**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
HOSPITAL DE REABILITAÇÃO DE ANOMALIAS CRANIOFACIAIS**

TULIO LORENZO OLANO DEXTRE

**Susceptibilidade genética a periodontite apical crônica em
indivíduos com fissura labiopalatina**

**BAURU
2016**

TULIO LORENZO OLANO DEXTRE

**Susceptibilidade genética a periodontite apical crônica em
indivíduos com fissura labiopalatina**

Tese apresentada ao Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências da Reabilitação.

Área de Concentração: Fissuras Orofaciais e Anomalias Relacionadas.

Orientadora: Prof^a. Dra. Lucimara Teixeira das Neves

BAURU

2016

**AUTORIZO A 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.**

O1s Olano-Dextre, Tulio Lorenzo
Susceptibilidade genética a periodontite apical crônica em indivíduos com fissura labiopalatina: Estudo caso-controle / Tulio Lorenzo Olano Dextre. Bauru, 2016. 87p.; il.; 30cm.

Tese (Doutorado – Área de concentração: Fissuras Orofaciais e Anomalias Relacionadas) – Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais, Universidade de São Paulo.

Orientadora: Prof^a. Dra. Lucimara Teixeira das Neves

1. Periodontite apical. 2. Metaloproteinase da membrana. 3. Fissura palatina. 4. Fenda labial.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Tulio Lorenzo Olano Dextre

Tese apresentada ao Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências da Reabilitação.

Área de Concentração: Fissuras Orofaciais e Anomalias Relacionadas.

Aprovado em: ____/____/2016

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____

Profa. Dra. Lucimara Teixeira das Neves - Orientadora

Faculdade de Odontologia Bauru -USP- Bauru - SP

Data de depósito da dissertação junto à SPG: ____/____/2016

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação...

A Deus, meu criador, luz e guia nesta caminhada, sem O qual seria impossível qualquer realização em minha vida.

A meus pais, Tulio e Maria Cristina por o exemplo de amor incondicional, força, coragem e sabedoria, que me ensinaram a alcançar meus sonhos, meu amor e gratidão.

A meus irmãos, Alvaro (in memoriam), Juan José e Milagros, por seu amor e companheirismo ao longo toda da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Ao Senhor, o único Mestre, pelo dom da vida, pelos talentos, pela inspiração, pela saúde e pelas oportunidades que na sua sabedoria infinita me proporciona para minha vida.

A minha família, Tulio, Maria Cristina, Juan José, Milagros, Joanne e Flavia, por todo o apoio, incentivo e carinho estando longe do lar.

*À Prof^a. Dra. Lucimara Teixeira das Neves, meu agradecimento pela oportunidade de ser seu orientado, pela atenção, respeito, dedicação e confiança depositada na realização deste trabalho, e sobretudo pela sua amizade. Não tenho palavras para agradecer tudo.
Muito Obrigado.*

Ao Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais “CENTRINHO” representado pela Prof^a Dra. Maria Aparecida de Andrade Moreira Machado

À Prof^a. Dra. Daniela Gamba Garib Carreira, presidente da Comissão de Pós-graduação, pelo trabalho e dedicação incansável.

Ao Prof. Dr. Carlos Ferreira dos Santos, por ter me recebido no Departamento de Ciências Biológicas, por ter me proporcionado a oportunidade de ter esta ótima convivência no laboratório de farmacologia e genética.

Ao Prof. Dr. Celso Kenji Nishiyama, minha gratidão, pelo auxílio incansável neste trabalho, os projetos, e sobretudo por sua amizade, meu profundo agradecimento.

À Profª. Dra. Lidiane de Castro Pinto, por sua ajuda e companheirismo neste tempo no “Centrinho” e por sua amizade, meu profundo agradecimento.

À auxiliar do setor de Endodontia do HRAAC-USP, Edna Vicente “Edninha”, por toda sua ajuda e parceria em este tempo compartilhado e por sua amizade

A todos os professores, funcionários e alunos do Departamento de Ciências Biológicas, das disciplinas de Farmacologia, Genética e Fisiologia, em especial ao prof. Flavio, Prof. Leonardo, Thiago, Viviane, Vera, Elza, Paulo, Thaisinha, Adriana, Giovana, Luís Fernando, Rubens, Daniel, Natalia, José Mateo por sua ajuda, companheirismo e amizade neste tempo, e espero que continue sempre, sobretudo nas “sextas científicas”.

Aos funcionários do Departamento de Endodontia da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo, em especial ao Prof. Dr. Marco Antônio Húngaro Duarte, por ter me permitido entrar nos arquivos dos pacientes para fazer esta pesquisa.

*Ao Centro de Pós-graduação em Odontologia, CPO-Uninga pela colaboração com esta pesquisa, sobretudo à coordenadora do curso de Especialização em Endodontia Profª. Dra. Claudia Ramos Pinheiro
Muito obrigado “Claudinha”*

Aos todos os ex-residentes do setor de Endodontia, Marcela, Pity, Renata, Maricel, Carô, Ana, Erika, Silvia e Tom; por todo este tempo compartilhado e pela amizade

Aos queridos Zezé, Tatiana, Ana, Lucy, Rogério e Andréa, pela paciência, carinho e excelente qualidade que executam seu trabalho na seção de pós-graduação.

*À equipe de profissionais da UEP e a Rosemeire Ap. G. Botelho, sempre prontos
a nos auxiliar.*

Aos voluntários que aceitaram participar do estudo, por sua colaboração

A CNPq pelo apoio financeiro no processo no. 141493/2013-5

*Agradeço a todos que contribuíram direta e indiretamente neste trabalho, pois
todos foram importantes para a sua concretização.*

Muito obrigado.

*"De tal maneira amou Deus ao mundo que deu Seu Filho Unigênito
para que todo aquele que nele crê não pereça, mas tenha a vida eterna."*

(João 3:16)

RESUMO

Olano-Dextre TL. Susceptibilidade genética a periodontite apical crônica em indivíduos com fissura labiopalatina [Tese]. Bauru: Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais, Universidade de São Paulo; 2016.

A periodontite apical é um processo inflamatório que ocorre na região do periápice, em decorrência de contaminação microbiana do sistema de canais que se origina a partir da necrose pulpar ou canais radiculares tratados inadequadamente. Estudos recentes avaliando os fatores genéticos envolvidos no desenvolvimento da periodontite apical crônica (PAC) relatam forte relação com uma predisposição genética do indivíduo e determinam que variantes polimórficas em certos genes envolvidos na remodelação da matriz óssea poderiam contribuir na persistência desta. As metaloproteinases da matriz (*MMPs*) são enzimas que estão fortemente associadas com os níveis de inflamação e desempenham um papel importante na remodelação e reabsorção óssea, e níveis elevados de *MMPs* têm relação com a deficiência de reparo da lesão induzindo a PAC. Além disso, as *MMPs* também participam do complexo desenvolvimento craniofacial o que faz com que também sejam consideradas para a ocorrência de malformações faciais. O objetivo deste trabalho foi determinar se variantes polimórficas nos genes *MMP-2* e *MMP-3*, envolvidos na resposta inflamatória estão associados a permanência de periodontite apical persistente após o tratamento endodôntico em indivíduos com fissura labiopalatina. Foram selecionados para este estudo 180 indivíduos divididos em 3 grupos: GI: 34 indivíduos com fissura labiopalatina, não síndrômicos, com história de PAC relacionada ao tratamento endodôntico; GII: 45 indivíduos sem fissura labiopalatina, não síndrômicos com história de PAC e GIII: grupo controle composto por 101 indivíduos sem fissura e sem relato de PAC. Como critério de inclusão para o diagnóstico de PAC foram considerados os escores 4 e 5 do índice PAI (PeriApical Index) analisado em radiografias periapicais de controle de um ano ou mais após o tratamento dos dentes envolvidos. Foram selecionadas para a genotipagem 3 variantes polimórficas no gene *MMP-2* (rs243865, rs2285053 e rs2287074) e 2 no gene *MMP-3* (rs679620 e rs522616). Os resultados foram analisados usando o software SDS 1.7 (Applied Biosystems) e os dados foram

tabulados no programa Excel 8.0. As comparações entre as frequências dos genótipos e alelos foram realizadas através do teste do qui-quadrado (χ^2) e Odds Ratio com intervalo de confiança de 95% (IC). Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Das variantes polimórficas pesquisadas neste grupo populacional brasileiro, foi encontrada associação positiva do rs679620 no gene *MMP-3* com a fissura labiopalatina e PAC somente quando comparado com o grupo com PAC e sem fissura. Sendo encontrada associação positiva também do rs522616 no gene *MMP-3* com PAC e sem fissura, somente no comparativo com o grupo controle. Não foi encontrada nenhuma associação positiva das variantes no gene *MMP-2* (rs243865, rs2285053 e rs2287074) nem com PAC nem com fissura labiopalatina. Dessa forma, são necessários estudos semelhantes analisando outras variantes polimórficas em outros genes envolvidos na cascata de sinalização da inflamação e na embriologia craniofacial, com amostras maiores, para esclarecer o papel do fator genético tanto para a periodontite apical crônica quanto para a fissura.

Palavras-chave: Periodontite Apical. Metaloproteinase da membrana. Fissura palatina. Fenda Labial.

ABSTRACT

Olano-Dextre TL. Genetic susceptibility to chronic apical periodontitis in individuals with cleft lip and/or palate [Thesis]. Bauru: Hospital of Rehabilitation of Craniofacial Anomalies, University of São Paulo; 2016.

Apical Periodontitis is an inflammatory process on periapical tissues, due to a microbial contamination of the canals system, arising from pulp necrosis or failed root canal treatment. Recent studies evaluating genetic factors involved on chronic apical periodontitis (CAP) show real relation with a genetic predisposition in individuals and determine whether polymorphic variability in some genes involved on bone matrix remodeling could contribute on the disease persistence. Matrix metalloproteinases (*MMPs*) are enzymes really associated with inflammation levels and take an important part of bone remodeling and resorption and high levels of *MMPs* have a relation with the lesion repair deficiency inducing CAP. Besides that, *MMPs* also participate on craniofacial development; being considered to the occurrence of some facial anomalies. The aim of this study was to determine whether polymorphic variability on genes *MMP-2* e *MMP-3* involved on inflammatory response is associated with the permanency of persistent apical periodontitis after endodontic therapy on individuals with cleft lip and/or palate. One hundred and eighty individuals were selected to this study, which was divided in 3 groups: GI: 34 individuals with cleft lip and/or palate, nonsyndromic, with CAP related to endodontic treatment; GII: 45 individuals without cleft lip and/or palate, nonsyndromic, with CAP, GIII: control group composed by 101 individuals without cleft and without report of chronic apical periodontitis. As inclusion criteria to CAP diagnosis were considered 4 and 5 of PAI score (Periapical Index) analyzed on control periapical radiographies after one year or more after treatment of the teeth involved. Were selected for genotyping 3 polymorphic variabilities on gene *MMP-2* (rs243865, rs2285053 e rs2287074) and 2 on gene *MMP-3* (rs679620 e rs522616) were selected to genotyping. Results were analyzed by software SDS 1.7 (Applied Biosystems) and data were tabulated on 8.0 Excel program. Comparison among genotype frequencies and alleles were performed through qui square test (χ^2) and Odds Ratio with 95% confidence. Values of $p < 0,05$ were considered statistically significant. From polymorphic variability

evaluated on this Brazilian group, it was only observed a positive association between rs679620 on *MMP-3* gene with cleft lip and palate and chronic apical periodontitis only when compared with chronic apical periodontitis group and without cleft lip and palate. A positive association was also found on rs522616 gene *MMP-3* with chronic apical periodontitis and without cleft lip and palate, only when compared to control group. It was not found any positive association of the variability of *MMP-2* (rs243865, rs2285053 e rs2287074) gene neither with chronic apical periodontitis nor with cleft lip and palate. Therefore, other studies are required to analyze other polymorphic variability on other genes involved on inflammation cascade of signaling and craniofacial embryology with more samples, to a better understanding of genetic influence not only on chronic apical periodontitis but also on cleft lip and/or palate

Keywords: Apical Periodontitis. Matrix Metalloproteinases, Membrane-Associated. Cleft Palate. Cleft Lip.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - PAI escore.....	39
----------------------------	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características da população estudada, gênero e idade.	47
Tabela 2 - Distribuição dos tipos de fissura labiopalatina GI.....	48
Tabela 3 - Característica dos genes <i>MMP-2</i> e <i>MMP-3</i> investigados neste estudo.	48
Tabela 4 - Comparação do GI vs GII para o rs243865 no gene <i>MMP-2</i>	49
Tabela 5 - Comparação do GI vs GIII para o rs243865 no gene <i>MMP-2</i>	49
Tabela 6 - Comparação do GII vs GIII para o rs243865 no gene <i>MMP-2</i>	50
Tabela 7 - Comparação do GI vs GII para o rs2287074 no gene <i>MMP-2</i>	50
Tabela 8 - Comparação do GI vs GIII para o rs2287074 no gene <i>MMP-2</i>	50
Tabela 9 - Comparação do GII vs GIII para o rs2287074 no gene <i>MMP-2</i>	51
Tabela 10 - Comparação do GI vs GII para o rs2285053 no gene <i>MMP-2</i>	51
Tabela 11 - Comparação do GI vs GIII para o rs2285053 no gene <i>MMP-2</i>	51
Tabela 12 - Comparação do GII vs GIII para o rs2285053 no gene <i>MMP-2</i>	52
Tabela 13 - Comparação do GI vs GII para o rs679620 no gene <i>MMP-3</i>	52
Tabela 14 - Comparação do GI vs GIII para o rs679620 no gene <i>MMP-3</i>	53
Tabela 15 - Comparação do GII vs GIII para o rs679620 no gene <i>MMP-3</i>	53
Tabela 16 - Comparação do GI vs GII para o rs522616 no gene <i>MMP-3</i>	54
Tabela 17 - Comparação do GI vs GIII para o rs522616 no gene <i>MMP-3</i>	54
Tabela 18 - Comparação do GII vs GIII para o rs522616 no gene <i>MMP-3</i>	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

USP	Universidade de São Paulo
FOB	Faculdade de Odontologia de Bauru
HRAC	Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais
CPO	Centro de Pós-Graduação em Odontologia
PA	Periodontite Apical
PAC	Periodontite Apical Crônica
MMPs	Metaloproteinases da matriz
PAI	Periapical index
IC	Intervalo de confiança
X²	Qui-quadrado
SNP	Polimorfismo de nuclotideo único
TIMPs	Inibidores teciduais de metaloproteinases
ILs	Interleucinas
LAFFIC	Laboratório de Farmacologia e Fisiologia Clínica
mL	mililitro
µL	microlitro
ng	nanogramas
rpm	Revoluções por minuto
PCR	Reação em cadeia de polimerases
DNA	Ácido desoxirribonucleico
TBI	Fissura transforame incisivo bilateral
ELISA	Teste de imunoabsorção enzimática

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA	15
1.1	PERIODONTITE APICAL CRÔNICA (PAC).....	17
1.2	VARIANTES POLIMÓRFICAS E A PERIODONTITE APICAL CRÔNICA	20
1.3	FISSURA LABIOPALATINA E AS VARIANTES POLIMÓRFICAS NAS <i>MMPs</i>	25
	JUSTIFICATIVA DO ESTUDO	29
2	OBJETIVO	31
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	35
3.1	CASUÍSTICA	37
3.2	CRITÉRIOS PARA A SELEÇÃO DA AMOSTRA	38
3.3	MÉTODOS	40
3.3.1	COLETA DE SALIVA.....	40
3.3.2	PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO.....	41
3.3.3	QUANTIFICAÇÃO DO DNA EXTRAÍDO DA SALIVA.....	41
3.3.4	DILUIÇÃO DAS AMOSTRAS DE DNA PARA GENOTIPAGEM.....	42
3.3.5	SELEÇÃO DE GENES CANDIDATOS E DE SNPs	42
3.3.6	GENOTIPAGEM.....	42
3.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA	43
4	RESULTADOS.....	45
4.1	CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA.....	47
4.2	RESULTADOS DA GENOTIPAGEM.....	48
5	DISCUSSÃO	55
6	CONCLUSÃO.....	65
	REFERÊNCIAS	69
	ANEXOS	83

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

1.1 PERIODONTITE APICAL CRÔNICA (PAC)

O termo periodontite apical (PA) é o termo mais utilizado para caracterizar o processo inflamatório que ocorre na região periapical, em decorrência de contaminação microbiana dos tecidos periapicais que se origina a partir de uma necrose pulpar ou canais radiculares tratados inadequadamente (VAN DER WAAL; LAPPIN; CRIELAARD, 2015; AN et al., 2016, PROVENZANO et al., 2016, SEGURANGEA et al., 2016), e sua interação com a defesa do hospedeiro, na interface entre o canal radicular e o ligamento periodontal (SOUSA et al., 2014).

Os microrganismos e suas toxinas podem alcançar a polpa dentária como consequência da cárie dentária, trauma ou procedimentos odontológicos. Muitas vezes essa contaminação pulpar envolve microrganismos, predominantemente gram-negativos e microbiota bacteriana anaeróbia (NAIR, 2004; ABBOTT, 2004, KAYA et al., 2012, AN et al., 2016). Uma vez instalados, inicialmente causam alterações pulpares próprias do processo inflamatório e consequentemente, se o processo não for tratado leva a infecção e necrose pulpar. A partir de então, dependendo da virulência microbiana e da resistência imunológica do indivíduo, podem avançar em direção aos tecidos periapicais (NAIR, 2004; ESTRELA et al., 2016). Como mecanismo de defesa do próprio organismo humano contra agentes agressores e com a finalidade de evitar que a infecção se espalhe por todo o osso alveolar, grande parte do tecido periapical relacionado com a polpa comprometida, é destruído. Portanto, o resultado de todo esse processo evolutivo patológico é a reabsorção óssea e a substituição dessa área por tecido inflamatório (RICUCCI et al., 2000; HUUMONEN; ØRSTAVIK, 2002; NAIR, 2004; ABBOTT, 2004; CONSOLARO, 2008; COTTI, 2010, AN et al., 2016; LEONARDI DUTRA et al., 2016).

Sinais clínicos e sintomas que podem estar associados aos diferentes estágios da PA são: dor, edema, presença de fístula, febre e prostração em casos agudos mais graves (HUUMONEN; ØRSTAVIK, 2002; ABBOTT, 2004; ROSENBERG, 2014; WESSELINK, 2014, VAN DER VEKEN et al., 2016). No

entanto, a periodontite apical crônica (PAC) frequentemente se desenvolve sem sintomas objetivos ao indivíduo e, por esse motivo, os exames de imagem exercem papel importante para a detecção do processo inflamatório crônico (ØRSTAVIK et al., 1986; HUUMONEN; ØRSTAVIK, 2002; ABBOTT, 2004; COTTI, 2010; ROSENBERG, 2014; KIMAK et al, 2015; VAN DER VEKEN et al., 2016; LEONARDI DUTRA et al., 2016). Apesar de muitas vezes assintomáticas (ABBOTT, 2004; KIMAK et al, 2015), essas lesões constituem um risco importante para a saúde bucal e geral, devendo ser corretamente diagnosticadas e tratadas (LOFTUS et al., 2005; COSTA et al, 2014; WASSELINK, 2014; AN et al., 2016; BAEZA et al., 2016).

A PAC é caracterizada por uma infecção crônica de origem endodôntica (COSTA et al., 2014, ANTUNES et al., 2015, PROVENZANO et al., 2016). A diferença entre uma PA aguda e PAC, é que a PA aguda é radiograficamente indetectável e não apresenta registro radiográfico, pois para que seja visualizada deve atingir um limite suficiente de destruição óssea, de pelo menos 30%, para ser detectável radiograficamente (AN et al., 2016; VAN DER VEKEN et al., 2016). A PAC ocorre quando a inflamação aguda falha na resolução do processo que pode ser acionado por um processo pro-inflamatório desregulado, onde seu início é atrasado, mas pode perdurar por um tempo ilimitado (VAN DER WAAL; LAPPIN; CRIELAARD, 2015); ou pela persistência do agente agressor.

Critérios diagnósticos para PAC incluem a presença dos sintomas e sinais clínicos durante o exame clínico e análise de radiografias (periapicais ou panorâmica). A análise radiográfica é importante porque a PAC é muitas vezes assintomática e não tratada. Apesar do risco relativamente baixo de exacerbações (menos de 5%), a influência da PAC em órgãos e tecidos afastados persiste mesmo na sua forma subaguda crônica (MURRAY; SAUNDERS, 2000; VAN DER VEKEN et al., 2016; BEACH, 2016). O diagnóstico da PAC representa uma estratégia essencial para determinar a seleção de um protocolo terapêutico eficaz para o controle da infecção endodôntica (NAIR et al., 1999; VAN DER VEKEN et al., 2016).

Como consequência da perda óssea estrutural resultante da reabsorção em decorrência da PAC, radiograficamente observa-se uma imagem radiolúcida (denominação em radiografias periapicais ou panorâmicas) ou hipodensa (denominação em imagens de tomografia computadorizada) na região periapical do dente afetado (ØRSTAVIK et al., 1986; ABBOTT, 2004; TANOMARU-FILHO et al.,

2010; TODD, 2014; DEXTRE et al., 2014). Dependendo do aspecto da imagem, o diagnóstico do tipo de lesão periapical pode ser presumido, em conjunto com uma minuciosa anamnese e o exame clínico do paciente (BECCONSALL-RYAN et al., 2010; COTTI, 2010; DEXTRE et al., 2014; KRUSE et al., 2015).

Dentre as lesões periapicais crônicas estão o granuloma periapical, o cisto periodontal apical e o abscesso dento-alveolar crônico. Os aspectos radiográficos são didaticamente descritos como imagem radiolúcida/hipodensa delimitada e raramente atingindo dimensões maiores que 1 cm (granuloma); circunscrita, bem delimitada e de dimensões maiores (cisto), e mal definida ou difusa (abscesso dento-alveolar crônico) (ABBOTT, 2004; CONSOLARO, 2008; OKADA et al., 2015). A determinação exata do tipo de lesão só é possível por meio de avaliação histológica, uma vez que as imagens podem ser muito semelhantes gerando dificuldade no diagnóstico, sobretudo no diagnóstico diferencial entre granuloma e cisto (RAMACHANDRAN NAIR et al., 1996; HUUMONEN; ØRSTAVIK, 2002; AGGARWAL; SINGLA, 2010; BECCONSALL-RYAN et al., 2010; ROSENBERG et al., 2010; PEREIRA FAUSTINO; AZEVEDO; TAKAHAMA, 2016; HADZIABDIC et al., 2016; KANAGASINGAM et al., 2016).

O fator crucial para a reestruturação da região periapical é a adequada instrumentação e completa obturação do canal radicular, uma vez que o princípio terapêutico de qualquer doença inflamatória baseia-se na identificação e eliminação do fator causal (CONSOLARO, 2008). No caso de lesões periapicais decorrentes como a PAC, o tratamento endodôntico executado adequadamente promove a eliminação da microbiota e de restos necróticos pulpare (RICUCCI et al., 2000; DE MOOR et al., 2000; DUGAS et al., 2003; NAIR, 2004; SIQUEIRA et al., 2005; KIRKEVANG et al., 2007; TOURÉ et al., 2008; SAINI; SANGWAN; SANGWAN, 2015; TANG; WANG; JIANG, 2015).

Outro fator que influencia a prevalência da PAC é a qualidade da restauração definitiva realizada posteriormente a finalização do tratamento endodôntico. Dentes com restaurações inadequadas foram associados a maior ocorrência de PAC devido à infiltração microbiana marginal (KIRKEVANG et al., 2007; HOMMEZ et al., 2002; SEGURA-EGEA et al., 2004; KAYAHAN et al., 2008).

Com relação a prevalência de PA em dentes tratados endodonticamente, existe uma grande variação entre as populações e países, variando de 22% a 80% nos indivíduos adultos (HUUMONEN; SUOMINEN; VEHKALAHTI, 2016). Esta variação depende, pelo menos em parte, das diferenças quanto a idade e gênero dos sujeitos selecionados nos estudos populacionais, sobre o tamanho e a possível tendência da amostra, bem como dos diferentes métodos utilizados para avaliar a PA (HUUMONEN; SUOMINEN; VEHKALAHTI, 2016). A persistência da PA após o tratamento de canal adequado, pode ocorrer em cerca de 31 a 36% (USA) e 24 a 65% (países europeus) dos casos levando a uma PAC (RÔÇAS et al., 2014; DI FILIPPO; SIDHU; CHONG, 2014; SIQUEIRA et al., 2014; AMINOSHARIAE; KULILD, 2015; SEGURA EGEA et al., 2016; VAN DER VIKEN et al., 2016; HUUMONEN; SUOMINEN; VEHKALAHTI, 2016). A prevalência de PA em dentes com tratamento de canal em indivíduos com fissura labiopalatina varia de 19,6% se for avaliado com radiografias periapicais, a 67,4% se for avaliado com tomografia computadorizada de feixe cônico (DEXTRE et al., 2015).

A causa primária da persistência da PAC é a infecção bacteriana intraradicular, mas existe a possibilidade de que fatores relacionados ao hospedeiro atuem como modificadores da doença, o que poderia influenciar a remissão das lesões (HADZIABDIC et al., 2016). Entre estes modificadores da doença estão incluídas algumas condições sistêmicas e os aspectos de origem genética, como as variantes polimórficas; esses fatores, de certa forma, podem ajudar a explicar as diferentes respostas ao tratamento dependendo do paciente (RÔÇAS et al., 2014; SIQUEIRA et al., 2014; HADZIABDIC et al., 2016).

1.2 VARIANTES POLIMÓRFICAS E A PERIODONTITE APICAL CRÔNICA

As variantes polimórficas (SNPs) também conhecidas como polimorfismos de nucleotídeo único, são o tipo mais comum de variação na sequência do DNA humano. Um SNP ocorre quando um único nucleotídeo é substituído no genoma humano e para que receba essa nomenclatura precisa ocorrer com uma frequência de pelo menos 1% na população (AMAYA et al., 2013). A ocorrência de SNPs pode interferir no padrão de expressão de um gene (SIQUEIRA et al., 2009). Dessa forma,

os SNPs representam um tipo de variante genética que pode induzir às respostas inflamatórias e imunológicas em geral, e assim poderia influenciar uma resposta diferente de acordo com o perfil genético do indivíduo, podendo contribuir como um fator importante para algumas doenças (MORSANI et al., 2011), como é o caso da PAC.

O reparo das lesões periapicais após o tratamento endodôntico envolve interações entre as células e o ambiente que as circunda, o que inclui a matriz extracelular e outros mediadores. A resposta local imune do hospedeiro a fatores irritantes desencadeia uma cascata de acontecimentos envolvidos na cicatrização, incluindo eventos inflamatórios vasculares e celulares, migração celular, proliferação e diferenciação, angiogênese e epitelização, deposição de matriz e remodelação de tecido ósseo comprometido (ARANHA et al., 2013; OZEKI et al., 2014).

Todo esse processo sofre influência de vários genes, entre eles: interleucinas (*IL-1 β* , *IL-1 α* , *IL-6*, *IL-8*, *IL-10*), os receptores para imunoglobulina G (*Fc γ RIIA*, *Fc γ RIIIA*, *Fc γ RIIIB*), fator de necrose tumoral (*TNF- α*), receptor ativador do ligante fator nuclear-kB (*RANKL* / *RANK*), sistema osteoprotegerina (*OPG*), cluster de diferenciação 14 (*CD14*), receptor do tipo Toll 4 (*TLR4*), metaloproteinases da matriz (*MMP-1*, *MMP-2*, *MMP-3*, *MMP-8*, *MMP-9*) e seus inibidores teciduais de metaloproteinase (*TIMPs*), (AMINOSHARIDE; KULILD, 2015), onde as células são induzidas a se diferenciar, proliferar ou manter-se em repouso assumindo a reestruturação do tecido danificado (GRAVES; OATES; GARLET, 2011; FUKUDA et al., 2009). Um desequilíbrio nessa cascata de eventos pró e anti-inflamatórios que tem como objetivo final promover a cicatrização das lesões pode provocar a destruição do tecido (GARLET et al., 2012)

As lesões periapicais são consequência desta resposta local imune frente à infecção bacteriana do sistema de canais radiculares, desde a polpa dental até o forame apical, resultando na destruição do osso circundantes ao ápice (ARANHA et al., 2013; OZEKI et al., 2014; ESTRELA et al., 2016). Uma das enzimas responsáveis pela degradação do substrato pericelular ou matriz extracelular, são as metaloproteinases da matriz (*MMPs*) (JAIN; BAHUGUNA, 2015).

As *MMPs* são enzimas de uma importante família de endopeptidases dependentes de metais; que inicialmente são secretadas em forma de pró-enzimas e

que requerem ativação extracelular, estão reguladas por inibidores endogenamente secretados, os *TIMPs* (HILL et al., 1994; PAULA-SILVA; DA SILVA; KAPILA, 2010; LETRA et al., 2013). Elas podem ser armazenadas em grânulos de células inflamatórias, mas são mais frequentemente encontradas secretadas e ancoradas à superfície da matriz extracelular (CARNEIRO et al, 2009).

Várias *MMPs* se expressam no tecido ósseo durante a ossificação endocondral no decorrer do desenvolvimento embrionário e na modelação e remodelação de osso pós-natal e durante toda a vida (KRANE; INADA, 2008).

As *MMPs* representam a classe principal de enzimas responsáveis pela degradação dos componentes da matriz extracelular do osso que é frequentemente induzido por citocinas com atividade de reabsorção óssea, como as interleucinas (*ILs*) (PAULA-SILVA; DA SILVA; KAPILA, 2010; LETRA et al., 2013; JAIN; BAHUGUNA, 2015; LU et al., 2015). As *MMPs* têm um papel importante durante o desenvolvimento da patologia periapical, implicado como a chave na iniciação da fase de reabsorção do osso que ocorre na PA, este processo de reabsorção osteoclástica remove a camada de colágeno da superfície do osso antes da desmineralização começar (COROTTI et al., 2009; CARNEIRO et al., 2009; PAULA-SILVA; DA SILVA; KAPILA, 2010; OZEKI et al., 2014; ANDRADE et al., 2016). Alguns membros da família das *MMPs* (*MMP-3*) podem inativar mediadores pró-inflamatórios, aumentar a eliminação de células inflamatórias e regular as condições inflamatórias, indicando que as *MMPs* estão envolvidas na destruição de tecidos e cicatrização de lesões (EBA et al., 2012; TAKIMOTO et al., 2014).

Na PA, a degradação de colágeno devido à infecção bacteriana dentro do sistema de canais radiculares é um dos processos que tem sido atribuído à presença de *MMPs*. No caso, a persistência dos microrganismos após o tratamento de canal tem sido associada à presença de desorganização tecidual grave e ao aumento dos níveis de *MMPs* nas áreas periapicais, está relacionada as suas várias funções no tecido ósseo como a remodelação e resposta imune (BEIDLER et al., 2008; LIU et al., 2009; PAULA-SILVA; DA SILVA; KAPILA, 2010; JAIN; BAHUGUNA, 2015). A expressão de *MMP* nas áreas periapicais, circundando processos inflamatórios agregados ao comprometimento endodôntico, tem sido confirmada em vários estudos, especificamente a *MMP-1* vem sendo investigada e observada a sua expressão em estudos realizados por meio de análise de cistos radiculares humanos

(LIN et al., 1997) e PA induzidas em ratos (HONG et al., 2004), sendo considerada uma das enzimas chave na iniciação da reabsorção óssea da lesão periapical. Outras metaloproteinases da matriz encontrados na PA foram: *MMP-2*, *MMP-3*, *MMP-8*, *MMP-9* e *MMP-13* (JAIN; BAHUGUNA, 2015)

Nos estudos de Menezes-Silva et al. (2012) e Ozeki et al. (2015) os autores observaram um aumento significativo nos níveis de expressão de *MMP-1*, *MMP-2* e *MMP-3* em lesões periapicais humanas, adicionalmente, há evidências que o *MMP-2* participa de forma importante na patogênese da destruição do tecido pulpar, periodontal e periapical, havendo também correlação entre os níveis de endotoxinas e a expressão *MMP-2* (HERRERA et al., 2015; PEREIRA FAUSTINO; AZEVEDO; TAKAHAMA, 2016).

A expressão de *MMPs* na região periapical têm sido, em avaliações histológicas, relacionada também à cistos periapicais e granulomas em seres humanos (WOESSNER, 1991; BIRKEDAL-HANSEN et al., 1993; CARNEIRO et al., 2009; PAULA-SILVA; DA SILVA; KAPILA, 2010; JAIN; BAHUGUNA, 2015; ANDRADE et al., 2016).

Níveis elevados de *MMPs* têm sido encontrados em dentes com PA tratados em uma única sessão (PAULA-SILVA; DA SILVA; KAPILA, 2010), e em lesões periapicais não reparadas (LIU et al., 2009). No entanto também devem ser considerados os fatores genéticos e microbianos como potenciais moduladores da expressão das *MMPs*, o que poderia resultar em lesões periapicais relacionadas à PAC (NAIR, 2006; GARLET et al., 2012; SIQUEIRA et al., 2009; MORSANI et al., 2011; MENEZES-SILVA et al., 2012; JAIN; BAHUGUNA, 2015).

No estudo de Jain e Bahuguna (2015), os autores relatam que na PAC, a *MMP-8* foi detectada imunohistoquimicamente em neutrófilos polimorfonucleares, macrófagos e células plasmáticas. A PAC é um processo complexo envolvendo bactérias e seus produtos, além de imunoglobulinas, citocinas pró-inflamatórias e outros mediadores inflamatórios. Os neutrófilos polimorfonucleares, que funcionam como a primeira barreira contra a invasão bacteriana, além da destruição das bactérias, promovem também danos aos tecidos circundantes por meio da ação das *MMPs*, especialmente a *MMP-8*. Também as *MMP-1*, *MMP-2* e *MMP-3* foram detectadas nas células plasmáticas, linfócitos e macrófagos presentes na lesão. Os

monócitos/macrófagos periapicais expressando *MMP-8* e *MMP-13*, atuam tanto no ambiente intracelular (fagocitose) quanto no processo extracelular (destruição do tecido). Os osteoclastos tendem a reabsorver o tecido ósseo na periferia da PAC, evento que é parcialmente mediado pelas *MMPs*, especialmente *MMP-9*. As *MMPs* presentes na PAC podem ser responsáveis pela degradação da matriz extracelular e dos resíduos de produtos após a dissolução dos osteoclastos no tecido ósseo durante a formação da PAC. O processo inflamatório e destruição dos tecidos na PAC são induzidos pela presença de bactérias, e estas, desencadeiam a liberação de *MMPs* e ativação pelos polimorfonucleares. Em adição a outro mecanismo de destruição óssea, as *MMPs* também exercem um papel destrutivo na PAC. O objetivo do tratamento endodôntico frente a PAC é remover as bactérias, fatores de virulência e toxinas, minimizando assim a reação inflamatória na região apical; uma vez que a área fica liberada de bactérias e seus produtos, o processo inflamatório e células inflamatórias diminuem. Assim levando em consideração que ocorre aumento de expressão das *MMPs* no tecido periapical circundante a polpa inflamada, associado ao fato de que quando a resposta inflamatória diminui, o nível de *MMPs* também diminui, os autores concluem que as *MMPs* desempenham um papel importante na degradação da estrutura de colágeno associada a processos inflamatórios. Ao mesmo tempo, as *MMPs* são também consideradas um componente essencial no processo fisiológico de remodelação do tecido destruído (JAIN; BAHUGUNA, 2015).

Os estudos avaliando os fatores genético envolvidos na evolução de lesões periapicais crônicas, relatam forte relação dessas lesões com a expressão local exacerbada de *MMPs* e *TIMPs* (LETRA et al., 2013). No entanto, estudos recentes propõem que, além disso, pode existir uma predisposição genética do indivíduo, e que variantes polimórficas em certos genes envolvidos na remodelação da matriz óssea poderiam contribuir na persistência da periodontite apical crônica (SIQUEIRA et al., 2009; PAULA-SILVA; DA SILVA; KAPILA, 2010; MORSANI et al., 2011; JAIN; BAHUGUNA, 2015; LU et al., 2015; DILL et al., 2015; PEREIRA FAUSTINO; AZEVEDO; TAKAHAMA, 2016).

1.3 FISSURA LABIOPALATINA E AS VARIANTES POLIMÓRFICAS NAS MMPs

A fissura labiopalatina é uma alteração congênita resultante da deficiência ou falta de coalescência dos processos faciais e/ou palatinos, durante o período embrionário e início do período fetal (TRINDADE; SILVA FILHO, 2007; FREITAS et al., 2012). Das malformações craniofaciais, que envolvem a face e a cavidade bucal, a fissura labiopalatina representa a mais comum (TRINDADE; SILVA FILHO, 2007; FREITAS et al., 2012), sendo 65% de todas as anomalias craniofaciais em seres humanos (LETRA et al., 2012; LETRA et al., 2014).

A prevalência da fissura labiopalatina ocorre numa proporção aproximada de 1 a cada 500 a 700 nascidos vivos (VANDERAS, 1987; TOLAROVÁ; CERVENKA, 1998; MOSSEY, 2006; CYMROT et al., 2010; HARILA et al., 2013; LESLI et al., 2016), esta é variável de acordo com a etnia, sendo a asiática a mais atingida, 1 a cada 440 nascidos vivos, seguida pela caucasiana, 1 a cada 650 nascidos vivos, e a africana, 1 a cada 2000 nascidos vivos (TRINDADE; SILVA FILHO, 2007; LETRA et al., 2012). No Brasil aceita-se que a proporção é de 1 para cada 650 nascidos vivos. As fissuras podem apresentar diversos graus de severidade, envolvendo total ou parcialmente o lábio, rebordo alveolar e palato (TRINDADE; SILVA FILHO, 2007, SÁ et al., 2016).

A fissura labiopalatina pode apresentar-se de duas formas, como fissuras isoladas ou não-sindrômicas, ou dentro do fenótipo das síndromes, chamadas de fissuras sindrômicas. Vários estudos sugerem que 60% a 70% dos casos são fissuras isoladas não associadas a síndromes. Os restantes 30% a 40% dos casos ocorrem como um padrão de malformações múltiplas e são classificados como uma síndrome relacionada com alterações cromossômicas, transtorno Mendeliano ou exposição a agente teratogênico conhecido (FREITAS et al., 2012; MOHAMAD SHAH et al., 2016).

Nas fissuras labiopalatinas existem várias classificações para descrever os diferentes fenótipos (ALLORI et al., 2015). De acordo com o tipo de fissura pode ocorrer envolvimento da crista alveolar, o que pode acarretar comprometimentos na odontogênese, pois os germes dentários estão localizados nessa região da crista, que então se torna susceptível a alterações dentárias, como de número, posição e forma (HUSSNE et al., 2009; SÁ et al., 2016).

Uma alta prevalência de cárie dentária em indivíduos com fissuras foi observada por vários autores e pode estar relacionada às peculiaridades bucais, como a presença de anomalias dentárias de número, posição e forma, fibrose de lábio e ausência de sulco vestibular na área operada, prejudicando a autolimpeza e higiene bucal (AHLUWALIA et al., 2004; CHENG; MOOR; HO, 2007; MUTARAI; RITTHAGOL; HUNSRISAKHUN, 2008; SUNDELL et al., 2013; XIAO; ZHANG; XU, 2015; ANTONARAKIS; PALASKA; HERZOG, 2016). A progressão da cárie dentária é o motivo mais frequente para a realização de tratamento endodôntico; uma vez que os pacientes enfrentam mais dificuldades em manter a higiene bucal, devido à condição bucal em si, dessa forma a higiene deficiente pode levar a ocorrência de cárie dentária e na evolução clínica dessa patologia a contaminação pode envolver a polpa dentária levando à necessidade de tratamento endodôntico (HUSSNE et al., 2009).

A etiologia das fissuras labiopalatinas é controversa, sendo possivelmente determinada pela interação de fatores genéticos e ambientais o que determina um padrão de herança multifatorial (TRINDADE; SILVA FILHO, 2007; FREITAS et al., 2012; LESLIE et al., 2016). Estima-se que muitos genes entre eles: *BMP4*, *FGF10*, *FGF8*, *FGFR1*, *FGFR2*, *FGFR3*, *FOXE1*, *GLI2*, *JAG2*, *LHX8*, *MSX1*, *MSX2*, *MMPs*, *NUDT6*, *PAX9*, *PTCH1*, *PVR*, *PVRL1*, *PVRL2*, *RYK*, *SATB2*, *SKI*, *SPRY2*, *TBX10*, *TGFB3* e *TP63*, atuando individualmente e/ou em conjunto, possam estar envolvidos na etiologia, fazendo com que o componente genético ainda permaneça pouco conhecido (LESLIE; MURRAY, 2013; LETRA et al., 2014; WOLF et al., 2015; LESLIE et al., 2016)

Durante o desenvolvimento embrionário ocorrem muitos eventos de remodelação dos tecidos e uma característica importante é a degradação oportuna da matriz extracelular. Esta degradação é regulada precisamente sob condições fisiológicas normais, mas quando desregulada pode ser causa de múltiplas doenças. Vários tipos de proteínas estão envolvidas na degradação da matriz extracelular e as *MMPs* tem um papel fundamental, participando ativamente durante a embriogênese e a homeostase dos tecidos em adultos (NAGASE; VISSE; MURPHY, 2006; LETRA et al., 2014; SABÓIA et al., 2015). A remodelação da matriz extracelular é dos eventos cruciais a ser considerado no qual poderia ocorrer algum distúrbio que poderia levar a falhas durante o desenvolvimento craniofacial (LETRA et al., 2012;

LETRA et al., 2014; SABÓIA et al., 2015) e estas falhas em qualquer momento no desenvolvimento embrionário dos processos faciais e palatinos poderiam levar a ocorrência das fissuras orofaciais (LETRA et al., 2007; KRIVICKA-UZKURELE, PILMANE, AKOTA, 2008; SABÓIA et al., 2015).

Varios trabalhos com modelos animais demonstraram fortes evidências dos genes das *MMPs* como candidatos à fissura labiopalatina (IAMAROON et al., 1996; MORRIS-WIMAN, DU, BRINKLEY, 1999; MORRIS-WIMAN, BURCH, BASCO, 2000; BLAVIER et al., 2001; BROWN et al., 2002; DE OLIVEIRA DEMARCHI et al., 2010; FRANÇOIS-FIQUET et al., 2014). Os genes das *MMPs* podem ser considerados como um grupo de genes candidatos devido ao seu papel importante na modelação craniofacial, por sua capacidade de degradar todos os componentes da matriz extracelular (LETRA et al., 2007; SMANE, PILMANE, AKOTA, 2013; FRANÇOIS-FIQUET et al., 2014). Especialmente *MMP-2* e *MMP-3* foram associados ao evento de modulação durante a remodelação da matriz extracelular na palatogênese (LETRA et al., 2007; LETRA et al., 2012; LETRA et al., 2014; SABÓIA et al., 2015).

Letra et al. (2007) investigaram, em estudo do tipo caso-controle, se polimorfismos nos genes *MMP-1* e *MMP-3* poderiam estar associados às fissuras labiopalatinas. Como resultados os autores encontraram diferenças significativas entre casos e controles para os SNPs no gene *MMP-3*, não sendo encontradas diferenças significantes para os SNPs no gene *MMP-1*. Concluíram que há associação entre o polimorfismo (rs3025058) no gene *MMP-3* e as fissuras labiopalatinas. Contudo ressaltam que a extensão com que este polimorfismo possa contribuir efetivamente para a ocorrência da fenda ainda precise ser esclarecida.

Ainda nessa linha de investigação de polimorfismos em *MMPs* e fissuras, Letra et al. (2012) investigaram a associação de 45 polimorfismos em 14 genes *MMPs* e *TIMPs* em 494 indivíduos com fissura labiopalatina não síndrômica e 413 indivíduos sem fissura como grupo controle. Dois polimorfismos, um (rs522616) no gene *MMP-3* e outro (rs8179096) no gene *TIMP-2* mostraram associação significativa com todos os tipos de fissura labiopalatina. Concluíram que este estudo fornece uma nova evidência de que variação no gene *MMP-3* pode contribuir com a ocorrência do fenótipo da fissura labiopalatina não síndrômica e apoia o envolvimento também do gene da *TIMP-2* como um gene de susceptibilidade à fissura labiopalatina. Embora reforce que estudos adicionais ainda são necessários

para desvendar o mecanismos exato pelo qual *MMP-3* e *TIMP-2* contribuiriam para o fenótipo da fissura.

Smane, Pilmane e Akota (2013) detectaram a expressão do *MMP-2* e *TIMP-2* e apoptose no tecido facial em crianças com fissura completa bilateral. Para este estudo foram utilizadas amostras de tecido de 19 pacientes com fissura completa bilateral e de 11 indivíduos sem fissura. As amostras do grupo com fissura foram coletadas durante a cirurgia corretiva do lábio e no grupo controle no momento de extração dentária. Todas as amostras de tecido foram processadas para detecção de expressão *MMP-2*, *TIMP-2* e apoptose. Os resultados mostraram que células do tecido conjuntivo apresentaram uma expressão inferior de *TIMP-2* no grupo controle, estatisticamente significativa, em comparação com o grupo fissura. Concluíram que células do tecido conjuntivo com níveis aumentados de *TIMP-2* evidenciam uma diminuição da apoptose local em pacientes com fissura labiopalatina e além disso os níveis de expressão destacados de *MMP-2* detectado no tecido mole da área da fissura analisado indicam um possível aumento da remodelação do tecido.

Após encontrar associação positiva de polimorfismos nos genes *MMP-3* e *TIMP-2* com a fissura labiopalatina em humanos, Letra et al. (2014) examinaram os efeitos funcionais desses dois polimorfismos no gene *MMP-3* (rs522616 e rs3025058), e um (rs8179096) no gene *TIMP-2* (rs8179096). Os resultados desse trabalho fornecem novas evidências de que os polimorfismos na região promotora dos genes *MMP-3* e *TIMP-2* são funcionais e podem afetar a ligação de moléculas sinalizadoras nessas regiões com possíveis efeitos sobre o desenvolvimento craniofacial o que poderia levar a ocorrência da fissura labiopalatina.

Sabóia et al. (2016) investigaram a associação epidemiológica e molecular entre fissura labiopalatina e câncer. Também foi pesquisado a associação entre polimorfismos nos genes *AXIN2*, *BMP2*, *BMP4*, *BMP7*, *DLX1*, *DLX2*, e *MMP-3* e fissura labiopalatina com ou sem história de câncer. Para tal forma, foram genotipados 148 núcleos familiares com fissura labiopalatina e 162 indivíduos sem defeitos congênitos. Concluíram que as fissuras labiopalatinas foram associadas à história familiar positiva de câncer e com variantes nos genes *DLX-1* e *MMP-3*. Sendo que o polimorfismo no gene *DLX-1* foi associado com fissura labiopalatina, e o do gene *MMP-3* foi associado só a fissura de palato.

Apesar de alguns trabalhos publicados sobre o envolvimento de variantes nos genes *MMPs* e a ocorrência das fissuras, a maioria dos autores ressalta a necessidade de esclarecer ainda até que ponto os SNPs nas *MMPs*, em especial *MMP-2* e *MMP-3*, e suas interações podem realmente contribuir para o status da fissura labiopalatina, e além disso, qual seria o mecanismo exato para a determinação do fenótipo da fissura labiopalatina (LETRA et al., 2007; LETRA et al., 2012; LETRA et al., 2014).

JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

Pelo exposto, a PAC é uma patologia que poderia trazer problemas sérios para a saúde geral do paciente, e, a fim de aprimorar a detecção precoce por meio da predisposição genética individual a essa patologia e consequentemente melhorar o prognóstico do tratamento da patologia em indivíduos com fissura labiopalatina, é importante avaliar os SNPs nos genes das *MMPs*, pois esses poderiam ser considerados como possíveis marcadores de susceptibilidade à PAC, podendo exacerbar a resposta inflamatória e destruição óssea do tecido perirradicular, modificando o curso e a resposta ao tratamento da necrose pulpar. Adicionalmente, e de igual importância, estes mesmos genes das *MMPs* tem sido considerados como genes candidatos para contribuir na susceptibilidade as fissura labiopalatina. Associado a isso, ainda não foram realizados estudos desta natureza no HRAC-USP, correlacionando as interações entre os SNPs nos genes das *MMPs* em indivíduos com fissura labiopalatina e PAC.

2 OBJETIVO

2 OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi investigar se existe associação das variantes polimórficas rs243865, rs2285053 e rs2287074 no gene *MMP-2*, e rs679620 e rs522616 no gene *MMP-3*, com a periodontite apical crônica e/ou com a fissura labiopalatina.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

Seguindo princípios éticos e jurídicos, a realização deste trabalho foi previamente aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Humanos (CEP) do Hospital de Anomalias Craniofaciais – Universidade de São Paulo (HRAC/USP), com Certificado de Apresentação de Apreciação Ética (CAAE) N° 25300713.4.0000.5441 e aprovação pelo parecer consubstanciado do CEP do HRAC/USP N° 501.083 de data 17/12/2013 (Anexo 1).

3.1 CASUÍSTICA

Fizeram parte deste estudo caso-controle, 180 indivíduos de ambos os sexos divididos em três grupos:

Grupo I: composto por 34 indivíduos com fissura labiopalatina não sindrômica, regularmente matriculados no HRAC-USP, com história e diagnóstico de periodontite apical crônica.

Grupo II: composto por 45 indivíduos sem fissura labiopalatina e não sindrômicos com história e diagnóstico de periodontite apical crônica tratados no curso de Especialização em Endodontia da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo (FOB/USP) e no curso de especialização em Endodontia do Centro de Pós-graduação em Odontologia, Unidade da Faculdade Inga (CPO UNINGA).

Grupo III: composto por 101 indivíduos sem fissura e sem história tratamento endodôntico radical, alunos voluntários dos cursos de graduação e pós-graduação de Odontologia e Fonoaudiologia da FOB/USP e do HRAC/USP, além de funcionários da FOB-USP e do HRAC-USP (grupo controle).

3.2 CRITÉRIOS PARA A SELEÇÃO DA AMOSTRA

Na seleção inicial dos sujeitos para compor o grupo I foram analisadas as radiografias periapicais convencionais e digitais de 1.868 indivíduos do arquivo radiográfico do setor de Endodontia do HRAC/USP, e para o grupo II foram analisadas as radiografias periapicais convencionais de 1.020 indivíduos do arquivo da clínica de pós-graduação em Endodontia da FOB/USP e do arquivo da clínica de pós-graduação do CPO UNINGÁ, vale ressaltar que foram analisadas mais de 3 radiografias por indivíduo em ambos grupos. Como critério de inclusão foram selecionados indivíduos que apresentaram tratamento endodôntico com lesão periapical na consulta de controle após o tratamento endodôntico, e com os dentes restaurados. Quanto à característica, essa lesão deveria ser igual ou maior à lesão presente na radiografia periapical realizada ao final do tratamento endodôntico, com persistência da lesão caracterizando periodontite apical crônica, conforme explicação referente aos escores atribuídos às lesões definidos abaixo. Essas radiografias de arquivo, as do final do tratamento endodôntico e as realizadas no período de preservação ou controle após o tratamento endodôntico, foram avaliadas segundo o índice periapical (Periapical Index, PAI) para radiografias periapicais, que define escores de 1 a 5 para as lesões presentes (Orstavik, Kerekes, Eriksen; 2008).

Os critérios para a atribuição desses escores são definidos da seguinte forma (Figura 1):

Escore 1, apresenta radiograficamente uma estrutura periapical normal com o espaço do ligamento periodontal e lâmina dura intacta.

Escore 2, apresenta pequenas alterações radiográficas na estrutura óssea circundante ao ápice.

Escore 3, apresenta alterações radiográficas na estrutura óssea com perda de tecido mineral.

Escore 4, apresenta alterações radiográficas na região periapical com mudanças no espaço do ligamento periodontal, perda da integridade da lâmina dura com alterações na estrutura óssea e áreas radiolúcidas bem definidas.

Escore 5, apresenta alterações radiográficas na região periapical com severa periodontite apical com áreas de exacerbação.

Figura 1 - PAI escore (Fonte: Orstavik, Kerekes, Eriksen; 2008).

Para o presente estudo foram selecionados somente voluntários que apresentassem os escores 4 ou 5, com um ou mais dentes já tratados e que retornaram para a radiografia de controle ou preservação após 1 ano ou mais.

Como critérios de exclusão, as radiografias periapicais de indivíduos com outros escores, que não 4 e 5, ou mal processadas foram descartadas para este estudo.

O critério de seleção de voluntários para compor o grupo III era de que os indivíduos não apresentassem fissura labiopalatina e nenhum elemento dentário tivesse sido submetido a tratamento endodôntico.

A coleta de saliva para extração de DNA dos voluntários da FOB-USP foi realizada no Laboratório de Fisiologia e Farmacologia Clínica (LAFFIC) do departamento de Ciências Biológicas da FOB/USP. Para os alunos de pós-graduação e funcionários do HRAC/USP as amostras foram coletadas no Laboratório Didático da Divisão Odontológica em horários previamente estabelecidos.

A triagem dos voluntários e a coleta da saliva dos mesmos foi realizada pelo doutorando Tulio Lorenzo Olano Dextre (Nº USP 7346392) cirurgião-dentista, especialista em Endodontia. Para os do grupo I, a coleta foi realizada quando os

indivíduos, regularmente matriculados no HRAC-USP, comparecerem para a consulta de rotina ao setor de Endodontia do HRAC-USP. Para os indivíduos do grupo II, quando estes comparecerem às consultas para o controle ou preservação na clínica de pós-graduação da FOB/USP e na clínica odontológica do CPO UNINGÁ. Para os indivíduos do grupo III, quando estes compareciam ao LAFFIC por ordem de chegada nos horários estabelecidos. Todos os indivíduos selecionados de acordo com os critérios acima descritos e convidados a participar do estudo, foram esclarecidos pelo pesquisador sobre o objetivo do trabalho com posterior leitura minuciosa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Todos os voluntários que aceitaram participar do estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e a eles foi entregue uma cópia do mesmo documento assinado pelo pesquisador.

3.3 MÉTODOS

Todos os procedimentos laboratoriais foram realizados no Laboratório de Farmacologia e Genética, do Departamento de Ciência Biológicas da FOB-USP sob a orientação da Profa. Dra. Lucimara Texeira das Neves e do especialista de laboratório Thiago José Dionísio (Nº USP 4305995).

3.3.1 COLETA DE SALIVA

Os indivíduos selecionados receberam um tubo Falcon de 15 mL identificado para a coleta de saliva total expelida até a marcação de 5 mL. Este, por sua vez, foi acondicionado em isopor com gelo picado e transportado até o Laboratório de Farmacologia e Genética, do Departamento de Ciência Biológicas da FOB-USP. Chegando ao Laboratório, as amostras foram aliquotadas em tubos estéreis de micro-centrifuga de 1,5 mL devidamente identificados. Todos os tubos foram imediatamente estocados em freezer a -20°C até o momento da extração de DNA.

3.3.2 PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO

As amostras foram submetidas à extração de DNA conforme protocolo estabelecido no Laboratório de Farmacologia e Genética, do Departamento de Ciência Biológicas da FOB-USP utilizando o kit de protocolo de extração de DNA QIAamp (Qiagen, Valencia, CA, Estados Unidos) pré-padronizados e validados, seguindo as instruções do fabricante.

Após do descongelamento total das amostras de saliva, cada tubo contendo 1,5 mL foi bem homogeneizado no agitador vórtex (Quimis Aparelhos Científicos Ltda, Diadema, SP, Brasil). Foram pipetados em um microtubo de 2 mL: 20 µL de proteinase K, 200 µL de saliva bem homogeneizada e 200 µL de buffer AL. Cada amostra foi vortexada por 15 segundos e posteriormente colocadas em banho maria por 10 minutos a 56°C. Em seguida, foram centrifugados rapidamente, para eliminar as gotas da tampa; e adicionado 200 µL de álcool absoluto, vortexado por 15 segundos e centrifugando rapidamente. Todo o conteúdo foi transferido para a coluna QIAamp e centrifugado a 15,000 rpm por um minuto em temperatura ambiente. Foi transferida a coluna para um microtubo novo e foi adicionado 500 µL do buffer AW1, e centrifugado por um minuto em temperatura ambiente. Foi transferida a coluna em um microtubo novo e foi adicionado 500 µL do buffer AW2, e centrifugado a 15,000 rpm por 3 minutos em temperatura ambiente. Logo foi centrifugada a coluna a seco em outro microtubo novo a 15,000 rpm por um minuto em temperatura ambiente. A coluna foi colocada em um microtubo de 1,5 mL e adicionado 50 µL do buffer AE e centrifugado a 15,000 rpm por um minuto em temperatura ambiente. As amostras de DNA foram congeladas à -20°C até o momento da quantificação do DNA em espectrofotômetro.

3.3.3 QUANTIFICAÇÃO DO DNA EXTRAÍDO DA SALIVA

A quantificação do DNA obtido de todas as amostras foi realizada por meio de leitura em espectrofotômetro NanoDrop™ 1000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, Estados Unidos) em comprimentos de onda de 260 e 280 nm. Esse equipamento fornece duas medidas importantes: concentração e pureza do DNA. Os valores referentes à concentração são expressos em ng/µL, e para a aferição

realizada no espectrofotômetro são necessários de 1,5 µL a 2 µL de cada amostra. Os valores referentes à qualidade são expressos por meio da relação das absorbâncias em 260 nm e 280 nm.

3.3.4 DILUIÇÃO DAS AMOSTRAS DE DNA PARA GENOTIPAGEM

A quantidade inicial de DNA para Genotipagem foi padronizado a 50 ng/µL. Após a adequada diluição, as amostras de DNA foram armazenadas em freezer - 20°C para serem utilizadas ao longo do estudo.

3.3.5 SELEÇÃO DE GENES CANDIDATOS E DE SNPs

Foram selecionados para a avaliação genética 5 polimorfismos (SNPs), 3 deles no gene *MMP-2*: rs243865 (catálogo C__3225943_10 da Life Technologies®), rs2285053 (catálogo C__26734093_20 da Life Technologies®) e rs2287074 (catálogo C__3225956_10 da Life Technologies®); e 2 no gene *MMP-3*: rs679620 (catálogo C__3047717_1_ da Life Technologies®) e rs522616 (catálogo C__3047714_10 da Life Technologies®). Esses polimorfismos foram escolhidos de acordo com os estudos de Menezes-Silva et al. (2012) e os estudos de Letra e colaboradores (2012 e 2014), e a partir de informações obtidas da base de dados do National Center for Biotechnology Information dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.gov/SNP/>) e do Projeto HapMap (<http://www.hapmap.org>).

3.3.6 GENOTIPAGEM

A análise das variantes polimórficas foi realizada por meio da técnica PCR em tempo real. As reações foram realizadas no termociclador Viia 7 (Applied Biosystems, Foster City, CA, Estados Unidos), por meio do método TaqMan utilizando ensaios TaqMan SNP genotyping assays (Applied Biosystems, Foster City, CA, Estados Unidos) pré-padronizados e validados experimentalmente, seguindo as instruções do fabricante. Esta técnica possibilita a análise das variantes dos SNPs, utilizando além do TaqMan Genotyping MasterMix (mix com todos os reagentes necessários para a reação da PCR), os primers específicos para cada um dos segmentos do DNA a ser analisado e dois tipos de sondas específicas marcadas

com fluoruros distintos (VIC e FAM) para cada um dos alelos possíveis, alelo ancestral ou alelo polimórfico, possibilitando a distinção alélica.

Os primers são específicos para as regiões adjacentes ao locus polimórfico e as sondas hibridizam no segmento de DNA, por complementariedade, de acordo com os alelos presentes.

Os experimentos foram realizados em duplicata em placas de 384 poços (catálogo 4309849, Applied Biosystems, Foster City, CA, Estados Unidos). Para cada uma das reações, para cada SNP, foi utilizado um produto final de 5 µL contendo 2 µL amostra de DNA diluído a 50 ng/µL, 2,5 µL do TaqMan Genotyping Master Mix (número de catálogo 4371355, Applied Biosystems, Foster City, CA, Estados Unidos), 0,125 µL do ensaio pré-desenhado por TaqMan (Applied Biosystems, Foster City, CA, Estados Unidos), e 0,375 µL de água ultrapura q.s.p.

As condições de ciclagem para a realização da PCR em tempo real no equipamento obedeceram ao seguinte padrão: temperatura inicial de 95°C por 10 minutos em seguida 50 ciclos de 95°C por 15 segundos, seguido de 60°C por um minuto. Foram utilizados controles negativos que consistiu na realização da reação sem a presença do DNA para conferir as possibilidades de contaminações dos reagentes.

As amostras submetidas à reação de PCR em tempo real foram posteriormente analisadas no software Viia 7 (versão 1.1, Applied Biosystems, Foster City, CA, Estados Unidos) o qual forneceu os relatórios com os resultados dos genótipos.

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram tabulados no programa Excel 8.0 e para os cálculos foi utilizados o programa Sigma Plot for Windows 12.0. As comparações entre frequências dos genótipos e alelos foram realizadas através do teste do Qui-quadrado (χ^2) e Odds Ratio com intervalo de confiança de 95% (IC). Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

4 RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

Para este estudo caso-controle foram analisados 180 indivíduos, sendo 34 indivíduos com fissura labiopalatina não síndrômica e PAC (GI); 45 indivíduos sem fissura labiopalatina e com PAC (GII) e 101 indivíduos sem fissura labiopalatina e sem PAC (GIII – grupo controle). A caracterização da população estudada está descrita nas tabelas 1 e 2.

A amostra desse estudo foi composta de forma não igualitária para indivíduos do gênero masculino e feminino nos diversos grupos, com prevalência maior para o sexo feminino nos 3 grupos. A média das idades foi maior no grupo de indivíduos sem fissura labiopalatina e com PAC (GII) em comparação com os grupos de fissura labiopalatina e PAC (GI) e o grupo controle (indivíduos sem fissura e sem PAC) (GIII). No grupo com fissura labiopalatina não síndrômica e PAC (GI) foi mais prevalente a fissura transforame incisivo bilateral (TIB).

Tabela 1. Características da população estudada, gênero e idade (n=180)

Gênero (%)	GI (n=34)	GII (n=45)	GIII (n=101)
Masculino	15 (44,1%)	18 (40%)	28 (27,7%)
Feminino	19 (55,9%)	27 (60%)	73 (72,3%)
Média de idade* (anos)	32,6 (±13)	36,7 (±16,3)	24,7 (±4,2)

* Idade média em anos ± desvio padrão

Tabela 2. Distribuição dos tipos de fissura labiopalatina GI (n=34)

Fissura	Unilateral	Bilateral	Total
Pré-forame	4 (11,8%)	3 (8,8%)	7 (20,6%)
Transforame	6 (17,7%)	13 (38,2%)	19 (55,9%)
Pós-forame	--	--	7 (20,6%)
Pré-forame/Pós-forame	--	1 (2,9%)	1 (2,9%)
			34 (100%)

4.2 RESULTADOS DA GENOTIPAGEM

Considerando as possibilidades nos locus gênicos no gene *MMP-2* (rs243865, rs2285053 e rs2287074) e no gene *MMP-3* (rs679620 e rs522616) os alelos considerados como ancestrais e os alelos considerados polimórficos, além da posição do polimorfismo no cromossomo e sua posição na região de cada gene, estão descritos na Tabela 3. Sendo possível sua manifestação em duplicidade, quando chamando de homozigoto polimórfico é quando ocorre associado ao alelo ancestral, situação em que se denomina de heterozigoto polimórfico.

Tabela 3. Características dos genes *MMP-2* e *MMP-3* investigados neste estudo.

Gene	SNP ID	Posição da base	SNP função	AA*	AP*
<i>MMP-2</i>	rs243865	Chr 16:55477894	5' UTR	C	T
<i>MMP-2</i>	rs2285053	Chr 16:55478465	5' UTR	C	T
<i>MMP-2</i>	rs2287074	Chr 16:55493201	Synonymous	G	A
<i>MMP-3</i>	rs679620	Chr 11:102842889	Missense	C	T
<i>MMP-3</i>	rs522616	Chr 11:102844317	5' UTR	T	C

* AA = alelo ancestral * AP = alelo polimórfico

Foram comparados os resultados dos grupos caso GI vs GII, GI vs GIII e GII vs GIII para cada uma das variantes polimórficas (SNPs).

Para o gene *MMP-2*, os rs243865 e rs2287074 nas comparações entre os grupos GI vs GII, GI vs GIII e GII vs GIII, e para o rs2285053 nas comparações GI vs GII e GI vs GIII não houve diferença estatisticamente significativa (Tabelas 4-11). Para o rs2285053 na comparação GII (sem fissura labiopalatina e com PAC) vs GIII (controle - sem fissura e sem PAC) foi possível constatar que houve diferença estatisticamente significativa associada ao genótipo C/T ($p=0,034$) e aos genótipos C/T + T/T ($p=0,034$), com maior frequência no grupo controle (GIII). (Tabela 12).

Tabela 4. Comparação do GI vs GII para o rs243865 no gene *MMP-2*

Genótipo	G I (n=34)		G II (n=45)		p	OR	CI
	n	%	n	%			
Homozigoto ancestral (CC)	21	61,8%	34	75,6%	-	-	-
Heterozigoto (CT)	11	32,4%	10	22,2%	0,262	1,78	0,65-4,91
Homozigoto mutado (TT)	2	5,9%	1	2,2%	0,326	3,24	0,28-37,95
Heterozigoto (CT) + Homozigoto mutado (TT)	13	38,2%	11	24,4%	0,187	1,91	0,73-5,05
Alelos					0,149	1,84	0,80-4,24
C	53	77,9%	78	86,7%			
T	15	22,1%	12	13,3%			

Tabela 5. Comparação do GI vs GIII para o rs243865 no gene *MMP-2*

Genótipo	G I (n=34)		G III (n=101)		p	OR	CI
	n	%	n	%			
Homozigoto ancestral (CC)	21	61,8%	65	64,4%	-	-	-
Heterozigoto (CT)	11	32,4%	34	33,7%	0,997	1,00	0,43-2,32
Homozigoto mutado (TT)	2	5,9%	2	2,0%	0,252	3,09	0,41-23,35
Heterozigoto (CT) + Homozigoto mutado (TT)	13	38,2%	38	37,6%	0,888	1,06	0,48-2,35
Alelos					0,56	1,22	0,62-2,39
C	53	77,9%	164	81,2%			
T	15	22,1%	38	18,8%			

Tabela 6. Comparação do GII vs GIII para o rs243865 no gene *MMP-2*

Genótipo	G II (n=45)		G III (n=101)		p	OR	CI
	n	%	n	%			
Homozigoto ancestral (CC)	34	75,6%	65	64,4%	-	-	-
Heterozigoto (CT)	10	22,2%	34	33,7%	0,165	0,56	0,25-1,27
Homozigoto mutado (TT)	1	2,2%	2	2,0%	0,971	0,96	0,08-10,92
Heterozigoto (CT) + Homozigoto mutado (TT)	11	24,4%	38	37,6%	0,139	0,55	0,25-1,22
Alelos							
C	78	86,7%	164	81,2%	0,251	0,66	0,33-1,34
T	12	13,3%	38	18,8%			

Tabela 7. Comparação do GI vs GII para o rs2287074 no gene *MMP-2*.

Genótipo	G I (n=34)		G II (n=45)		p	OR	CI
	n	%	n	%			
Homozigoto ancestral (GG)	14	41,2%	21	46,7%	-	-	-
Heterozigoto (GA)	16	47,1%	19	42,2%	0,629	1,26	0,49-3,26
Homozigoto mutado (AA)	4	11,8%	5	11,1%	0,809	1,20	0,27-5,26
Heterozigoto (GA) + Homozigoto mutado (AA)	20	58,8%	24	53,3%	0,627	1,25	0,51-3,07
Alelos							
G	44	64,7%	61	67,8%	0,685	1,15	0,59-2,23
A	24	35,3%	29	32,2%			

Tabela 8. Comparação do GI vs GIII para o rs2287074 no gene *MMP-2*.

Genótipo	G I (n=34)		G III (n=101)		p	OR	CI
	n	%	n	%			
Homozigoto ancestral (GG)	14	41,2%	41	40,6%	-	-	-
Heterozigoto (GA)	16	47,1%	49	48,5%	0,916	0,96	0,42-2,19
Homozigoto mutado (AA)	4	11,8%	11	10,9%	0,924	1,06	0,29-3,89
Heterozigoto (GA) + Homozigoto mutado (AA)	20	58,8%	60	59,4%	0,952	0,98	0,44-2,15
Alelos							
G	44	64,7%	131	64,9%	0,983	1,00	0,57-1,79
A	24	35,3%	71	35,1%			

Tabela 9. Comparação do GII vs GIII para o rs2287074 no gene *MMP-2*

Genótipo	G II (n=45)		G III (n=101)		p	OR	CI
	n	%	n	%			
Homozigoto ancestral (GG)	21	46,7%	41	40,6%	-	-	-
Heterozigoto (GA)	19	42,2%	49	48,5%	0,464	0,76	0,36-1,60
Homozigoto mutado (AA)	5	11,1%	11	10,9%	0,843	0,89	0,27-2,89
Heterozigoto (GA) + Homozigoto mutado (AA)	24	53,3%	60	59,4%	0,493	0,78	0,38-1,58
Alelos							
G	61	67,8%	131	64,9%	0,627	0,88	0,52-1,49
A	29	32,2%	71	35,1%			

Tabela 10. Comparação do GI vs GII para o rs2285053 no gene *MMP-2*

Genótipo	G I (n=34)		G II (n=45)		p	OR	CI
	n	%	n	%			
Homozigoto ancestral (CC)	4	11,8%	11	24,4%	-	-	-
Heterozigoto (CT)	16	47,1%	17	37,8%	0,155	2,59	0,68-9,81
Homozigoto mutado (TT)	14	41,2%	17	37,8%	0,228	2,26	0,59-8,69
Heterozigoto (CT) + Homozigoto mutado (TT)	30	88,2%	34	75,6%	0,155	2,43	0,70-8,43
Alelos							
C	24	35,3%	39	43,3%	0,307	1,40	0,73-2,68
T	44	64,7%	51	56,7%			

Tabela 11. Comparação do GI vs GIII para o rs2285053 no gene *MMP-2*.

Genótipo	G I (n=34)		G III (n=101)		p	OR	CI
	n	%	n	%			
Homozigoto ancestral (CC)	4	11,8%	11	10,9%	-	-	-
Heterozigoto (CT)	16	47,1%	49	48,5%	0,869	0,90	0,25-3,22
Homozigoto mutado (TT)	14	41,2%	41	40,6%	0,924	0,94	0,26-3,43
Heterozigoto (CT) + Homozigoto mutado (TT)	30	88,2%	90	89,1%	0,888	0,92	0,27-3,09
Alelos							
C	24	35,3%	71	35,1%	0,983	3,38	1,90-6,01
T	44	64,7%	131	64,9%			

Tabela 12. Comparação do GII vs GIII para o rs2285053 no gene *MMP-2*

Genótipo	G II (n=45)		G III (n=101)		p	OR	CI
	n	%	n	%			
Homozigoto ancestral (CC)	11	24,4%	11	10,9%	-	-	-
Heterozigoto (CT)	17	37,8%	49	48,5%	0,034*	0,34	0,12-0,94
Homozigoto mutado (TT)	17	37,8%	41	40,6%	0,083	0,41	0,15-1,14
Heterozigoto (CT) + Homozigoto mutado (TT)	34	75,6%	90	89,1%	0,034*	0,38	0,15-0,95
Alelos							
C	39	43,3%	71	35,1%	0,183	0,71	0,43-1,18
T	51	56,7%	131	64,9%			

* Teste Qui-quadrado; $p \leq 0,05$ indica diferença estatisticamente significativa.

Para o gene *MMP-3*, o rs679620 na comparação do GI (com fissura labiopalatina e PAC) com o GII (sem fissura labiopalatina e com PAC) foi possível constatar que houve diferença estatística significativa associada ao genótipo C/T ($p=0,016$) e aos genótipos C/T + T/T ($p=0,016$), com maior frequência no grupo com fissura labiopalatina e PAC comparada ao grupo sem fissura labiopalatina e PAC (Tabela 13). Para as comparações dos grupos GI vs GIII e GII vs GIII não houve diferença estatística significativa (Tabelas 14-15).

Tabela 13. Comparação do GI vs GII para o rs679620 no gene *MMP-3*.

Genótipo	G I (n=34)		G II (n=45)		p	OR	CI
	n	%	n	%			
Homozigoto ancestral (CC)	4	11,8%	16	35,6%	-	-	-
Heterozigoto (CT)	22	64,7%	20	44,4%	0,016*	4,40	1,26-15,39
Homozigoto mutado (TT)	8	23,5%	9	20,0%	0,08	3,55	0,83-15,18
Heterozigoto (CT) + Homozigoto mutado (TT)	30	88,2%	29	64,4%	0,016*	4,14	1,23-13,86
Alelos							
C	30	44,1%	52	57,8%	0,089	1,73	0,92-3,27
T	38	55,9%	38	42,2%			

* Teste Qui-quadrado; $p \leq 0,05$ indica diferença estatisticamente significativa.

Tabela 14. Comparação do GI vs GIII para o rs679620 no gene *MMP-3*.

Genótipo	G I (n=34)		G III (n=101)		p	OR	CI
	n	%	n	%			
Homozigoto ancestral (CC)	4	11,8%	27	26,7%	-	-	-
Heterozigoto (CT)	22	64,7%	54	53,5%	0,079	2,75	0,86-8,78
Homozigoto mutado (TT)	8	23,5%	20	19,8%	0,135	2,70	0,71-10,23
Heterozigoto (CT) + Homozigoto mutado (TT)	30	88,2%	74	73,3%	0,073	2,74	0,88-8,49
Alelos							
C	30	44,1%	108	53,5%	0,182	1,45	0,84-2,53
T	38	55,9%	94	46,5%			

Tabela 15. Comparação do GII vs GIII para o rs679620 no gene *MMP-3*.

Genótipo	G II (n=45)		G III (n=101)		p	OR	CI
	n	%	n	%			
Homozigoto ancestral (CC)	16	35,6%	27	26,7%	-	-	-
Heterozigoto (CT)	20	44,4%	54	53,5%	0,25	0,62	0,28-1,40
Homozigoto mutado (TT)	9	20,0%	20	19,8%	0,774	0,76	0,28-2,06
Heterozigoto (CT) + Homozigoto mutado (TT)	29	64,4%	74	73,3%	0,280	0,66	0,31-1,40
Alelos							
C	52	57,8%	108	53,5%	0,494	0,84	0,51-1,39
T	38	42,2%	94	46,5%			

Para o rs522616 no gene *MMP-3*, nas comparações dos grupos GI vs GII e GI vs GIII não houve diferença estatisticamente significativa (Tabelas 16-17). Na comparação dos grupos GII (sem fissura labiopalatina e com PAC) e GIII (controle - sem fissura e sem PAC) foi possível constatar que houve diferença estatisticamente significativa associada ao genótipo T/C ($p=0,015$) e aos genótipos T/C + C/C ($p=0,009$), com maior frequência para o grupo sem fissura labiopalatina e com PAC comparado ao grupo controle. Também houve diferença estatística na comparação entre os alelos (T e C) com associação para a presença do alelo C (polimórfico) em sujeitos sem fissura e com PAC ($p=0,011$) (Tabela 18).

Tabela 16. Comparação do GI vs GII para o rs522616 no gene *MMP-3*.

Genótipo	G I (n=34)		G II (n=45)		p	OR	CI
	n	%	n	%			
Homozigoto ancestral (TT)	19	55,9%	20	44,4%	-	-	-
Heterozigoto (TC)	13	38,2%	22	48,9%	0,316	0,62	0,24-1,58
Homozigoto mutado (CC)	2	5,9%	3	6,7%	0,713	0,70	0,10-4,67
Heterozigoto (TC) + Homozigoto mutado (CC)	15	44,1%	25	55,6%	0,314	0,63	0,26-1,55
Alelos							
T	51	75,0%	62	68,9%	0,34	0,74	0,36-1,50
C	17	25,0%	28	31,1%			

Tabela 17. Comparação do GI vs GIII para o rs522616 no gene *MMP-3*.

Genótipo	G I (n=34)		G III (n=101)		p	OR	CI
	n	%	n	%			
Homozigoto ancestral (TT)	19	55,9%	68	67,3%	-	-	-
Heterozigoto (TC)	13	38,2%	30	29,7%	0,296	1,55	0,68-3,54
Homozigoto mutado (CC)	2	5,9%	3	3,0%	0,347	2,39	0,37-15,33
Heterozigoto (TC) + Homozigoto mutado (CC)	15	44,1%	33	32,7%	0,228	1,63	0,73-3,60
Alelos							
T	51	75,0%	166	82,2%	0,197	1,54	0,80-2,96
C	17	25,0%	36	17,8%			

Tabela 18. Comparação do GII vs GIII para o rs522616 no gene *MMP-3*.

Genótipo	G II (n=45)		G III (n=101)		p	OR	CI
	n	%	n	%			
Homozigoto ancestral (TT)	20	44,4%	68	67,3%	-	-	-
Heterozigoto (TC)	22	48,9%	30	29,7%	0,015*	2,49	1,19-5,24
Homozigoto mutado (CC)	3	6,7%	3	3,0%	0,133	3,40	0,64-18,17
Heterozigoto (TC) + Homozigoto mutado (CC)	25	55,6%	33	32,7%	0,009*	2,58	1,25-5,29
Alelos							
T	62	68,9%	166	82,2%	0,011*	2,08	1,17-3,70
C	28	31,1%	36	17,8%			

* Teste Qui-quadrado; $p \leq 0,05$ indica diferença estatisticamente significativa

5 DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

A PA é uma doença multifatorial resultante da interação do hospedeiro e fatores microbianos (SIQUEIRA; RÔÇAS, 2007). Quando a polpa dental sofre algum tipo de alteração por causa de um trauma ou à progressão da cárie dental, as bactérias e/ou outros irritantes da cavidade oral podem invadir o sistema de canais radiculares (ESPÍNDOLA et al, 2002). Esta contaminação e progressão dos invasores microbianos e seus produtos dentro do sistema de canais radiculares poderiam provocar a necrose da polpa, e estes podem avançar até chegar a região periapical, Os fatores microbianos associados a mecanismos inflamatórios e de defesa do hospedeiro podem levar a destruição do tecido periapical, resultado da inflamação dos tecidos periapicais, também conhecida como PA (NAIR et al., 2004).

As bactérias patogênicas, que iniciam essa cascata de resposta inflamatória localizada, associada a inúmeros fatores podem determinar a gravidade da evolução da doença modulando ou amplificando a resposta inflamatória. Dentre esses fatores um dos mais discutidos na literatura são os fatores de virulência microbianos, dentre eles o mais conhecido é o lipopolissacarídeo (LPS). Esses fatores de virulência podem agir em conjunto determinando as diversas fases do processo de evolução da doença, acionando processos de degradação de colágeno (SIQUEIRA; RÔÇAS, 2007; MORSANI et al., 2011).

Quando esta cascata de eventos inflamatórios, derivada da necrose pulpar, persiste devido à falta de tratamento, tratamento mal sucedido ou mesmo diante de respostas inadequadas de defesas do hospedeiro, o processo poderia perdurar por um tempo ilimitado dando origem a uma PAC (VAN DER WAAL; LAPPIN; CRIELAARD, 2015). A PAC é doença inflamatória principalmente causada pela infecção crônica no sistema de canais radiculares, podendo se manter após o tratamento endodôntico, também por uma infecção extra-radicular (ANTUNES et al., 2015, PROVENZANO et al., 2016), muitas vezes assintomática e detectada somente durante o controle radiográfico de preservação (DEXTRE et al., 2014).

Quando a PAC esta presente, esta induz uma fase aguda de propagação da infecção, em que pode haver alguma repercussão sistêmica (VAN DER WAAL;

LAPPIN; CRIELAARD, 2015). Nesse sentido, alguns estudos tem relacionado a PAC com diagnóstico de doenças cardiovasculares (CAPLAN et al., 2006; PASQUALINI et al., 2012; LIN et al., 2015). Ainda diante dessa possibilidade, Willershausen et al. (2009) relataram que indivíduos que sofrem de infarto do miocárdio tiveram um maior número de lesões periapicais em comparação com indivíduos saudáveis. Cotti et al (2011), investigando a associação de periodontite apical e doença cardiovascular sugeriram que os pacientes com PA tem a tendência de apresentarem marcadores para a inflamação (*IL-1*, *IL-2*, e *IL-6*) elevados relacionados a níveis também elevados de dimetil-arginina assimétrica, que é um marcador da função vascular sistêmica, o que poderia levar a inferência de que ambos poderiam desempenhar algum papel na disfunção epitelial participando assim na patogênese e progressão das doenças cardiovasculares.

Em resposta ao processo infeccioso, dentro da cascata de eventos que ocorre acionada pela defesa do hospedeiro, encontram-se as *MMPs* ou metaloproteinases da matriz. Estas são enzimas que geralmente se expressam em níveis baixos em condições fisiológicas homeostáticas, mas aumentam rapidamente seus níveis de expressão quando são requeridas para a remodelação dos tecidos como no caso de inflamações e cicatrização de feridas. Normalmente elas são sintetizadas na forma latente e são armazenadas em grânulos nas células inflamatórias, desempenhando um papel importante nos processos de remodelação óssea quando induzidas a se expressar no ambiente inflamatório (CARNEIRO et al., 2009).

Um dos processos que tem sido atribuído às *MMPs*, presentes na PA, diz respeito a degradação de colágeno da matriz extracelular do osso nas infecções bacterianas dentro do sistema de canais radiculares. Nesse contexto, a persistência dos microrganismos após o tratamento endodôntico tem como resultado uma desorganização tecidual ocasionando um aumento dos níveis de *MMPs* na região periapical, onde estas poderiam contribuir com a susceptibilidade a PAC, e como resultado, a persistência da lesão (SHIN; LEE; BAEK, 2002; BEIDLER et al., 2008; LIU et al., 2009; PAULA-SILVA; DA SILVA; KAPILA, 2010; JAIN; BAHUGUNA, 2015). É entendido que este insucesso endodôntico é originado principalmente pela persistência da infecção no sistema de canais radiculares, que nessa situação

atuam como reservatório para os microrganismos, seus produtos e subprodutos, e antígenos que coletivamente podem induzir ou manter a PA. Esses componentes microbianos persistentes nos canais, especialmente os lipopolissacarídeos, induzem os macrófagos a sintetizar e secretar uma variedade de moléculas pró-inflamatórias, incluindo a *IL-1* e fator de necrose tumoral- α , prostaglandinas e enzimas hidrolíticas que tem um papel importante na ruptura do tecido periodontal através das enzimas colagenolítica como as *MMPs*. Além disso, na presença de biofilmes periapicais, mediante a existência bactérias, grandes quantidades de citocinas pró-inflamatórias são liberadas levando a uma condição crônica, e subsequentemente, estimulando novamente as *MMPs* a participar no processo de degradação do tecido periapical (MENEZES-SILVA et al., 2012).

Dentro das famílias de genes que sintetizam enzimas envolvidas na degradação do colágeno, as *MMPs*, dentre elas as *MMP-2* e *MMP-3*, tem sido investigadas quanto a sua participação na periodontite apical. Nesses estudos, tem sido relatada elevada expressão destas enzimas colagenolíticas relacionadas a inflamação pulpar e a lesão periapical (OZEKI et al., 2015). Shin, Lee e Baek (2002) considerando a atenção de outros autores sobre as *MMPs* nos últimos anos, avaliaram os níveis de *MMPs* e suas distribuições em polpa dentais inflamadas e lesões periapicais, utilizando teste de imunoabsorção enzimática (ELISA) e/ou teste de imuno-histoquímica, e em seus resultados os autores sugerem que as *MMPs* (*MMP-1*, *MMP-2* e *MMP-3*) tem um papel importante na destruição do tecido pulpar com inflamação aguda e lesão periapical. Letra et al. (2013) avaliaram a expressão das *MMPs* e *TIMPs* em uma amostra de indivíduos com PAC, utilizando Reação em cadeia da polimerase (PCR) e imuno-histoquímica, encontraram níveis significantes de RNA mensageiro para vários genes dessa família em lesões de PAC (*MMP-2*, *MMP-3*, *MMP-7*, *MMP-9*, *MMP-9*, *MMP-14*, *MMP-16*, *MMP-25*, *TIMP-1* e *TIMP-2*). Os autores concluíram que as *MMPs* tem um papel influente em PAC atuando na dinâmica da lesão periapical. Herrera et al. (2015) estudaram os níveis de endotoxinas nas infecções endodônticas primárias antes e depois do preparo químico-mecânico determinando a sua antigenicidade em fibroblastos 3T3 através da atividade gelatinolítica da *MMP-2* e a da *MMP-9*, onde encontraram uma maior expressão gênica do *MMP-2* antes do preparo químico-mecânico quando

comparados aos níveis verificados depois do preparo e no grupo controle de células sem estímulo inflamatório.

Algumas variantes polimórficas ou SNPs nos genes *MMP-2* e *MMP-3* tem sido estudadas (MENEZES-SILVA et al., 2012; LETRA et al., 2013) , assim como no presente estudo, testando a hipótese de que estes SNPs nesses genes poderiam estar associados à ocorrência de lesão periapical, podendo contribuir em diferentes níveis do processo inflamatório, de remodelação óssea e regeneração tecidual e por consequência na cronicidade da lesão. No caso de nosso estudo, delineado para um estudo caso-controle, a escolha dessas variantes nesses genes ocorreu devido a dois motivos em particular. Primeiro, em decorrência do interesse de pesquisar as prováveis susceptibilidades do hospedeiro frente a um estímulo infeccioso e inflamatório, buscando compreender porque alguns sujeitos apesar de não realizar o tratamento endodôntico ou mediante insucesso nesse tratamento, apresentam a PAC, e outros, na mesma condição não apresentam tais lesões. Um segundo motivo, foi investigar essa susceptibilidade à PAC em sujeitos com fissura labiopalatina, uma vez que essa população específica, em estudo publicado por Dextre et al. (2015) apresentou índices elevados (67,4%) de PAC pós-tratamento endodôntico, quando diagnosticada por tomografia computadorizada de feixe cônico. Desta forma, a proposta foi investigar a associação desses SNPs escolhidos nos genes *MMP-2* e *MMP-3* com a PAC e com a presença da fissura labiopalatina, uma vez que essas variantes já foram associadas tanto com a PAC como com a fissura labiopalatina, contudo como características individuais. Assim, a inovação do presente estudo está na investigação de associação desses polimorfismos frente ao cruzamento dessas duas condições (PAC e fissura labiopalatina).

Em nossos resultados ao rs2285053 no gene *MMP-2* foi constatada diferença estatisticamente significativa para o genótipo CT e para a associação dos genótipos C/T + T/T na comparação entre o grupo de indivíduos com periodontite apical crônica e sem fissura labiopalatina (GII) com o grupo de indivíduos do grupo controle (GIII – sem fissura e sem PAC). Contudo essa diferença aponta para associação desses genótipos ao grupo controle, sem fissura e sem PAC. Desta forma, esse rs2285053 no gene *MMP-2* ,no presente estudo, não foi associado nem a PAC e nem a fissura labiopalatina. Este resultado não era o esperado e acredita-

se que poderia estar relacionado ao tamanho reduzido da amostra. Os nossos resultados corroboram os encontrados por Menezes-Silva et al (2012), que também não encontraram associação dessa variante especificamente, rs2285053 no gene *MMP-2*, com a PAC isoladamente. Concordando também com os achados de Letra e colaboradores (2012) que também não encontraram associação significativa dessa variação com as fissuras isoladamente.

Em relação ao SNP *rs679620 no gene MMP-3* foi constatada diferença estatisticamente significativa na comparação entre os grupo de indivíduos com fissura labiopalatina não sindrômica e periodontite apical crônica (GI), com o grupo sem fissura e com PAC para o genótipo CT e para a presença dos genótipos CT + TT, que foram associados aos sujeitos com fissura e com PAC. Esses resultados possibilitam uma interpretação de associação destes genótipos polimórficos com a ocorrência da fissura labiopalatina. Este achado discorda dos resultados encontrados no trabalho realizado por Letra et al. (2012) onde estudaram diferentes SNPs em alguns genes, dentre eles o rs679620 no gene *MMP-3*, e não encontraram associação significativa dessa variante com a fissura labiopalatina. Deve-se ressaltar ainda que em nosso resultado para o rs679620 no gene *MMP-3* não foi confirmada a associação dessa variante com a fissura quando comparado o grupo de indivíduos com fissura labiopalatina não sindrômica e periodontite apical crônica (GI) com o grupo controle (GIII), no qual não foi confirmada diferença significativa. Assim, esses resultados para esse polimorfismo devem ser interpretados com cautela uma vez que ambos os grupos amostrais analisados e comparados, nos quais foi observada diferença estatística (GI X GII) eram reduzidos, o que pode ter determinado essas diferenças.

Para o rs522616 no gene *MMP-3*, na comparação entre o grupo de indivíduos sem fissura labiopalatina e com periodontite apical crônica (GII), com o grupo de controle (GIII- indivíduos sem fissura labiopalatina e sem periodontite apical crônica) foi confirmada associação estatisticamente significativa do genótipo TC e da associação de genótipos TC + CC com o grupo com PAC sem fissura (GII). Da mesma forma foi observada associação significativa ($p=0,011$) para a frequência do alelo C nesse mesmo grupo com PAC e sem fissura quando comparado ao grupo controle. Contudo, analisando percentualmente a frequência do alelo polimórfico C

nesse Grupo II deste estudo, observa-se que o mesmo ocorreu em 31,1% e este resultado para a frequência aproxima-se do publicado na base de dados Ensembl, que é de 32%. Isso significa que apesar da diferença estatística encontrada especificamente neste grupo para essa variante associando-a a PAC, a frequência desse alelo polimórfico no grupo estudado está dentro do intervalo esperado para a população em geral que não necessariamente apresente PAC. Novamente este resultado deve ser interpretado com cautela, pois essa associação só ocorreu no grupo de indivíduos com PAC e sem fissura (GII) comparado com o grupo controle (GIII), e para confirmar essa associação, a mesma deveria ter ocorrido também no grupo com PAC com fissura quando comparado ao controle, fato este que não aconteceu. Esses nossos achados corroboram os encontrados por Menezes-Silva et al. (2012) no qual entre outros polimorfismos estudados, os autores não encontraram associação com a presença de PAC. Por outro lado, nossos achados diferem dos resultados encontrados por Letra et al. (2012) em estudo que investigou esse SNP e sua associação com a fissura labiopalatina isoladamente, no qual os autores encontraram associação positiva desse rs522616 no gene *MMP-3* com a fissura labiopalatina.

Em relação aos outros polimorfismos estudados rs243865 e rs2287074 no gene *MMP-2*, observa-se que os mesmos não foram associados nem a fissura e nem a PAC em nenhuma das comparações realizadas entre os grupos casos e controle. Esses resultados estão de acordo com a literatura, na qual Menezes-Silva et al (2012) e Letra et al. (2012) também não encontraram associação com a PAC e com a fissura labiopalatina respectivamente.

A partir dos dados deste estudo é razoável afirmar que os polimorfismos escolhidos no gene *MMP-2* (rs243865, rs2285053 e rs2287074) possivelmente não apresentem interferência quanto à susceptibilidade tanto para a PAC quanto para a fissura labiopalatina.

Em relação aos polimorfismos escolhidos no gene *MMP-3*, rs679620 e rs522616, o primeiro foi associado à fissura labiopalatina e o segundo associado a PAC, contudo em comparações entre grupos específicos, não confirmadas por meio de outras comparações envolvendo sujeitos com as mesmas características, o que nos obriga a interpretar com muita cautela os resultados estatísticos, uma vez que a

provável contribuição de cada uma dessas variantes para as patologias em questão possa ser considerada modesta, levando em consideração que os genes apresentam, em condições fisiológicas e patológicas, atuação em background, se expressando normalmente em conjunto. Sendo que não foi proposta deste estudo investigar essa interação gene-gene na determinação da PAC e da fissura labiopalatina.

Dessa forma, investigações semelhantes analisando outras variantes polimórficas em outros genes envolvidos na cascata de sinalização molecular regulando a inflamação e na embriologia craniofacial, com amostras maiores, são necessárias para esclarecer o papel do fator genético no desenvolvimento dessas duas condições patológicas. Esse conhecimento poderia contribuir no esclarecimento da contribuição genética quanto à susceptibilidade do hospedeiro para a ocorrência de PAC assim como auxiliar na explicação da etiologia genética das fissuras labiopalatinas.

6 CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

Das variantes polimórficas pesquisadas neste grupo populacional brasileiro, foi encontrada associação positiva do rs679620 no gene *MMP-3* com a fissura labiopalatina e PAC e também do rs522616 no gene *MMP-3* com a PAC em sujeitos sem fissura, no comparativo com o grupo controle.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

Abbott PV. Classification, diagnosis and clinical manifestations of apical periodontitis. *Endod Top*. 2004;8(1):36-54.

Aggarwal V, Singla M. Use of computed tomography scans and ultrasound in differential diagnosis and evaluation of nonsurgical management of periapical lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2010;109(6):917-23.

Ahluwalia M, Brailsford SR, Tarelli E, Gilbert SC, Clark DT, Barnard K, et al. Dental caries, oral hygiene, and oral clearance in children with craniofacial disorders. *J Dent Res* 2004; 83(2):175-9.

Allori AC, Mulliken JB, Meara JG, Shusterman S, Marcus JR; CleftKit Collaboration. Classification of Cleft Lip/Palate: Then and Now. *Cleft Palate Craniofac J*. 2015 Sep 4.

Amaya MP, Criado L, Blanco B, Gómez M, Torres O, Flórez L, González CI, Flórez O. Polymorphisms of pro-inflammatory cytokine genes and the risk for acute suppurative or chronic nonsuppurative apical periodontitis in a Colombian population. *Int Endod J*. 2013 ;46(1):71-8.

Aminoshariae A, Kulild JC. Association of Functional Gene Polymorphism with Apical Periodontitis. *J Endod*. 2015 ;41(7):999-1007.

An GK, Morse DE, Kunin M, Goldberger RS, Psoter WJ. Association of Radiographically Diagnosed Apical Periodontitis and Cardiovascular Disease: A Hospital Records-based Study. *J Endod*. 2016 Apr 16.

Andrade A, Santos EM, Carmo AF, Freitas RA, Galvão HC. Analysis of tryptase-positive mast cells and immunoexpression of MMP-9 and MMP-13 in periapical lesions. *Int Endod J*. 2016 Mar 22.

Antonarakis GS, Palaska PK, Herzog G. Caries prevalence in non-syndromic patients with cleft lip and/or palate: a meta-analysis. *Caries Res*. 2013;47(5):406-13.

Antunes HS, Rôças IN, Alves FR, Siqueira JF Jr. Total and Specific Bacterial Levels in the Apical Root Canal System of Teeth with Post-treatment Apical Periodontitis. *J Endod*. 2015 Jul;41(7):1037-42.

Aranha AM, Repeke CE, Garlet TP, Vieira AE, Campanelli AP, Trombone AP, Letra A, Silva RM, Garlet GP. Evidence supporting a protective role for th9 and th22 cytokines in human and experimental periapical lesions. *J Endod*. 2013;39(1):83-7.

Baeza M, Garrido M, Hernández-Ríos P, Dezerega A, García-Sesnich J, Strauss F, Aitken JP, Lesaffre E, Vanbelle S, Gamonal J, Brignardello-Petersen R, Tervahartiala T, Sorsa T, Hernández M. Diagnostic accuracy for apical and chronic periodontitis biomarkers in gingival crevicular fluid: an exploratory study. *J Clin Periodontol*. 2016 Jan;43(1):34-45.

Beach DA. CBCT Use in Endodontic Diagnosis. *Dent Today*. 2016 Feb;35(2):80,82-3.

Beaconsall-Ryan K, Tong D, Love RM. Radiolucent inflammatory jaw lesions: a twenty-year analysis. *Int Endod J*. 2010;43(10):859-65.

Beidler SK, Douillet CD, Berndt DF, Keagy BA, Rich PB, Marston WA. Multiplexed analysis of matrix metalloproteinases in leg ulcer tissue of patients with chronic venous insufficiency before and after compression therapy. *Wound Repair Regen*. 2008;16(5):642-8.

Birkedal-Hansen H, Moore WG, Bodden MK, Windsor LJ, Birkedal-Hansen B, DeCarlo A, Engler JA. Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1993;4(2):197-250.

Blavier L, Lazaryev A, Groffen J, Heisterkamp N, DeClerck YA, Kaartinen V. TGF-beta3-induced palatogenesis requires matrix metalloproteinases. *Mol Biol Cell*. 2001;12(5):1457-66.

Brown NL, Yarram SJ, Mansell JP, Sandy JR. Matrix metalloproteinases have a role in palatogenesis. *J Dent Res*. 2002 Dec;81(12):826-30.

Caplan DJ, Chasen JB, Krall EA, Cai J, Kang S, Garcia RI, Offenbacher S, Beck JD. Lesions of endodontic origin and risk of coronary heart disease. *J Dent Res*. 2006 Nov;85(11):996-1000.

Carneiro E, Menezes R, Garlet GP, Garcia RB, Bramante CM, Figueira R, Sogayar M, Granjeiro JM. Expression analysis of matrix metalloproteinase-9 in epithelialized and nonepithelialized apical periodontitis lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2009;107(1):127-32.

Cheng LL, Moor SL, Ho CT. Predisposing factors to dental caries in children with cleft lip and palate: a review and strategies for early prevention. *Cleft Palate Craniofac J* 2007;44(1):67-72.

Consolaro A. Dentes com lesão periapical crônica diagnosticada e tratada durante o tratamento ortodôntico: quando retomar a aplicação de forças? *Rev Clin Ortodon Dental Press*. 2008;7(1):109-11.

Corotti MV, Zambuzzi WF, Paiva KB, Menezes R, Pinto LC, Lara VS, Granjeiro JM. Immunolocalization of matrix metalloproteinases-2 and -9 during apical periodontitis development. *Arch Oral Biol*. 2009 Aug;54(8):764-71.

Costa TH, de Figueiredo Neto JA, de Oliveira AE, Lopes e Maia Mde F, de Almeida AL. Association between chronic apical periodontitis and coronary artery disease. *J Endod*. 2014 Feb;40(2):164-7

Cotti E. Advanced techniques for detecting lesions in bone. *Dent Clin North Am*. 2010 Apr;54(2):215-35.

Cotti E, Dessì C, Piras A, Flore G, Deidda M, Madeddu C, Zedda A, Longu G, Mercurio G. Association of endodontic infection with detection of an initial lesion to the cardiovascular system. *J Endod*. 2011 Dec;37(12):1624-9.

Cymrot M, Sales FCD, Teixeira FAA, Teixeira Junior FAA, Teixeira GSB, Cunha Filho JF, Oliveira NH. Prevalência dos tipos de fissura em pacientes com fissuras labiopalatinas atendidos em um Hospital Pediátrico do Nordeste brasileiro. *Rev Bras Cir Plást*. 2010; 25(4): 648-51.

De Moor RJ, Hommez GM, De Boever JG, Delme KI, Martens GE. Periapical health related to the quality of root canal treatment in a Belgian population. *Int Endod J*. 2000;33(2):113-20.

de Oliveira Demarchi AC, Zambuzzi WF, Paiva KB, da Silva-Valenzuela Md, Nunes FD, de Cássia Sávio Figueira R, Sasahara RM, Demasi MA, Winnischofer SM, Sogayar MC, Granjeiro JM. Development of secondary palate requires strict regulation of ECM remodeling: sequential distribution of RECK, MMP-2, MMP-3, and MMP-9. *Cell Tissue Res*. 2010;340(1):61-9.

Dextre TLO, Pinto LC, Nishiyama CK, Oliveira TM, Neves LT. Diagnóstico de periodontitis apical crônica em um paciente com fissura labiopalatina com ajuda de tomografia computadorizada de haz cônico. *Paraguay Oral Research* 2014 Abril; 2(2):49-54.

Dextre TLO, Nishiyama CK, Pinto LC, Siqueira DCR, Oliveira TM. Cone-beam computed tomography and periapical radiograph as follow-up methods of periapical lesions in cleft patients. *Dental Press Endod.* 2015 Jan-Apr;5(1):8-12.

Di Filippo G, Sidhu SK, Chong BS. Apical periodontitis and the technical quality of root canal treatment in an adult sub-population in London. *Br Dent J.* 2014 May;216(10):E22.

Dill A, Letra A, Chaves de Souza L, Yadlapati M, Bigueti CC, Garlet GP, Vieira AR, Silva RM. Analysis of multiple cytokine polymorphisms in individuals with untreated deep carious lesions reveals IL1B (rs1143643) as a susceptibility factor for periapical lesion development. *J Endod.* 2015 ;41(2):197-200.

Dugas NN, Lawrence HP, Teplitsky PE, Pharoah MJ, Friedman S. Periapical health and treatment quality assessment of root-filled teeth in two Canadian population. *Int Endod J.* 2003;36(3):181-92.

Eba H, Murasawa Y, Iohara K, Isogai Z, Nakamura H, Nakamura H, Nakashima M. The anti-inflammatory effects of matrix metalloproteinase-3 on irreversible pulpitis of mature erupted teeth. *PLoS One.* 2012;7(12):e52523.

Espíndola ACS, Passos CO, Souza EDA, Santos RA. Avaliação do grau de sucesso e insucesso no tratamento endodôntico. *RGO - Revista Gaúcha de Odontologia.* 2002;50(3):164-166.

Estrela C, Decurcio Dde A, Silva JA, Batista AC, de Souza Lima NC, de Freitas Silva BS, de Souza JA, Souza Costa CA. Immune-Inflammatory Cell Profile and Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa B Ligand/Osteoprotegerin Expression in Persistent Apical Periodontitis after Root Canal Retreatment Failure. *J Endod.* 2016 Mar;42(3):439-446.

François-Fiquet C, Poli-Merol ML, Nguyen P, Landais E, Gaillard D, Doco-Fenzy M. Role of angiogenesis-related genes in cleft lip/palate: review of the literature. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2014 Oct;78(10):1579-85.

Freitas JA, das Neves LT, de Almeida AL, Garib DG, Trindade-Suedam IK, Yaedú RY, et al. Rehabilitative treatment of cleft lip and palate: experience of the Hospital for Rehabilitation of Craniofacial Anomalies/USP (HRAC/USP)-Part 1: overall aspects. *J Appl Oral Sci.* 2012;20(1):9-15.

Fukada SY, Silva TA, Garlet GP, Rosa AL, da Silva JS, Cunha FQ. Factors involved in the T helper type 1 and type 2 cell commitment and osteoclast regulation in inflammatory apical diseases. *Oral Microbiol Immunol.* 2009;24(1):25-31.

Garlet GP, Horwat R, Ray HL Jr, Garlet TP, Silveira EM, Campanelli AP, Trombone AP, Letra A, Silva RM. Expression analysis of wound healing genes in human periapical granulomas of progressive and stable nature. *J Endod*. 2012;38(2):185-90.

Graves DT, Oates T, Garlet GP. Review of osteoimmunology and the host response in endodontic and periodontal lesions. *J Oral Microbiol*. 2011;3:5304.

Hadziabdic N, Kurtovic-Kozaric A, Pojskic N, Sulejmanagic N, Todorovic L. Gene-expression analysis of matrix metalloproteinases 1 and 2 and their tissue inhibitors in chronic periapical inflammatory lesions. *J Oral Pathol Med*. 2016 Mar;45(3):224-30.

Harila V, Ylikontiola LP, Palola R, Sándor GK. Maxillary arch dimensions in cleft infants in Northern Finland. *Acta Odontol Scand*. 2013;71(3-4):930-6.

Herrera DR, Silva EJ, Santos CC, Zaia AA, Ferraz CC, Almeida JF, Gomes BP. Root canal content from primary endodontic infection and upregulation of gelatinases in fibroblast cells. *Int Endod J*. 2015 Dec; 48(12):1168-74.

Hill PA, Murphy G, Docherty AJ, Hembry RM, Millican TA, Reynolds JJ, Meikle MC. The effects of selective inhibitors of matrix metalloproteinases (MMPs) on bone resorption and the identification of MMPs and TIMP-1 in isolated osteoclasts. *J Cell Sci*. 1994 Nov;107 (Pt 11):3055-64.

Hommez GM, Coppens CR, De Moor RJ. Periapical health related to the quality of coronal restorations and root fillings. *Int Endod J*. 2002;35(8):680-9.

Hong CY, Lin SK, Kok SH, Cheng SJ, Lee MS, Wang TM, Chen CS, Lin LD, Wang JS. The role of lipopolysaccharide in infectious bone resorption of periapical lesion. *J Oral Pathol Med*. 2004 Mar;33(3):162-9.

Hussne RP, Berbert FLCV, Nishiyama CK, Câmara AS, Pinheiro CR, Leonardo RT. Investigation of the endodontic needs and planning in patients with cleft lip and/or palate submitted to surgical treatment. *Perspect Oral Sci* 2009; 1(2):19-23.

Huomonen S, Ørstavik D. Radiological aspects of apical periodontitis. *End Top* 2002;1(1):3-25.

Huomonen S, Suominen AL, Vehkalahti MM. Prevalence of apical periodontitis in root filled teeth: findings from a nationwide survey in Finland. *Int Endod J*. 2016 Feb 25.

Iamaroon A, Wallon UM, Overall CM, Diewert VM. Expression of 72-kDa gelatinase (matrix metalloproteinase-2) in the developing mouse craniofacial complex. *Arch Oral Biol*. 1996;41(12):1109-19.

Jain A, Bahuguna R. Role of matrix metalloproteinases in dental caries, pulp and periapical inflammation: An overview. *J Oral Biol Craniofac Res*. 2015;5(3):212-8.

Kanagasingam S, Mannocci F, Lim CX, Yong CP, Patel S. Diagnostic accuracy of periapical radiography and cone beam computed tomography in detecting apical periodontitis using histopathological findings as a reference standard. *Int Endod J*. 2016 Apr 11.

Kaya S, Yavuz I, Uysal I, Akkuş Z. Measuring bone density in healing periapical lesions by using cone beam computed tomography: A clinical investigation. *J Endod*. 2012;38(1):28-31.

Kayahan MB, Malkondu O, Canpolat C, Kaptan F, Bayirli G, Kazazoglu E. Periapical health related to the type of coronal restorations and quality of root canal filling in a Turkish subpopulation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2008;105(1):e58-62.

Kimak A, Strycharz-Dudziak M, Bachanek T, Kimak E. Lipids and lipoproteins and inflammatory markers in patients with chronic apical periodontitis. *Lipids Health Dis*. 2015 Dec 14;14:162.

Kirkevang LL, Vaeth M, Hörsted-Bindslev P, Bahrami G, Wenzel A. Risk factors for developing apical periodontitis in a general population. *Int Endod J*. 2007;40(4):290-9.

Krane SM, Inada M. Matrix metalloproteinases and bone. *Bone*. 2008;43(1):7-18.

Krivicka-Uzkurele B, Pilmane M, Akota I. Barx1, growth factors and apoptosis in facial tissue of children with clefts. *Stomatologija*. 2008;10(2):62-6.

Kruse C, Spin-Neto R, Wenzel A, Kirkevang LL. Cone beam computed tomography and periapical lesions: a systematic review analysing studies on diagnostic efficacy by a hierarchical model. *Int Endod J*. 2015 Sep;48(9):815-28.

Leonardi Dutra K, Haas L, Porporatti AL, Flores-Mir C, Nascimento Santos J, Mezzomo LA, Corrêa M, De Luca Canto G. Diagnostic Accuracy of Cone-beam Computed Tomography and Conventional Radiography on Apical Periodontitis: A Systematic Review and Meta-analysis. *J Endod*. 2016 Mar;42(3):356-64.

Leslie EJ, Carlson JC, Shaffer JR, Feingold E, Wehby G, Laurie CA, Jain D, Laurie CC, Doheny KF, McHenry T, Resick J, Sanchez C, Jacobs J, Emanuele B, Vieira AR, Neiswanger K, Lidral AC, Valencia-Ramirez LC, Lopez-Palacio AM, Rivera Valencia D, Arcos-Burgos M, Czeizel AE, Field LL, Padilla CD, Cutiongco-de la Paz EM, Deleyiannis F, Christensen K, Munger RG, Lie RT, Wilcox A, Romitti PA, Castilla EE, Mereb JC, Poletta FA, Orioli IM, Carvalho FM, Hecht JT, Blanton SH, Buxó CJ, Butali A, Mossey PA, Adeyemo WL, James O, Braimah RO, Aregbesola BS, Eshete MA, Abate F, Koruyucu M, Seymen F, Ma L, Enríquez de Salamanca J, Weinberg S, Moreno L, Murray JC, Marazita ML. A multi-ethnic genome-wide association study identifies novel loci for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate on 2p24.2, 17q23 and 19q31. *Hum Mol Genet.* 2016 Mar 30.

Letra A, Silva RA, Menezes R, Astolfi CM, Shinohara A, de Souza AP, Granjeiro JM. MMP gene polymorphisms as contributors for cleft lip/palate: association with MMP3 but not MMP1. *Arch Oral Biol.* 2007;52(10):954-60.

Letra A, Silva RM, Motta LG, Blanton SH, Hecht JT, Granjeiro JM, Vieira AR. Association of MMP3 and TIMP2 promoter polymorphisms with nonsyndromic oral clefts. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2012;94(7):540-8.

Letra A, Ghaneh G, Zhao M, Ray H Jr, Francisconi CF, Garlet GP, Silva RM. MMP-7 and TIMP-1, new targets in predicting poor wound healing in apical periodontitis. *J Endod.* 2013;39(9):1141-6.

Letra A, Zhao M, Silva RM, Vieira AR, Hecht JT. Functional Significance of MMP3 and TIMP2 Polymorphisms in Cleft Lip/Palate. *J Dent Res.* 2014 Jul;93(7):651-6.

Lin SK, Chiang CP, Hong CY, Lin CP, Lan WH, Hsieh CC, Kuo MY. Immunolocalization of interstitial collagenase (MMP-1) and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) in radicular cysts. *J Oral Pathol Med.* 1997 Nov;26(10):458-63.

Lin PY, Chien KL, Chang HJ, Chi LY. Unfinished Root Canal Treatments and the Risk of Cardiovascular Disease. *J Endod.* 2015 Dec;41(12):1991-6.

Liu Y, Min D, Bolton T, Nubé V, Twigg SM, Yue DK, McLennan SV. Increased matrix metalloproteinase-9 predicts poor wound healing in diabetic foot ulcers. *Diabetes Care.* 2009;32(1):117-9.

Loftus JJ, Keating AP, McCartan BE. Periapical status and quality of endodontic treatment in an adult Irish population. *Int Endod J.* 2005;38(2):81-6.

Lu B, Zhang J, Huang X, Xiao S, Zhang M, Cai Z. Expression of Interleukin-1 β and Matrix Metalloproteinase-8 in Cytolytic and Noncytolytic *Enterococcus faecalis*-induced Persistent Apical Periodontitis: A Comparative Study in the Rat. *J Endod*. 2015 ;41(8):1288-93.

Menezes-Silva R, Khaliq S, Deeley K, Letra A, Vieira AR. Genetic susceptibility to periapical disease: conditional contribution of MMP2 and MMP3 genes to the development of periapical lesions and healing response. *J Endod*. 2012;38(5):604-7.

Mohamad Shah NS, Salahshourifar I, Sulong S, Wan Sulaiman WA, Halim AS. Discovery of candidate genes for nonsyndromic cleft lip palate through genome-wide linkage analysis of large extended families in the Malay population. *BMC Genet*. 2016 Feb 11;17:39.

Morsani JM, Aminoshariae A, Han YW, Montagnese TA, Mickel A. Genetic predisposition to persistent apical periodontitis. *J Endod*. 2011;37(4):455-9.

Morris-Wiman J, Du Y, Brinkley L. Occurrence and temporal variation in matrix metalloproteinases and their inhibitors during murine secondary palatal morphogenesis. *J Craniofac Genet Dev Biol*. 1999;19(4):201-12.

Morris-Wiman J, Burch H, Basco E. Temporospatial distribution of matrix metalloproteinase and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases during murine secondary palate morphogenesis. *Anat Embryol (Berl)*. 2000;202(2):129-41.

Mossey P. World Health Organization. Addressing the global challenges of craniofacial anomalies. Geneva: World Health Organization; 2006.

Murray CA, Saunders WP. Root canal treatment and general health: a review of the literature. *Int Endod J*. 2000 Jan;33(1):1-18.

Mutarai T, Ritthagol W, Hunsrisakhun J. Factors influencing early childhood caries of cleft lip and/or palate children aged 18 to 36 months in southern Thailand. *Cleft Palate Craniofac J* 2008; 45(5):468-72.

Nair PN, Sjögren U, Figdor D, Sundqvist G. Persistent periapical radiolucencies of root-filled human teeth, failed endodontic treatments, and periapical scars. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1999; 87(5):617-27.

Nair PN. Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2004;15(6):348-81.

Nair PN. On the causes of persistent apical periodontitis: a review. *Int Endod J*. 2006;39(4):249-81.

Nagase H, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res*. 2006;69(3):562-73.

Okada K, Rysavy S, Flores A, Linguraru MG. Noninvasive differential diagnosis of dental periapical lesions in cone-beam CT scans. *Med Phys*. 2015 Apr;42(4):1653-65.

Ørstavik D, Kerekes K, Eriksen HM. The periapical index: a scoring system for radiographic assessment of apical periodontitis. *Endod Dent Traumatol*. 1986;2(1):20-34.

Ozeki N, Hase N, Hiyama T, Yamaguchi H, Kawai R, Kondo A, Nakata K, Mogi M. IL-1 β -induced, matrix metalloproteinase-3-regulated proliferation of embryonic stem cell-derived odontoblastic cells is mediated by the Wnt5 signaling pathway. *Exp Cell Res*. 2014 Oct 15;328(1):69-86.

Ozeki N, Hase N, Kawai R, Yamaguchi H, Hiyama T, Kondo A, Nakata K, Mogi M. Unique proliferation response in odontoblastic cells derived from human skeletal muscle stem cells by cytokine-induced matrix metalloproteinase-3. *Exp Cell Res*. 2015 ;331(1):105-14.

Pasqualini D, Bergandi L, Palumbo L, Borraccino A, Dambra V, Alovise M, Migliaretti G, Ferraro G, Ghigo D, Bergerone S, Scotti N, Aimetti M, Berutti E. Association among oral health, apical periodontitis, CD14 polymorphisms, and coronary heart disease in middle-aged adults. *J Endod*. 2012 Dec;38(12):1570-1577.

Paula-Silva FW, da Silva LA, Kapila YL. Matrix metalloproteinase expression in teeth with apical periodontitis is differentially modulated by the modality of root canal treatment. *J Endod*. 2010;36(2):231-7.

Pereira Faustino IS, Azevedo RS, Takahama A Jr. Metalloproteinases 2 and 9 Immunoeexpression in Periapical Lesions from Primary Endodontic Infection: Possible Relationship with the Histopathological Diagnosis and the Presence of Pain. *J Endod*. 2016 Apr;42(4):547-51.

Provenzano JC, Antunes HS, Alves FR, Rôças IN, Alves WS, Silva MR, Siqueira JF Jr. Host-Bacterial Interactions in Post-treatment Apical Periodontitis: A Metaproteome Analysis. *J Endod*. 2016 Apr 8.

Ramachandran Nair PN, Pajarola G, Schroeder HE. Types and incidence of human periapical lesions obtained with extracted teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1996;81(1):93-102.

Ricucci D, Gröndahl K, Bergenholtz G. Periapical status of root-filled teeth exposed to the oral environment by loss of restoration or caries. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2000;90(3):354-9.

Rôças IN, Siqueira JF Jr, Del Aguila CA, Provenzano JC, Guilherme BP, Gonçalves LS. Polymorphism of the CD14 and TLR4 genes and post-treatment apical periodontitis. *J Endod.* 2014 ;40(2):168-72.

Rosenberg PA. Endodontic pain. *Endod Topics.* 2014 May 30(1):75-98.

Rosenberg PA, Frisbie J, Lee J, Frommer H, Kottal S, Phelan J, Lin L, Fisch G. Evaluation of pathologists (histopathology) and radiologists (cone beam computed tomography) differentiating radicular cyst from granulomas. *J Endod.* 2010;36(3):423-8.

Sá J, Araújo L, Guimarães L, Maranhão S, Lopes G, Medrado A, Coletta R, Reis S. Dental anomalies inside the cleft region in individuals with nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2016 Jan 1;21(1):e48-52.

Saini HR, Sangwan P, Sangwan A. Pain following foraminal enlargement in mandibular molars with necrosis and apical periodontitis - A randomized controlled trial. *Int Endod J.* 2015 Nov 18.

Segura-Egea JJ, Jiménez-Pinzon A, Poyato-Ferrera M, Velasco-Ortega E, Ríos-Santos JV. Periapical status and quality of root fillings and coronal restorations in an adult Spanish population. *Int Endod J.* 2004;37(8):525-30.

Segura-Egea JJ, Martín-González J, Cabanillas-Balsera D, Fouad AF, Velasco-Ortega E, López-López J. Association between diabetes and the prevalence of radiolucent periapical lesions in root-filled teeth: systematic review and meta-analysis. *Clin Oral Investig.* 2016 Apr 8.

Shin SJ, Lee JI, Baek SH, Lim SS. Tissue levels of matrix metalloproteinases in pulps and periapical lesions. *J Endod.* 2002 Apr;28(4):313-5.

Siqueira JF Jr, Rôças IN, Alves Fr, Campos LC. Periradicular status related to the quality of coronal restoration and root canal fillings in a Brazilian population. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2005;100(3):369-74.

Siqueira JF Jr, Rôças IN. Bacterial pathogenesis and mediators in apical periodontitis. *Braz Dent J.* 2007;18(4):267-80.

Siqueira JF Jr, Rôças IN, Provenzano JC, Daibert FK, Silva MG, Lima KC. Relationship between Fcγ receptor and interleukin-1 gene polymorphisms and post-treatment apical periodontitis. *J Endod.* 2009;35(9):1186-92.

Siqueira JF Jr, Rôças IN, Ricucci D, Hülsmann M. Causes and management of post-treatment apical periodontitis. *Br Dent J.* 2014 ;216(6):305-12.

Smane L, Pilmane M, Akota I. Apoptosis and MMP-2, TIMP-2 expression in cleft lip and palate. *Stomatologija.* 2013;15(4):129-34.

Sousa NG, Cardoso CR, Silva JS, Kuga MC, Tanomaru Filho M, Faria G. Association of matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) with the expression of matrix metalloproteinases-1, -2 and -9 during periapical lesion development. *Arch Oral Biol.* 2014;59(9):944-53.

Sundell AL, Nilsson AK, Ullbro C, Twetman S, Marcusson A. Caries prevalence and enamel defects in 5- and 10-year-old children with cleft lip and/or palate: A case-control study. *Acta Odontol Scand.* 2016;74(2):90-5.

Takimoto K, Kawashima N, Suzuki N, Koizumi Y, Yamamoto M, Nakashima M, Suda H. Down-regulation of inflammatory mediator synthesis and infiltration of inflammatory cells by MMP-3 in experimentally induced rat pulpitis. *J Endod.* 2014 Sep;40(9):1404-9.

Tang Z, Wang H, Jiang S. Clinical study of single-visit root canal treatment with a nickel-titanium (Ni-Ti) rotary instrument combined with different ultrasonic irrigation solutions for elderly patients with chronic apical periodontitis. *Biomed Mater Eng.* 2015;26 Suppl 1:S311-8.

Tanomaru-Filho M, Lima RK, Nakazone PA, Tanomaru JM. Use of computerized tomography for diagnosis and follow-up after endodontic surgery: clinical case report with 8 years of follow-up. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2010;109(4):629-33.

Todd R. Cone beam computed tomography updated technology for endodontic diagnosis. *Dent Clin North Am.* 2014 Jul;58(3):523-43.

Tolarová MM, Cervenka J. Classification and birth prevalence of orofacial clefts. *Am J Med Genet.* 1998;13;75(2):126-37.

Touré B, Kane AW, Sarr M, Ngom CT, Boucher Y. Prevalence and technical quality of root filling in Dakar, Senegal. *Int Endod J*. 2008;41(1):41-9.

Trindade IEK, Silva Filho OG. Fissuras Labiopalatinas – Uma abordagem interdisciplinar. São Paulo: Ed. Santos, 2007. 337p.

Vanderas AP. Incidence of cleft lip, cleft palate, and cleft lip and palate among races: A review. *Cleft Palate J*. 1987;24(3):216-25.

Van der Veken D, Curvers F, Fieuws S, Lambrechts P. Prevalence of apical periodontitis and root filled teeth in a Belgian subpopulation found on CBCT images. *Int Endod J*. 2016 Mar 19.

van der Waal SV, Lappin DF, Crielaard W. Does apical periodontitis have systemic consequences? The need for well-planned and carefully conducted clinical studies. *Br Dent J*. 2015 May 8;218(9):513-6.

Wasselink PR. The incidental discovery of apical periodontitis. *Endod Topics*. 2014 May 30(1):23-28.

Willershausen B, Kasaj A, Willershausen I, Zahorka D, Briseño B, Blettner M, Genth-Zotz S, Münzel T. Association between chronic dental infection and acute myocardial infarction. *J Endod*. 2009 May;35(5):626-30.

Woessner JF Jr. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J*. 1991;5(8):2145-54.

Wolf ZT, Brand HA, Shaffer JR, Leslie EJ, Arzi B, Willet CE, Cox TC, McHenry T, Narayan N, Feingold E, Wang X, Sliskovic S, Karmi N, Safra N, Sanchez C, Deleyiannis FW, Murray JC, Wade CM, Marazita ML, Bannasch DL. Genome-wide association studies in dogs and humans identify ADAMTS20 as a risk variant for cleft lip and palate. *PLoS Genet*. 2015 Mar 23;11(3):e1005059.

Xiao WL, Zhang DZ, Xu YX. The caries prevalence of oral clefts in Eastern China. *Int J Clin Exp Med*. 2015 Sep 15;8(9):16322-7.

ANEXOS

ANEXOS

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Susceptibilidade genética a periodontite apical crônica em indivíduos com fissura labiopalatina: Estudo caso controle.

Pesquisador: Tulio Lorenzo Olano Dextre

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 25300713.4.0000.5441

Instituição Proponente: Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais da USP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 501.083

Data da Relatoria: 17/12/2013

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um projeto com a finalidade de tese de doutorado, onde os pesquisadores pretendem selecionar 300 indivíduos, de ambos os sexos, divididos em 3 grupos: Grupo I: 100 indivíduos com fissura labiopalatina completa uni ou bilateral, não sindrômico, regularmente matriculados no HRAC-USP; Grupo II: 100 indivíduos sem fissura labiopalatina e não sindrômicos tratados no CPO UNINGA e, Grupo III: 100 indivíduos sem fissura e sem periodontite apical crônica, composto por alunos voluntários dos cursos de graduação e pós-graduação de Odontologia e Fonoaudiologia da FOB-USP e do HRAC-USP, além de funcionários não-docentes da FOB-USP e do HRAC-USP, que nunca tenham realizado tratamento endodôntico. Será utilizado o escore 4 do índice PAI (Periapical Index) nas radiografias de controle de 6 meses a um ano para selecionar os indivíduos que tiveram história de PAC. Os sujeitos da pesquisa receberão um tubo Falcon de 15 mL identificado para a coleta de saliva total expectorada até a marcação de 5 mL, que será transportada até o Laboratório de Farmacologia e Genética, do Departamento de Ciências Biológicas da FOB-USP, onde será realizada a extração de DNA. Foram selecionados para a avaliação genética de variantes polimórficas 5 polimorfismos abrangendo os genes MMP2 (rs243865 e rs 2285053 e rs2287074) e MMP3 (rs679620 e rs522616) para genotipagem em PCR Real Time. Os resultados serão analisados usando o software SDS 1.7 (Applied Biosystems). As sequências alélicas e

Endereço: SILVIO MARCHIONE 3-20

Bairro: VILA NOVA CIDADE UNIVERSITARIA

CEP: 17.012-900

UF: SP

Município: BAURU

Telefone: (14)3235-8421

Fax: (14)3234-7818

E-mail: uep_projeto@centrinho.usp.br

Continuação do Parecer: 501.083

Materiais ou Dados Coletados;

- Análise Crítica dos Riscos e Benefícios;
- Critérios para Suspender ou Encerrar as Pesquisas; e
- Termo de Compromisso do Pesquisador Responsável.

Além dos termos apresentados, os pesquisadores anexaram carta de anuência do responsável pelo Centro de Pós-Graduação C.P.O. Uninga-Bauru, Prof. Dr. Celso Kenji Nishiyama e do responsável pelo Laboratório de Farmacologia e Genética da FOB/USP, Prof. Dr. Carlos Ferreira dos Santos.

Recomendações:

Não se aplica.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto bem fundamentado e bem redigido, obedecendo aos padrões éticos exigidos.

Sendo assim, sugiro a esse Comitê, parecer aprovado.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O Colegiado acatou o parecer do relator em seus aspectos éticos e metodológicos de acordo com as Diretrizes estabelecidas na Resolução 466/12 e complementares do Conselho Nacional de Saúde. Ressaltamos que, conforme a Resolução CNS 466/12, o pesquisador é responsável por "desenvolver o projeto conforme delineado" e por informar ao CEP as emendas, ou seja, "todos os fatos relevantes que alterem o curso normal dos estudos por ele aprovados e, especificamente, nas pesquisas na área da saúde, dos efeitos adversos e da superioridade significativa de uma intervenção sobre outra ou outras comparativas" (alterações que envolva métodos, critérios éticos, mudança de pesquisadores/entrevistadores e instrumental), tais emendas devem ser entregues na Seção de Apoio a Pesquisa do SVAPEPE, bem como anexadas na Plataforma Brasil. O CEP avaliará e emitirá o parecer das emendas.

O pesquisador também fica responsável pela entrega dos relatórios semestrais e final, bem como notificá-los pela Plataforma Brasil.

Informamos que após o recebimento do trabalho concluído, este Comitê enviará o parecer final para publicação do trabalho.

Endereço: SILVIO MARCHIONE 3-20

Bairro: VILA NOVA CIDADE UNIVERSITÁRIA

CEP: 17.012-900

UF: SP

Município: BAURU

Telefone: (14)3235-8421

Fax: (14)3234-7818

E-mail: uep_projeto@centrinho.usp.br

Continuação do Parecer: 501.083

BAURU, 19 de Dezembro de 2013

Assinador por:
Marcia Ribeiro Gomide
(Coordenador)

Endereço: SILVIO MARCHIONE 3-20
Bairro: VILA NOVA CIDADE UNIVERSITARIA **CEP:** 17.012-900
UF: SP **Município:** BAURU
Telefone: (14)3235-8421 **Fax:** (14)3234-7818 **E-mail:** uep_projeto@centrinho.usp.br