
3. Mandíbula
4. Alterações fenotípicas
5. Polimorfismos

FOLHA DE APROVAÇÃO

OMORI, Marjorie Ayumi. **Avaliação do papel do estrógeno no crescimento e desenvolvimento da maxila e da mandíbula**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Ciências. Área de Concentração: Odontopediatria

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DADOS CURRICULARES

Marjorie Ayumi Omori

Nascimento 03 de abril de 1992 – São Paulo/SP

Filiação Masahiko Omori

Isabel Cristina de Amorim

2010-2014

Curso de Graduação (Universidade de São Paulo) Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto

Iniciação científica: Efeito do Hipoclorito de Sódio em diferentes concentrações na retenção de pinos de fibra de vidro fixados com diferentes agentes cimentantes resinosos

Orientadora: Prof^a. Dr^a Rossana Pereira de Almeida Antunes

Iniciação científica: Efeito de duas concentrações de peróxido de carbamida sobre uma cerâmica odontológica. Análise da rugosidade superficial e microscopia eletrônica de varredura

Orientadora: Prof^a Dr^a Rossana Pereira de Almeida Antunes

Iniciação científica: Análise da rugosidade superficial e microscopia eletrônica de varredura de uma cerâmica feldspática exposta ao peróxido de carbamida 10 e 16%

Orientadora: Prof^a Dr^a Rossana Pereira de Almeida Antunes

Iniciação científica: Avaliação da força de união de cimentos temporários, com ou sem eugenol, utilizados na cimentação de copings metálicos fundidos tendo como substrato núcleos metálicos fundidos

Orientadora: Prof^a Dr^a Rossana Pereira de Almeida Antunes

2015-2018

Curso de Especialização em Ortodontia (GESTOS - IPPEO)

2016-2018

Mestrado em Odontopediatria (Universidade de São Paulo)

Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – EM ANDAMENTO

Orientadora: Erika Calvano Küchler

Bolsista FAPESP (2016/13982-4)

Trabalho realizado com apoio financeiro do Programa de Auxílio à Pesquisa Jovem Pesquisador (Processo 2015/06866-5) e Bolsa de Mestrado (Processo 2016/13982-4), concedidos pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (**FAPESP**).

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente a Deus e ao meu anjo da guarda por nunca me desampararem em todas as etapas da minha vida. Aos meus pais, familiares, amigos e namorado por todo amor e compreensão a mim dedicados. E a todos aqueles que contribuíram para que este trabalho fosse realizado.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À minha orientadora Erika, por todo empenho na condução deste trabalho. Meu grande exemplo de Jovem Pesquisadora! Minha eterna gratidão pela oportunidade de iniciar a vida acadêmica ao seu lado, por todo o conhecimento que me transmitiu de forma sempre prática e mais ainda pela amiga pessoal que ganhei nestes anos de convivência. Obrigada por todo apoio e incentivo neste momento tão único de minha vida. Poderemos não estar mais tão próximas fisicamente, mas como você mesmo me disse, “existem amigos por todos os lugares do mundo”, e não importa onde esteja, você terá sempre um lugar em meu coração.

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, por permitir a minha existência e sempre abençoar a minha vida!

À Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na pessoa da atual Diretora **Profª. Drª Léa Assed Bezerra da Silva** e do Vice-Diretor **Prof. Dr. Arthur Belém Novaes Júnior**.

À coordenação do Curso de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na pessoa da **Profª. Drª. Raquel Assed Bezerra Segato**.

A **todos os funcionários** da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo pela cordialidade e atenção.

Aos **professores** do Departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo: Profª. Drª. Aldevina Campos de Freitas, Profª. Drª Alexandra Mussolino de Queiroz, Profª. Drª. Andiará De Rossi Daldegan, Prof. Dr. Fábio Lourenço Romano, Prof. Dr. Fabrício Kitazono de Carvalho, Prof. Dr. Francisco Wanderley Garcia Paula-Silva, Prof. Dr. José Tarcísio Lima Ferreira, Profª. Drª. Kranya Victoria Díaz Serrano, Profª. Drª. Léa Assed Bezerra da Silva, Profª. Drª. Maria Bernadete Sasso Stuaní, Profª. Drª. Maria Cristina Borsato, Profª. Drª. Maria da Conceição Pereira Saraiva, Profª. Drª. Mírian Aiko Nakane Matsumoto, Prof. Dr. Paulo Nelson Filho e Profª. Drª. Raquel Assed Bezerra Segato, pela sempre agradável convivência e por todo o conhecimento comigo compartilhado.

Em especial aos professores que ministraram disciplinas durante o curso de mestrado, obrigada pela formação sólida que me proporcionaram.

Aos professores **Francisco, Bernadete e Jorge**, obrigada por sempre estarem dispostos a me ajudar tanto quanto eu precisei, o auxílio de vocês foi imprescindível.

Ao meu tão precioso **Daddynho**... “Pai, quem dera se por um descuido Deus te fizesse eterno.” E agora? Me faltam palavras para te agradecer simplesmente por ser você. Muito obrigada, papai, por toda confiança e incentivo que sempre me deu. Espero e farei de tudo para sempre ser motivo de alegria e orgulho. Esta conquista será nossa!

À minha tão especial **Mãe**, minha imensurável gratidão por sempre estar ao meu lado, me apoiando e me confortando em todas as circunstâncias da vida. Muito obrigada por me conduzir a ser quem sou! Toda vez que alguém me elogia, lembro de você, de toda a educação que desde pequeninha me deu. Tudo o que você me

ensinou me faz ser uma pessoa e profissional melhor. “Uma mãe segura as mãos de seu filho por pouco tempo, mas seu coração para sempre”, é assim que meu coração se sente, sempre acolhido por você!!!

Ao meu querido **irmão**, que sorte a minha em nascer já tendo você como irmão. Sou muito feliz por ter alguém com quem compartilhar a minha vida tão de perto. Obrigada por sempre se preocupar comigo, Ju.

Ao meu **namorado**, meu Boy! Como sou abençoada por ter um companheiro de vida tão maravilhoso como você! Muito obrigada por tanto carinho, cuidado, tanta dedicação, paciência e companheirismo. Com toda certeza vencer os obstáculos desta etapa foi muito mais leve tendo você sempre me ajudando.

À **minha família**, que sempre acompanhou de perto cada etapa de minha vida e carreira, agradeço em especial minha prima-irmã, Nathy, símbolo de verdadeira amizade e companheirismo. Obrigada por me inspirar, ajudar e principalmente por ser minha eterna melhor amiga.

Aos **funcionários** do Departamento de Clínica Infantil, pela harmoniosa convivência durante esses semestres. Matheus, Filó, Michelli, Fátima, Marco e Nilza, que bom seria se todos os programas tivessem funcionários como vocês, muito obrigada por sempre estarem prontos para nos ajudar.

Aos **professores da banca examinadora**, meu enorme agradecimento por concederem o precioso tempo de vocês para ler minha dissertação, me sinto verdadeiramente lisonjeada.

À todas as **minhas amigas** e amigos de pós-graduação, obrigada por todo apoio, incentivo e momentos compartilhados.

Aos meus queridos amigos **Guilherme, Bia, Isa, Jéssica, Karine e Renata**, obrigada por terem vindo para Ribeirão Preto, meus dias ficaram muito mais alegres tendo vocês junto comigo.

Ao **Guido** e ao **Lucas**, obrigado meninos por me ajudarem nas etapas deste trabalho, foi muito proveitoso estar com vocês. Obrigada, obrigada e obrigada!

Aos **meus professores** do curso de especialização em Ortodontia de Araraquara, vocês foram verdadeiras inspirações nesta área tão única e especial que escolhi como minha. Minha eterna gratidão por compartilharem tanto conhecimento comigo.

Às minhas **amigas da especialização**, obrigada meninas por todo incentivo logo no início, quando eu ainda estava estudando para prestar o mestrado. Agradeço

ainda mais pelos maravilhosos 3 anos que compartilhamos, vocês moram em meu coração.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (**FAPESP**) por possibilitar suporte fundamental para a execução deste projeto, por meio de bolsa de mestrado (**2016/13982-4**) vinculada ao processo 2015/06866-5.

RESUMO

OMORI, MA. Avaliação do papel do estrógeno no crescimento e desenvolvimento da maxila e da mandíbula [Dissertação]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto; 2018.

Os hormônios sexuais desempenham um importante papel no metabolismo ósseo. Além disso, polimorfismos genéticos em genes expressos durante o desenvolvimento craniofacial estão associados com alterações dimensionais na maxila e na mandíbula. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar, por meio de modelo animal e de genética humana, o papel do estrógeno e dos polimorfismos genéticos nos seus receptores ($ER\alpha$ e $ER\beta$), codificados pelos genes *ESR1* e *ESR2*, nas alterações dimensionais da maxila e da mandíbula. Um total de 40 ratas *Wistar* foram divididas em 2 grupos: Ovariectomizadas (para estimular deficiência de estrógeno) e Sham. Foram realizadas 3 tomadas radiográficas da região craniofacial das ratas, sendo a primeira aos 21 dias, a segunda aos 45 dias e a última aos 63 dias de vida. Medidas cefalométricas da maxila e da mandíbula foram obtidas para avaliação das alterações verticais e sagitais. Após a eutanásia, peças anatômicas das regiões de interesse foram utilizadas para realização de imuno-histoquímica e PCR em tempo real para os genes *ESR1* e *ESR2*. Paralelamente, na área da genética humana, um total de 143 amostras de DNA genômico e dados relativos à análise cefalométrica destes indivíduos foram avaliados quanto aos polimorfismos genéticos nos genes de interesse pelo método de discriminação alélica por PCR em tempo real. Os resultados foram agrupados de acordo com os diferentes testes; as variáveis contínuas foram avaliadas com testes paramétricos e/ou não paramétricos para comparação das médias entre os grupos. Os testes do qui-quadrado e exato de Fisher foram usados para avaliar a associação do padrão esquelético facial com as distribuições genotípica e alélica na população humana (alfa de 5%). No modelo animal, foi possível observar um aumento nas dimensões maxilares e mandibulares do grupo sob condição de deficiência de estrógeno ($p \leq 0,05$), onde não houve diferença na expressão do RNAm de ambos os genes ($p > 0,05$). Para mais, a presença de $ER\beta$ foi confirmada nos sítios de crescimento mandibulares de ambos os grupos. Na população humana, foi possível identificar associação estatisticamente significativa entre medidas cefalométricas e polimorfismos em *ESR1* e *ESR2* ($p \leq 0,05$). Desta forma, conclui-se que o estrógeno tem um papel importante no crescimento e desenvolvimento da maxila e da mandíbula em modelo animal e que polimorfismos genéticos nos seus receptores estão associados com o padrão esquelético facial.

Palavras-chave: Estrógeno. Maxila. Mandíbula. Alterações fenotípicas. Polimorfismos.

ABSTRACT

OMORI, MA. Evaluation of the role of estrogen in the maxilla and mandible growth and development [Dissertation]. Ribeirão Preto: University of São Paulo, School of Dentistry of Ribeirão Preto, 2018.

Sex hormones play an important role on bone metabolism. In addition, genetic polymorphisms in genes expressed during craniofacial development are associated with dimensional changes in maxilla and mandible. Thus, the aim of this study was to evaluate, using animal models and human genetics, the role of estrogen and genetic polymorphisms in its receptors ($ER\alpha$ and $ER\beta$), codified by *ESR1* and *ESR2*, in the dimensional alterations of the maxilla and the mandible. A total of 40 Wistar rats were divided into 2 groups: Ovariectomized (to stimulate estrogen deficiency) and Sham. Radiographic exams of rat's craniofacial region were performed, the first at 21 days, the second at 45 days and the last at 90 days old. Cephalometric measurements of maxilla and mandible were obtained to evaluate the vertical and sagittal skeletal alterations. After euthanasia, anatomical parts of interesting regions were used to performed immunohistochemistry and real time PCR for *ESR1* and *ESR2*. In parallel, a total of 143 genomic DNA samples and cephalometric data of these individuals were evaluated for genetic polymorphisms by real time PCR (allele discrimination method). The results were grouped according to the different tests; continuous variables were evaluated with parametric and/or non-parametric test to compare means between groups. Chi-square and Fisher's exact tests were used to evaluate the association of facial skeletal pattern with genotypic and allelic distributions in the human population (5% alpha). In the animal model, it was possible to detect an increase in the maxillary and mandibular dimensions of ovariectomized group ($p \leq 0,05$). There was no difference in the mRNA expression of both genes ($p > 0.05$). Moreover, the $ER\beta$ presence was confirmed at mandible's growth sites of both groups. In the human population, it was possible to identify statistically significant association in cephalometric measures and polymorphisms in *ESR1* and *ESR2* ($p \leq 0.05$). Therefore, in conclusion, estrogen has an important role in the mandible and maxilla growth and development in the animal model, and genetic polymorphisms in estrogen receptors are associated with facial skeletal patterns.

Keywords: Estrogen. Maxilla. Mandible. Phenotypic alterations. Polymorphisms.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Dispositivo para estabilização da cabeça.....	49
Figura 2.	Radiografia cefalométrica com pontos de referência	49
Figura 3.	Pontos de referência usados na análise cefalométrica de ratos de acordo com Fujita et al. (2004)	49
Figura 4.	Fotomicrografias das reações de imuno-histoquímica empregando ER β na porção anterior da mandíbula (região de sínfise) de um animal do grupo SHAM, em corte axial. A – Visão geral do corte obtido contendo os dois incisivos centrais do animal (ICs), x50. B – Imagem com ampliação intermediária favorecendo a visualização do ligamento periodontal (LP), osso alveolar (OA) e região de proliferação cartilaginosa (PC), x100. C – Ampliação do retângulo vermelho presente na figura 4A mostrando o epitélio sulcular (ES) expressando fortemente ER β , utilizado como controle positivo interno. Nota-se na porção central o ligamento periodontal (LP), contendo células expressando ER β na interface com o osso alveolar, caracterizando a presença de diferenciação osteoblástica na região (cabeça de seta preta), x400. D – Visão ampliada do retângulo vermelho presente na figura 4B demonstrando a presença de condrócitos ER β -positivos na região central da sínfise mandibular na região de proliferação cartilaginosa, x400....	67
Figura 5.	Fotomicrografias das reações de imuno-histoquímica empregando ER β no côndilo de um animal do grupo OVX, em corte sagital. A e B – Visão geral do côndilo, x50 e x100, respectivamente. C – Ampliação da imagem contida no retângulo vermelho presente na figura 5A, x200. D – Imagem aproximada do retângulo vermelho presente na figura 5C demonstrando a imunoexpressão de ER β no citoplasma e núcleo de múltiplos condrócitos dispersos pela área, exemplificados pelas setas pretas, x400.....	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Distribuição dos grupos experimental e controle.....	47
Tabela 2 -	Distâncias utilizadas na análise cefalométrica de ratos de acordo com Fujita et al. (2004)	50
Tabela 3 -	Polimorfismos genéticos estudados (SNPs)	57
Tabela 4 -	Medidas lineares da maxila durante a puberdade (45 dias)	63
Tabela 5 -	Medidas lineares da mandíbula durante a puberdade (45 dias)	64
Tabela 6 -	Medidas lineares da maxila após a puberdade (63 dias)	64
Tabela 7 -	Medidas lineares da mandíbula após a puberdade (63 dias)	65
Tabela 8 -	Expressão relativa de mRNA (<i>ESR1</i>) nos sítios de crescimento.....	65
Tabela 9 -	Expressão relativa de mRNA (<i>ESR2</i>) nos sítios de crescimento.....	66
Tabela 10 -	Médias (DP) dos valores cefalométricos selecionados.....	71
Tabela 11 -	Frequências genotípicas e alélicas de acordo com a má oclusão esquelética.....	72
Tabela 12 -	Frequências genotípicas e alélicas de acordo com o tipo facial.....	73
Tabela 13 -	Média (DP) das medidas angulares (°) sagitais de acordo com o genótipo.....	75
Tabela 14 -	Média (DP) das medidas angulares verticais (°) de acordo com o genótipo.....	76
Tabela 15 -	Média (DP) das medidas lineares sagitais (mm) de acordo com o genótipo.....	78
Tabela 16 -	Média (DP) das medidas lineares verticais (mm) de acordo com o genótipo.....	79

LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS E SIGLAS

$\Delta\Delta C_T$	Diferença entre o ΔC_T da amostra de interesse e o ΔC_T da amostra calibradora (controle)
ΔC_T	Diferença entre o C_T da amostra amplificada para o gene alvo e o C_T da mesma amostra amplificada para o gene de referência
μL	Microlitro
$2^{-\Delta\Delta C_T}$	Exponencial para obtenção da diferença de expressão entre as amostras
A (animal)	Ponto mais anterior do osso nasal
A (humanos)	Ponto A
ACTB	Beta Actina
ADAMST1	Desintegrina e Metaloproteinase com motivo de Trombospondina 1
ANB	Diferença entre os ângulos SNA e SNB
ANS	Espinha Nasal Anterior
AO	Osso alveolar
ARHGAP21	Proteína Ativadora Rho GTPase 21
Ba	Básio
BI	Ponto na intersecção entre a superfície lingual do incisivo inferior e a porção mais anterior do osso alveolar lingual
Bu	Ponto na pré-maxila entre o osso maxilar e a superfície lingual do incisivo superior
C	Celsius
CAAE	Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
Co (animal)	Ponto mais posterior e superior do processo condilar
Co (humanos)	Condílio
Co'	Ponto de cruzamento em Pg-Gn, perpendicular a Pg-Gn a partir de Co
COL1A1	Colágeno tipo I cadeia alpha 1
COL2A1	Colágeno tipo II cadeia alpha 1
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
C_T	Ciclo de amplificação (cycle threshold)
DAB	Diaminobenzidina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio Padrão
DTM	Disfunção Temporomandibular
E	Intersecção do osso frontal e o ponto mais anterior superior do limite posterior do osso etmoide
EDN1	Endotelina 1

EDTA	Etileno-diamino-tetra-acético
EPB41	Banda de Proteínas de Membrana de Eritrócitos 4.1
ERs	Receptores de Estrógeno
ERα	Receptor de Estrógeno alpha
ERβ	Receptor de Estrógeno beta
ES	Epitélio sulcular
ESR1	Receptor de Estrógeno 1
ESR2	Receptor de Estrógeno 2
EVC1	Subunidade do Complexo Ciliar EvC 1
EVC2	Subunidade do Complexo Ciliar EvC 2
FGF23	Fator de crescimento Fibroblástico 23
FGFR2	Receptor 2 do Fator de Crescimento de Fibroblastos
FORP	Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GH	Hormônio do Crescimento
GHR	Receptor do Hormônio de Crescimento
Gn (animal)	Ponto mais inferior no contorno do processo angular da mandíbula
Gn (humanos)	Gnátio
Go (animal)	Ponto mais posterior do processo angular da mandíbula
Go (humanos)	Gônio
ICs	Incisivos centrais
Id	Ponto mais anterior e inferior do processo alveolar mandibular
IGF-I	Fator de Crescimento Semelhante à Insulina
Il	Ponto mais proeminente entre as bordas incisais dos incisivos inferiores
Iu	Ponto mais proeminente entre as bordas incisais dos incisivos superiores
kVp	Pico de quilovoltagem
LP	Ligamento periodontal
LTBP2	Fator de Crescimento Transformador Latente de Ligação Beta Proteína 2
mA	Miliampere
mg	Milígrama
MATN1	Matrilina 1
Me	Mentoniano
miRNA	Micro ácidorubonucleico
MI	Ponto na intersecção entre o osso alveolar mandibular e a superfície mesial do primeiro molar
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
Mu	Ponto na intersecção entre o osso maxilar e a superfície mesial do primeiro molar superior até o
MYOH1	Miosina 1
N (animal)	Ponto da sutura nasofrontal

N (humanos)	Násio
ng	Nanograma
OVX	Ovariectomia
PAX5	Proteína de Caixa Emperalhada 5
PAX7	Proteína de Caixa Emperalhada 7
PBS	Tampão fosfato salino
PC	Proliferação cartilaginosa
PCR	Reação de polimerase em cadeia
Pg (animal)	Ponto mais inferior no contorno da borda inferior da mandíbula
Pg (humanos)	Pogônio
Pr	Ponto mais anterior e inferior do processo alveolar da pré-maxila
Pt	Pterigoideo
Ptm	Pterigomaxilar
qPCR	Reação de polimerase em cadeia quantitativo
RANK	Receptor ativador do fator nuclear kappa B
RNA	Ácido ribonucleico
RNAm	Ácido ribonucleico mensageiro
RNAses	Ribonucleases
Rpm	Rotação por minuto
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
S	Sela
Sham	Cirurgia fictícia
SNA	Ângulo que indica a posição da maxila, no sentido anteroposterior, em relação a base anterior do crânio
SNAI3	Repressor Transcricional da Família Caracol 3
SNB	Ângulo que indica a posição da mandíbula, no sentido anteroposterior, em relação a base anterior do crânio
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único
TBX5	Fator de Transcrição T-Box 5
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TE	Tampão de Extração
TGF-β	Fator de Transformação do Crescimento Beta
Tris-HCl	Cloridrato de Trisaminometano
TWIST	Proteína relacionada à Torção
TWIST1	Proteína relacionada à Torção 1
USP	Universidade de São Paulo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	35
2. PROPOSIÇÃO	43
2.1. Objetivo Geral	43
2.2. Objetivos Específicos	43
3. MATERIAL E MÉTODOS	47
3.1. Modelo Animal	47
3.1.1. Aspectos Éticos	47
3.1.2. Obtenção dos Animais	47
3.1.3. Ovariectomia	47
3.1.4. Análise Cefalométrica do Desenvolvimento Craniofacial	48
3.1.5. Eutanásia	50
3.1.6. PCR em tempo real – Quantitativo	50
3.1.7. Processamento Histotécnico	53
3.1.8. Imuno-histoquímica	53
3.2. Amostras Humanas	54
3.2.1. Aspectos Éticos	54
3.2.2. Caracterização da Amostra	55
3.2.3. Critérios de Inclusão e Exclusão	55
3.2.4. Determinação do Fenótipo	55
3.2.5. Coleta do Material Biológico	56
3.2.6. Extração do DNA Genômico e Genotipagem	56
3.3. Análise Estatística	59
3.3.1. Modelo Animal	59
3.3.2. Amostras Humanas	59
4. RESULTADOS	63
4.1. Modelo Animal	63
4.1.1. Análise Cefalométrica do Desenvolvimento Craniofacial	63
4.1.2. PCR em tempo real – Quantitativo	65
4.1.3. Imuno-histoquímica	66
4.2. Amostras Humanas	71
5. DISCUSSÃO	83
5.1. Desenho do Estudo e Amostra	83
5.1.1. Modelo Animal	83
5.1.2. Amostras Humanas	83

5.1.3. Características Fenotípicas.....	84
5.2. Imuno-histoquímica.....	85
5.3. Biologia Molecular.....	85
5.3.1. PCR em tempo real – Quantitativo.....	85
5.3.2. PCR em tempo real – Qualitativo (Genotipagem).....	86
5.4. O Estrógenos e seus Receptores.....	87
6. CONCLUSÃO.....	97
REFERÊNCIAS.....	99
ANEXOS.....	111

Introdução

1.INTRODUÇÃO

O complexo craniofacial é constituído por diferentes estruturas anatómicas compostas por tecidos moles e mineralizados. Por meio do correto e orquestrado funcionamento deste sistema torna-se possível a realização de funções indispensáveis para a vida humana como a respiração, mastigação, alimentação e fala (Madeira et al., 2012). O desenvolvimento deste complexo é um processo morfogenético altamente orquestrado, envolvendo centenas de moléculas que controlam a diferenciação e proliferação dos tecidos com distintas origens embriológicas (Roosenboom et al., 2016).

A desarmonia no crescimento e desenvolvimento do esqueleto craniofacial leva a mudanças que podem, por sua vez, influenciar a posição e a orientação dos ossos maxilares e da mandíbula, conduzindo a alterações nas dimensões craniofaciais, o que possui uma relação direta com os padrões faciais esqueléticos (Huh et al., 2013; Bayram et al., 2014). A compreensão de sua evolução vem sendo estudada nos campos ortodôntico e genético (da Fontoura et al., 2015; Yoon e Chung, 2015; Choi et al., 2017), uma vez que discrepâncias no crescimento e desenvolvimento destas estruturas são consideradas alterações de desenvolvimento.

A maxila e a mandíbula são tecidos mineralizados (ósseos) que fazem parte deste complexo. Modificações localizadas nestes ossos podem levar a diferentes alterações fenotípicas encontradas na prática clínica. Estudos têm demonstrado que o desenvolvimento dessas estruturas faciais requer a coordenação de diferentes mecanismos moleculares complexos, envolvendo interações celulares e teciduais (Kouskoura et al., 2011; Nieminen et al., 2011; Pallares et al., 2015; Parada e Chai, 2015; Šidlauskas et al., 2016).

De fato, um importante fator na formação, crescimento e desenvolvimento ósseo são os hormônios, assim como os hormônios sexuais. Já é bem estabelecido que os hormônios sexuais são fundamentais na regulação das funções reprodutivas e desempenham um importante papel no crescimento e manutenção óssea (Lorenzo, 2003).

Os hormônios sexuais, assim como os demais hormônios, são substâncias químicas que regulam o crescimento, desenvolvimento e metabolismo de diversos tecidos através da transferência de informações entre as células, atuando na ativação de genes específicos fundamentais para as atividades celulares.

O estrógeno (estradiol, estriol e estrona) é um hormônio sexual produzido principalmente pelos ovários nas mulheres, apesar de outros tecidos também realizarem sua produção. Já nos homens, sua maior produção é proveniente do tecido adiposo e do cérebro. Estudos populacionais têm indicado claramente que os estrógenos são necessários não apenas para a regulação da homeostase esquelética das mulheres, mas também dos homens (Khosla et al., 2001; Khosla et al., 2002; Gennari et al., 2003). Este hormônio possui como alvo diversas células do organismo, inclusive células presentes no complexo dento facial (Gennari et al., 2005).

Através de sua atuação, os estrógenos produzem efeitos benéficos no desenvolvimento e manutenção do esqueleto (Prince, 1994; Turner et al., 1994b; Compston, 2001), além disso, este hormônio pode atuar diretamente sobre o tecido ósseo tanto por meio de funções protetoras (Arboleya e Castañeda, 2013), como no crescimento e desenvolvimento dos ossos (Márquez Hernández et al., 2011a).

A atribuição do estrógeno no desenvolvimento ósseo se inicia no período embrionário (Ben-Hur et al., 1993) estendendo-se até a puberdade (Nilsson et al., 2002; Fujita et al., 2004), atuando tanto no sexo feminino quanto no sexo masculino, uma vez que ambos secretam os receptores de estrógeno (Márquez Hernández et al., 2011b).

Alterações nas taxas hormonais de estrógeno, bem como em seus receptores estão diretamente relacionadas com diversas doenças (Deroo e Korach, 2006) inclusive as que causam alterações no complexo craniofacial (Lee et al., 2006; Traub et al., 2014).

Os genes receptores de estrógeno (*ESR1* e *ESR2*) fornecem instruções para a codificação das proteínas receptoras de estrógeno ($ER\alpha$ e $ER\beta$), as quais exercem papel de mediadores, visto que os efeitos esqueléticos do estrógeno são alcançados através da sua ligação a locais específicos nos receptores, localizados a nível nuclear e citoplasmático, como um sistema chave-fechadura. Por meio da ativação de fatores de transcrição por seus ligantes, sinais são acionados, podendo então afetar o desenvolvimento e a função das células (Miller, 2002; Lorenzo, 2003; Gennari et al., 2005).

Os receptores de estrógeno podem ser classificados em três diferentes tipos, sendo os mais prevalentes $ER\alpha$ e $ER\beta$, codificados pelos genes *ESR1* e *ESR2*, respectivamente (Green et al., 1986; Kuiper et al., 1996; Prossnitz et al., 2007), eles têm sido amplamente estudados (Katzenellenbogen et al., 2000; Hall et al., 2001; Lee

et al., 2006; Tetel e Pfaff, 2010; Barros e Gustafsson, 2011; Hess et al., 2011; Planey et al., 2014; Eyster, 2016). Sabe-se que ambos receptores podem ser expressos no mesmo tecido em níveis variados (Nilsson et al., 2001), sendo que a expressão dos ER α (*ESR1*) predomina em células da mama, endométrio, tecido adiposo, rins, músculo esquelético e osso, enquanto os ER β (*ESR2*) prevalecem em células vasculares/endoteliais e também na medula óssea (Kos et al., 2001; Gruber et al., 2002; Nilsson e Gustafsson, 2011), e além disso, é sabido que ambos receptores são significativos reguladores para o crescimento e maturação do esqueleto (Vidal et al., 2000; Lindberg et al., 2001).

Estudos prévios têm demonstrado que o estrógeno possui um efeito no metabolismo ósseo (Riggs e Melton, 1986; Turner et al., 1994b; Harris et al., 1996), podendo ocorrer uma estimulação a diferenciação osteoclástica (Oreffo et al., 1999) através dos hormônios sexuais. Em casos onde há baixos níveis de estrógeno, há um aumento na contagem osteoclástica, sendo que quando os níveis de estrógeno são maiores ocorre o oposto, ou seja, regeneração (Yamashiro e Takano-Yamamoto, 2001; Haruyama et al., 2002).

O ER α representa um importante mediador da ação do estrógeno no osso com expressão predominante no osso cortical (Braidman et al., 2001) e possui um efeito significativo na regulação tanto da manutenção da massa óssea quanto de seu *turn-over*; Já o ER β , mais evidente em tecido ósseo esponjoso e cartilaginoso (Dietrich et al., 2006) parece ter uma função distinta, pois experimentos em ratos *knock-out* para ER α ou ER β apresentaram fenótipos esqueléticos diferentes, sendo eles opostos no que se diz respeito ao crescimento ósseo (Vidal et al., 1999; Windahl et al., 1999; Dietrich et al., 2006).

A deficiência de estrógeno após a ocorrência da menopausa exerce um papel importante nas alterações do volume ósseo trabecular, conduzindo as formas precoce e tardia da osteoporose em mulheres (Riggs et al., 1998). Um modelo animal bastante utilizado para simular a deficiência de estrógeno, devido a sua similaridade com os seres humanos, são os ratos e os camundongos (Lander et al., 2001; Waterston et al., 2002; Gibbs et al., 2004). Nestes roedores, os efeitos da deficiência de estrógeno podem ser modelados através da ovariectomia (OVX), um procedimento operatório que provoca deficiência hormonal (Weitzmann e Pacifici, 2006).

Alguns autores encontraram em seus resultados que os ossos maxilares não são muito afetados pela OVX (Ishihara et al., 1999; Liu et al., 2015). Entretanto,

opondo-se a isso, foi demonstrado em outros trabalhos que mudanças nos níveis de estrógeno causam alterações dimensionais na maxila e/ou na mandíbula (Fujita et al., 2004; Márquez Hernández et al., 2011a; Singh e Gunberg, 1971). Fujita et al. (2004) avaliaram as alterações morfométricas no esqueleto craniofacial de camundongos recém-nascidos, encontrando alterações tanto na maxila quanto na mandíbula. Distâncias lineares medidas através de radiografias laterais apresentaram-se significativamente reduzidas para ambos ossos (maxila e mandíbula) no modelo animal ovariectomizado. A partir dessas considerações pode-se supor que os hormônios sexuais representam um fator crítico não somente para o crescimento cartilaginoso, mas também para o crescimento sutural.

Paralelamente a estes achados do efeito hormonal no crescimento ósseo, estudos com famílias e também com gêmeos têm sugerido que a etiologia das dimensões craniofaciais além de sofrer influências multifatoriais, é também poligênica, ou seja, diversos fatores genéticos aditivos desempenham um relevante papel (Mossey, 1999).

A associação entre variações do material genético e fenótipos hereditários representa um aspecto essencial nas pesquisas em Biologia Molecular. Estas variações ocorrem devido a pequenas diferenças presentes na sequência do DNA genômico, denominadas polimorfismos. Os polimorfismos de DNA, por sua vez, são alterações que ocorrem naturalmente devido a modificações no material genético com mais de uma variação (um alelo), sendo a sua frequência maior que 1% (Sherry et al., 1999; Ye, 2000; Nielsen, 2004). O tipo mais comum desses polimorfismos é denominado Polimorfismo de Nucleotídeo Único (*SNP*), ocorrendo essa mutação devido a troca de um único par de bases, ou seja, a substituição de um nucleotídeo por outro, sendo sua constância em cada 500 -1.000 pares de bases (Sherry et al., 1999; Takashiba e Naruishi, 2006).

Apesar de a maioria dos polimorfismos de DNA serem funcionalmente neutros, uma parte deles pode exercer um efeito alelo-específico na regulação da expressão gênica e/ou na função da proteína por ele codificada, o que leva a diferenças entre os indivíduos tanto no que diz respeito às características físicas, quanto a susceptibilidade às doenças (Ye, 2000; Takashiba e Naruishi, 2006).

Neste contexto, nas duas últimas décadas, diferentes polimorfismos em genes candidatos como: *FGF23*, *ADAMTS1*, *ARHGAP21*, *COL2A1*, *MATN1*, *MYO11*, *EPB41*, *RANK* e *TWIST* foram associados com a etiologia das alterações

dimensionais, principalmente da mandíbula (Jang et al., 2010; Xue et al., 2010; Cruz et al., 2011; Tassopoulou-Fishell et al., 2012; Perillo et al., 2015; Guan et al., 2015; Chen et al., 2015; da Fontoura et al., 2015; Cruz et al., 2017; Küchler et al., 2018b). Embora os genes *ESR1* e *ESR2* não tenham sido previamente investigados no âmbito das dimensões craniofaciais, são possíveis genes candidatos por apresentarem participação no desenvolvimento ósseo em sua ligação com o estrógeno.

Com base nas evidências expostas até o momento, é possível assumir que o estrógeno e seus receptores estão envolvidos de forma direta ou indireta nas alterações fenotípicas do complexo craniofacial, devido à atuação em diferentes mecanismos moleculares que participam de importantes vias do desenvolvimento deste complexo. E, apesar desses conhecimentos, até o presente momento, há reduzida informação disponível na literatura no que se diz respeito ao efeito do estrógeno e seus polimorfismos genéticos no crescimento craniofacial.

Desta forma, é possível hipotetizar que o estrógeno e seus receptores poderiam estar associados a alterações nas dimensões maxilares e mandibulares.

Proposição

2.PROPOSIÇÃO

2.1. Objetivo geral

- Avaliar a influência do estrógeno e seus receptores (ER α e ER β) nas alterações dimensionais da maxila e da mandíbula.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar as dimensões maxilares e mandibulares sob a condição de deficiência de estrógeno durante a puberdade, em modelo animal.
- Avaliar a expressão de *ESR1* e *ESR2* nos sítios de crescimento da maxila e da mandíbula sob a condição de deficiência de estrógeno durante a puberdade, em modelo animal.
- Avaliar, em amostras humanas, a associação entre as alterações cefalométricas e os polimorfismos genéticos em *ESR1* e *ESR2*.

Material e Métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Modelo animal

3.1.1. Aspectos Éticos

O presente projeto de pesquisa foi submetido à apreciação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (FORP) - Universidade de São Paulo (USP) (Protocolo nº 2014.1.721.58.7 – ANEXO A), tendo sido aprovado.

3.1.2. Obtenção dos Animais

Para experimentação, foram utilizadas 40 ratas da linhagem *Wistar* de 21 dias de idade, correspondendo ao período pré-puberal, uma vez que o período de puberdade em ratas *Wistar* ocorre entre o 35º e 55º (Ojeda et al., 1976), adquiridas do Biotério Central da Universidade de São Paulo (USP) – Campus de Ribeirão Preto. Todos os animais foram mantidos no Biotério I da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP com livre acesso à ração e água filtrada, em ambiente com temperatura controlada e ciclo de 12 horas claro-escuro.

O número de animais foi estabelecido por meio de um estudo piloto. O cálculo foi realizado com base nas medidas maxilares e mandibulares e a diferença das médias encontradas entre os grupos. Além disso, foi levado em consideração a estratificação dos grupos e a possibilidade de perdas. Para o cálculo amostral foi utilizado o software *Stat* com poder de 80% e alfa de 5%.

Os animais foram divididos aleatoriamente em 2 grupos (Tabela 1).

Tabela 1 - Distribuição dos grupos experimental e controle

Grupos	Procedimento	n
I	OVX	20 animais
II	SHAM (controle)	20 animais

OVX = Ovariectomia; Sham = Cirurgia de ovariectomia fictícia

Fonte: Autoria própria

3.1.3. Ovariectomia

Para a obtenção dos animais deficientes de estrógeno foi realizada ligadura seguida de excisão cirúrgica dos ovários, denominada ovariectomia. As ratas foram anestesiadas por meio de injeção intraperitoneal com Cloridrato de 10% Ketamina na dosagem de 55mg/Kg de peso corporal e Xilazina 2% na dosagem de 10mg/Kg de peso corporal. Ovariectomias bilaterais foram realizadas nos animais do grupo I, conforme protocolo descrito por Weitzmann e Pacifi (2006). Os animais do grupo II foram submetidos a cirurgias de ovariectomia fictícias (sham), nas quais os ovários foram apenas movimentados e devolvidos intactos à posição original, como descrito por (Orrico et al., 2005). O sucesso da ovariectomia foi confirmado por meio da pesagem do útero no dia da eutanásia uma vez que este procedimento promove atrofia uterina (Chen G et al., 2014) quando comparado ao grupo Sham.

3.1.4. Análise Cefalométrica do Desenvolvimento Craniofacial

Foram realizadas 3 tomadas radiográficas da região craniofacial das ratas sendo a primeira realizada aos 21 dias de vida, a segunda aos 45 dias e a última aos 63 dias com o auxílio de um dispositivo próprio para roedores onde a cabeça de cada animal foi estabilizada firmemente através de um par de hastes inseridos nas orelhas (Figura 1). As radiografias cefalométricas (Figura 2) em norma lateral foram obtidas com o uso de filmes radiográficos oclusais *Insight Oclusal F E Speed* (Eastman Kodak Company, Nova Iorque, EUA), com distância foco-objeto fixa de 12 cm, além da presença de um segmento de fio ortodôntico retangular de 10mm para possibilitar as posteriores mensurações, sob uma condição elétrica de 8mA e 70 kVp com tempo de exposição de 0,8 segundos, utilizando-se do aparelho de raios-X Spectro 70X (Dabi Atlante Indústrias Médico Odontológicas Ltda, São Paulo, BR). Após a obtenção, as imagens radiográficas foram digitalizadas. As análises cefalométricas foram executadas com o *Software Image J 1.51k* (Wayne Rasband National Institutes of Health, EUA) em um computador de uso pessoal (*Inspiron 14700*, Dell Technologies, Texas, EUA) de acordo com os pontos de referência e medidas lineares previamente estabelecidos por Fujita et al., 2004 (Figura 3; Tabela 2).

Figura 1 - Dispositivo para estabilização da cabeça

Fonte: Produção do próprio autor

Figura 2 - Radiografia cefalométrica com pontos de referência

Fonte: Produção do próprio autor

Figura 3 - Pontos de referência usados na análise cefalométrica de ratos de acordo com Fujita et al. (2004).

Fonte: Fujita et al. (2004)

Tabela 2 - Distâncias utilizadas na análise cefalométrica de ratos de acordo com Fujita et al., 2004

Maxila	Mandíbula
N-A	Pg-Go
E-A	Pg-Gn
Mu-Bu	MI-BI
Mu-Pr	Co-Co'
A-Pr	Co-Go
A-Bu	Co-Gn
N-Mu	Co-Pg
Iu-A	II-BI
Iu-Pr	II-Id
Iu-Bu	

Fonte: Produção do próprio autor

3.1.5. Eutanásia

A eutanásia ocorreu aos 45 dias em metade da amostra e aos 63 dias para o restante da amostra, seguindo as diretrizes de eutanásia do CONCEA, as quais estão disponíveis na página da CEUA, no site www.forp.usp.br:

“Os anestésicos gerais injetáveis, administrados por via intraperitoneal, são aceitos como método de eutanásia quando usados em sobredose a partir de três vezes a dose requerida para anestesia geral.” Portanto, a indução da eutanásia nos animais do presente estudo será realizada por sobredose anestésica, através da associação de Ketamina (300mg/kg de peso) e Xilazina (30mg/kg de peso).”

Após a eutanásia, os sítios de crescimento da mandíbula (ângulo mandibular, côndilo e sínfise) e a sutura palatina foram dissecados para posterior análise de expressão.

3.1.6. PCR em tempo Real Quantitativo

Para verificar se os ER α e ER β estavam diferencialmente expressos entre os grupos OVX e Sham nos sítios de crescimento, as amostras foram mantidas em *RNAlater* (Life Technologies Corporation – Carlsbad, CA, EUA) e congeladas a -80°C até o dia do processamento. Para tanto, foi utilizado o kit *mirVana™ miRNA Isolation* (Ambion/Life Technologies™) e seguido o protocolo do fabricante, onde durante todo

o procedimento de extração foi utilizada a solução RNaseZap® (*Ambion/Life Technologies™*) para descontaminação de todos os materiais utilizados assim como da bancada. Este procedimento foi adotado para a obtenção de um ambiente livre de RNAses que poderiam levar à degradação dos produtos de extração. As amostras do modelo animal foram descongeladas e pesadas de forma a garantir que a quantidade de tecido submetida à extração não estivesse fora dos limites determinados pelo kit (0,5 – 250 mg). Após pesagem, as amostras foram acondicionadas em tubos do tipo *Falcon* de 50 mL devidamente identificados e a elas foram adicionados o tampão de lise proveniente do kit (*Lysis/Binding Buffer*) seguindo a regra de 1mL para cada 100 mg de tecido. Os tubos foram armazenados em gelo enquanto as amostras eram homogeneizadas individualmente com o auxílio de um homogeneizador de tecidos (BioSpec Products, Inc., Bartlesville, OK, EUA). Ao término desta fase, foi adicionado o aditivo de miRNA (*miRNA Homogenate Additive*) na proporção de 1/10 do volume de tampão utilizado. Passados 10 minutos em que as amostras foram incubadas em gelo, procedeu-se a extração orgânica utilizando solução de fenol-clorofórmio fornecida com o kit em igual volume de tampão previamente adicionado. Após agitação em vortexador por 30 segundos, as amostras foram centrifugadas em rotação máxima da centrífuga (aprox. 10000 x g) e as fases aquosas resultantes foram transferidas para microtubos de polipropileno de 2,0 mL. Foi então adicionado etanol absoluto em temperatura ambiente na proporção de 1,25 vezes o volume recuperado na etapa anterior e os tubos foram agitados vigorosamente.

As amostras então foram processadas utilizando colunas filtrantes e tubos coletores fornecidos com o kit para completar o isolamento do RNA total, sendo submetidas a centrifugação e lavagem com as soluções conforme instruções do fabricante, sendo a última etapa constituída pela eluição dos ácidos nucleicos retidos na coluna utilizando 100 µL da solução de eluição (*Elution Solution*) aquecida a 100°C. Ao final do processo, os tubos foram armazenados em *freezer* a -20° C para posterior análises.

Para realização da análise de pureza e quantificação de RNA total, as amostras de RNA total foram retiradas do *freezer* e deixadas brevemente sobre a bancada para descongelar. A quantificação por densidade óptica foi realizada em espectrofotômetro NanoDrop™One (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA) utilizando-se 1 µL do produto da extração. A concentração de RNA foi determinada a partir de análise de absorbância a 260 nm e, com base nas leituras a 280 nm, a qualidade da amostra

foi avaliada usando a razão A260/A280, com valores dessa razão próximos a 2,0 sendo considerados como indicativos de alta pureza.

Após a extração do RNA, o DNA complementar (cDNA) foi sintetizado utilizando 1µg de RNA total e o kit *High Capacity* (Applied Biosystems, Foster City, California, EUA). As reações então foram submetidas ao sistema de PCR em tempo real *StepOnePlus™ Real-Time PCR System* (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA) para programa de termociclagem recomendado pelo fabricante do kit de transcrição reversa utilizado. O programa consistia de uma etapa a 25° C por 10 minutos, seguido por uma etapa a 37° C por 120 minutos, outra etapa a 85° C por 5 minutos sendo então finalizado a 4° C por 5 minutos. Ao término deste processo, as amostras estavam prontas para serem submetidas ao processo de quantificação por PCR em tempo real ou poderiam ser armazenadas em *freezer* a -20° C ou -80° C dependendo do tempo de armazenagem necessário.

O produto resultante do PCR (cDNA) foi utilizado para o ensaio de quantificação por PCR em tempo real (qPCR) visando analisar os níveis de expressão dos ERα e ERβ. Para tanto, realizou-se a adição do reagente *TaqMan™ Fast Universal PCR Master Mix (2X)*, no *AmpErase™ UNG* (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA), sendo as reações para quantificação preparadas seguindo orientações do fabricante.

As condições de reação de RT-PCR para cada gene de interesse foram otimizadas com relação à concentração de *primers* e eficiência da amplificação do gene alvo. Após inserção no equipamento *StepOnePlus™ Real-Time PCR System* (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA), foi selecionado o programa de termociclagem “*Quantitative (comparative $\Delta\Delta Ct$)*”, que consiste em um estágio inicial para aquecimento das reações até 95° C por 20 segundos seguido por um estágio composto por 40 ciclos em que as amostras foram aquecidas a 95° C por 1 segundo e depois levadas a 60° C por 20 segundos para que houvesse a extensão da nova cadeia de DNA, liberação das sondas fluorescentes presentes nos ensaios e leitura desses sinais pelo aparelho, visando a construção da curva de sinal em relação ao número de ciclos completados.

Obtidos os gráficos, foi possível determinar o valor de *Cycle Threshold (Ct)*; visto que as amostras foram realizadas em duplicatas, primeiramente realizou-se média aritmética entre os C_{Ts} de cada amostra, e, do C_T médio obtido de cada

amostra, foi subtraído o C_T médio dos diferentes controles endógenos utilizados (*ACTB* e *GAPDH*), caracterizando o primeiro Δ do método utilizado.

Na sequência, as amostras do grupo Sham foram selecionadas como “controle” (calibradores do experimento), ou seja, essas amostras serviram como base de comparação para os níveis de expressão e caracterização dos resultados. Em outras palavras, de cada ΔC_T obtido para as amostras foi subtraído o ΔC_T médio do grupo Sham, configurando então o $\Delta\Delta C_T$. Esse valor foi então aplicado em uma exponencial do tipo $2^{-\Delta\Delta C_T}$ para que fosse enfim obtido o valor de *fold change*, isto é, a quantidade de vezes que caracteriza a diferença de expressão encontrada nas amostras.

3.1.7. Processamento Histotécnico

Após a eutanásia dos animais no período de 45 dias, metade dos espécimes de cada grupo foram fixados por imersão em formol tamponado a 10% por 24 horas à temperatura ambiente e, em seguida, lavados por, aproximadamente, 4 horas em água corrente. Na sequência, para a desmineralização das peças, foi utilizada solução à base de EDTA a 4,13% (pH 7-7,4). As peças foram mantidas nesta solução à temperatura ambiente, trocada semanalmente, até sua completa desmineralização. O grau de desmineralização das estruturas mineralizadas foi testado por meio da penetração de uma agulha nos tecidos para verificação da sua consistência. Após esse procedimento, as peças foram submetidas ao processamento histotécnico de rotina, sendo lavadas em água corrente por 2 horas, desidratadas em álcool de concentrações crescentes (70% e 95% por 30 minutos cada; 2 trocas de 100% por 20 minutos cada e 2 trocas de álcool 100% por 40 minutos cada), diafanizadas em xilol (2 banhos de 20 minutos e 1 de 40 minutos) e incluídas em parafina.

Os blocos contendo os espécimes das diferentes regiões craniofaciais (palato, côndilo, ângulo mandibular e sínfise) foram cortados em micrótomo (Leica RM2145; Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemanha) nos sentidos sagital ou transversal com espessura de 5 μ m.

3.1.8. Imuno-histoquímica

A imuno-histoquímica de ER β foi realizada nos cortes provenientes das mandíbulas dos dois grupos. Os cortes histológicos foram desparafinizados em estufa a 60° por 4 horas. A desparafinização foi seguida da imersão das lâminas em concentrações decrescentes de álcool etílico (2 banhos em álcool etílico absoluto, 90%, 70% e 50%, respectivamente) e na sequência em água destilada (10 passagens sem intervalo). A recuperação antigênica foi realizada utilizando solução pH 9,0 (Dako: Target Retrieval Solution S2367), em fervura, por 15 minutos na panela de pressão elétrica. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com imersão das lâminas em peróxido de hidrogênio 3,5% em temperatura ambiente por 10 minutos, seguido pela imersão em tampão fosfato-salino (PBS – pH 7,4). Todos os cortes foram cobertos com o anticorpo primário (Anti-ER β - mouse monoclonal IgG2a; Santa Cruz Biotechnology Inc.; diluído 1:50) em ambiente com umidade constante a 4°C por 16 horas. Após este período, foi realizada a detecção com o kit LSAB® (Dako: Agilent Technologies, Inc., Glostrup, Dinamarca). O complexo antígeno anticorpo foi revelado utilizando 3,3' – diaminobenzidina (DAB) (Dako: Agilent Technologies, Inc., Glostrup, Dinamarca) e os cortes foram contra corados com hematoxilina de Carazzi. As lâminas foram então lavadas em água corrente, lavadas em água amoniacal por 30 segundos, lavadas em água corrente, diafanizadas, desidratadas e montadas. As amostras foram examinadas em microscópio Axio Imager.M1 (Zeiss, Oberkochen, Alemanha) sob luz convencional e as imagens capturadas utilizando a ocular de até 40X (e aumento agregado de até 400X) para avaliar a presença ou ausência da imunomarcação, bem como sua localização.

3.2. Amostras humanas

3.2.1. Aspectos Éticos

O presente projeto de pesquisa foi previamente submetido à apreciação pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo (CAAE: 50765715.3.0000.5419 – ANEXO B), tendo sido aprovado. Todos os pacientes e seus responsáveis receberam informações sobre o projeto de pesquisa e foram incluídos no mesmo após lerem e assinarem o TCLE.

3.2.2. Caracterização da Amostra

A amostra foi composta por 143 pacientes em tratamento ortodôntico do Curso de Especialização em Ortodontia e da Disciplina de Ortodontia Preventiva do Curso de Graduação em Odontologia da FORP/USP.

3.2.3. Critérios de inclusão e exclusão

Foram incluídos apenas pacientes com conjunto de registros pré-tratamento ortodôntico completo, incluindo telerradiografia em normal lateral, fotografias intra/extra bucais e modelos de gesso. Não foram incluídos pacientes portadores de síndromes genéticas e/ou doenças sistêmicas, pacientes portadores de fissuras orais, além dos que não tiveram o TCLE assinado.

3.2.4. Determinação do fenótipo

As telerradiografias em norma lateral foram escaneadas (*Scanjet G4050*, HP, CA, EUA) para possibilitar a realização dos traçados cefalométricos pelo sistema *Dolphin® Imaging 11.0* (Dolphin Imaging and Management Solutions, Chatsworth, CA, EUA). Durante a etapa de escaneamento das imagens utilizou-se uma régua milimetrada como indicador (*Dolphin® Radiographic Film Calibration Ruler*) para determinar a ampliação, podendo assim estabelecer uma proporção adequada da imagem escaneada. As imagens foram convertidas no formato JPEG e salvas com qualidade máxima.

Todos os traçados e medidas foram obtidos por um único examinador previamente calibrado ($Kappa > 0,9$), especialista em Ortodontia. Os ângulos ANB (Steiner) e NBa-PtGn (Ricketts) foram medidos para determinar a relação esquelética sagital dos arcos (má oclusão esquelética), como um padrão craniofacial sagital, e o tipo facial como um padrão vertical, respectivamente. Os indivíduos foram classificados de acordo com o ângulo ANB como Classe I (0° a 4°), Classe II ($> 4^\circ$) ou Classe III ($< 0^\circ$), e conforme o ângulo NBa-PtGn como mesofacial (87° - 93°), dólcofacial ($< 87^\circ$) ou braquifacial ($> 93^\circ$). Foram avaliadas as seguintes variáveis: Má oclusão esquelética, tipo facial, medidas angulares sagitais (SNA, SNB e ANB),

medidas angulares verticais (SN-GoGn e NBa-PtGn), medidas lineares sagitais (SN, Ptm-A, Go-Pg e Co-Gn) e verticais (N-Me, ANS-Me, S-Go, Co-Go).

3.2.5. Coleta do Material Biológico

Durante o tratamento ortodôntico, amostras de saliva foram coletadas como fonte de DNA genômico, seguindo protocolo previamente estabelecido (Küchler et al., 2012). Para a coleta, os indivíduos realizaram bochecho com 5mL de solução salina a 5% durante 1 minuto, sendo o volume do bochecho acondicionado em tubos para centrífuga de 15mL (Corning Inc., Corning, NY, EUA).

3.2.6. Extração do DNA Genômico, Quantificação e Genotipagem

Cada tubo contendo a saliva coletada foi centrifugado a 550rpm durante 15 minutos para sedimentação do pellet de células. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspendido em 1mL de tampão de extração (Tris-HCl 10mM, pH 7,8; EDTA 5mM; SDS 0,5%). A amostra foi então, transferida para um microtubo de 1,5mL, o qual foi congelado a -20°C, até o momento da extração do DNA.

Posteriormente, as amostras foram descongeladas e incubadas com 100ng/mL de Proteinase K (4μL de Proteinase K - Fungal, Invitrogen Laboratories, na concentração de 25mg/mL), em banho-maria a 56°C 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 (12000rpm), sendo o sobrenadante dividido em dois microtubos plásticos de 1,5mL, contendo 700μL cada. O mesmo volume (700μL) de álcool isopropílico resfriado foi adicionado a cada microtubo, seguido de agitação vigorosa.

Após nova centrifugação por 20 minutos (1200 rpm) a 4°C, a formação da "nuvem de DNA" foi observada em cada microtubo de todas as alíquotas. Em seguida, o sobrenadante foi descartado cuidadosamente para não deslocar o pellet de DNA e 1mL de etanol a 70% resfriado foi adicionado, seguido de centrifugação por 15 minutos (12000rpm), a 4°C. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e o tubo aberto e emborcado em papel para secar por pelo menos 30 minutos e evaporar o excesso de

etanol. O pellet de DNA foi ressuspensionado em 400µL de Tampão de Extração (TE) e congelado a -20°C.

Para realizar a avaliação de pureza e quantificação de DNA extraído, as amostras foram retiradas do freezer e deixadas sobre a bancada para descongelar. A quantificação por densidade óptica foi realizada em espectrofotômetro NanoDrop™One (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA) utilizando-se 1 µL do produto da extração. A concentração de DNA foi determinada a partir de análise de absorbância a 260 nm e, com base nas leituras a 280 nm, a qualidade da amostra foi avaliada usando a razão A260/A280 (Glase, 1995), com valores próximos a 1,8 sendo considerados como indicativos de alta pureza.

Para a avaliação da associação das variantes genéticas com os diversos fenótipos, foram avaliados polimorfismos dos genes ERα e ERβ. Selecionou-se polimorfismos que se classifiquem como potencialmente funcionais, por alterarem a sequência de aminoácidos da proteína final ou por potencialmente influenciarem a expressão gênica (Tabela 3).

Tabela 3 - Polimorfismos genéticos estudados (SNPs)

Gene	Locus	Sequência Referência	Tipo	Troca de base (Sequência contexto)	Menor frequência alélica
ESR1	6q25.1	rs12154178	Variação Intron	TGT[A/C]ATA	0.4744/2376
		rs1884051	Variação Intron	GCC[A/G]TCT	0.4908/2458
		rs2273206	Variação Intron	GTA[G/T]TTT	0.2774/1389
		rs7774230	Variação Intron	TGA[C/T]TGG	0.4427/2217
		rs2747649	Variação Intron	TAA[C/G]CTT	0.2562/1283
		rs2234693	Variação Intron	AGC[C/T]GTT	0.4463/2235
		rs9340799	Variação Intron	TCT[A/G]GAG	0.2813/1409
ESR2	14q23.2	rs1256049	Variação Intron	CCG[C/T]ACT	0.1296/649
		rs4986938	Variação Intron	AGC[C/T]TGT	0.2598/1301

Negrito: Alelo de menor frequência

Bases de informação: dbSNP (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>; <http://genome.uscs.edu/>; e <https://www.thermofisher.com>)

Fonte: Autoria própria

O ensaio de genotipagem dos polimorfismos selecionados foi executado segundo o método de *RT-PCR* (do inglês, Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real) utilizando ensaios *TaqMan*® de discriminação alélica (Livak et al., 1995;

Heid et al., 1996; Ranade et al., 2001) adquiridos da empresa *Applied Biosystems* (Foster City, Califórnia, EUA) em conjunto com uma solução denominada *TaqMan™ Genotyping Master Mix®*, que contém todos os outros reagentes necessários para a realização da reação. Cada ensaio incluía um par de *primers* flanqueadores da região do polimorfismo bem como sondas específicas para a identificação dos alelos, compostas de dois oligonucleotídeos - desenhados um para cada sequência resultante da mudança de base - conjugados com fluoróforos que emitem fluorescência em comprimentos de ondas diferentes, denominados VIC™ e FAM™. Durante a *PCR* essas sondas foram clivadas pela DNA Polimerase na etapa de extensão, caso estivessem aneladas ao DNA, permitindo a liberação dos fluoróforos e a emissão de fluorescência. A emissão desse sinal foi lida pelo sistema de *RT-PCR* utilizado (*StepOnePlus™ Real-Time PCR System, Thermo Fisher Scientific*, Massachusetts, EUA), e a partir dela o *software* fornecido junto com o equipamento pode efetuar a discriminação alélica das amostras.

Para iniciar o protocolo de genotipagem, as amostras previamente quantificadas foram utilizadas para o preparo de soluções de DNA genômico com a concentração de 4 ng/μL. Dessas soluções foram usados 1,5 μL, pipetados individualmente diretamente no fundo de placas de 96 poços e postos para secar em temperatura ambiente a fim de evitar pequenas flutuações no volume final de reação. Cada placa ainda contava com um poço que permaneceu vazio nessa etapa para poder atuar como controle negativo da reação. Após secagem completa, cada poço recebeu 0,08 μL do ensaio *TaqMan®*, 1,5 μL de *TaqMan™ Genotyping Master Mix®* e 2,52 μL de água deionizada purificada em sistema *Milli-Q®* (Millipore Corporation, Burlington, Massachusetts, EUA). Cada placa preenchida foi selada com filme transparente e submetida ao equipamento de *RT-PCR* para o processo de termociclagem. O protocolo para a ciclagem da temperatura seguiu a programação já estabelecida no aparelho sob o nome de *Genotyping*, que consistia de quatro etapas: a etapa pré-*PCR*, composta de um aquecimento até 60°C ficando estável nessa temperatura por 30 segundos para uma leitura inicial; a etapa de desnaturação, que aqueceu as amostras até 95°C e manteve a temperatura por 10 minutos para que ocorresse a desnaturação da dupla fita de DNA e ativação da enzima DNA polimerase; a etapa de ciclagem de temperatura, caracterizada por 40 ciclos em que a temperatura era alternada entre 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto – durante essa etapa ocorre a hibridização dos *primers*

e sondas (fase de anelamento) seguida da síntese da nova fita (fase de extensão) e consequente liberação do sinal fluorescente, que é captado pelo aparelho ao fim de cada ciclo; e por fim uma última etapa de leitura pós-PCR a 60°C por 30 segundos.

3.3. Análise estatística

3.3.1. Modelo animal

Os dados foram tabulados no programa *Microsoft Excel* e a análise estatística foi realizada no *GraphPad Prism 5.0* (Graph-Pad, San Diego, CA, EUA). A normalidade na distribuição dos dados, tanto das medidas cefalométricas, quanto dos valores de expressão foi avaliada pelo teste de *Shapiro-Wilk*. O teste *t de student* ou o teste de Mann Whitney foram utilizados de acordo com a distribuição dos dados para a comparação das médias entre os grupos OVX e Sham. A significância estatística adotada foi de $p \leq 0,05$.

3.3.2. Amostras humanas

Os dados foram tabulados no programa *Microsoft Excel* e a análise estatística foi realizada no Epi Info 3.5.2 (www.cdc.gov/epiinfo) e no *GraphPad Prism 5.0* (Graph-Pad, San Diego, CA, USA). As frequências absoluta e relativa foram utilizadas para apresentar as distribuições genóticas e alélicas, e as médias e desvios padrão (DP) para mostrar as medidas cefalométricas angulares e lineares.

Na análise das medidas categóricas, foi utilizado o teste do qui-quadrado ou o teste exato de *Fisher* para avaliar se algum genótipo ou alelo estava preferencialmente associado com algum padrão fenotípico. O teste do qui-quadrado também foi utilizado para avaliar o equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Para os dados contínuos, a normalidade na distribuição dos dados foi avaliada pelo teste de *Shapiro-Wilk*. O teste *t de student* ou teste *Mann-Whitney-U* ou teste de Análise de Variância ou o teste *Kruskal-Wallis* foram usados de acordo com a distribuição dos dados. O pós-teste de Tukey ou Dunn foram utilizados. A significância estatística adotada foi de $p \leq 0,05$.

Resultados

4. RESULTADOS

4.1. Modelo animal

4.1.1. Análise Cefalométrica do Desenvolvimento Craniofacial

As médias e desvios padrão (DP) para todas as medidas lineares nos períodos de 45 e 63 dias tanto para o grupo OVX quanto para o grupo Sham são mostradas nas tabelas 4 a 7.

No período da puberdade, aos 45 dias, no grupo OVX, as medidas maxilares (Mu-Bu, Mu-Pr e A-Pr, A-Bu) e as medidas mandibulares (Pg-Gn, Co-Pg e Iu-BI) apresentaram-se significativamente aumentadas quando comparadas ao grupo SHAM ($p \leq 0,05$). Ao final da puberdade, aos 63 dias, o crescimento total maxilar apresentou-se aumentado de maneira significativa no grupo experimental, ocorrendo isso em quase todas as medidas com exceção apenas de A-Pr e Iu-Bu. Quase todas as medidas mandibulares estavam aumentadas, quando comparadas as do grupo Sham, sendo que 4 delas (Pg-Gn, Co-Co', Co-Go e Co-Pg) apresentaram diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$).

Tabela 4 - Medidas lineares da maxila durante a puberdade (45 dias)

45 dias	Grupos	Mínimo - máximo	Média (DP)	p-valor
N-A	OVX	13,331 – 14,840	14,270 ± 0,219	0,070
	Sham	12,521 – 14,728	13,310 ± 0,491	
E-A	OVX	17,731 – 19,373	18,520 ± 0,223	0,060
	Sham	16,043 – 18,323	17,440 ± 0,535	
Mu-Bu	OVX	11,154 – 11,927	11,550 ± 0,136	0,010*
	Sham	10,779 – 11,222	10,940 ± 0,974	
Mu-Pr	OVX	13,549 – 14,313	13,980 ± 0,138	0,003*
	Sham	12,994 – 13,355	13,220 ± 0,795	
A-Pr	OVX	4,655 – 5,784	5,149 ± 0,152	0,034*
	Sham	4,091 – 5,206	4,443 ± 0,256	
A-Bu	OVX	7,350 – 7,608	7,468 ± 0,435	0,0004*
	Sham	6,520 – 7,082	6,819 ± 0,124	
N-Mu	OVX	9,847 – 10,651	10,280 ± 0,126	0,831
	Sham	9,595 – 10,943	10,340 ± 0,286	
Iu-A	OVX	10,985 – 11,939	11,450 ± 0,136	0,001*
	Sham	10,138 – 10,643	10,470 ± 0,117	
Iu-Pr	OVX	6,085 – 6,976	6,442 ± 0,139	0,084
	Sham	5,177 – 6,522	5,850 ± 0,309	
Iu-Bu	OVX	4,075 – 4,549	4,365 ± 0,068	0,015*
	Sham	3,688 – 4,184	3,952 ± 0,131	

*Diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$); DP: desvio padrão.

Fonte: Autoria própria

Tabela 5 - Medidas lineares da mandíbula durante a puberdade (45 dias)

45 dias	Grupos	Mínimo -máximo	Média (DP)	p-valor
Pg-Go	OVX	17,437 – 18,840	23,000 ± 0,561	0,0936
	Sham	15,746 – 18,071	21,810 ± 0,399	
Pg-Gn	OVX	13,645 – 17,784	16,590 ± 0,433	0,0260*
	Sham	14,094 – 15,267	15,410 ± 0,270	
MI-BI	OVX	5,047 – 6,090	6,786 ± 0,162	0,1043
	Sham	4,156 – 5,647	6,481 ± 0,952	
Co-Co'	OVX	8,588 – 9,526	9,054 ± 0,131	0,3254
	Sham	7,425 – 10,409	8,572 ± 0,631	
Co-Go	OVX	5,999 – 7,314	6,855 ± 0,202	0,7951
	Sham	5,391 – 7,555	6,987 ± 0,532	
Co-Gn	OVX	8,485 – 9,530	9,142 ± 0,146	0,7691
	Sham	7,399 – 10,231	8,984 ± 0,612	
Co-Pg	OVX	18,314 – 19,997	19,100 ± 0,275	0,0016*
	Sham	16,855 – 17,620	17,360 ± 0,178	
II-BI	OVX	6,116 – 6,798	6,456 ± 0,118	0,0018*
	Sham	5,412 – 7,181	5,572 ± 0,805	
II-Id	OVX	9,285 – 11,360	10,000 ± 0,292	0,7150
	Sham	8,884 – 10,644	9,825 ± 0,365	

*Diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$); DP: desvio padrão.

Fonte: Autoria própria

Tabela 6 - Medidas lineares da maxila após a puberdade (63 dias)

63 dias	Grupo	Mínimo – máximo	Média (DP)	p-valor
N-A	OVX	15,389 – 18,047	16,730 ± 0,295	0,0174*
	Sham	15,488 – 16,665	16,000 ± 0,106	
E-A	OVX	21,200 – 23,421	22,370 ± 0,320	0,0011*
	Sham	20,366 – 21,924	21,090 ± 0,157	
Mu-Bu	OVX	13,581 – 14,769	14,140 ± 0,152	0,0005*
	Sham	11,880 – 13,784	13,130 ± 0,169	
Mu-Pr	OVX	16,250 – 17,575	16,860 ± 0,205	0,0023*
	Sham	14,784 – 16,494	15,930 ± 0,163	
A-Pr	OVX	4,703 – 5,917	5,605 ± 0,134	0,8175
	Sham	5,041 – 6,520	5,653 ± 0,144	
A-Bu	OVX	8,292 – 9,362	8,837 ± 0,142	0,0001*
	Sham	7,952 – 8,695	8,108 ± 0,065	
N-Mu	OVX	11,749 – 12,869	12,350 ± 0,171	0,0021*
	Sham	11,332 – 12,198	11,710 ± 0,088	
Iu-A	OVX	13,562 – 14,286	13,880 ± 0,088	0,0001*
	Sham	11,946 – 13,184	12,720 ± 0,110	
Iu-Pr	OVX	7,856 – 9,078	8,320 ± 0,162	0,0003*
	Sham	6,591 – 8,113	7,203 ± 0,174	
Iu-Bu	OVX	4,702 – 6,032	5,348 ± 0,140	0,1248
	Sham	4,461 – 5,504	5,102 ± 0,081	

*Diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) ; DP: desvio padrão

Fonte: Autoria própria

Tabela 7 - Medidas lineares da mandíbula após a puberdade (63 dias)

63 dias	Grupo	Mínimo – Máximo	Média (DP)	p-valor
Pg-Go	OVX	19,297 – 24,021	23,000 ± 0,561	0,0936
	Sham	19,743 – 24,168	21,810 ± 0,399	
Pg-Gn	OVX	13,933 – 17,607	16,590 ± 0,433	0,0260*
	Sham	13,740 – 16,881	15,410 ± 0,270	
MI-BI	OVX	5,924 – 6,990	6,786 ± 0,162	0,1043
	Sham	5,908 – 6,947	6,481 ± 0,095	
Co-Co'	OVX	10,309 – 14,417	12,840 ± 0,695	0,0046*
	Sham	10,388 – 11,994	10,850 ± 0,139	
Co-Go	OVX	9,008 – 15,735	11,250 ± 0,730	0,033*
	Sham	9,013 – 10,809	9,757 ± 0,156	
Co-Gn	OVX	10,836 – 17,314	13,290 ± 0,702	0,093
	Sham	10,929 – 12,574	11,490 ± 0,134	
Co-Pg	OVX	22,162 – 24,267	23,160 ± 0,367	0,005*
	Sham	21,021 – 23,282	21,900 ± 0,214	
II-BI	OVX	4,956 – 7,648	6,554 ± 0,395	0,094
	Sham	6,719 – 7,440	7,166 ± 0,075	
II-Id	OVX	8,122 – 12,852	10,680 ± 0,549	0,435
	Sham	9,316 – 12,220	11,130 ± 0,275	

*Diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$); DP: desvio padrão]

Fonte: Autoria própria

4.1.2. PCR quantitativo em tempo real (qPCR)

A expressão do RNA mensageiro dos receptores de estrógeno foi analisada no período da puberdade (aos 45 dias). Não houve diferença estatisticamente significativa na expressão de *ESR1* e *ESR2* nos diferentes grupos ($p \geq 0,05$) (Tabelas 8 e 9).

Tabela 8 - Expressão relativa de mRNA (*ESR1*) nos sítios de crescimento

ESR1	Grupos	Mínimo - máximo	Média (DP)	p-valor
Ângulo mandibular	OVX	0,1874– 0,366	0,264 ± 0,075	0,602
	Sham	0,215 – 0,387	0,294 ± 0,081	
Côndilo	OVX	0,740 – 1,842	1,059 ± 0,460	0,060
	Sham	0,362 – 0,506	0,420 ± 0,075	
Palato	OVX	0,3080 – 0,8430	0,5778 ± 0,129	1
	Sham	0,6300 – 0,7390	0,6897 ± 0,055	
Processo coronóide	OVX	0,2386 – 0,4504	0,3460 ± 0,09274	0,730
	Sham	0,2467 – 0,3968	0,3048 ± 0,06443	
Sínfise	OVX	0,7487– 1,924	1,337 ± 0,5094	0,140
	Sham	0,3808 – 0,8096	0,5952 ± 0,3032	

Fonte: Autoria própria

Tabela 9 - Expressão relativa de mRNA (*ESR2*) nos sítios de crescimento

ESR2	Grupos	Mínimo - máximo	Média (DP)	p-valor
Ângulo mandibular	OVX	0,2767 – 0,584	0,424 ± 0,135	0,270
	Sham	0,189 – 0,488	0,285 ± 0,141	
Cândilo	OVX	0,181 – 1,403	0,689 ± 0,466	0,317
	Sham	0,186 – 0,549	0,374 ± 0,182	
Palato	OVX	0,2960 – 1,066	0,5293 ± 0,3604	0,400
	Sham	0,4800 – 1,037	0,6663 ± 0,3210	
Processo coronóide	OVX	0,2386 – 0,4504	0,3460 ± 0,09274	0,730
	Sham	0,2467 – 0,3968	0,3048 ± 0,06443	
Sínfise	OVX	0,286 – 1,086	0,821 ± 0,367	0,899
	Sham	0,223 – 1,553	0,888 ± 0,940	

Fonte: Autoria própria

4.1.3. Imuno-histoquímica

A imuno-histoquímica foi realizada no período da puberdade (aos 45 dias). Empregando a técnica da imunoperoxidase foi possível a visualização da presença e localização dos ER β na região de sínfise mandibular, na qual pode-se identificar a imunomarcagem nuclear e citoplasmática em condrócitos e osteoblastos como vistos na Figura 4.

Figura 4 - Fotomicrografias das reações de imuno-histoquímica empregando ER β na porção anterior da mandíbula (região de sínfise) de um animal do grupo Sham, em corte axial. **A** – Visão geral do corte obtido contendo os dois incisivos centrais do animal (ICs), x50. **B** – Imagem com ampliação intermediária favorecendo a visualização do ligamento periodontal (LP), osso alveolar (OA) e região de proliferação cartilaginosa (PC), x100. **C** – Ampliação do retângulo vermelho presente na figura 4A mostrando o epitélio sulcular (ES) expressando fortemente ER β , utilizado como controle positivo interno. Nota-se na porção central do ligamento periodontal (LP) contendo células expressando ER β na interface com o osso alveolar, caracterizando a presença de diferenciação osteoblástica na região (cabeça de seta preta), x400. **D** – Visão ampliada do retângulo vermelho presente na figura 4B demonstrando a presença de condrócitos ER β -positivos na região central da sínfise mandibular na região de proliferação cartilaginosa, x400.

Fonte: Autoria própria

Nos côndilos foi possível observar o mesmo padrão de imunexpressão encontrado nos cortes da região de sínfise. Os condrócitos apresentaram expressão no citoplasma e núcleo e foram localizados principalmente nas camadas proliferativa e hipertrófica, ilustrados na Figura 5.

Figura 5 - Fotomicrografias das reações de imuno-histoquímica empregando ER β no côndilo de um animal do grupo OVX, em corte sagital. **A e B** – Visão geral do côndilo, x50 e x100, respectivamente. **C** – Ampliação da imagem contida no retângulo vermelho presente na figura 5A, x200. **D** – Imagem aproximada do retângulo vermelho presente na figura 5C demonstrando a imunexpressão de ER β no citoplasma e núcleo de múltiplos condrócitos dispersos pela área, exemplificados pelas setas pretas, x400.

Fonte: Autoria própria

4.2. Amostras Humanas

Todos os polimorfismos avaliados nos genes *ESR1* e *ESR2* estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg (dados não apresentados).

Um total de 143 pacientes foram incluídos e analisados neste estudo, dos quais 69 (48,3%) são do gênero masculino e 74 (51,7%) do gênero feminino. A média de idade dos indivíduos incluídos foi de 15,2 anos (DP 7,4 anos).

Foram utilizadas medidas cefalométricas angulares e lineares para a caracterização fenotípica da amostra. As médias e DP dos valores selecionados estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 - Médias (DP) dos valores cefalométricos selecionados

Medidas angulares (°)	Média (DP)
SNA	83,2 (4,9)
SNB	80,3 (5,0)
ANB	2,9 (2,7)
Eixo Y	59,7 (4,6)
SN-GoGn	30,1 (6,3)
Nba-PtGn	88,0 (4,6)
Medidas lineares (mm)	Média (DP)
S-N	67,2 (5,8)
Ptm-A	49,8 (4,7)
Go-Pg	67,7 (7,8)
Co-Gn	114,2 (11,2)
N-Me	109,6 (10,4)
ANS-Me	59,1 (7,6)
S-Go	73,4 (9,3)
Co-Go	57,1 (7,5)

Fonte: Autoria própria

As distribuições genotípicas e alélicas dos polimorfismos avaliados nos genes *ESR1* e *ESR2*, de acordo com a má oclusão esquelética (Classe I, Classe II ou Classe III) são mostradas na Tabela 11. Foi encontrada associação estatisticamente significativa entre a frequência alélica e a presença de má oclusão esquelética de Classe III para o polimorfismo rs2747649 (*ESR1*), sendo que o alelo C apresentou-se mais frequente nos pacientes com esta condição ($p=0,05$). Similarmente, houve associação significativa entre a frequência alélica e a presença de má oclusão esquelética de Classe II para o polimorfismo rs4986938 (*ESR2*), sendo que o alelo C

também se apresentou mais frequente nos pacientes com esta condição ($p=0,03$). Para este último polimorfismo (rs4986938), a análise no modelo recessivo para o alelo C demonstrou associação significativa entre o genótipo CC e a presença de Classe II esquelética ($p=0,05$). Não foi possível evidenciar associação estatisticamente significativa entre as distribuições genotípicas e/ou alélicas para os demais polimorfismos estudados em ambos os genes e a presença das diferentes má oclusões esqueléticas ($p>0,05$).

Tabela 11 - Frequências genotípicas e alélicas de acordo com a má oclusão esquelética

	Genótipos n (%)			P Valor	Alelos n (%)		P Valor
ESR1 rs12154178	AA	AC	CC		A	C	
Classe I	6 (17,6)	16 (47,1)	12 (35,3)	Ref.	28 (41,2)	40 (58,8)	Ref.
Classe II	5 (27,8)	9 (50,0)	4 (22,2)	0,53	19 (52,8)	17 (47,2)	0,35
Classe III	3 (42,9)	3 (42,9)	1 (14,3)	0,28	9 (64,3)	5 (35,7)	0,19
ESR1 rs1884051	AA	AG	GG		A	G	
Classe I	19 (28,8)	31 (47)	16 (24,2)	Ref.	69 (52,3)	63 (47,7)	Ref.
Classe II	14 (43,8)	9 (28,1)	9 (28,1)	0,17	37 (57,8)	27 (42,2)	0,56
Classe III	4 (23,5)	11 (64,7)	2 (11,8)	0,37	19 (55,9)	15 (44,1)	0,86
ESR1 rs2273206	GG	GT	TT		G	T	
Classe I	15 (41,7)	11 (30,6)	10 (27,8)	Ref.	41 (56,9)	31 (43,1)	Ref.
Classe II	11 (39,3)	8 (28,6)	9 (32,1)	0,93	30 (53,6)	26 (46,4)	0,84
Classe III	2 (22,2)	4 (44,4)	3 (33,3)	0,54	8 (44,4)	10 (55,6)	0,49
ESR1 rs7774230	CC	CT	TT		C	T	
Classe I	24 (37,5)	29 (45,3)	11 (17,2)	Ref.	77 (60,2)	51 (39,8)	Ref.
Classe II	19 (47,5)	15 (37,5)	6 (15,0)	0,60	53 (66,3)	27 (33,8)	0,46
Classe III	6 (42,9)	7 (50,0)	1 (7,1)	0,64	19 (67,9)	9 (32,1)	0,58
ESR1 rs2747649	CC	CG	GG		C	G	
Classe I	35 (52,2)	24 (35,8)	8 (11,9)	Ref.	94 (70,1)	40 (29,9)	Ref.
Classe II	23 (56,1)	15 (36,6)	3 (7,3)	0,73	61 (74,4)	21 (25,6)	0,60
Classe III	13 (76,5)	4 (23,5)	0 (0)	0,13	30 (88,2)	4 (11,8)	0,05*
ESR1 rs2234693	CC	CT	TT		C	T	
Classe I	13 (17,3)	32 (42,7)	30 (40,0)	Ref.	58 (38,7)	92 (61,3)	Ref.
Classe II	6 (13,6)	22 (50,0)	16 (36,4)	0,71	34 (38,6)	54 (61,4)	0,88
Classe III	2 (11,1)	8 (44,4)	8 (44,4)	0,80	12 (33,3)	24 (66,7)	0,68
ESR1 rs9340799	AA	AG	GG		A	G	
Classe I	40 (54,1)	25 (33,8)	9 (12,2)	Ref.	105 (70,9)	43 (29,1)	Ref.
Classe II	21 (48,8)	20 (46,5)	2 (4,7)	0,23	62 (72,1)	24 (27,9)	> 0,99
Classe III	9 (50,0)	8 (44,4)	1 (5,6)	0,58	26 (72,2)	10 (27,8)	> 0,99
ESR2 rs1256049	CC	CT	TT		C	T	
Classe I	74 (96,1)	3 (3,9)	0 (0)	Ref.	151 (98,1)	3 (1,9)	Ref.
Classe II	41 (87,2)	6 (12,8)	0 (0)	0,18	88 (93,6)	6 (6,4)	0,14
Classe III	18 (94,7)	1 (5,3)	0 (0)	0,96	37 (97,4)	1 (2,6)	0,70
ESR2 rs4986938	CC	CT	TT		C	T	
Classe I	19 (27,1)	37 (52,9)	14 (20,0)	Ref.	75 (53,6)	65 (46,4)	Ref.
Classe II	21 (46,7)	20 (44,4)	4 (8,9)	0,06	62 (68,9)	28 (31,1)	0,03*
Classe III	8 (47,1)	8 (47,1)	1 (5,9)	0,18	24 (70,6)	10 (29,4)	0,10

* Associação estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$). Ref.: Referência

Fonte: Autoria própria

As distribuições genotípicas e alélicas dos polimorfismos avaliados nos genes *ESR1* e *ESR2*, de acordo com tipo facial apresentado (Mesofacial, Dólicofacial e Braquifacial) são mostradas na Tabela 12. Foi encontrada associação estatisticamente significativa entre a frequência genotípica e a presença do padrão Braquifacial para o polimorfismo rs2747649 (*ESR1*) ($p=0,03$). Não foi possível evidenciar associação estatisticamente significativa entre as distribuições genotípicas e/ou alélicas para os demais polimorfismos estudados em ambos os genes e a presença dos diferentes tipos faciais ($p>0,05$) (Tabela 12).

Tabela 12 - Frequências genotípicas e alélicas de acordo com o tipo facial

	Genótipos n (%)			P Valor	Alelos n (%)		P Valor
ESR1 rs12154178	AA	AC	CC		A	C	
Mesofacial	8 (26,7)	15 (50,0)	7 (23,3)	Ref.	31 (51,7)	29 (48,3)	Ref.
Dólicofacial	4 (16,7)	11 (45,8)	9 (37,5)	0,46	19 (39,6)	29 (60,4)	0,29
Braquifacial	2 (40,0)	2 (40,0)	1 (20,0)	0,82	6 (60,0)	4 (40,0)	0,888
ESR1 rs1884051	AA	AG	GG		A	G	
Mesofacial	15 (27,3)	29 (52,7)	11 (20)	Ref.	59 (53,6)	51 (46,4)	Ref.
Dólicofacial	15 (33,3)	15 (33,3)	15 (33,3)	0,12	45 (50,0)	45 (50,0)	0,70
Braquifacial	7 (46,7)	7 (46,7)	1 (6,7)	0,25	21 (70,0)	9 (30,0)	0,16
ESR1 rs2273206	GG	GT	TT		G	T	
Mesofacial	12 (37,5)	9 (28,1)	11 (34,4)	Ref.	33 (51,6)	31 (48,4)	Ref.
Dólicofacial	14 (41,2)	11 (32,4)	9 (26,5)	0,78	39 (57,4)	29 (42,6)	0,62
Braquifacial	2 (28,6)	3 (42,9)	2 (28,6)	0,74	7 (50,0)	7 (50,0)	0,84
ESR1 rs7774230	CC	CT	TT		C	T	
Mesofacial	20 (35,1)	26 (45,6)	11 (19,3)	Ref.	66 (57,9)	48 (42,1)	Ref.
Dólicofacial	23 (50,0)	16 (34,8)	7 (15,2)	0,31	62 (67,4)	30 (32,6)	0,21
Braquifacial	6 (40,0)	9 (60,0)	0 (0)	0,17	21 (70,0)	9 (30,0)	0,32
ESR1 rs2747649	CC	CG	GG		C	G	
Mesofacial	35 (59,3)	17 (28,8)	7 (11,9)	Ref.	87 (73,7)	31 (26,3)	Ref.
Dólicofacial	31 (59,6)	17 (32,7)	4 (7,7)	0,73	79 (76,0)	25 (24,0)	0,82
Braquifacial	5 (35,7)	9 (64,3)	0 (0)	0,03*	19 (67,9)	9 (32,1)	0,69
ESR1 rs2234693	CC	CT	TT		C	T	
Mesofacial	11 (15,9)	33 (47,8)	25 (36,2)	Ref.	55 (39,9)	83 (60,1)	Ref.
Dólicofacial	8 (14,8)	23 (42,6)	23 (42,6)	0,77	39 (36,1)	69 (63,9)	0,63
Braquifacial	2 (14,3)	6 (42,9)	6 (42,9)	0,89	10 (35,7)	18 (64,3)	0,84
ESR1 rs9340799	AA	AG	GG		A	G	
Mesofacial	37 (53,6)	25 (36,2)	7 (10,1)	Ref.	99 (71,7)	39 (28,3)	Ref.
Dólicofacial	26 (51,0)	22 (43,1)	3 (5,9)	0,59	74 (72,5)	28 (27,5)	> 0,99
Braquifacial	7 (46,7)	6 (40,0)	2 (13,3)	0,86	20 (66,7)	10 (33,3)	0,74
ESR2 rs1256049	CC	CT	TT		C	T	
Mesofacial	67 (93,1)	5 (6,9)	0 (0)	Ref.	139 (96,5)	5 (3,5)	Ref.
Dólicofacial	51 (92,7)	4 (7,3)	0 (0)	0,99	106 (96,4)	4 (3,6)	0,79
Braquifacial	15 (93,8)	1 (6,3)	0 (0)	0,99	31 (96,9)	1 (3,1)	0,66
ESR2 rs4986938	CC	CT	TT		C	T	
Mesofacial	25 (36,8)	36 (52,9)	7 (10,3)	Ref.	86 (63,2)	50 (36,8)	Ref.
Dólicofacial	19 (37,3)	24 (47,1)	8 (15,7)	0,64	62 (60,8)	40 (39,2)	0,80
Braquifacial	4 (30,8)	5 (38,5)	4 (30,8)	0,14	13 (50,0)	13 (50,0)	0,29

* Associação estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$). Ref.: Referência

Fonte: Autoria própria

As médias dos valores cefalométricos angulares (sagittais e verticais) de acordo com o genótipo apresentado para os polimorfismos avaliados nos genes *ESR1* e *ESR2* são mostradas na Tabela 13 e 14. Foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre as médias do ângulo ANB de acordo com o genótipo apresentado ($p=0,01$) para o polimorfismo rs1884051 (*ESR1*). No modelo recessivo para o alelo A foi encontrada associação estatisticamente significativa entre a presença do genótipo AA e medidas aumentadas do ângulo ANB ($p=0,03$) para o polimorfismo rs1884051 (Tabela 13). Similarmente, a análise no modelo recessivo para o alelo G apresentou associação significativa do genótipo GG com medidas diminuídas do ângulo NaBa-PtGn ($p=0,03$) (Tabela 14). Não foi possível evidenciar diferença estatisticamente significativa entre as médias de todos os outros valores angulares de acordo com o genótipo apresentado para os demais polimorfismos estudados em ambos os genes ($p>0,05$) (Tabelas 13 e 14).

Tabela 13 - Média (DP) das medidas angulares (°) sagitais de acordo com o genótipo

	Genótipos			P Valor
ESR1 rs12154178	AA	AC	CC	
SNA	82,5 (4,8)	82,7 (4,8)	83,5 (6,0)	0,98
SNB	79,6 (4,7)	79,7 (5,3)	80,6 (6,2)	0,84
ANB	2,9 (2,5)	2,9 (2,7)	2,9 (2,4)	0,99
ESR1 rs1884051	AA	AG	GG	
SNA	83,3 (5,7)	82,7 (4,7)	83,3 (3,8)	0,60
SNB	79,7 (5,7)	80,7 (4,7)	80,2 (5,0)	0,65
ANB	3,5 (2,5)	1,9 (2,7)	3,1 (3,0)	0,01*
ESR1 rs2273206	GG	GT	TT	
SNA	82,7 (4,6)	83,3 (4,5)	83,3 (5,3)	0,83
SNB	79,3 (5,6)	80,6 (5,3)	79,8 (4,3)	0,70
ANB	3,3 (2,6)	2,8 (2,8)	3,4 (3,0)	0,69
ESR1 rs7774230	CC	CT	TT	
SNA	83,6 (5,3)	82,9 (4,4)	84,1 (5,4)	0,34
SNB	80,7 (5,4)	80,0 (4,3)	80,4 (5,4)	0,80
ANB	3,0 (2,5)	2,9 (3,0)	3,6 (2,9)	0,60
ESR1 rs2747649	CC	CG	GG	
SNA	82,4 (4,4)	83,4 (5,0)	84,5 (5,8)	0,27
SNB	79,6 (4,7)	80,2 (4,8)	81,6 (6,5)	0,45
ANB	2,8 (2,9)	3,2 (2,9)	2,9 (1,7)	0,75
ESR1 rs2234693	CC	CT	TT	
SNA	83,8 (5,2)	82,7 (5,3)	83,1 (4,0)	0,41
SNB	80,5 (4,9)	79,7 (5,5)	80,4 (3,9)	0,69
ANB	3,2 (2,4)	3,0 (3,1)	2,7 (2,3)	0,75
ESR1 rs9340799	AA	AG	GG	
SNA	83,3 (4,6)	82,8 (5,0)	83,5 (6,3)	0,65
SNB	80,5 (4,5)	79,6 (5,1)	80,7 (5,7)	0,60
ANB	2,8 (2,4)	3,2 (3,0)	2,9 (2,2)	0,73
ESR2 rs1256049	CC	CT	TT	
SNA	83,1 (4,7)	84,9 (6,3)	-----	0,56
SNB	80,2 (4,8)	80,9 (7,1)	-----	0,67
ANB	2,9 (2,7)	4,0 (2,4)	-----	0,21
ESR2 rs4986938	CC	CT	TT	
SNA	83,2 (5,3)	82,9 (4,1)	83,6 (5,9)	0,98
SNB	80,0 (5,8)	80,1 (4,0)	80,4 (4,6)	0,94
ANB	3,2 (2,7)	2,9 (2,8)	3,1 (2,1)	0,81

* Associação estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$)

Fonte: Autoria própria

Tabela 14 - Média (DP) das medidas angulares verticais (°) de acordo com o genótipo

	Genótipos			P Valor
ESR1 rs12154178	AA	AC	CC	
Eixo Y	59,6 (4,3)	59,8 (5,1)	60,0 (4,8)	0,96
SN-GoGn	30,9 (5,1)	30,9 (6,9)	30,6 (6,5)	0,98
NBa-PtGn	89,0 (4,5)	87,0 (5,1)	87,6 (4,4)	0,46
ESR1 rs1884051	AA	AG	GG	
Eixo Y	59,9 (5,1)	58,7 (4,2)	60,2 (5,2)	0,34
SN-GoGn	30,2 (6,8)	28,6 (5,8)	31,6 (6,5)	0,12
NBa-PtGn	88,0 (5,3)	88,9 (4,3)	86,3 (4,5)	0,08
ESR1 rs2273206	GG	GT	TT	
Eixo Y	60,6 (5,4)	59,3 (4,3)	60,1 (4,1)	0,62
SN-GoGn	31,6 (7,4)	29,5 (5,6)	30,8 (5,7)	0,51
NBa-PtGn	86,6 (5,7)	88,1 (5,0)	87,9 (3,9)	0,51
ESR1 rs7774230	CC	CT	TT	
Eixo Y	59,7 (4,5)	59,3 (4,9)	59,8 (4,3)	0,85
SN-GoGn	30,1 (5,7)	29,3 (7,1)	32,3 (5,8)	0,24
NBa-PtGn	87,5 (4,8)	88,7 (4,9)	87,6 (3,7)	0,44
ESR1 rs2747649	CC	CG	GG	
Eixo Y	60,2 (4,8)	59,2 (4,0)	60,1 (6,1)	0,50
SN-GoGn	30,7 (6,7)	29,8 (5,7)	30,8 (7,7)	0,75
NBa-PtGn	87,4 (4,9)	88,5 (4,5)	87,1 (3,9)	0,40
ESR1 rs2234693	CC	CT	TT	
Eixo Y	59,2 (4,8)	60,0 (5,1)	59,8 (3,7)	0,80
SN-GoGn	31,0 (5,6)	30,3 (7,4)	29,9 (4,9)	0,80
NBa-PtGn	87,9 (4,8)	87,6 (4,9)	88,0 (3,8)	0,91
ESR1 rs9340799	AA	AG	GG	
Eixo Y	59,5 (4,0)	60,4 (4,9)	58,7 (5,8)	0,40
SN-GoGn	29,9 (5,5)	30,6 (7,3)	29,8 (5,7)	0,80
NBa-PtGn	88,2 (4,0)	87,3 (4,9)	89,6 (4,9)	0,22
ESR2 rs1256049	CC	CT	TT	
Eixo Y	59,7 (4,6)	59,6 (4,5)	-----	0,98
SN-GoGn	30,1 (6,3)	30,2 (5,4)	-----	0,95
NBa-PtGn	87,9 (4,7)	88,2 (3,4)	-----	0,85
ESR2 rs4986938	CC	CT	TT	
Eixo Y	60,5 (5,3)	59,3 (3,9)	58,9 (3,8)	0,26
SN-GoGn	31,2 (7,0)	30,0 (5,4)	28,4 (6,1)	0,20
NBa-PtGn	87,2 (5,1)	87,9 (4,2)	88,9 (4,2)	0,39

Fonte: Autoria própria

As médias dos valores cefalométricos lineares (sagittais e verticais) de acordo com o genótipo apresentado para os polimorfismos avaliados nos genes *ESR1* e *ESR2* são mostradas nas Tabelas 15 e 16. Foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre as médias das medidas lineares SN ($p=0,02$), Go-Pg ($p=0,04$) e Co-Gn ($p=0,05$) de acordo com o genótipo apresentado para o polimorfismo rs2273206. No modelo recessivo (GG+GT X TT) foi encontrada associação estatisticamente significativa entre a presença do genótipo TT e valores aumentados para as medidas acima citadas: SN ($p=0,01$), Go-Pg ($p=0,01$) e Co-Gn ($p=0,01$) (Tabela 15).

Similarmente, no modelo recessivo, foi encontrada associação significativa entre a presença do genótipo TT e valor aumentado da medida N-Me ($p=0,04$) para o polimorfismo citado. Não foi possível evidenciar diferença estatisticamente significativa entre as médias de todos os outros valores lineares de acordo com o genótipo apresentado para os demais polimorfismos estudados em ambos os genes ($p>0,05$) (Tabela 15 e 16).

Tabela 15 - Média (DP) das medidas lineares sagitais (mm) de acordo com o genótipo

	Genótipos			P Valor
ESR1 rs12154178	AA	AC	CC	
SN	67,0 (4,9)	66,8 (4,7)	66,7 (8,9)	0,83
Ptm-A	50,2 (5,2)	49,7 (4,2)	49,0 (7,1)	0,61
Go-Pg	66,9 (8,1)	66,8 (7,1)	69,2 (10,4)	0,89
Co-Gn	112,5 (9,2)	111,4 (8,5)	115,2 (14,4)	0,83
ESR1 rs1884051	AA	AG	GG	
SN	66,7 (4,5)	67,8 (6,9)	67,3 (5,7)	0,79
Ptm-A	50,4 (4,9)	49,8 (5,0)	49,2 (4,1)	0,73
Go-Pg	66,4 (6,3)	68,5 (8,7)	67,2 (8,1)	0,60
Co-Gn	112,2 (8,5)	114,6 (12,9)	114,5 (11,1)	0,94
ESR1 rs2273206	GG	GT	TT	
SN	65,7 (5,4)	65,6 (5,8)	69,1 (5,8)	0,02*
Ptm-A	49,1 (4,4)	49,8 (5,5)	51,2 (4,5)	0,28
Go-Pg	65,0 (6,9)	65,7 (8,9)	70,5 (8,4)	0,04*
Co-Gn	111,1 (8,0)	111,6 (14,6)	117,6 (12,5)	0,05*
ESR1 rs7774230	CC	CT	TT	
SN	67,1 (7,0)	67,4 (4,9)	67,0 (4,8)	0,89
Ptm-A	49,8 (5,5)	50,4 (3,8)	50,0 (4,2)	0,64
Go-Pg	67,5 (9,7)	68,2 (6,8)	67,1 (6,3)	0,55
Co-Gn	115,5 (14,3)	113,2 (8,6)	113,7 (9,1)	0,99
ESR1 rs2747649	CC	CG	GG	
SN	67,2 (5,0)	67,6 (7,5)	66,8 (4,5)	0,99
Ptm-A	49,9 (4,4)	50,1 (5,5)	49,9 (3,6)	0,97
Go-Pg	67,9 (7,7)	67,0 (8,7)	68,6 (6,6)	0,51
Co-Gn	113,9 (10,4)	113,1 (12,6)	117,2 (8,9)	0,20
ESR1 rs2234693	CC	CT	TT	
SN	66,6 (6,0)	67,4 (5,5)	67,0 (5,6)	0,54
Ptm-A	50,8 (5,7)	49,7 (4,1)	49,1 (4,5)	0,40
Go-Pg	67,3 (7,5)	66,8 (7,1)	67,9 (7,1)	0,81
Co-Gn	112,8 (11,2)	113,0 (8,8)	115,0 (10,8)	0,72
ESR1 rs9340799	AA	AG	GG	
SN	67,9 (5,7)	66,0 (5,2)	67,6 (6,8)	0,32
Ptm-A	49,8 (4,7)	49,6 (4,3)	50,5 (6,2)	0,95
Go-Pg	68,4 (7,1)	66,3 (7,4)	67,4 (8,7)	0,40
Co-Gn	115,3 (11,1)	112,0 (8,4)	113,2 (12,8)	0,44
ESR2 rs1256049	CC	CT	TT	
SN	67,3 (5,9)	66,2 (3,6)	-----	0,63
Ptm-A	49,8 (4,7)	49,7 (5,5)	-----	0,69
Go-Pg	67,8 (7,9)	66,7 (6,6)	-----	0,71
Co-Gn	114,1 (11,2)	114,9 (12,5)	-----	0,88
ESR2 rs4986938	CC	CT	TT	
SN	65,9 (5,3)	67,3 (5,6)	68,2 (5,8)	0,48
Ptm-A	48,8 (4,5)	50,2 (4,6)	50,2 (5,3)	0,24
Go-Pg	65,8 (7,1)	67,6 (7,0)	68,9 (7,6)	0,37
Co-Gn	112,7 (10,2)	113,2 (10,0)	114,4 (11,1)	0,92

* Associação estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$)

Fonte: Autoria própria

Tabela 16 - Média (DP) das medidas lineares verticais (mm) de acordo com o genótipo

	Genótipos			P Valor
ESR1 rs12154178	AA	AC	CC	
N-Me	107,6 (9,3)	107,5 (8,0)	111,4 (14,7)	0,40
ANS-Me	58,2 (5,7)	57,9 (5,8)	62,2 (9,5)	0,27
S-Go	70,9 (6,1)	71,3 (7,5)	74,0 (10,0)	0,65
Co-Go	55,1 (4,8)	54,8 (5,6)	56,7 (7,4)	0,62
ESR1 rs1884051	AA	AG	GG	
N-Me	107,9 (8,1)	109,2 (12,4)	110,5 (9,1)	0,57
ANS-Me	58,5 (5,4)	59,8 (8,7)	61,0 (7,3)	0,49
S-Go	72,1 (7,2)	74,3 (10,9)	73,3 (8,3)	0,86
Co-Go	55,9 (6,2)	57,5 (8,7)	57,1 (6,9)	0,69
ESR1 rs2273206	GG	GT	TT	
N-Me	107,6 (8,0)	106,4 (9,9)	113,2 (12,4)	0,07
ANS-Me	58,5 (5,0)	57,6 (8,6)	61,5 (9,1)	0,18
S-Go	70,9 (5,9)	72,4 (11,7)	74,7 (9,2)	0,25
Co-Go	55,4 (5,1)	56,5 (10,6)	57,4 (6,6)	0,39
ESR1 rs7774230	CC	CT	TT	
N-Me	110,8 (11,5)	108,3 (9,5)	109,2 (8,5)	0,50
ANS-Me	61,0 (9,1)	59,2 (6,7)	59,6 (6,9)	0,84
S-Go	75,0 (9,8)	72,9 (8,5)	70,9 (7,6)	0,16
Co-Go	58,6 (8,5)	56,2 (6,4)	55,1 (6,1)	0,19
ESR1 rs2747649	CC	CG	GG	
N-Me	109,9 (9,1)	108,6 (12,5)	111,4 (7,1)	0,31
ANS-Me	59,6 (6,7)	59,0 (8,2)	62,5 (7,6)	0,22
S-Go	73,1 (7,9)	73,0 (11,1)	75,0 (9,7)	0,61
Co-Go	56,7 (6,7)	56,3 (8,2)	58,7 (8,6)	0,49
ESR1 rs2234693	CC	CT	TT	
N-Me	107,5 (12,3)	109,2 (8,7)	110,3 (10,0)	0,76
ANS-Me	57,6 (6,6)	60,0 (6,6)	60,2 (7,4)	0,47
S-Go	70,9 (10,6)	73,3 (8,7)	74,0 (7,9)	0,25
Co-Go	55,2 (7,8)	56,5 (6,7)	57,9 (6,8)	0,17
ESR1 rs9340799	AA	AG	GG	
N-Me	110,6 (10,4)	108,1 (8,8)	108,1 (15,0)	0,70
ANS-Me	60,4 (8,2)	58,9 (5,9)	57,7 (7,1)	0,65
S-Go	74,3 (9,2)	72,0 (7,5)	72,3 (12,2)	0,34
Co-Go	57,8 (7,5)	56,0 (5,6)	55,5 (8,9)	0,21
ESR2 rs1256049	CC	CT	TT	
N-Me	109,6 (10,5)	109,8 (9,1)	-----	0,77
ANS-Me	59,8 (7,5)	61,1 (9,7)	-----	0,92
S-Go	73,4 (9,4)	73,4 (8,5)	-----	0,88
Co-Go	57,0 (7,5)	57,4 (8,1)	-----	0,91
ESR2 rs4986938	CC	CT	TT	
N-Me	109,1 (10,3)	108,5 (9,9)	109,4 (11,5)	0,70
ANS-Me	59,6 (7,2)	58,8 (6,8)	59,6 (8,0)	0,75
S-Go	72,6 (8,0)	72,5 (9,0)	74,5 (10,0)	0,89
Co-Go	56,4 (6,6)	56,1 (6,9)	57,9 (7,2)	0,72

Fonte: Autoria própria

Discussão

5.DISCUSSÃO

5.1. Desenho do estudo e amostra

5.1.1. Modelo animal

Diversos modelos animais podem ser utilizados para estudar o papel dos hormônios no crescimento e desenvolvimento craniofacial. Apesar de existirem trabalhos prévios no assunto utilizando como modelo animal a espécie *Zebrafish* (Fushimi et al., 2009; He et al., 2018), o modelo de escolha foram ratos, dado que estudos que utilizam roedores permitem uma maior reprodutibilidade do desenvolvimento humano em razão de mais de 90% de seu genoma poder ser dividido em regiões correspondentes ao dos humanos (Waterston et al., 2002). Ademais, outros estudos também têm utilizado amostras murinas para estudar a regulação hormonal no crescimento longitudinal (Blanchard et al., 1991; Gevers et al., 1995; van der Eerden et al., 2002a). Neste grupo animal, os efeitos da deficiência de estrógeno muitas vezes foram obtidos pela ovariectomia (Weitzmann e Pacifici, 2006), além de outros métodos como o uso de antagonistas dos receptores de estrógeno também já terem sido aplicados (Márquez Hernández et al., 2011b). O modelo experimental ovariectomizado é amplamente utilizado na área da saúde, inclusive para investigar os efeitos de algumas doenças, como por exemplo a osteoporose, condição sistêmica diretamente relacionada com a deficiência estrogênica (Kalu, 1991; Peng et al., 1997; Mathavan et al., 2015).

Cabe aqui ressaltar que a genômica comparativa acaba por permitir uma correlação entre as pesquisas utilizando modelo animal (pesquisas pré-clínicas) e humanos (Waterston et al., 2002; Gibbs et al., 2004). Além disso, esta privação de estrógeno em ratas parece assemelhar-se aos padrões de alterações apreciados em humanos sob essa mesma condição (Frost e Jee, 1992), desta forma, o presente estudo optou por utilizar a ovariectomia como indutor de deficiência de estrógeno em ratas para a compreensão do papel deste hormônio no crescimento e desenvolvimento dos maxilares durante a puberdade.

5.1.2. Amostras Humanas

A amostra do presente estudo, constituída por pacientes ortodônticos da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, caracteriza-se como amostra por conveniência, uma vez que foi realizada por acessibilidade. Este tipo de amostragem (não probabilística) é carecida de rigor estatístico, uma vez que o pesquisador seleciona apenas os elementos a que tem acesso, assumindo que estes venham a representar um universo maior. Apesar disso, o emprego de amostras por conveniência não só é bastante aplicado como também adequado para a criação de ideias em pesquisas do tipo exploratórias (Marotti et al., 2008), como no caso do presente projeto, onde na literatura específica foi o primeiro estudo a avaliar a associação entre polimorfismos genéticos nos genes *ESR1* e *ESR2* com as dimensões craniofaciais em população humana. Cabe ainda ressaltar que um desenho de estudo com uma amostra representativa da população incorreria em questões éticas, uma vez que são necessárias radiografias do complexo craniofacial. Desta forma, pacientes em tratamento ortodôntico representaram a melhor abordagem para a realização do presente estudo.

Os estudos de associação são importantes ferramentas para a identificação de polimorfismos genéticos que podem predispor a alterações complexas. Com isso, o objetivo é verificar se um determinado genótipo ou alelo de um gene candidato, neste caso os receptores de estrógenos, está associado a alguma alteração, permitindo assim a identificação de genes candidatos a condições específicas de fenótipo. Este estudo associativo pode ser realizado tanto através de famílias de indivíduos afetados (Li et al., 2010; Chen et al., 2015; Guan et al., 2015; Perillo et al., 2015), o que é mais complexo, pois o acesso a todos os membros é difícil, bem como por indivíduos não relacionados entre si, como na presente pesquisa. O modelo de estudo utilizado, denominado caso-controle, é mais constantemente realizado, uma vez que permite o agrupamento de um maior número de indivíduos afetados sem que exista a necessidade da inclusão de seus familiares (Risch, 2000).

5.1.3. Características fenotípicas

A avaliação fenotípica no modelo animal foi realizada através de método 2D (radiografias cefalométricas). Para tanto, pontos de referência previamente publicados foram selecionados, de maneira a permitir uma avaliação comparativa de distâncias lineares verticais e sagitais que apresentam alguma correspondência em populações

humanas (Kiliaridis et al., 1985; Fujita et al., 2004), o que é fundamental em pesquisas translacionais.

Na população humana, para a caracterização fenotípica foi adotada a análise da radiografia cefalométrica lateral (2D), por ser o método que tem sido extensivamente utilizado no estudo da face na pesquisa ortodôntica (Todorova-Plachiyska e Stoilova-Todorova, 2018). Ademais, a análise cefalométrica visa avaliar as variações individuais nas dimensões maxilares e mandibulares (Durão et al., 2013). É importante destacar que os pontos e planos utilizados neste estudo foram selecionados com base em uma revisão sistemática da literatura previamente realizada (Nascimento et al., 2016), a qual demonstrou que essas medidas são as mais utilizadas nos estudos de associação entre polimorfismos genéticos e alterações dimensionais da maxila e da mandíbula.

5.2. Imuno-histoquímica

A imuno-histoquímica foi selecionada para ilustração e obtenção de informações confirmativas preliminares para os achados na área da biologia molecular, mais especificamente PCR quantitativo em tempo real. Esta técnica funciona como um primoroso método para determinar antígenos (proteínas), mas necessita de procedimento específicos com diferentes etapas que podem levar a erros (Ward e Rehg, 2014). Distintas técnicas de recuperação antigênica já foram utilizadas para estas proteínas, além disso, os diferentes clones dos receptores de estrógeno têm apresentado padrões de imunoexpressão não homogêneos, onde apresentam tanto marcação predominantemente nuclear (Nilsson et al., 1999) como também citoplasmática (van der Eerden et al., 2002b). Devido a estes diversos fatores que influenciam na imunomarcação faz-se necessária uma análise cuidadosa, além de interpretação criteriosa dos resultados aqui obtidos. Desta forma, no presente estudo, a técnica de imuno-histoquímica foi utilizada apenas para imunolocalização e não para quantificar as proteínas comparando a expressão proteica entre os grupos.

5.3. Biologia Molecular

5.3.1. PCR Quantitativo em tempo real

O PCR quantitativo em tempo real foi a técnica utilizada no presente estudo para avaliar e comparar a expressão gênica de *ESR1* e *ESR2* nos grupos OVX e Sham. Essa técnica é utilizada para a quantificação da expressão de RNA mensageiro em baixos níveis (Heid et al., 1996), uma vez que possibilita essa análise anteriormente inalcançada através dos métodos tradicionais (Southern, 1975; Sharp et al., 1980; Thomas, 1980). Desde a década de 90, o PCR quantitativo em tempo real vem sendo amplamente utilizado na avaliação de respostas biológicas a diferentes estímulos (Tan et al., 1994; Huang et al., 1995a; Huang et al., 1995b), como a deficiência de estrógeno, em razão de permitir a detecção direta dos produtos do PCR durante a fase exponencial da reação, fazendo uma combinação da amplificação e da detecção em um único passo. O princípio desta técnica baseia-se na atividade exonuclease 5''3' da enzima *Taq DNA polimerase* e na construção de sondas de oligonucleotídeos marcadas duplamente. Estas sondas baseiam-se no princípio FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*) e emitem um sinal de fluorescência quando são clivadas. No presente estudo foram utilizadas sondas *TaqMan*, onde uma sonda específica para os receptores de estrógeno foi marcada duplamente com um corante repórter em uma das extremidades e um corante “silenciador” na outra. Na forma livre, a transferência de energia fluorescente ocorre de forma que a emissão realizada pelo repórter é absorvida pelo silenciador (Heid et al., 1996). Assim sendo, foram selecionados dois calibradores considerados genes normalizadores/“housekeeping” (*GAPDH* e *ACTB*), que permitiram a obtenção dos valores de expressão gênica relativas de *ESR1* e *ESR2* nos grupos OVX e Sham das regiões do ângulo mandibular, côndilo, sínfise mandibular e sutura palatina.

5.3.2. PCR Qualitativo em tempo real – Genotipagem

A seleção dos polimorfismos rs12154178, rs2273206, rs7774230, rs2747649, rs2234693, rs9340799 em *ESR1*, e rs1256049 e rs4986938 em *ESR2* foi realizada por meio de uma busca no “*dbSNP*”, uma base de dados que funciona como um repositório central para variações moleculares, onde a escolha baseou-se na menor frequência alélica, que deveria ser maior que 10% e na associação desses polimorfismos com outros “fenótipos” (condições) como diferentes tipos de câncer (Chae et al., 2009; Son et al., 2015; Fjeldheim et al., 2016), esquizofrenia (Weickert et al., 2008), Alzheimer (Pan et al., 2014), doença cardiovascular (Casazza et al., 2010),

Lupus eritematoso (Rupasree et al., 2015), osteoartrite (Kisiel et al., 2011; Ma et al., 2015), escoliose idiopática (Chen S et al., 2014), desordem temporomandibular (Quinelato et al., 2018), entre outros diversos já presentes na literatura.

A genotipagem também foi realizada por PCR em tempo real com o método de *TaqMan*. Este método foi selecionado por ser uma técnica simples, além de apresentar alta especificidade e confiabilidade dos resultados. Isso faz com que diversos outros estudos na área da odontologia utilizem o mesmo método (Antunes et al., 2017; Lips et al., 2017; Kuchler et al., 2017; Kuchler et al., 2018a; Kuchler et al., 2018b). Especificamente neste projeto, por se tratar de um estudo envolvendo discriminação alélica, foi utilizada a técnica específica proposta por Ranade et al. (2001), a qual consiste na utilização de sondas fluorescentes alelo-específicas, que combinam as etapas de amplificação e detecção dos alelos em uma única etapa. A fluorescência é medida durante a reação de PCR e os genótipos inferidos a partir desses valores. Desta forma, o método *Taqman* elimina viés por erros interpretativos, uma vez que os genótipos são gerados de maneira automática, ou seja, sem interferência humana. Apesar dessas vantagens, esta é uma técnica onerosa por ser indispensável o uso de um equipamento especial para detecção de fluorescências em diferentes comprimentos de onda, além do alto custo das sondas (Ranade et al., 2001).

5.4. O estrógeno e seus receptores

Os hormônios sexuais não apenas regulam funções reprodutivas, mas também exercem importante influência em outros sistemas, como o cardiovascular e o nervoso (Nilsson et al., 2001; Gustafsson, 2003; Hess, 2003; Heldring et al., 2007). Além disso, os estrógenos são imprescindíveis para o desenvolvimento e integridade do esqueleto (Lorenzo, 2003). Sendo que os resultados obtidos com o modelo animal demonstram que o estrógeno realmente desempenha um papel importante no desenvolvimento dos ossos maxilares.

A via clássica pela qual o estrógeno realiza sua ação é mediada por seus receptores intracelulares (Cato et al., 2002; Shupnik, 2002), os quais pertencem a uma família de receptores nucleares e operam como fatores de transcrição quando induzidos por seus ligantes (Nelson e Habibi, 2013). Apesar do conhecimento de que esse hormônio regula atividades celulares desde a proliferação, morfogênese,

diferenciação e até mesmo a apoptose (Lorenzo, 2003), ainda não está claro como o estrógeno e seus receptores influenciam o crescimento e/ou desenvolvimento maxilar e mandibular.

Para buscar elucidar parte da regulação da expressão dos ERs, foi estudada a expressão dos *ESR1* e *ESR2* em sítios de crescimento maxilares e mandibulares durante a puberdade de ratas fêmeas controle e ovariectomizadas. A pesagem do útero de ambos os grupos confirmou a efetividade da castração, e analisando esta variável (dado não mostrado) foi possível obter indicação de que o procedimento cirúrgico foi apropriado para estimular a deficiência hormonal (Chen G et al., 2014). Apesar de alterações dimensionais da maxila e da mandíbula, não houve alteração na expressão do RNA mensageiro de ambos genes (*ESR1* e *ESR2*). O presente estudo demonstra que existe expressão do RNAm destes receptores nas diferentes regiões de crescimento da maxila e da mandíbula mesmo sob a condição de deficiência de estrógeno. Um estudo prévio também já demonstrou a expressão destes receptores em regiões de crescimento através da técnica de Hibridação *in situ* não radioativa, onde os ER α e ER β estavam abundantemente expressos no final da zona proliferativa e nos condrócitos iniciais da camada hipertrófica (van der Eerden et al., 2002a). Desta forma, evidenciando essa expressão inclusive no modelo animal ovariectomizado, é possível hipotetizar que a deficiência estrógeno leva a alterações nos fenótipos craniofaciais durante a puberdade não devido a uma alteração direta nos receptores, mas sim em outras vias, como as relacionadas aos fatores de crescimento.

Além da presença dos RNAm para os *ESR1* e *ESR2*, pode-se observar que não houve diferença na expressão relativa de ambos os grupos, o que possibilita pressupor que a deficiência do estrógeno não influencia na expressão dos RNAm, o que parece contrário a informação anterior de que o nível de expressão desses receptores nos tecidos é regulado por hormônios (Nilsson et al., 1999). Esse achado é de grande importância, pois é sabido que o balanço relativo de proteínas receptoras, coativadoras e correpessoras são um fator crítico deliberativo na habilidade da via clássica iniciar suas respostas (Lorenzo, 2003).

No presente estudo, a imunoexpressão dos ER β apresentou-se bastante evidente nos condrócitos das regiões de interesse mandibulares, principalmente na camada hipertrófica, em ambos os grupos, no período puberal, demonstrando que o ER β parece um importante elemento durante os estágios de crescimento,

corroborando com achado anterior tanto em modelo animal (Márquez Hernández et al., 2011b) quanto em população humana (Nilsson et al., 1999; Ushiyama et al., 1999). Isto mostra uma possível ação direta do estrógeno na mandíbula, posto que a taxa de crescimento é determinada tanto pela proliferação dos condrócitos, como pela sua hipertrofia e secreção de matriz, onde a superação da invasão vascular sobre o crescimento cartilaginoso controlará o fim do mesmo, sendo este evento dependente da atividade/recrutamento dos condrocitos. E, já é sabido que tanto a proliferação de condrócitos bem como o recrutamento de condrocitos são inibidos pelo estrógeno em diferentes graus (Gustafsson et al., 1975; Turner et al., 1994a; Turner et al., 1994b). Entretanto, os condrócitos podem não ser o único tipo celular responsável pela mediação dos efeitos do estrógeno nas regiões em crescimento, já que células osteoblásticas também se apresentaram imunomarcadas. Em resumo, nosso estudo imuno-histoquímico preliminar sugere que a proteína ER β está expressa em áreas de crescimento cartilaginoso e aposicional da mandíbula durante o desenvolvimento.

Além disso, foi possível claramente evidenciar que uma deficiência do estrógeno afeta as dimensões craniofaciais, uma vez que no modelo animal diferentes medidas lineares mandibulares apresentaram-se aumentadas no grupo ovariectomizado quando comparado ao Sham tanto em animais de 45 quanto de 63 dias de vida. Paralelamente, e para avaliar se o desfecho ocorreria exclusivamente na mandíbula, medidas maxilares foram avaliadas, demonstrando que o estrógeno afeta o crescimento de ambos os ossos, de tal modo que sua deficiência leva a um aumento nas dimensões maxilomandibulares, sendo esta influência mais proeminente nas medidas da maxila, o que sugere uma participação diferencial deste hormônio nos diferentes tipos de crescimento e tecidos ósseos. Este dado é bastante relevante, em razão de a morfologia craniofacial ser determinada tanto por crescimento intramembranoso (sutural), como pelo cartilaginoso (endocondral), sendo que esta atuação seletiva pode ser sugerida pelos estrógenos estimularem a diferenciação osteoblástica, e também a ossificação endocondral (Eriksen et al., 1988). Contrariamente a estes achados, estudos prévios demonstraram que uma deficiência de estrógeno pode não levar a alterações dimensionais craniofaciais (Masoud et al., 2008), e quando induzida em períodos neonatais, leva a diminuições nas medidas desses mesmos ossos (Fujita et al., 2004), cabendo aqui ressaltar que no presente estudo foi induzida a deficiência de estrógeno no período da puberdade, diferente dos

supracitados. Mas, estudos tanto em ratos (Chow et al., 1992; Turner et al., 1994a), quanto em humanos, corroboram com o aqui exposto, ao avaliar que altas doses de estrógeno, bem como as alterações hormonais inerentes a puberdade, ao contrário, inibem o crescimento ósseo longitudinal (Bonjour et al., 1991; Turner et al., 1994b; Gevers et al., 1995). Isto pode ser fortemente sustentado pela evidência existente de que o estrógeno é essencial para a maturação óssea durante a puberdade, e principalmente por ser responsável pelo fechamento das placas epifisárias de crescimento com consequente encerramento do crescimento (Garn et al., 1966; Turner et al., 1994b; Smith e Korach, 1996).

Apesar da presente evidência da influência da atuação deste hormônio no crescimento maxilomandibular, seu mecanismo de ação ainda é parcialmente caracterizado, uma vez que o estrógeno influencia o crescimento ósseo longitudinal em conjunto com outros hormônios e com fatores sistêmicos, como os fatores de crescimento (Turner et al., 1994b). Este hormônio pode agir de maneira variável no crescimento, seja pela ação inibitória na síntese do *insulin-like growth factor-I* (IGF-I) ou pelo seu efeito estimulatório na secreção de GH (hormônio do crescimento), sendo ambos dependentes do período de exposição ao estrógeno (Ho e Weissberger, 1992). Mas, interessante, o GH promove o crescimento ósseo devido também a sua ação estimulante na síntese de IGF-I (Isgaard et al., 1986). Ou seja, o crescimento pode ser influenciado pelas ações suplementares de ambos hormônios (Turner et al., 1994b). Além disso, existem outros mecanismos de atuação não genômicos que envolvem receptores acoplados a proteínas G (pertencentes a uma família de receptores transmembrana que transduzem sinais através da sua interação com hormônios, por exemplo) os quais levam a ativação de diferentes cascatas de sinalização intracelular (Moreira et al., 2014).

De posse do conhecimento exposto em modelo animal e sabendo que as variações faciais sofrem significativa influência genética, com hereditariedade estimada de 60 a 90% nos fenótipos faciais (Martínez-Abadías et al., 2009; Liu et al., 2012) surge a hipótese de que polimorfismos genéticos em diferentes genes poderiam levar a alterações fenotípicas inclusive no complexo craniofacial. É importante salientar que os polimorfismos genéticos nos *ESR1* e *ESR2* foram escolhidos como genes candidatos para estudo dos padrões esqueléticos e tipos faciais, uma vez que é bastante estabelecido o importante papel do estrógeno no crescimento durante a puberdade (Cutler, 1997; Lee e Witchel, 1997; MacGillivray et al., 1998; Frank, 2003;

Grumbach, 2004; Sowińska-Przepiera et al., 2011) e sua atuação tanto na preservação da massa óssea, bem como na manutenção do equilíbrio entre as atividades dos osteoblastos e osteoclastos (Parfitt, 1979). Essa mesma abordagem de seleção de genes candidatos para o crescimento da maxila e da mandíbula já foi utilizada anteriormente (Xue et al., 2010; Jang et al., 2010; Tassopoulou-Fishell et al., 2012; Xue et al., 2014; Guan et al., 2015; Perillo et al., 2015; da Fontoura et al., 2015; Cruz et al., 2017; Chen et al., 2015), como no caso do hormônio do crescimento (GH), onde polimorfismos genéticos no Receptor do Hormônio do Crescimento (*GHR*) foram associados com alterações dimensionais, sejam elas discrepâncias maxilo-mandibulares (Cruz et al., 2017), variações na altura mandibular (Yamaguchi et al., 2001; Zhou et al., 2005; Kang et al., 2009; Tomoyasu et al., 2009) ou também reduções tanto na altura facial inferior bem como no comprimento mandibular (Bayram et al., 2014).

Os dados do presente estudo sugerem que o polimorfismo rs2273206 no *ESR1*, localizado no cromossomo 6, está envolvido com o aumento de dimensões craniofaciais, tanto da base do crânio (SN), quanto do comprimento efetivo da mandíbula (Co-Gn) e de seu corpo (Go-Pg). E, apesar deste polimorfismo já ter sido associado com condições de enfermidades, como o câncer e a esquizofrenia (Weickert et al., 2008; Chae et al., 2009; Son et al., 2015), apenas um estudo na área odontológica foi publicado, onde existiu uma forte associação deste polimorfismo com o risco de desenvolvimento de DTM muscular e com a dor na articulação temporomandibular, onde através do modelo recessivo, assim como no presente estudo, o genótipo TT esteve associado com as alterações (Quinelato et al., 2018).

Pesquisas anteriores também já puderam associar diferentes genes candidatos (*PAX5*, *SNAI3*, *MYO1H*, *TWIST1* e *PAX7*) com variações craniofaciais, bem como *FGFR2*, *EDN1*, *TBX5* e *COL1A1* com o tipo de má oclusão esquelética (da Fontoura et al., 2015). Além disso, estudos prévios envolvendo análise genética em populações humanas evidenciaram associação tanto do prognatismo mandibular com outros cromossomos como 1, 3, 5, 11, 12 e 19 (Yamaguchi et al., 2005; Frazier-Bowers et al., 2009; Li et al., 2011), quanto do retrognatismo (Cruz et al., 2011). E, não somente cromossomos, mas inclusive regiões cromossômicas específicas (*loci* 1p36, 1q32.2, 1p22.3, 4p16.1, 6q25, 19p13, 14q24.3, 14q31.1 e 14q31.2) já foram considerados como de susceptibilidade ao prognatismo mandibular em populações asiáticas (Yamaguchi et al., 2005; Li et al., 2010; Li et al., 2011), sendo que genes propostos

localizados nos *loci* acima citados como *EVC1*, *EVC2*, *LTBP2*, *TGF- β* e *MATN1* são em sua maioria associados com desenvolvimento esquelético, e/ou com a formação cartilaginosa, assim como os candidatos deste estudo.

Ainda no *ESR1*, o polimorfismo rs2747649, localizado no *locus* 6q25.2, mostrou-se relacionado a um tipo morfológico braquifacial, e a presença de um alelo específico (C) como fator de risco para o desenvolvimento de má oclusão esquelética de classe III. Sabe-se que perfis faciais são determinados pela relação entre os crescimentos vertical e horizontal, onde um maior crescimento horizontal da mandíbula pode estar relacionado ao padrão braquifacial, o qual apresenta prevalência acentuada nos indivíduos com má oclusão de classe III esquelética (Brasil et al., 2016), consentindo com a associação exposta. E, por fim no *ESR1*, o polimorfismo rs1884051 teve o genótipo AA associado a valores maiores de ANB, demonstrando mais uma evidência de atuação desse gene na face. Do mesmo modo, no *ESR2*, apenas o polimorfismo rs4986938 apresentou associação com a Classe II esquelética, onde o alelo C foi de maior frequência, permitindo apenas sugerir a associação deste polimorfismo com a presença desta má oclusão esquelética.

É importante salientar que não houve associação de nenhum dos polimorfismos com a medida maxilar específica. Isso pode tanto ser devido a esses genes serem importantes candidatos apenas nas dimensões da mandíbula, ou pelo fato deste estudo ter se limitado a utilizar uma única medida linear (Ptm-A) através de radiografias bidimensionais. Por conseguinte, sugere-se que estudos futuros com maior número de medidas maxilares e análise 3D, por exemplo, possam permitir análises genéticas mais amplas deste osso.

As análises aqui presentes demonstraram que principalmente o *ESR1* pode estar envolvido com medidas mandibulares, bem como influenciar os padrões de crescimento anteroposterior e vertical. O alfa adotado neste estudo foi de 5%, sendo importante também enfatizar que não foi realizada uma correção pós-teste, pois isso poderia levar a maiores chances de erro tipo I. Além disso, deve ficar claro que esta é uma importante estratégia para buscar polimorfismos associados àqueles genes denominados de “pequeno efeito”, que são genes cujos polimorfismos afetam de maneira coletiva alguma característica de interesse. Para mais, sabe-se que os fenótipos humanos dependem dessa ação aditiva de diferentes polimorfismos, uma vez que existem mecanismos hormonais, musculares e de desenvolvimento ósseo envolvidos no complexo craniofacial.

As associações genéticas encontradas até o presente momento são encorajadoras e impulsionam a ciência a prosseguir em busca de confirmações dessas descobertas, bem como a identificação de novas variantes. Sendo que na ortodontia, especificamente, a identificação da influência genética nos diferentes fenótipos faciais propiciará melhor compreensão dos mecanismos moleculares do crescimento facial pós-natal, podendo em um futuro melhorar a eficiência do tratamento de pacientes ortodônticos (da Fontoura et al., 2015).

Conclusão

6. CONCLUSÃO

- A deficiência de estrógeno durante a puberdade leva à um aumento das dimensões maxilares;
- A deficiência de estrógeno durante a puberdade leva a um aumento das dimensões mandibulares;
- A deficiência de estrógeno não afeta a expressão de RNAm de *ESR1* e *ESR2* nos diferentes sítios de crescimento da maxila e da mandíbula
- Houve associação entre os polimorfismos genéticos em *ESR1* e *ESR2* com as dimensões maxilares e mandibulares em humanos.

REFERÊNCIAS¹

- Antunes LAA, Machado CMC, Couto ACK, Lopes LB, Sena FC, Abreu FV, et al. A Polymorphism in the MTRR Gene Is Associated with Early Childhood Caries and Underweight. *Caries Res* 2017; 51(2): 102–8.
- Arbolea L, Castañeda S. Osteoimmunology: the study of the relationship between the immune system and bone tissue. *Reumatol Clin* 2013; 9(5): 303–15.
- Barros RPA, Gustafsson J-Å. Estrogen receptors and the metabolic network. *Cell Metab* 2011; 14(3): 289–99.
- Bayram S, Basciftci FA, Kurar E. Relationship between P561T and C422F polymorphisms in growth hormone receptor gene and mandibular prognathism. *Angle Orthod* 2014; 84(5): 803–9.
- Ben-Hur H, Mor G, Blickstein I, Likhman I, Kohen F, Dgani R, et al. Localization of estrogen receptors in long bones and vertebrae of human fetuses. *Calcif Tissue Int* 1993; 53(2): 91–6.
- Blanchard O, Tsagris L, Rappaport R, Duval-Beaupere G, Corvol M. Age-dependent responsiveness of rabbit and human cartilage cells to sex steroids in vitro. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1991; 40(4-6): 711–6.
- Bonjour JP, Theintz G, Buchs B, Slosman D, Rizzoli R. Critical years and stages of puberty for spinal and femoral bone mass accumulation during adolescence. *J Clin Endocrinol Metab* 1991; 73(3): 555–63.
- Braidman IP, Hainey L, Batra G, Selby PL, Saunders PT, Hoyland JA. Localization of estrogen receptor beta protein expression in adult human bone. *J Bone Miner Res* 2001; 16(2): 214–20.
- Brasil DM, Kurita LM, Groppo FC, Haiter-Neto F. Relationship of craniofacial morphology in 3-dimensional analysis of the pharynx. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2016; 149(5): 683-691.e1.
- Casazza K, Page GP, Fernandez JR. The association between the rs2234693 and rs9340799 estrogen receptor alpha gene polymorphisms and risk factors for cardiovascular disease: a review. *Biol Res Nurs* 2010; 12(1): 84–97.
- Cato ACB, Nestl A, Mink S. Rapid actions of steroid receptors in cellular signaling pathways. *Sci STKE* 2002; 2002(138): re9.
- Chae YK, Huang H-Y, Strickland P, Hoffman SC, Helzlsouer K. Genetic polymorphisms of estrogen receptors alpha and beta and the risk of developing prostate cancer. *PLoS ONE* 2009; 4(8): e6523.
- Chen F, Li Q, Gu M, Li X, Yu J, Zhang Y-B. Identification of a Mutation in FGF23 Involved in Mandibular Prognathism. *Sci Rep* 2015; 5: 11250.

¹ De acordo com o Estilo Vancouver (sistema autor-data).

- Chen G-X, Zheng S, Qin S, Zhong Z-M, Wu X-H, Huang Z-P, et al. Effect of low-magnitude whole-body vibration combined with alendronate in ovariectomized rats: a random controlled osteoporosis prevention study. *PLoS ONE* 2014; 9(5): e96181.
- Chen S, Zhao L, Roffey DM, Phan P, Wai EK. Association between the ESR1 -351AG single nucleotide polymorphism (rs9340799) and adolescent idiopathic scoliosis: a systematic review and meta-analysis. *Eur Spine J* 2014; 23(12): 2586–93.
- Choi S-H, Fan D, Hwang M-S, Lee H-K, Hwang C-J. Effect of growth hormone treatment on craniofacial growth in children: Idiopathic short stature versus growth hormone deficiency. *J Formos Med Assoc* 2017; 116(4): 313–21.
- Chow JW, Lean JM, Chambers TJ. 17 beta-estradiol stimulates cancellous bone formation in female rats. *Endocrinology* 1992; 130(5): 3025–32.
- Compston JE. Sex steroids and bone. *Physiol Rev* 2001; 81(1): 419–47.
- Cruz CV, Mattos CT, Maia JC, Granjeiro JM, Reis MF, Mucha JN, et al. Genetic polymorphisms underlying the skeletal Class III phenotype. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2017; 151(4): 700–7.
- Cruz RM, Hartsfield JK, Falcão-Alencar G, Koller DL, Pereira RW, Mah J, et al. Exclusion of Class III malocclusion candidate loci in Brazilian families. *J Dent Res* 2011; 90(10): 1202–5.
- Cutler GB. The role of estrogen in bone growth and maturation during childhood and adolescence. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1997; 61(3-6): 141–4.
- da Fontoura CSG, Miller SF, Wehby GL, Amendt BA, Holton NE, Southard TE, et al. Candidate Gene Analyses of Skeletal Variation in Malocclusion. *J Dent Res* 2015; 94(7): 913–20.
- Deroo BJ, Korach KS. Estrogen receptors and human disease. *J Clin Invest* 2006; 116(3): 561–70.
- Dietrich W, Haitel A, Holzer G, Huber JC, Kolbus A, Tschugguel W. Estrogen receptor-beta is the predominant estrogen receptor subtype in normal human synovia. *J Soc Gynecol Investig* 2006; 13(7): 512–7.
- Durão AR, Pittayapat P, Rockenbach MIB, Olszewski R, Ng S, Ferreira AP, et al. Validity of 2D lateral cephalometry in orthodontics: a systematic review. *Prog Orthod* 2013; 14: 31.
- Eriksen EF, Colvard DS, Berg NJ, Graham ML, Mann KG, Spelsberg TC, et al. Evidence of estrogen receptors in normal human osteoblast-like cells. *Science* 1988; 241(4861): 84–6.
- Eyster KM. The Estrogen Receptors: An Overview from Different Perspectives. *Methods Mol Biol* 2016; 1366: 1–10.

- Fjeldheim FN, Frydenberg H, Flote VG, McTiernan A, Furberg A-S, Ellison PT, et al. Polymorphisms in the estrogen receptor alpha gene (ESR1), daily cycling estrogen and mammographic density phenotypes. *BMC Cancer* 2016; 16(1): 776.
- Frank GR. Role of estrogen and androgen in pubertal skeletal physiology. *Med Pediatr Oncol* 2003; 41(3): 217–21.
- Frazier-Bowers S, Rincon-Rodriguez R, Zhou J, Alexander K, Lange E. Evidence of linkage in a Hispanic cohort with a Class III dentofacial phenotype. *J Dent Res* 2009; 88(1): 56–60.
- Frost HM, Jee WS. On the rat model of human osteopenias and osteoporoses. *Bone Miner* 1992; 18(3): 227–36.
- Fujita T, Ohtani J, Shigekawa M, Kawata T, Kaku M, Kohno S, et al. Effects of sex hormone disturbances on craniofacial growth in newborn mice. *J Dent Res* 2004; 83(3): 250–4.
- Fushimi S, Wada N, Nohno T, Tomita M, Saijoh K, Sunami S, et al. 17beta-Estradiol inhibits chondrogenesis in the skull development of zebrafish embryos. *Aquat Toxicol* 2009; 95(4): 292–8.
- Garn SM, Rohmann CG, Blumenthal T. Ossification sequence polymorphism and sexual dimorphism in skeletal development. *Am J Phys Anthropol* 1966; 24(1): 101–15.
- Gennari L, Merlotti D, Martini G, Gonnelli S, Franci B, Campagna S, et al. Longitudinal association between sex hormone levels, bone loss, and bone turnover in elderly men. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88(11): 5327–33.
- Gennari L, Merlotti D, Paola V de, Calabrò A, Becherini L, Martini G, et al. Estrogen receptor gene polymorphisms and the genetics of osteoporosis: a HuGE review. *Am J Epidemiol* 2005; 161(4): 307–20.
- Gevers EF, Wit JM, Robinson IC. Effect of gonadectomy on growth and GH responsiveness in dwarf rats. *J Endocrinol* 1995; 145(1): 69–79.
- Gibbs RA, Weinstock GM, Metzker ML, Muzny DM, Sodergren EJ, Scherer S, et al. Genome sequence of the Brown Norway rat yields insights into mammalian evolution. *Nature* 2004; 428(6982): 493–521.
- Glaser JA. Validity of nucleic acid purities monitored by 260nm/280nm absorbance ratios. *BioTechniques* 1995; 18(1): 62–3.
- Green S, Walter P, Kumar V, Krust A, Bornert JM, Argos P, et al. Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature* 1986; 320(6058): 134–9.
- Gruber CJ, Tschugguel W, Schneeberger C, Huber JC. Production and actions of estrogens. *N Engl J Med* 2002; 346(5): 340–52.

- Grumbach MM. Mutations in the synthesis and action of estrogen: the critical role in the male of estrogen on pubertal growth, skeletal maturation, and bone mass. *Ann N Y Acad Sci* 2004; 1038: 7–13.
- Guan X, Song Y, Ott J, Zhang Y, Li C, Xin T, et al. The ADAMTS1 Gene Is Associated with Familial Mandibular Prognathism. *J Dent Res* 2015; 94(9): 1196–201.
- Gustafsson J-A. What pharmacologists can learn from recent advances in estrogen signalling. *Trends Pharmacol Sci* 2003; 24(9): 479–85.
- Gustafsson PO, Kasström H, Lindberg L, Olsson SE. Growth and mitotic rate of the proximal tibial epiphyseal plate in hypophysectomized rats given estradiol and human growth hormone. *Acta Radiol Suppl* 1975; 344: 69–74.
- Hall JM, Couse JF, Korach KS. The multifaceted mechanisms of estradiol and estrogen receptor signaling. *J Biol Chem* 2001; 276(40): 36869–72.
- Harris B, Lovett L, Smith J, Read G, Walker R, Newcombe R. Cardiff puerperal mood and hormone study. III. Postnatal depression at 5 to 6 weeks postpartum, and its hormonal correlates across the peripartum period. *Br J Psychiatry* 1996; 168(6): 739–44.
- Haruyama N, Igarashi K, Saeki S, Otsuka-Isoya M, Shinoda H, Mitani H. Estrous-cycle-dependent variation in orthodontic tooth movement. *J Dent Res* 2002; 81(6): 406–10.
- He H, Wang C, Tang Q, Yang F, Xu Y. Elucidation of possible molecular mechanisms underlying the estrogen-induced disruption of cartilage development in zebrafish larvae. *Toxicol Lett* 2018; 289: 22–7.
- Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res* 1996; 6(10): 986–94.
- Heldring N, Pike A, Andersson S, Matthews J, Cheng G, Hartman J, et al. Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets. *Physiol Rev* 2007; 87(3): 905–31.
- Hess RA. Estrogen in the adult male reproductive tract: a review. *Reprod Biol Endocrinol* 2003; 1: 52.
- Hess RA, Fernandes SAF, Gomes GRO, Oliveira CA, Lazari MFM, Porto CS. Estrogen and its receptors in efferent ductules and epididymis. *J Androl* 2011; 32(6): 600–13.
- Ho KK, Weissberger AJ. Impact of short-term estrogen administration on growth hormone secretion and action: distinct route-dependent effects on connective and bone tissue metabolism. *J Bone Miner Res* 1992; 7(7): 821–7.
- Huang SK, Xiao HQ, Kleine-Tebbe J, Paciotti G, Marsh DG, Lichtenstein LM, et al. IL-13 expression at the sites of allergen challenge in patients with asthma. *J Immunol* 1995a; 155(5): 2688–94.

- Huang SK, Yi M, Palmer E, Marsh DG. A dominant T cell receptor beta-chain in response to a short ragweed allergen, Amb a 5. *J Immunol* 1995b; 154(11): 6157–62.
- Huh A, Horton MJ, Cuenco KT, Raoul G, Rowlerson AM, Ferri J, et al. Epigenetic influence of KAT6B and HDAC4 in the development of skeletal malocclusion. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2013; 144(4): 568–76.
- Isgaard J, Nilsson A, Lindahl A, Jansson JO, Isaksson OG. Effects of local administration of GH and IGF-1 on longitudinal bone growth in rats. *Am J Physiol* 1986; 250(4 Pt 1): E367–72.
- Ishihara A, Sasaki T, Debari K, Furuya R, Kawawa T, Ramamurthy NS, et al. Effects of ovariectomy on bone morphology in maxillae of mature rats. *J Electron Microsc (Tokyo)* 1999; 48(4): 465–9.
- Jang JY, Park EK, Ryoo HM, Shin HI, Kim TH, Jang JS, et al. Polymorphisms in the Matrilin-1 gene and risk of mandibular prognathism in Koreans. *J Dent Res* 2010; 89(11): 1203–7.
- Kalu DN. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. *Bone Miner* 1991; 15(3): 175–91.
- Kang EH, Yamaguchi T, Tajima A, Nakajima T, Tomoyasu Y, Watanabe M, et al. Association of the growth hormone receptor gene polymorphisms with mandibular height in a Korean population. *Arch Oral Biol* 2009; 54(6): 556–62.
- Katzenellenbogen BS, Montano MM, Ediger TR, Sun J, Ekena K, Lazennec G, et al. Estrogen receptors: selective ligands, partners, and distinctive pharmacology. *Recent Prog Horm Res* 2000; 55: 163–93; discussion 194–5.
- Khosla S, Melton LJ, Atkinson EJ, O'Fallon WM. Relationship of serum sex steroid levels to longitudinal changes in bone density in young versus elderly men. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86(8): 3555–61.
- Khosla S, Melton LJ, Riggs BL. Clinical review 144: Estrogen and the male skeleton. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87(4): 1443–50.
- Kiliaridis S, Engström C, Thilander B. The relationship between masticatory function and craniofacial morphology. I. A cephalometric longitudinal analysis in the growing rat fed a soft diet. *Eur J Orthod* 1985; 7(4): 273–83.
- Kisiel BM, Kosinska J, Wierzbowska M, Rutkowska-Sak L, Musiej-Nowakowska E, Wudarski M, et al. Differential association of juvenile and adult systemic lupus erythematosus with genetic variants of oestrogen receptors alpha and beta. *Lupus* 2011; 20(1): 85–9.
- Kos M, Reid G, Denger S, Gannon F. Minireview: genomic organization of the human ERalpha gene promoter region. *Mol Endocrinol* 2001; 15(12): 2057–63.

- Kouskoura T, Fragou N, Alexiou M, John N, Sommer L, Graf D, et al. The genetic basis of craniofacial and dental abnormalities. *Schweiz Monatsschr Zahnmed* 2011; 121(7-8): 636–46.
- Küchler EC, Dea Bruzamolín C, Ayumi Omori M, Costa MC, Antunes LS, Pecharki GD, et al. Polymorphisms in Nonamelogenin Enamel Matrix Genes Are Associated with Dental Fluorosis. *Caries Res* 2018a; 52(1-2): 1–6.
- Küchler EC, Nascimento MAd, Matsumoto MAN, Romano FL, da Silva RAB, Ayumi Omori M, et al. Genetic polymorphism in RANK is associated with mandibular size. *J Orthod* 2018b: 1–6.
- Küchler EC, Tannure PN, Falagan-Lotsch P, Lopes TS, Granjeiro JM, Amorim LMF. 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* 2012; 20(4): 467–71.
- Küchler EC, Tannure PN, Oliveira DSBd, Charone S, Nelson-Filho P, Silva RABd, et al. Polymorphisms in genes involved in enamel development are associated with dental fluorosis. *Arch Oral Biol* 2017; 76: 66–9.
- Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93(12): 5925–30.
- Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001; 409(6822): 860–921.
- Lee D-G, Kim T-W, Kang S-C, Kim ST. Estrogen receptor gene polymorphism and craniofacial morphology in female TMJ osteoarthritis patients. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2006; 35(2): 165–9.
- Lee PA, Witchel SF. The influence of estrogen on growth. *Curr Opin Pediatr* 1997; 9(4): 431–6.
- Li Q, Li X, Zhang F, Chen F. The identification of a novel locus for mandibular prognathism in the Han Chinese population. *J Dent Res* 2011; 90(1): 53–7.
- Li Q, Zhang F, Li X, Chen F. Genome scan for locus involved in mandibular prognathism in pedigrees from China. *PLoS ONE* 2010; 5(9).
- Lindberg MK, Alatalo SL, Halleen JM, Mohan S, Gustafsson JA, Ohlsson C. Estrogen receptor specificity in the regulation of the skeleton in female mice. *J Endocrinol* 2001; 171(2): 229–36.
- Lips A, Antunes LS, Antunes LA, Abreu JGBd, Barreiros D, Oliveira DSBd, et al. Genetic Polymorphisms in DEFB1 and miRNA202 Are Involved in Salivary Human β -Defensin 1 Levels and Caries Experience in Children. *Caries Res* 2017; 51(3): 209–15.
- Liu F, van der Lijn F, Schurmann C, Zhu G, Chakravarty MM, Hysi PG, et al. A genome-wide association study identifies five loci influencing facial morphology in Europeans. *PLoS Genet* 2012; 8(9): e1002932.

- Liu XL, Li CL, Lu WW, Cai WX, Zheng LW. Skeletal site-specific response to ovariectomy in a rat model: change in bone density and microarchitecture. *Clin Oral Implants Res* 2015; 26(4): 392–8.
- Livak KJ, Marmaro J, Todd JA. Towards fully automated genome-wide polymorphism screening. *Nat Genet* 1995; 9(4): 341–2.
- Lorenzo J. A new hypothesis for how sex steroid hormones regulate bone mass. *J Clin Invest* 2003; 111(11): 1641–3.
- Ma H, Wu W, Yang X, Liu J, Gong Y. Genetic effects of common polymorphisms in estrogen receptor alpha gene on osteoarthritis: a meta-analysis. *Int J Clin Exp Med* 2015; 8(8): 13446–54.
- MacGillivray MH, Morishima A, Conte F, Grumbach M, Smith EP. Pediatric endocrinology update: an overview. The essential roles of estrogens in pubertal growth, epiphyseal fusion and bone turnover: lessons from mutations in the genes for aromatase and the estrogen receptor. *Horm Res* 1998; 49 Suppl 1: 2–8.
- Madeira MC, Rizzolo RJC, Caria PHF, Cruz RSM. *Anatomia da face*. 8th ed. São Paulo: Sarvier, 2012. 244 p.
- Marotti JG, Furuyama R, Pigozzo M, Campos T, Laganá D. Amostragem em pesquisa clínica: Tamanho da amostra. *Revista de Odontologia da Universidade de São Paulo* 2008(20): 186–94.
- Márquez Hernández RA, Ohtani J, Fujita T, Sunagawa H, Ishikawa E, Tsubamoto N, et al. Mandibular and femoral growth alteration after sex hormone disruption in growing mice. *Orthod Craniofac Res* 2011a; 14(2): 63–9.
- Márquez Hernández RA, Ohtani J, Fujita T, Sunagawa H, Kawata T, Kaku M, et al. Sex hormones receptors play a crucial role in the control of femoral and mandibular growth in newborn mice. *Eur J Orthod* 2011b; 33(5): 564–9.
- Martínez-Abadías N, Esparza M, Sjøvold T, González-José R, Santos M, Hernández M. Heritability of human cranial dimensions: comparing the evolvability of different cranial regions. *J Anat* 2009; 214(1): 19–35.
- Masoud S, Masoud A, Masoud H. Effect of sexual hormone elimination on the changes of craniofacial dimensions in rats. *Journal of Dental School Shahid* 2008: 365–72.
- Mathavan N, Turunen MJ, Tägil M, Isaksson H. Characterising bone material composition and structure in the ovariectomized (OVX) rat model of osteoporosis. *Calcif Tissue Int* 2015; 97(2): 134–44.
- Miller G. Endocrinology. Divorcing estrogen's bright and dark sides. *Science* 2002; 298(5594): 723–4.
- Moreira SA, Souza A, Torres, Iraci Lucena da Silva. Effects of melatonin and estradiol on chronic pain during postmenopause. *Clinical and biomedical research* 2014: 223–33.

- Mossey PA. The heritability of malocclusion: part 2. The influence of genetics in malocclusion. *Br J Orthod* 1999; 26(3): 195–203.
- Nascimento MA, Sérvulo SS, Terada H, Romano FL, Nelson-Filho P, Küchler EC. Associação entre polimorfismo P561 no GHR e no prognatismo mandibular: revisão sistemática e metanálise. *Brazilian Oral Research* 2016.
- Nelson ER, Habibi HR. Estrogen receptor function and regulation in fish and other vertebrates. *Gen Comp Endocrinol* 2013; 192: 15–24.
- Nielsen R. Population genetic analysis of ascertained SNP data. *Hum Genomics* 2004; 1(3): 218–24.
- Nieminen P, Morgan NV, Fenwick AL, Parmanen S, Veistinen L, Mikkola ML, et al. Inactivation of IL11 signaling causes craniosynostosis, delayed tooth eruption, and supernumerary teeth. *Am J Hum Genet* 2011; 89(1): 67–81.
- Nilsson LO, Boman A, Sävendahl L, Grigelioniene G, Ohlsson C, Ritzén EM, et al. Demonstration of estrogen receptor-beta immunoreactivity in human growth plate cartilage. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84(1): 370–3.
- Nilsson O, Abad V, Chrysis D, Ritzén EM, Sävendahl L, Baron J. Estrogen receptor-alpha and -beta are expressed throughout postnatal development in the rat and rabbit growth plate. *J Endocrinol* 2002; 173(3): 407–14.
- Nilsson S, Gustafsson J-Å. Estrogen receptors: therapies targeted to receptor subtypes. *Clin Pharmacol Ther* 2011; 89(1): 44–55.
- Nilsson S, Mäkelä S, Treuter E, Tujague M, Thomsen J, Andersson G, et al. Mechanisms of estrogen action. *Physiol Rev* 2001; 81(4): 1535–65.
- Ojeda SR, Wheaton JE, Jameson HE, McCann SM. The onset of puberty in the female rat: changes in plasma prolactin, gonadotropins, luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH), and hypothalamic LHRH content. *Endocrinology* 1976; 98(3): 630–8.
- Oreffo RO, Kusec V, Virdi AS, Flanagan AM, Grano M, Zamboni-Zallone A, et al. Expression of estrogen receptor-alpha in cells of the osteoclastic lineage. *Histochem Cell Biol* 1999; 111(2): 125–33.
- Orrico SRP, Gonçalves D, Galeazzi ST, Giro G, Takayama L, Pereira RMR. The influence of loss of bone mass on induced periodontal disease: a radiographic and densitometric study of female rats. *J Periodontol* 2005; 76(9): 1436–42.
- Pallares LF, Carbonetto P, Gopalakrishnan S, Parker CC, Ackert-Bicknell CL, Palmer AA, et al. Mapping of Craniofacial Traits in Outbred Mice Identifies Major Developmental Genes Involved in Shape Determination. *PLoS Genet* 2015; 11(11): e1005607.

- Pan Y, Li Y, Shen H. Meta-analysis of the association between polymorphisms of estrogen receptor α genes rs9340799 and rs2234693 and Alzheimer's disease: evidence from 23 articles. *Am J Alzheimers Dis Other Dement* 2014; 29(8): 704–11.
- Parada C, Chai Y. Mandible and Tongue Development. *Curr Top Dev Biol* 2015; 115: 31–58.
- Parfitt AM. Quantum concept of bone remodeling and turnover: implications for the pathogenesis of osteoporosis. *Calcif Tissue Int* 1979; 28(1): 1–5.
- Peng ZQ, Väänänen HK, Zhang HX, Tuukkanen J. Long-term effects of ovariectomy on the mechanical properties and chemical composition of rat bone. *Bone* 1997; 20(3): 207–12.
- Perillo L, Monsurrò A, Bonci E, Torella A, Mutarelli M, Nigro V. Genetic association of ARHGAP21 gene variant with mandibular prognathism. *J Dent Res* 2015; 94(4): 569–76.
- Planey SL, Kumar R, Arnott JA. Estrogen receptors (ER α versus ER β): friends or foes in human biology? *J Recept Signal Transduct Res* 2014; 34(1): 1–5.
- Prince RL. Counterpoint: estrogen effects on calcitropic hormones and calcium homeostasis. *Endocr Rev* 1994; 15(3): 301–9.
- Prossnitz ER, Arterburn JB, Sklar LA. GPR30: A G protein-coupled receptor for estrogen. *Mol Cell Endocrinol* 2007; 265-266: 138–42.
- Quinelato V, Bonato LL, Vieira AR, Granjeiro JM, Tesch R, Casado PL. Association Between Polymorphisms in the Genes of Estrogen Receptors and the Presence of Temporomandibular Disorders and Chronic Arthralgia. *J Oral Maxillofac Surg* 2018; 76(2): 314.e1-314.e9.
- Ranade K, Chang MS, Ting CT, Pei D, Hsiao CF, Olivier M, et al. High-throughput genotyping with single nucleotide polymorphisms. *Genome Res* 2001; 11(7): 1262–8.
- Riggs BL, Khosla S, Melton LJ. A unitary model for involutional osteoporosis: estrogen deficiency causes both type I and type II osteoporosis in postmenopausal women and contributes to bone loss in aging men. *J Bone Miner Res* 1998; 13(5): 763–73.
- Riggs BL, Melton LJ. Involutional osteoporosis. *N Engl J Med* 1986; 314(26): 1676–86.
- Risch NJ. Searching for genetic determinants in the new millennium. *Nature* 2000; 405(6788): 847–56.
- Roosenboom J, Hens G, Mattern BC, Shriver MD, Claes P. Exploring the Underlying Genetics of Craniofacial Morphology through Various Sources of Knowledge. *Biomed Res Int* 2016; 2016: 3054578.

- Rupasree Y, Naushad SM, Rajasekhar L, Uma A, Kutala VK. Association of estrogen receptor 1 (ESR1) haplotypes with risk for systemic lupus erythematosus among South Indians. *Indian J Exp Biol* 2015; 53(11): 714–8.
- Sharp PA, Berk AJ, Berget SM. Transcription maps of adenovirus. *Meth Enzymol* 1980; 65(1): 750–68.
- Sherry ST, Ward M, Sirotkin K. dbSNP-database for single nucleotide polymorphisms and other classes of minor genetic variation. *Genome Res* 1999; 9(8): 677–9.
- Shupnik MA. Oestrogen receptors, receptor variants and oestrogen actions in the hypothalamic-pituitary axis. *J Neuroendocrinol* 2002; 14(2): 85–94.
- Šidlauskas M, Šalomskienė L, Andriuškevičiūtė I, Šidlauskienė M, Labanauskas Ž, Vasiliauskas A, et al. Heritability of mandibular cephalometric variables in twins with completed craniofacial growth. *Eur J Orthod* 2016; 38(5): 493–502.
- Singh IJ, Gunberg DL. Effect of estrogen treatment on bone cortex of the young rat. *Anat Rec* 1971; 171: 273–82.
- Smith EP, Korach KS. Oestrogen receptor deficiency: consequences for growth. *Acta Paediatr Suppl* 1996; 417: 39–43; discussion 44.
- Son BH, Kim MK, Yun YM, Kim HJ, Yu JH, Ko BS, et al. Genetic polymorphism of ESR1 rs2881766 increases breast cancer risk in Korean women. *J Cancer Res Clin Oncol* 2015; 141(4): 633–45.
- Southern EM. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 1975; 98(3): 503–17.
- Sowińska-Przepiera E, Andrysiak-Mamos E, Jarząbek-Bielecka G, Friebe Z, Syrenicz A. Effects of oestrogen deficiency on bone mineralisation in girls during "adolescent crisis". *Endokrynol Pol* 2011; 62(6): 538–46.
- Takashiba S, Naruishi K. Gene polymorphisms in periodontal health and disease. *Periodontol* 2000 2006; 40: 94–106.
- Tan X, Sun X, Gonzalez-Crussi FX, Gonzalez-Crussi F, Hsueh W. PAF and TNF increase the precursor of NF-kappa B p50 mRNA in mouse intestine: quantitative analysis by competitive PCR. *Biochim Biophys Acta* 1994; 1215(1-2): 157–62.
- Tassopoulou-Fishell M, Deeley K, Harvey EM, Sciote J, Vieira AR. Genetic variation in myosin 1H contributes to mandibular prognathism. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2012; 141(1): 51–9.
- Tetel MJ, Pfaff DW. Contributions of estrogen receptor- α and estrogen receptor- β to the regulation of behavior. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1800(10): 1084–9.

- Thomas PS. Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1980; 77(9): 5201–5.
- Todorova-Plachiyska KG, Stoilova-Todorova MG. Lateral Cephalometric Study in Adult Bulgarians with Normal Occlusion. *Folia Med (Plovdiv)* 2018; 60(1): 141–6.
- Tomoyasu Y, Yamaguchi T, Tajima A, Nakajima T, Inoue I, Maki K. Further evidence for an association between mandibular height and the growth hormone receptor gene in a Japanese population. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2009; 136(4): 536–41.
- Traub RJ, Cao D-Y, Karpowicz J, Pandya S, Ji Y, Dorsey SG, et al. A clinically relevant animal model of temporomandibular disorder and irritable bowel syndrome comorbidity. *J Pain* 2014; 15(9): 956–66.
- Turner RT, Evans GL, Wakley GK. Reduced chondroclast differentiation results in increased cancellous bone volume in estrogen-treated growing rats. *Endocrinology* 1994a; 134(1): 461–6.
- Turner RT, Riggs BL, Spelsberg TC. Skeletal effects of estrogen. *Endocr Rev* 1994b; 15(3): 275–300.
- Ushiyama T, Ueyama H, Inoue K, Ohkubo I, Hukuda S. Expression of genes for estrogen receptors alpha and beta in human articular chondrocytes. *Osteoarthritis Cartil* 1999; 7(6): 560–6.
- van der Eerden BCJ, Emons J, Ahmed S, van Essen HW, Lowik CWGM, Wit JM, et al. Evidence for genomic and nongenomic actions of estrogen in growth plate regulation in female and male rats at the onset of sexual maturation. *J Endocrinol* 2002a; 175(2): 277–88.
- van der Eerden BCJ, Gevers EF, Löwik CWGM, Karperien M, Wit JM. Expression of estrogen receptor alpha and beta in the epiphyseal plate of the rat. *Bone* 2002b; 30(3): 478–85.
- Vidal O, Lindberg M, Sävendahl L, Lubahn DB, Ritzen EM, Gustafsson JA, et al. Disproportional body growth in female estrogen receptor-alpha-inactivated mice. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 265(2): 569–71.
- Vidal O, Lindberg MK, Hollberg K, Baylink DJ, Andersson G, Lubahn DB, et al. Estrogen receptor specificity in the regulation of skeletal growth and maturation in male mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97(10): 5474–9.
- Ward JM, Rehg JE. Rodent immunohistochemistry: pitfalls and troubleshooting. *Vet Pathol* 2014; 51(1): 88–101.
- Waterston RH, Lindblad-Toh K, Birney E, Rogers J, Abril JF, Agarwal P, et al. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* 2002; 420(6915): 520–62.
- Weickert CS, Miranda-Angulo AL, Wong J, Perlman WR, Ward SE, Radhakrishna V, et al. Variants in the estrogen receptor alpha gene and its mRNA contribute to risk for schizophrenia. *Hum Mol Genet* 2008; 17(15): 2293–309.

- Weitzmann MN, Pacifici R. Estrogen deficiency and bone loss: an inflammatory tale. *J Clin Invest* 2006; 116(5): 1186–94.
- Windahl SH, Vidal O, Andersson G, Gustafsson JA, Ohlsson C. Increased cortical bone mineral content but unchanged trabecular bone mineral density in female ERbeta(-/-) mice. *J Clin Invest* 1999; 104(7): 895–901.
- Xue F, Rabie ABM, Luo G. Analysis of the association of COL2A1 and IGF-1 with mandibular prognathism in a Chinese population. *Orthod Craniofac Res* 2014; 17(3): 144–9.
- Xue F, Wong R, Rabie ABM. Identification of SNP markers on 1p36 and association analysis of EPB41 with mandibular prognathism in a Chinese population. *Arch Oral Biol* 2010; 55(11): 867–72.
- Yamaguchi T, Maki K, Shibasaki Y. Growth hormone receptor gene variant and mandibular height in the normal Japanese population. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2001; 119(6): 650–3.
- Yamaguchi T, Park SB, Narita A, Maki K, Inoue I. Genome-wide linkage analysis of mandibular prognathism in Korean and Japanese patients. *J Dent Res* 2005; 84(3): 255–9.
- Yamashiro T, Takano-Yamamoto T. Influences of ovariectomy on experimental tooth movement in the rat. *J Dent Res* 2001; 80(9): 1858–61.
- Ye S. Polymorphism in matrix metalloproteinase gene promoters: implication in regulation of gene expression and susceptibility of various diseases. *Matrix Biol* 2000; 19(7): 623–9.
- Yoon SS, Chung C-H. Comparison of craniofacial growth of untreated Class I and Class II girls from ages 9 to 18 years: a longitudinal study. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2015; 147(2): 190–6.
- Zhou J, Lu Y, Gao XH, Chen YC, Lu JJ, Bai YX, et al. The growth hormone receptor gene is associated with mandibular height in a Chinese population. *J Dent Res* 2005; 84(11): 1052–6.

ANEXO A – Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO CEUA – FORP/USP

Certificamos que o Protocolo nº 2014.1.721.58.7 sobre a pesquisa intitulada **“Avaliação do papel do estrógeno nas estruturas do complexo dento-facial”**, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Paulo Nelson Filho, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, USP, foi APROVADO em reunião da CEUA de 29/08/2014 (totalizando 40 animais).

We hereby certify that the protocol nº 2014.1.721.58.7 regarding the research entitled **“Evaluation of the role of the estrogen in the dental-facial structures”**, under the responsibility of Prof. Dr. Paulo Nelson Filho, is in accordance with the Ethical principles in animal research adopted by the Animal Research Ethics Committee of the School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Brazil, and was approved in 29/08/2014 (totalizing 40 animals).

Ribeirão Preto, 29 de agosto de 2014.

Profa. Dra. Andriara De Rossi Daldegan
Coordenadora da CEUA – FORP/USP

ANEXO B – Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO
PRETO/ FORP/ USP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Associação entre polimorfismos genéticos e alterações no perfil esquelético facial

Pesquisador: Mariele Andrade do Nascimento

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 1

CAAE: 50765715.3.0000.5419

Instituição Proponente: Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.338.841

Apresentação do Projeto:

O projeto de pesquisa em questão pretende analisar a associação entre polimorfismos genéticos e alterações no padrão esquelético facial. Pacientes em tratamento ortodôntico na clínica de especialização de Ortodontia/Ortopedia da FORP-USP, com idade superior a oito anos, serão incluídos nesse estudo. Após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido pelos pacientes ou por seus responsáveis, a determinação do fenótipo do

padrão esquelético facial será realizada por meio de teleradiografias, usando referências cefalométricas da mandíbula, da maxila e da base do crânio. Será realizada a coleta da saliva como fonte de material biológico para a extração de DNA. A genotipagem dos genes candidatos será realizada por PCR em tempo real/ Taqman. Os dados serão tabulados e analisados no programa Epi Info 7.0 e no software Plink. Todos os polimorfismos serão avaliados para verificar se estão em Equilíbrio de Hardy-Weinberg. Teste do qui-quadrado ou exato de Fisher serão utilizados para avaliar se algum alelo ou genótipo está preferencialmente associado com algum padrão esquelético facial específico. O nível de significância adotado será de 5%. A temática proposta é original e importante para a área da saúde humana. O projeto está bem estruturado, com revisão bibliográfica adequada, pertinente ao tema e atualizada. Os pesquisadores apresentam formação

Endereço: Avenida do Café s/nº

Bairro: Monte Alegre

CEP: 14.040-904

UF: SP

Município: RIBEIRÃO PRETO

Telefone: (16)3315-0493

Fax: (16)3315-4102

E-mail: cep@forp.usp.br

**FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO
PRETO/ FORP/ USP**

Continuação do Parecer: 1.338.841

acadêmica adequada para desenvolver o projeto.

Objetivo da Pesquisa:

Hipótese:

Polimorfismos genéticos participam da etiologia dos diversos Padrões Esqueléticos Faciais.

Objetivo Primário:

Avaliar a associação entre polimorfismos genéticos e alterações fenotípicas nos Padrões Esqueléticos Faciais.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

O presente projeto apresenta riscos mínimos, relacionados com possíveis desconfortos como cuspir e ocupar um pouco o tempo do paciente.

Benefícios:

Os participantes da pesquisa não terão ganhos diretos com os resultados da mesma, mas terão como benefício orientação sobre técnica de higiene bucal, limpeza.

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. Os pesquisadores são habilitados para execução do mesmo. Relevante para a área da saúde. Bem embasado cientificamente.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Adequados.

Recomendações:

Aprovado.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado.

Considerações Finais a critério do CEP:

Conforme deliberado na 186ª Reunião Ordinária do CEP, realizada em 25/11/2015.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_606659.pdf	04/11/2015 20:14:36		Aceito

Endereço: Avenida do Café s/nº

Bairro: Monte Alegre

CEP: 14.040-904

UF: SP

Município: RIBEIRÃO PRETO

Telefone: (16)3315-0493

Fax: (16)3315-4102

E-mail: cep@forp.usp.br

**FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO
PRETO/ FORP/ USP**

Continuação do Parecer: 1.338.841

Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProejtoDetalhado.docx	03/11/2015 22:12:09	Mariele Andrade do Nascimento	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.doc	03/11/2015 22:06:39	Mariele Andrade do Nascimento	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEparamenores.doc	03/11/2015 22:04:46	Mariele Andrade do Nascimento	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TermodeAssentimento.doc	03/11/2015 21:56:07	Mariele Andrade do Nascimento	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	AutorizacaodainfraestruturaLab.pdf	28/10/2015 15:47:59	Mariele Andrade do Nascimento	Aceito
Folha de Rosto	Fohaderosto.pdf	28/10/2015 14:30:24	Mariele Andrade do Nascimento	Aceito
Cronograma	cronograma.docx	20/10/2015 13:17:51	Mariele Andrade do Nascimento	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	AutorizacaodainfraestruturaClinica.pdf	20/10/2015 12:33:27	Mariele Andrade do Nascimento	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIBEIRAO PRETO, 26 de Novembro de 2015

**Assinado por:
Simone Cecilio Hallak Regalo
(Coordenador)**

Endereço: Avenida do Café s/nº

Bairro: Monte Alegre

CEP: 14.040-904

UF: SP

Município: RIBEIRAO PRETO

Telefone: (16)3315-0493

Fax: (16)3315-4102

E-mail: cep@forp.usp.br