



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO - USP**



**BEATRIZ BANDEIRA DANTAS DE ARAUJO**

**POLIMORFISMO NO GENE RECEPTOR DO HORMÔNIO DO  
CRESCIMENTO.**

Ribeirão Preto

2021



**BEATRIZ BANDEIRA DANTAS DE ARAÚJO**

**POLIMORFISMO NO GENE RECEPTOR DO HORMÔNIO DO  
CRESCIMENTO.**

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências.  
Programa: Odontopediatria.

Área de Concentração: Odontopediatria.

**Orientadora:** Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Regina Guenka Palma-Dibb

**Co-Orientadora** Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Andiará De Rossi Daldegan

Ribeirão Preto

2021



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

Ficha Catalográfica preparada pela Seção de Tratamento da Informação da  
Biblioteca

Araújo, Beatriz Bandeira Dantas

Polimorfismo no gene receptor do hormônio do crescimento. Ribeirão Preto, 2021. 73 p:il., 30cm

Tese de Doutorado. A versão original se encontra disponível na Unidade que aloja o Programa), apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Odontopediatria

Orientadora: Profa. Dra. Regina Guenka Palma Dibb

1. polimorfismos genéticos; 2. hormônio; 3. P561T; 4.perfil esquelético facial; 5.gene, 6.face, 7.Ortodontia.



ARAÚJO, B.B.D. **Polimorfismo no gene receptor do hormônio do crescimento.** Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Doutora em Ciências.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Aprovado em: \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_\_\_

Prof (a). Dr (a). \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof (a). Dr (a). \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof (a). Dr (a). \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof (a). Dr (a). \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_



## **Dedicatória**

Dedico este trabalho primeiramente a Deus e a Nossa Senhora de Nazaré, por me dar força, guiar e por nunca me desampararem em todas as etapas da minha vida, me guiando, iluminando, protegendo e agraciando. Aos meus pais, ao meu irmão e ao meu marido.

## **Agradecimentos Especiais**

A minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Regina Guenka Palma-Dibb, pela paciência e competência nas correções do meu trabalho e por entender que cada etapa até aqui levou o dobro do caminho.

A minha Co-Orientadora Profa. Dra. Erika Calvano Küchler, que me acolheu me ensinou me orientou me mostrou um mundo de novas possibilidades, não há palavras suficiente para agradecê-la, obrigada por todas as oportunidades que tive ao longo desses anos, sua inteligência, competência e dedicação merecem a minha eterna gratidão e admiração. Meu grande referencial de mulher dentro da ciência.

Agradeço também ao Prof. Dr. Alexandre Vieira, da universidade de Pittsburgh por ter me recebido e ter me dado a oportunidade de desenvolver os resultados da minha pesquisa com todo o apoio, paciência dedicação e com os melhores recursos que poderia ter. A minha eterna gratidão e admiração.



## **Agradecimentos**

A Deus, por me permitir esta oportunidade nesta vida, me abençoando, iluminando, guiando, acolhendo e aconselhando em todos os momentos.

Aos meus pais, pela oportunidade de me permitir voar, e segurar a minha mão em todas as fases da minha vida. Não há palavras que possam traduzir a gratidão, amor e orgulho que sinto por vocês.

Ao meu marido, pelo amor, apoio, incentivo e paciência por nunca me deixar desistir dos meus sonhos, cada conquista tem a sua digital.

A minha tão esperada filha Maria Antonia por me dar um sentido a vida mesmo quando tudo esteve de cabeça para baixo e que o único caminho possível na minha frente era desistir e com ela e por ela entrego esse trabalho.

À Universidade de São Paulo, nas pessoas do atual Reitor Prof. Dr. Vahan Agopyan, e do Vice-Diretor Prof. Dr. Antônio Carlos Hernandes.

À Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na pessoa da atual Diretora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Léa Assed Bezerra da Silva e do Vice-Diretor Prof. Dr. Arthur Belém Novaes Júnior.

À coordenação do Curso de Pós-graduação da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na pessoa da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Raquel Assed Bezerra Segato.

À Universidade de São Paulo-USP e à Faculdade do Amazonas-IAES, por tornarem possível este doutorado Dinter.

À Universidade de Piitsburgh, PA, EUA, na pessoa do Prof. Dr. Alexandre Vieira, por terem tão bem me recebido e por me proporcionarem conhecimentos infinitos para o desenvolvimento não só dessa tese como pessoal, a vocês a minha eterna gratidão.

À Faculdade do Amazonas-IAES, na pessoa da Diretora Profa. Dra. Zobélia Maria de Souza Lopes e do coordenador Prof. Dr. Alberto Tadeu do Nascimento Borges. Obrigada.

À Profa. Dra. Lea Assed Bezerra da Silva, por sua dedicação, carinho, mesmo sendo referência na odontopediatria nunca deixou de ser humilde em ouvir e orientar seus alunos. Minha eterna admiração.

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

Aos professores do Departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, em especial aos professores que ministraram disciplinas durante o curso de doutorado, obrigada pela formação sólida que me proporcionaram.

À Nilza Letícia Magalhães, pela ajuda, esclarecimentos e apoio no laboratório de genética, sua energia, alegria e dedicação, foram fundamentais no dia a dia do laboratório a você a minha eterna gratidão e a certeza de que a terei sempre em meu coração.

À Mary Possani Carmessano, por ser meu anjo da guarda ao longo desses anos.

Aos professores da banca examinadora, meu enorme agradecimento por concederem o precioso tempo de vocês para lerem minha tese.

À querida Alice Gomes de Carvalho Ramos, minha amiga e professora, compartilhamos muitas etapas desta jornada, se mostrou extremamente dedicada e durante essa jornada nos fundimos e criamos juntas esse trabalho, cada etapa cada linha, me diverti muito compartilhar isso com você. Minha eterna gratidão e amizade.

A todas as minhas amigas e amigos de Doutorado, obrigada por todo apoio, incentivo e momentos compartilhados. Ao Arthur, Mariele, Guido, Marjorie a todos do grupo de Ortodontia e em especial a Juliana Arid, obrigada pela ajuda e paciência durante as etapas deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo/FAPESP, em nome da Profª Doutora Érika Calvano Küchler, pelo financiamento e incentivo à pesquisa. Aos pacientes das clínicas de Especialização em Ortodontia das Faculdades de Odontologia de Manaus, Ribeirão Preto, Rio de Janeiro e Curitiba, participantes da pesquisa, tornando-a possível.

A todos que direta ou indiretamente me ajudaram na realização deste trabalho.

A Parte experimental desta Tese foi desenvolvida nos seguintes laboratórios:

– Laboratório de Biologia Molecular e Cultura de Células, do Departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP.

– Vieira Lab, do Departamento de Biologia Oral, Escola de Medicina Dentária, Universidade de Pittsburgh.



ARAUJO, BBD. **O Poliformismo No Gene Receptor Do Hormônio Do Crescimento**. Ribeirão Preto, 2021, 73p. Tese [Doutorado]. Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

## Resumo

O objetivo do presente estudo foi avaliar a existência de associação entre polimorfismo P561T no gene que codifica o receptor do hormônio do crescimento (GHR) com classe III esquelética. A amostra foi composta por 596 pacientes em tratamento na clínica de especialização em Ortodontia da Faculdade do Amazonas (IAES-AM), da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP (Ribeirão Preto – SP), da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal Fluminense (Rio de Janeiro-RJ) além de uma amostra de 98 pacientes que necessitavam de cirurgia ortognática, recrutados do centro de cirurgia ambulatorial bucomaxilofacial da Universidade Positivo e Universidade Federal do Paraná – Curitiba, totalizando 694 pacientes. Foram incluídos no estudo, pacientes com idade entre 7 a 67 anos, de ambos os gêneros. O padrão esquelético foi determinado por meio de telerradiografias, utilizando pontos de referências cefalométricas da mandíbula, da maxila e da base do crânio. O DNA foi extraído por meio da coleta de saliva, como fonte de material biológico. A genotipagem da variação genética P561T em GHR foi realizada por meio da reação em cadeia da polimerase em tempo real, pela técnica Taqman. Os dados obtidos foram tabulados e analisados no programa Epi Info 7.0 e no software Plink. O Equilíbrio de Hardy-Weinberg foi testado para cada polimorfismo genético. A razão de chance (odds ratio), o teste do qui-quadrado, exato de Fisher, o teste t, ANOVA com pós-teste de Tukey foram utilizados para avaliar se algum alelo ou genótipo está preferencialmente associado com algum PEF específico. O nível de significância adotado foi de 5%. Os resultados obtidos permitiram concluir que não houve associação entre os genótipos e alelos para os polimorfismos estudados com as Maloclusões Esqueléticas, em relação aos diferentes Tipos Morfológicos Faciais

**Palavras-chave:** polimorfismos genéticos; hormônio; P561T; perfil esquelético facial; gene, face, Ortodontia.



ARAUJO, BBD. **Poliformism in the Growth Hormone Receptor Gene**. Ribeirão Preto, 2021, 73p. Thesis [Doctorate]. Faculty of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo.

#### Abstract

The aim of the present study will be to assess whether there is an association between P561T polymorphism in the gene encoding the growth hormone receptor (GHR) with skeletal class III. The sample consisted of 596 patients undergoing treatment at the Orthodontics Specialization Clinic of Faculdade do Amazonas (IAES-AM), Ribeirão Preto Dental School - USP (Ribeirão Preto - SP), Dentistry School of Universidade Federal Fluminense (Rio de Janeiro-RJ) in addition to a sample of 98 patients who needed orthognathic surgery, recruited from the buccomaxillofacial outpatient surgery center at Universidade Positivo and Universidade Federal do Paraná - Curitiba, totaling 694 patients. The study included patients aged 7 to 67 years, of both genders. The skeletal pattern will be determined by means of teleradiographies, using cephalometric reference points of the mandible, maxilla, and skull base. The DNA will be extracted through the collection of saliva, as a source of biological material. The genotyping of the genetic variation P561T in GHR will be performed through the polymerase chain reaction in real time, by the Taqman technique. The data obtained were tabulated and analyzed using the Epi Info 7.0 program and the Plink software. The Hardy-Weinberg Balance was tested for each genetic polymorphism. The odds ratio, the chi-square test, Fisher's exact test, the t test and ANOVA with Tukey's post-test were used to assess whether any allele or genotype is preferably associated with any specific PEF. The level of significance adopted will be 5%. The results demonstrated that there was not association between genotypes and alleles for the polymorphisms studied with Skeletal Malocclusion, in relation to different Morphological Facial Types.

**Keywords:** genetic polymorphisms; hormone; P561T; skeletal facial profile; gene, face, orthodontics.

# Sumário

Resumo

Abstract

1. INTRODUÇÃO .....	23
2. PROPOSIÇÃO .....	32
2.1 Objetivo Geral .....	31
2.2 Objetivos Específicos .....	31
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	32
3.1 Caracterização da amostra .....	35
3.2 Critérios de inclusão e exclusão.....	36
3.3 Avaliação do fenótipo mandibular e maxilar .....	36
3.4 Coleta de material biológico, extração e quantificação do DNA.....	38
3.5 Genotipagem por PCR em tempo Real .....	39
3.6 Análise dos dados.....	39
4. RESULTADOS .....	35
5. DISCUSSÃO .....	44
6. CONCLUSÃO .....	51
REFERÊNCIAS.....	58
ANEXOS .....	62

## **1. INTRODUÇÃO**

---



## 1 INTRODUÇÃO

A má oclusão é um desalinhamento ou relação incorreta dos dentes e/ou arcos dentários que pode levar a alterações na função mastigatória, na aparência facial podendo impactar na estética, e resultar em aumento do risco de trauma dental e comprometimento da qualidade de vida. A má oclusão esquelética de Classe III é uma das deformidades esqueléticas maxilofaciais mais graves na ortodontia. E pode estar relacionada ao crescimento excessivo da mandíbula, ao crescimento maxilar ineficiente ou a uma combinação de ambas as condições. (Bayram et al., 2014)

O desvio morfofuncional do aparelho mastigatório (má-oclusão) são encontradas nos diversos grupos humanos, expressando as infinitas possibilidades de combinações entre alterações dentárias, desequilíbrios esqueléticos, musculares, estéticos e funcionais, sendo de natureza e intensidade variadas (Queluz, Gimenez, 2000).

Esse desvio pode ocorrer devido às discrepâncias no crescimento e no desenvolvimento do esqueleto craniofacial, ou seja, por alterações durante o processo. Quando estas se encontram localizadas nas arcadas dentárias (maxila e/ou mandíbula), são denominadas alterações dentofaciais, as quais podem influenciar a posição e orientação dos maxilares, dos músculos da mastigação e dos dentes, conduzindo às alterações no Padrão Esquelético Facial (PEF) (Proffit et al., 2012).

O desenvolvimento craniofacial normalmente é mediado pelo hormônio do crescimento (GH) e a deficiência ou excesso pode produzir alterações no desenvolvimento (Rosenbloom 2000). O GH é hormônio peptídeo produzido na adenohipófise e desempenha um papel importante na regulação do crescimento e desenvolvimento do complexo maxilofacial. GH liga receptores hormonais de crescimento (GHRs) localizados na superfície celular, a fim de ativar as vias de sinalização intracelular envolvidas nesses processos. Além disso, desempenha um papel importante no crescimento da cartilagem, e os GHRs estão especialmente presentes no côndilo mandibular, que desempenha um papel significativo no crescimento e desenvolvimento da morfologia craniofacial regulando o ângulo e o tamanho da morfologia. (Cakan DG et al., 2012) Mutações disfuncionais no gene GHR

causam síndrome de Laron (síndrome de insensibilidade de GH), que está associada à morfologia craniofacial característica e baixa estatura.(Bayram et al., 2014) Curiosamente, pacientes com deficiência de GHR apresentam morfologia craniofacial caracterizada pela falta de crescimento vertical. (Nakawaki et. al., 2017)

O gene GHR vem sendo muito estudado na Ortodontia em função do seu efeito sobre o crescimento facial. O polimorfismo P561T em GHR é uma mutação missense, causando uma transversão do aminoácido da citosina para a adenina e mudando o códon 56 da prolina para a treonina. O gene GHR humano é codificado por um único gene no cromossoma 5p13.1. GHR é um dos prováveis candidatos para a determinação de traços morfológicos, pois o GH é um regulador chave do crescimento ósseo. Esse hormônio se liga a receptores de superfície celular específicos para iniciar estes processos e ativar vias de sinalização intracelulares diversas. (Sasaki Y et al.)

Apesar de muitos estudos avaliarem a associação entre o polimorfismo P561T em GHR com má oclusão esquelética de Classe III (Yamaguchi et al., 2001; Zhou et al., 2005; Tomoyasu et al., 2009; Sasaki et al., 2009; Kang et al., 2009; Tassopoulou-Fishell et al., 2012; Bayram et al., 2014; Zebrick et al., 2014), pouco se sabe sobre o polimorfismo P561T e qual é o papel dele na etiologia má oclusão esquelética de Classe III em brasileiros.

O polimorfismo genético é uma alteração na sequência de pares de bases do DNA. Embora a maioria destas alterações seja funcionalmente neutra, o polimorfismo pode estar relacionado à regulação da expressão do gene ou à função da proteína codificada, ocasionando diferentes comportamentos biológicos e a susceptibilidade a doenças (Ye, 2000).

O tipo mais comum de polimorfismo é o que envolve um único nucleotídeo, denominado de polimorfismo de nucleotídeo único, polimorfismo de transição ou SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms), onde ocorre a substituição de um nucleotídeo por outro, ocorrendo a troca de um único par de bases, podendo ainda assim afetar a expressão de proteínas, a estrutura e a função de um gene (Takashiba e Naruishi (2006),).

O polimorfismo genético está disperso por todo o genoma e ocorre em regiões codificadoras e não codificadoras. Nestas, de regiões codificadoras, denominados não-sinônimos, pode ocorrer uma substituição de um aminoácido na sequência

proteica, podendo levar a modificações estruturais e funcionais na proteína e um potencial efeito biológico. Alguns polimorfismos genéticos de regiões não codificadoras, classificados como sinônimos, podem modificar a estrutura e estabilidade do RNA mensageiro e afetar a quantidade de proteína produzida. Outro tipo de polimorfismo importante é aquele localizado em regiões promotoras, pois é capaz de alterar a expressão do gene (Chasman e Adams, 2001).

Nos casos em que o polimorfismo ocorre na região codificadora do gene pode resultar na substituição de um aminoácido, alterando a síntese de uma proteína e podendo alterar a função da célula (Ikuta et al., 2015), como no caso do polimorfismo P561T em GHR, onde ocorre uma substituição de aminoácidos na posição 561. Se a função das proteínas for afetada em um processo biológico, o polimorfismo de alguns genes pode aumentar ou diminuir o risco do paciente à expressão fenotípica avaliada (Kinane e Hart, 2003; Quilez, et al., 2016), como no caso de má oclusão esquelética de Classe III.

Desta forma, apesar de diversos estudos terem demonstrado que o polimorfismo P561T está envolvido com má oclusão esquelética de Classe III, nenhum estudo prévio avaliou esse polimorfismo em populações brasileiras.





## **2. PROPOSIÇÃO**

---





## **2 PROPOSIÇÃO**

### **2.1 Objetivo Geral**

O objetivo do presente estudo foi avaliar a existência de associação entre o polimorfismo P561T no gene que codifica o receptor do hormônio do crescimento e a má oclusão esquelética de Classe III em 4 populações de regiões distintas do país (Rio de Janeiro - RJ, Manaus - AM, Ribeirão Preto - SP e Curitiba - PR).

### **2.2 Objetivos Específicos**

Avaliar a associação entre as alterações dimensionais mandibulares com as variações genética P561T em GHR.

Avaliar a associação entre as alterações dimensionais maxilares com as variações genéticas P561T em GHR.





### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

---





### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

O presente projeto de pesquisa, *cross-sectional* multicêntrico, previamente submetido à apreciação pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos nas diferentes locais que foram realizadas as coletas e as análises, Universidade Federal Fluminense – Hospital Antônio Pedro (33791314.3.0000.5243), Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo (CAAE: 50765715.3.0000.5419), Universidade Positivo (80846317.8.0000.0093) e University of Pittsburgh (no. 12080056), tendo sido aprovado em todos os comitês. Todos os pacientes e seus responsáveis receberam informações sobre o projeto de pesquisa e foram incluídos após lerem e assinarem o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo B).

#### **3.1 Caracterização da amostra**

O presente estudo se caracteriza por uma investigação do tipo transversal. A amostra foi composta por 596 pacientes em tratamento nas clínicas de especialização em Ortodontia de do Instituto Amazônia de Ensino Superior (Manaus-AM), da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal Fluminense (Rio de Janeiro-RJ) e da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP (Ribeirão Preto – SP). Além disso, uma amostra de 98 pacientes que necessitavam de cirurgias ortognáticas, foram recrutados do centro de cirurgia ambulatorial bucomaxilofacial da Universidade Positivo e Universidade Federal do Paraná - Curitiba, totalizando 694 indivíduos. Foram incluídos, no estudo, pacientes com idade entre 14 a 67 anos, de ambos os gêneros após assinatura dos Termos de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Apêndice A) e de Assentimento (Apêndice B) pelos pacientes ou por seus responsáveis, foram obtidas informações como gênero e idade, a partir do prontuário de cada paciente.

### 3.2 Critérios de inclusão e exclusão

Pacientes que apresentavam má oclusão classe III, com diagnóstico clínico, e com um conjunto completo de registros pré-tratamento ortodôntico incluindo telerradiografia em norma lateral, radiografia panorâmica, fotografias intra e extra-bucais, modelos de gesso e com idade superior a 14 anos foram incluídos. Foram excluídos pacientes portadores de síndromes genéticas e/ou sistemicamente comprometidos e que não concordaram com o TCLE ou o Termo de Assentimento assinados.

### 3.3 Avaliação do fenótipo mandibular e maxilar

A telerradiografia em norma lateral de cada paciente foi avaliada para análise dos seguintes parâmetros:

- Análise da relação esquelética ântero-posterior da maxila e da mandíbula, dependendo da medida do ângulo ANB, classificado em Classe I (ANB=0 a 4°), Classe II (ANB>4°) ou Classe III (ANB<0°). (Figura 1)
- Linha S-N: linha que passa pelos pontos S e N, situados no plano médiosagital e na base do crânio, que sofrem alterações pouco apreciáveis durante o crescimento em relação as estruturas faciais. Utilizada como referência para relação espacial das estruturas faciais quando estas são relacionadas com a base do crânio.
- GoGn: representa o corpo mandibular; plano mandibular.
- A-Ptm: equivalente ao comprimento maxilar.
- Pog-Go: caracteriza o comprimento do corpo mandibular.
- Co-Go: representa a altura do ramo mandibular.

A análise cefalométrica foi baseada no traçado cefalométrico realizado sob supervisão de profissionais experientes.

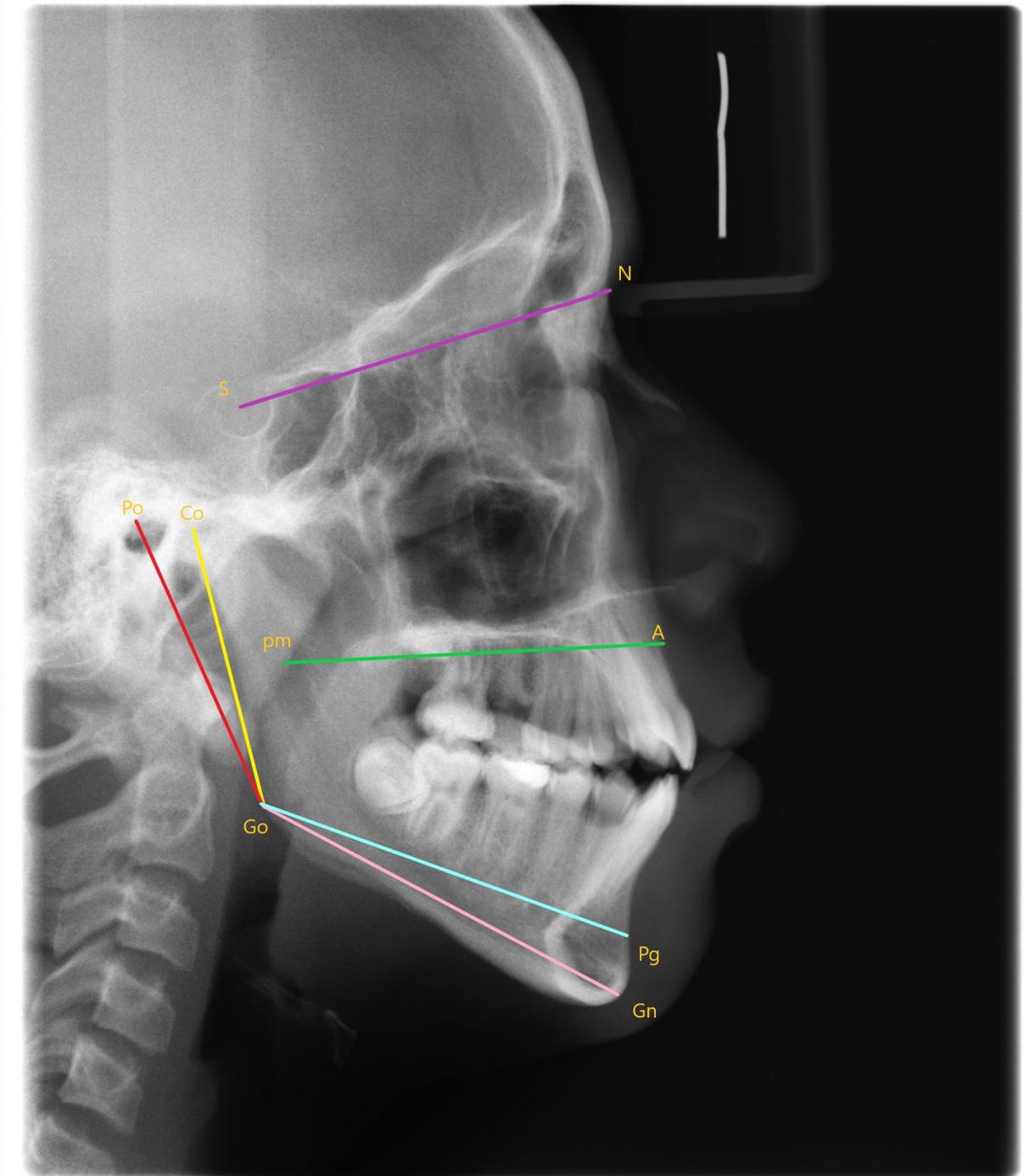


Figura 1. Pontos analisados neste estudo.

### 3.4 Coleta de material biológico, extração e quantificação do DNA

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

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

Posteriormente, as amostras foram descongeladas e incubadas com 100ng/mL de Proteinase K (4µL de Proteinase K - Fungal, Invitrogen Laboratories, na concentração de 25mg/mL), em banho-maria a 56°C overnight e, então, submetidas a processos de precipitação utilizando-se 400µL de solução de acetato de amônio a 10M. A seguir, todos os tubos foram agitados manualmente por 5 minutos, centrifugados por 15 minutos (12000rpm), sendo o sobrenadante dividido em dois tubos eppendorf de 700µL cada. O mesmo volume (700µL) de álcool isopropílico será acrescentado e os tubos foram resfriados e agitados vigorosamente.

Após nova centrifugação por 20 minutos (12000rpm) a 4°C a formação da "nuvem de DNA" foi observada em cada eppendorf de todas as alíquotas. Em seguida, o sobrenadante foi descartado com cuidado para não deslocar o pellet de DNA e 1mL de etanol a 70% resfriado será adicionado, seguido de centrifugação por 15 minutos (12000rpm), a 4°C. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e o tubo aberto e emborcado em papel para secar por pelo menos 30 minutos e evaporar o excesso de etanol. O pellet de DNA foi ressuscitado em 400µL de Tampão de Extração (TE) e congelado a -20°C.

A concentração e a pureza do DNA foram determinadas por densidade óptica em espectrofotômetro (NanoDrop®2000c) utilizando-se 2µL do material extraído. A concentração de DNA foi avaliada em um comprimento de onda de 260 nanômetros

(nm). A razão entre os valores obtidos nos comprimentos de onda 260nm e 280 nm foi usada para estimar a pureza do DNA genômico. As amostras foram diluídas em água Milli-Q à 2ng/  $\mu$ L.

### **3.5 Genotipagem por PCR em tempo Real**

A variação genética P561T foi genotipada pela reação em cadeia da polimerase em tempo real, usando o método Taqman (Ranade et al., 2001). As amplificações foram realizadas no termociclador StepOnePlus Real Time PCR System, fornecido pela Applied Biosystems (Foster City-Califórnia-USA), no laboratório de “Biologia Molecular e Cultura de Células” do Departamento de Clínica Infantil, da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP. Na análise de Taqman, duas sondas (VIC e FAM) foram utilizadas no ensaio de discriminação alélica, onde cada sonda anela com a variante polimórfica específica. Durante o PCR, primers se hibridizam com a sequência alvo do DNA. Essa reação resulta na liberação de fluorescência específica de cada sonda e essa fluorescência é capturada e mensurada pelo termociclador como consequência da amplificação do DNA alvo.

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

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

### **3.6 Análise dos dados**

Como método para avaliar a confiabilidade da identificação dos pontos anatômicos nas radiografias cefalométricas laterais da face, realizadas pelos examinadores por meio do programa Dolphin, foi utilizado o ICC – Coeficiente de Correlação IntraClasse. Dez por cento do total das radiografias cefalométricas laterais da face foram aleatoriamente selecionadas para avaliação de 2 dos 4 examinadores, com um intervalo de 2 semanas. Os testes Qui-quadrado ou exato de Fisher foram

utilizados para avaliar o equilíbrio de Hardy-Weinberg e para avaliar a associação entre o genótipo e as frequências alélicas para cada variação genética avaliada com cada ME e TMF, individualmente para cada cidade. Os dados foram analisados usando Epi Info 3.5.2. ([www.cdc.gov/epiinfo](http://www.cdc.gov/epiinfo)) e pacote GraphPadPrism 5.0 (gráfico-Pad, San Diego, CA, EUA).

## **4. RESULTADOS**

---



## 4 RESULTADOS

Um total de 694 pacientes foram incluídos e analisados neste estudo, dos quais 273 (39.3%) eram do gênero masculino e 421(60,7%) do gênero feminino. A média de idade dos indivíduos incluídos na amostra do Rio de Janeiro, Manaus e Ribeirão Preto foi de 22,9 anos (DP- 11 anos). Na amostra de Curitiba, onde os indivíduos iriam realizar cirurgia ortognática, a média de idade foi de 29,3 anos (DP 9,1 anos). As características da amostra por região são apresentadas na Tabela 1. Todos os polimorfismos estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg para cada cidade avaliada.

**Tabela 1.** Características da amostra por região

		Rio de Janeiro (RJ)	Manaus (M)	Ribeirão Preto (RP)	Amostras Totais (RJ+M+R P)	Curitiba (Amostras Cirurgicas)
<b>Idade</b>	Desvio Padrão (DP)	24,7 (10,7)	26,5 (11)	14,9 (7,1)	22,9 (11)	29,3 (9,1)
	Média	22	24	12	20	28
	Min	7	14	7	7	16
	Max	67	66	51	67	55
<b>Gênero</b> <i>n (%)</i>	Masculino	124 (37,1)	51 (39,2)	65 (49,2)	240 (40,3)	33 (33,7)
	Feminino	210 (62,9)	79 (60,8)	67 (50,8)	356 (59,7)	65 (66,3)
<b>Malocclusão Esquelética</b>	Classe I <i>n (%)</i>	128 (38,3)	68 (52,3)	73 (55,3)	269 (45,1)	21 (21,4)
	Classe II <i>n (%)</i>	173 (51,8)	50 (38,5)	42 (31,8)	265 (44,5)	19 (19,4)
	Classe III <i>n (%)</i>	33 (9,9)	12 (9,2)	17 (12,9)	62 (10,4)	58 (59,2)
<b>Tipo Morfológico Facial</b>	Mesofacial <i>n (%)</i>	155 (46)	68 (52,3)	64 (48,5)	287 (48,2)	24 (24,5)
	Dolicofacial <i>n (%)</i>	94 (28,1)	33 (25,4)	53 (40,2)	180 (30,2)	15 (15,3)
	Braquifacial <i>n (%)</i>	85 (25,4)	29 (22,3)	15 (11,4)	129 (21,6)	59 (60,2)

**Tabela 2.** Variações genéticas para o gene GHR

Gene	Loci	Sequência de Referência	Tipo da Alteração	Mudança na base (Sequência de contexto)	Menor Frequência Alélica Global
<i>GHR</i>	5p12	rs2910875	utr variant 3 prime	ATG[A/G]CTA	0.4557/2282
<i>GHR</i>	5p12	rs2973015	intron variant	TTT[A/G]CTG	0.4493/2250
<i>GHR</i>	5p13.1	rs1509460	intron variant	CAG[G/T]ACT	0.4407/2207

Na tabela 2 pode-se observar as variações genéticas para o gene GHR, o tipo de alteração e as mudanças de bases.

Comparações entre os genótipos e as frequências alélicas encontradas nas variações avaliadas no gene GHR com a maloclusão esquelética são apresentadas na Tabela 3. Não foi possível evidenciar associação estatisticamente significativa entre as distribuições genotípicas e/ou alélicas para as variações genéticas estudadas no gene e a presença das diferentes ME ( $p > 0,05$ ).

**Tabela 3.** Frequências genótípicas e alélicas de acordo com a maloclusão esquelética e a região estudada.

<b>GHR rs291087</b>		<b>Genotypes n (%)</b>				<b>Alleles n (%)</b>		
Variation		<b>AA</b>	<b>AG</b>	<b>GG</b>	<b>P value</b>	<b>A</b>	<b>G</b>	<b>P value</b>
Rio de Janeiro	Class I	25 (20.7)	51 (42.1)	45 (37.2)	Reference	101 (41.7)	141 (58.3)	Reference
	Class II	25 (14.8)	90 (53.3)	54 (32)	0.1526	140 (41.4)	198 (58.6)	0.9999
	Class III	7 (25.9)	11 (40.7)	9 (33.3)	0.827	25 (46.3)	29 (53.7)	0.6468
Manaus	Class I	18 (26.9)	28 (41.8)	21 (31.3)	Reference	64 (47.8)	70 (52.2)	Reference
	Class II	11 (24.4)	20 (44.4)	14 (31.1)	0.9465	42 (46.7)	48 (53.3)	0.9999
	Class III	1 (9.1)	7 (63.6)	3 (27.3)	0.3198	9 (40.9)	13 (59.1)	0.7184
Ribeirão Preto	Class I	5 (7.9)	36 (57.1)	22 (34.9)	Reference	46 (36.5)	80 (63.5)	Reference
	Class II	7 (18.9)	19 (51.4)	11 (29.7)	0.2618	33 (44.6)	41 (55.4)	0.3272
	Class III	4 (26.7)	6 (40)	5 (33.3)	0.1136	14 (46.7)	16 (53.3)	0.4131
All samples (RJ+M+RP)	Class I	48 (19.1)	115 (45.8)	88 (35.1)	Reference	211 (42)	291 (58)	Reference
	Class II	43 (17.1)	129 (51.4)	79 (31.5)	0.4584	215 (42.8)	287 (57.2)	0.8415
	Class III	12 (22.6)	24 (45.3)	17 (32.1)	0.8228	48 (45.3)	58 (54.7)	0.6101
Curitiba (Orthognathic sample)	Class I	3 (14.3)	8 (38.1)	10 (47.6)	Reference	14 (33.3)	28 (66.7)	Reference
	Class II	7 (36.8)	5 (26.3)	7 (36.8)	0.2554	19 (50)	19 (50)	0.199
	Class III	9 (15.8)	23 (40.4)	25 (43.9)	0.956	41 (36)	73 (64)	0.9203

**GHR rs1509460**

Variation		GG	GT	TT	P value	G	T	P value
Rio de Janeiro	Class I	30 (26.8)	58 (51.8)	24 (21.4)	Reference	118 (52.7)	106 (47.3)	Reference
	Class II	52 (32.1)	73 (45.1)	37 (22.8)	0.5194	177 (54.6)	147 (45.4)	0.7184
	Class III	5 (20)	17 (68)	3 (12)	0.3214	27 (54)	23 (46)	0.9999
Manaus	Class I	18 (27.3)	37 (56.1)	11 (16.7)	Reference	73 (55.3)	59 (44.7)	Reference
	Class II	9 (19.6)	29 (63)	8 (17.4)	0.6376	47 (51.1)	45 (48.9)	0.6242
	Class III	3 (25)	6 (50)	3 (25)	0.7866	12 (50)	12 (50)	0.7913
Ribeirão Preto	Class I	15 (20.5)	41 (56.2)	17 (23.3)	Reference	71 (48.6)	75 (51.4)	Reference
	Class II	11 (26.8)	26 (63.4)	4 (9.8)	0.192	48 (58.5)	34 (41.5)	0.1936
	Class III	3 (17.6)	5 (29.4)	9 (52.9)	0.0453*	11 (32.4)	23 (67.6)	0.1269
All samples (RJ+M+RP)	Class I	63 (25.1)	136 (54.2)	52 (20.7)	Reference	262 (52.2)	240 (47.8)	Reference
	Class II	72 (28.9)	128 (51.4)	49 (19.7)	0.6313	272 (54.6)	226 (45.4)	0.4795
	Class III	11 (20.4)	28 (51.9)	15 (27.8)	0.4819	50 (46.3)	58 (53.7)	0.3149
Curitiba (Orthognathic sample)	Class I	1 (4.8)	14 (66.7)	6 (28.6)	Reference	16 (38.1)	26 (61.9)	Reference
	Class II	0 (0)	17 (89.5)	2 (10.5)	0.2019	17 (44.7)	21 (55.3)	0.7083
	Class III	5 (8.6)	46 (79.3)	7 (12.1)	0.2039	56 (48.3)	60 (51.7)	0.3401

**GHR rs2973015**

Variation		AA	AG	GG	P value	A	G	P value
Rio de Janeiro	Class I	13 (10.2)	56 (44.1)	58 (45.7)	Reference	82 (32.3)	172 (67.7)	Reference

	Class II	18 (10.5)	80 (46.8)	73 (42.7)	0.8737	116 (33.9)	226 (66.1)	0.7401
	Class III	1 (3.1)	16 (50)	15 (46.9)	[0.4339]	18 (28.1)	46 (71.9)	0.6242
Manaus	Class I	30 (44.8)	24 (35.8)	13 (19.4)	Reference	84 (62.7)	50 (37.3)	Reference
	Class II	22 (46.8)	20 (42.6)	5 (10.6)	0.4296	64 (68.1)	30 (31.9)	0.4839
	Class III	5 (41.7)	7 (58.3)	0 (0)	0.1596	17 (70.8)	7 (29.2)	0.5902
All samples (RJ+M)	Class I	43 (22.2)	80 (41.2)	71 (36.6)	Reference	166 (42.8)	222 (57.2)	Reference
	Class II	40 (18.3)	100 (45.9)	78 (35.8)	0.5299	180 (41.3)	256 (58.7)	0.7184
	Class III	6 (13.6)	23 (52.3)	15 (34.1)	0.3104	35 (39.8)	53 (60.2)	0.6892
Curitiba (Orthognathic sample)	Class I	8 (38.1)	11 (52.4)	2 (9.5)	Reference	27 (64.3)	15 (35.7)	Reference
	Class II	6 (31.6)	6 (31.6)	7 (36.8)	0.1081	18 (47.4)	20 (52.6)	0.1949
	Class III	28 (48.3)	19 (32.8)	11 (19)	0.2528	75 (64.7)	41 (35.3)	0.8875

\* Associação estatística significativa ( $p < 0.05$ )

As distribuições genóticas e alélicas das variações avaliadas no gene IGF2R, de acordo com TMF apresentado (Mesofacial, Dolicofacial e Braquifacial) estão demonstradas na Tabela 4. Foi encontrada associação estatisticamente significativa entre a frequência genotípica e alélica e a presença do padrão Dolicofacial para a variação genética rs2910875 ( $p=0,01$ ) e ( $p=0,02$ ) respectivamente, na amostra da cidade de Ribeirão Preto - São Paulo. Adicionalmente, foi encontrada a associação estatisticamente significativa entre a frequência alélica e a presença do padrão Braquicefálico para a mesma variação ( $p=0,03$ ), também na amostra da cidade de Ribeirão Preto - São Paulo. Não foi possível evidenciar associação estatisticamente significativa entre as distribuições genóticas e/ou alélicas para as demais variações estudadas no gene GHR e a presença dos diferentes TMF ( $p > 0,05$ ) (Tabela 4).

**Tabela 4.** Frequências genotípicas e alélicas de acordo com o TMF.

		<i>Genotypes n (%)</i>				<i>Alleles n (%)</i>		
		<b>AA</b>	<b>AG</b>	<b>GG</b>	<b>P value</b>	<b>A</b>	<b>G</b>	<b>P value</b>
<b>GHR rs2910875</b>								
<i>Variation</i>								
<i>Rio de Janeiro</i>	Mesofacial	27 (18.4)	72 (49)	48 (32.7)	Reference	126 (42.9)	168 (57.1)	Reference
	Dolichofacial	15 (16.7)	45 (50)	30 (33.3)	0.9465	75 (41.7)	105 (58.3)	0.8625
	Brachyfacial	15 (18.8)	35 (43.8)	30 (37.5)	0.7189	65 (40.6)	95 (59.4)	0.7184
<i>Manaus</i>	Mesofacial	15 (22.7)	30 (45.5)	21 (31.8)	Reference	60 (45.5)	72 (54.5)	Reference
	Dolichofacial	5 (16.1)	14 (45.2)	12 (38.7)	0.6907	24 (38.7)	38 (61.3)	0.4666
	Brachyfacial	10 (38.5)	11 (42.3)	5 (19.2)	0.2478	31 (59.6)	21 (40.4)	0.1175
<i>Ribeirão Preto</i>	Mesofacial	10 (18.2)	24 (43.6)	21 (38.2)	Reference	44 (40)	66 (60)	Reference
	Dolichofacial	5 (10.4)	31 (64.6)	12 (25)	0.10. 23	41 (42.7)	55 (57.3)	0.8065
	Brachyfacial	1 (8.3)	6 (50)	5 (41.7)	0.7047	8 (33.3)	16 (66.7)	0.7083
<i>All samples (RJ+M+RP)</i>	Mesofacial	52 (19.4)	126 (47)	90 (33.6)	Reference	230 (42.9)	306 (57.1)	Reference
	Dolichofacial	25 (14.8)	90 (53.3)	54 (32)	0.3413	140 (41.4)	198 (58.6)	0.7184

	Brachyfacial	26 (22)	52 (44.1)	40 (33.9)	0.8025	104 (44.1)	132 (55.9)	0.8231
<i>Curitiba</i> ( <i>Orthognathic</i> <i>sample</i> )	Mesofacial	6 (25)	9 (37.5)	9 (37.5)	Reference	21 (43.8)	27 (56.3)	Reference
	Dolichofacial	5 (33.3)	3 (20)	7 (46.7)	0.5117	13 (43.3)	17 (56.7)	0.8415
	Brachyfacial	8 (13.8)	24 (41.4)	26 (44.8)	0.4653	40 (34.5)	76 (65.5)	0.3482
<b>GHR rs1509460</b>		<b>GG</b>	<b>GT</b>	<b>TT</b>	<b>P value</b>	<b>G</b>	<b>T</b>	<b>P value</b>
<i>Variation</i>								
<i>Rio de</i> <i>Janeiro</i>	Mesofacial	47 (33.8)	67 (48.2)	25 (18)	Reference	161 (57.9)	117 (42.1)	Reference
	Dolichofacial	26 (29.9)	39 (44.8)	22 (25.3)	0.4148	91 (52.3)	83 (47.7)	0.2835
	Brachyfacial	14 (19.2)	42 (57.5)	17 (23.3)	0.0801	70 (47.9)	76 (52.1)	0.0636
<i>Manaus</i>	Mesofacial	19 (29.7)	34 (53.1)	11 (17.2)	Reference	72 (56.3)	56 (43.8)	Reference
	Dolichofacial	6 (19.4)	22 (71)	3 (9.7)	0.2503	34 (54.8)	28 (45.2)	0.9999
	Brachyfacial	5 (17.2)	16 (55.2)	8 (27.6)	0.3214	26 (44.8)	32 (55.2)	0.1976
<i>Ribeirão</i> <i>Preto</i>	Mesofacial	13 (20.6)	34 (54)	16 (25.4)	Reference	60 (47.6)	66 (52.4)	Reference
	Dolichofacial	13 (24.5)	30 (56.6)	10 (18.9)	0.6771	56 (52.8)	50 (47.2)	0.512
	Brachyfacial	3 (20)	8 (53.3)	4 (26.7)	0.995	14 (46.7)	16 (53.3)	0.9203
<i>All samples</i> ( <i>RJ+M+RP</i> )	Mesofacial	79 (29.7)	135 (50.8)	52 (19.5)	Reference	293 (55.1)	239 (44.9)	Reference

	Dolichofacial	45 (26.3)	91 (53.2)	35 (20.5)	0.7445	181 (52.9)	161 (47.1)	0.5777
	Brachyfacial	22 (18.8)	66 (56.4)	29 (24.8)	0.0739	110 (47)	124 (53)	0.0477*
<i>Curitiba</i> ( <i>Orthognathic</i> <i>sample</i> )	Mesofacial	0 (0)	20 (83.3)	4 (16.7)	Reference	20 (41.7)	28 (58.3)	Reference
	Dolichofacial	0 (0)	13 (86.7)	2 (13.3)	0.9608	13 (43.3)	17 (56.7)	0.9203
	Brachyfacial	6 (10.2)	44 (74.6)	9 (15.3)	0.2685	56 (47.5)	62 (52.5)	0.6101
<b>GHR rs2973015</b>		<b>AA</b>	<b>AG</b>	<b>GG</b>	<b>P value</b>	<b>A</b>	<b>G</b>	<b>P value</b>
<i>Variation</i>								
<i>Rio de</i> <i>Janeiro</i>	Mesofacial	15 (9.8)	71 (46.4)	67 (43.8)	Reference	101 (33)	205 (67)	Reference
	Dolichofacial	10 (10.8)	45 (48.4)	38 (40.9)	0.8958	65 (34.9)	121 (65.1)	0.729
	Brachyfacial	7 (8.3)	36 (42.9)	41 (48.8)	0.7483	50 (29.8)	118 (70.2)	0.5323
<i>Manaus</i>	Mesofacial	27 (41.5)	30 (46.2)	8 (12.3)	Reference	84 (64.6)	46 (35.4)	Reference
	Dolichofacial	21 (65.6)	10 (31.3)	1 (3.1)	0.0602	52 (81.3)	12 (18.8)	0.0269*
	Brachyfacial	9 (31)	11 (37.9)	9 (31)	0.0916	29 (50)	29 (50)	0.0838
<i>All samples</i> ( <i>RJ+M</i> )	Mesofacial	42 (19.3)	101 (46.3)	75 (34.4)	Reference	185 (42.4)	251 (57.6)	Reference
	Dolichofacial	31 (24.8)	55 (44)	39 (31.2)	0.4771	117 (46.8)	133 (53.2)	0.3032
	Brachyfacial	16 (14.2)	47 (41.6)	50 (44.2)	0.1836	79 (35)	147 (65)	0.0755
	Mesofacial	7 (29.2)	11 (45.8)	6 (25)	Reference	25 (52.1)	23 (47.9)	Reference

<i>Curitiba</i> ( <i>Orthognathic</i> <i>sample</i> )	Dolichofacial	7 (46.7)	3 (20)	5 (33.3)	0.2554	17 (56.7)	13 (43.3)	0.8625
	Brachyfacial	28 (47.5)	22 (37.3)	9 (15.3)	0.278	78 (66.1)	40 (33.9)	0.1311

\* Associação Estatística significativa ( $P < 0.05$ )





## 5. DISCUSSÃO

---

## 5 DISCUSSÃO

O presente estudo foi constituído por amostras de pacientes em tratamento ortodôntico de quatro cidades brasileiras diferentes. As quatro amostras caracterizam-se como amostra consecutiva de conveniência, uma vez que foi realizada por acessibilidade. Este tipo de amostragem, que é não probabilística, carece de rigor estatístico, uma vez que o pesquisador inclui apenas os pacientes a que tem acesso, assumindo que estes venham a representar um universo amostral maior. Apesar disso, o emprego de amostras por conveniência não só é bastante aplicado como também adequado para a criação de ideias em pesquisas do tipo exploratórias (Marotti et al., 2008), como no presente estudo. Cabe ainda ressaltar que um desenho de estudo com amostra representativa da população incorreria em questões éticas, uma vez que são necessárias radiografias do complexo craniofacial de todos os pacientes incluídos no estudo. Desta forma, pacientes que estavam em tratamento ortodôntico e orto-cirúrgico representaram a melhor abordagem para a realização do presente estudo.

Para a caracterização fenotípica, foi adotada a análise da radiografia cefalométrica lateral da face (2D), por ser o método que tem sido extensivamente utilizado para estudo da maxila e da mandíbula, em pesquisas realizadas em Ortodontia (Todorova-Plachiyska e Stoilova-Todorova, 2018). Além disso, essas imagens estão disponíveis no prontuário odontológico dos pacientes, sem necessidade de exposição a uma nova tomada radiográfica. É importante ressaltar que os pontos e planos cefalométricos utilizados no presente estudo foram selecionados com base em revisão sistemática da literatura previamente realizada (Nascimento et al., 2016), a qual demonstrou que essas medidas são as mais utilizadas nos estudos de associação entre polimorfismos genéticos e alterações dimensionais da maxila e da mandíbula.

A seleção dos polimorfismos rs2910875, rs2973015 e rs1509460 foi realizada por meio de busca no “dbSNP”, base de dados que funciona como um repositório central para variações moleculares. Essa escolha baseou-se na menor frequência alélica, que deveria ser maior que 20%. A genotipagem foi realizada por PCR em

tempo real, por meio do método TaqMan. Este método foi selecionado por ser uma técnica simples, além de apresentar alta especificidade e confiabilidade dos resultados, amplamente utilizado em pesquisas dessa natureza (As et al., 2017; Lips et al., 2017; Kuchler et al., 2017; Kuchler et al., 2018a; Kuchler et al., 2018b; Cunha et al., 2019). Especificamente no presente estudo, por se tratar de pesquisa envolvendo discriminação alélica, foi utilizada a técnica específica proposta por Ranade et al. (2001), a qual consiste na utilização de sondas fluorescentes alelo-específicas, que combinam as etapas de amplificação e detecção dos alelos em uma única etapa. A fluorescência é medida durante a reação de PCR e os genótipos inferidos a partir desses valores. Desta forma, o método Taqman elimina viés por erros interpretativos, uma vez que os genótipos são gerados de maneira automática, ou seja, sem interferência humana. Apesar dessas vantagens, esta é uma técnica onerosa por ser indispensável o uso de um equipamento especial para detecção de fluorescências em diferentes comprimentos de onda, além do alto custo das sondas (Ranade et al., 2001).

O presente estudo teve como objetivo avaliar se existe associação entre variantes genéticas em GHR com TMF e ME. O GHR é o gene que codifica o receptor do GH e, desta forma, no presente trabalho optou-se por avaliar variações genéticas nesse gene. Essa mesma abordagem de seleção de genes candidatos para o crescimento da maxila e da mandíbula foi utilizada anteriormente (Xue et al., 2010; Jang et al., 2010; Tassopoulou-Fishell et al., 2012; Xue et al., 2014; Guan et al., 2015; Perillo et al., 2015; da Fontoura et al., 2015; Cruz et al., 2017; Chen et al., 2015), como no caso do hormônio do crescimento (GH), onde polimorfismos genéticos no Receptor do Hormônio do Crescimento (GHR) foram selecionados e associados com alterações dimensionais, sejam elas discrepâncias maxilomandibulares (Cruz et al., 2017), variações na altura mandibular (Yamaguchi et al., 2001) ou também reduções tanto na altura facial inferior bem como no comprimento mandibular (Bayram et al., 2014). (Hoyo et al., 2010). No presente estudo, o polimorfismo rs2910875 em GHR. Como não foi possível observar essa associação nas demais populações, é possível que o presente resultado seja um falso positivo, onde estaria ocorrendo um erro do tipo I devido às múltiplas comparações.

Durante as buscas nas bases de dados utilizadas, não foram encontradas publicações prévias avaliando associações de polimorfismos genéticos em IGF2R

com os diferentes tipos morfológicos faciais. Desta forma, como os resultados deste estudo são inéditos, há necessidade de estudos adicionais futuros, principalmente com o polimorfismo rs2910875 em GHR, para realização comparações entre os resultados obtidos, refutando ou corroborando os resultados observados no presente estudo.



## **6. CONCLUSÃO**

---



## 6 CONCLUSÃO

Com base na metodologia empregada e nos resultados obtidos, pode-se concluir que não houve associação entre os genótipos e alelos para os polimorfismos rs2910875, rs2973015 e rs1509460 em GHR com as maloclusões esqueléticas. – O polimorfismo rs2910875 em GHR foi associado com os tipos morfológicos faciais Dolicofacial e Braquifacial, na população de Ribeirão Preto - SP. – Os polimorfismos rs2973015 e rs1509460 em GHR não apresentaram associação com os diferentes tipos morfológicos faciais, nas diferentes regiões estudadas.





## **REFERÊNCIAS**

---





## REFERÊNCIAS:

Bayram S, Basciftci FA, Kurar E. Relationship between P561T and C422F polymorphisms in growth hormone receptor gene and mandibular prognathism. *Angle Orthod*. 2014;84(5):803-9.

Cakan DG, Ulkur F, Taner T. The genetic basis of facial skeletal characteristics and its relation with orthodontics. *Eur J Den* 2012;6(3):340–345.

Consolaro A. *Inflamação e reparo: um sílabo para a compreensão clínica e implicações terapêuticas*. Maringá: Dental Press; 2009.

Huh A, Horton MJ, Cuenco KT, Raoul G, Rowlerson AM, Ferri J, et al. Epigenetic influence of KAT6B and HDAC4 in the development of skeletal malocclusion. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2013;144(4):568-76.

Ikuta T, Inagaki Y, Tanaka K, Saito T, Nakajima Y, Bando M, et al. Gene polymorphism of  $\beta$ -defensin-1 is associated with susceptibility to periodontitis in Japanese. *Odontology* 2015;103(1):66-74.

Kang EH, Yamaguchi T, Tajima A, Nakajima T, Tomoyasu Y, Watanabe M, et al. Association of the growth hormone receptor gene polymorphisms with mandibular height in a Korean population. *Arch Oral Biol* 2009;54(6):556-62.

Kinane DF, Hart TC. Genes and gene polymorphisms associated with periodontal disease. *Crit Rev Oral Biol Med* 2003;14(6):430-49.

Kuchler EC, Tannure PN, Falagan-Lotsch P, Lopes TS, Granjeiro JM, Amorim LM. Buccal cells DNA extraction to obtain high quality human genomic DNA suitable for polymorphism genotyping by PCR-RFLP and Real-Time PCR. *J Appl Oral Sci* 2012;20(4):467-71.

Li Q, Li X, Zhang F, Chen F. The identification of a novel locus for mandibular prognathism in the Han Chinese population. *J Dent Res* 2011;90(1):53-7.

Li Q, Zhang F, Li X, Chen F. Genome scan for locus involved in mandibular prognathism in pedigrees from China. *Plos One* 2010;5(9)1-4.

Madeira, MC. Anatomia da face: bases anatomofuncionais para a prática odontológica. 8. ed. São Paulo: Sarvier; 2012.

Marotti JG, Furuyama R, Pigozzo M, Campos T, Laganá D. Amostragem em pesquisa clínica: Tamanho da amostra. *Revista de Odontologia da Universidade de São Paulo* 2008(20): 186– 94.

Nascimento MA, Sérvulo SS, Terada H, Romano FL, Nelson-Filho P, Kúchler EC. Associação entre polimorfismo P561 no GHR e no prognatismo mandibular: revisão sistemática e metanálise. *SBPqO- Brazilian Oral Research* 2016.

Proffit WR, Fields HW, Sarver DM. *Ortodontia contemporânea*. 5° ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2012.

Quillez J, Guilmatre A, Garg P, Highnam G, Gymrek M, Erlich Y, et al. Polymorphic tandem repeats within gene promoters act as modifiers of gene expression and DNA methylation in humans. *Nucleic Acids Res* 2016;44(8):3750–3762.

Ranade K, Chang MS, Ting CT, Pei D, Hsiao CF, Olivier M, et al. High-throughput genotyping with single nucleotide polymorphisms. *Genome Res* 2001; 11:1262-68.

Sasaki Y, Satoh K, Hayasaki H, Fukumoto S, Fujiwara T, Nonaka K. The P561T polymorphism of the growth hormone receptor gene has an inhibitory effect on mandibular growth in young children. *Eur J Orthod* 2009;31(5):536-41.

Todorova-Plachiyska KG, Stoilova-Todorova MG. Lateral Cephalometric Study in Adult Bulgarians with Normal Occlusion. *Folia Med (Plovdiv)* 2018; 60(1): 141–6.

Takashiba S, Naruishi K. Gene polymorphisms in periodontal health and disease. *Periodontol 2000* 2006;40:94-106.

Tassopoulou-Fishell M, Deeley K, Harvey EM; Sciote J, Vieira AR. Genetic variation in myosin 1H contributes to mandibular prognathism. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2012;141(1):51-9.

Tomoyasu Y, Yamaguchi T, Tajima A, Nakajima T, Inoue I, Maki K. Further evidence for an association between mandibular height and the growth hormone receptor gene in a Japanese population. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2009;136(4):536-41.

Yamaguchi T, Maki K, Shibasaki Y. Growth hormone receptor gene variant and mandibular height in the normal Japanese population. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2001;119(6):650-3.

Yamaguchi T, Park SB, Narita A, Maki K, Inoue I. Genome-wide linkage analysis of mandibular prognathism in Korean and Japanese patients. *J Dent Res* 2005;84(3):255-9.

Ye S. Polymorphism in matrix metalloproteinase gene promoters: implication in regulation of gene expression and susceptibility of various diseases. *Matrix Biol* 2000; 19:623–9.

Zebrick B, Teeramongkolgul T, Nicot R, Horton MJ, Raoul G, Ferri J, et al. ACTN3 R577X genotypes associate with Class II and deepbite malocclusions. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2014;146(5):603-11.

Zhou J, Lu Y, Gao XH, Chen YC, Lu JJ, Bai YX, et al. The growth hormone receptor gene is associated with mandibular height in a Chinese population. *J Dent Res* 2005;84(11):1052-6.





**ANEXOS**

---





## Anexo A.

Artigo publicado

ORIGINAL ARTICLE

AJO-DO

## *GHR* and *IGF2R* genes may contribute to normal variations in craniofacial dimensions: Insights from an admixed population

Guido Antônio Maranhão-Vásquez,<sup>a</sup> Alexandre R. Vieira,<sup>b</sup> Alice Gomes de Carvalho Ramos,<sup>c</sup> Beatriz Dantas,<sup>d</sup> Fábio Lourenço Romano,<sup>a</sup> Regina Guenika Palma-Dibb,<sup>d</sup> Juliana Afid,<sup>a</sup> Karla Carpio,<sup>a</sup> Paulo Nilson-Filho,<sup>a</sup> Andriara de Rossi,<sup>a</sup> Rafaela Scarib,<sup>a</sup> Simone Carvalho Levy,<sup>f</sup> Livia Assredo A. Antunes,<sup>g</sup> Leonardo Santos Antunes,<sup>h</sup> and Erika C. Küchler<sup>i</sup>  
Ribeirão Preto, São Paulo, and Manaus, Amazonas, and Curitiba, Paraná, and Niterói and Nova Friburgo, Rio de Janeiro, Brazil, and Pittsburgh, Pa

**Introduction:** This study aimed to determine whether single nucleotide polymorphisms in the growth hormone receptor (*GHR*) and insulin-like growth factor 2 receptor (*IGF2R*) genes are associated with different craniofacial phenotypes. **Methods:** A total of 596 orthodontic and 98 orthognathic patients from 4 cities in Brazil were included for analyses. Angular and linear cephalometric measurements were obtained, and phenotype characterizations were performed. Genomic DNA was collected from buccal cells and single nucleotide polymorphisms in *GHR* (rs2910875, rs2973015, rs1509480) and *IGF2R* (rs2277071, rs6909881, rs6920141) were genotyped by polymerase chain reactions using TaqMan assay. Genotype-phenotype associations were assessed in the total sample (statistical significance was set at  $P < 8.333 \times 10^{-5}$ ) and by a meta-analytic approach implemented to calculate the single effect size measurement for the different cohorts. **Results:** Rare homozygotes for the *GHR* rs2973015 showed increased measurements for the lower anterior facial height (ANS-Me) and mandibular sagittal lengths (Co-Gn and Go-Pg). In contrast, common homozygotes for the *IGF2R* rs6920141 presented reduced measurements for these dimensions (ANS-Me and Go-Pg). Furthermore, the less common homozygotes for *IGF2R* rs2277071 had reduced maxillary sagittal length (Pm1-A'). The meta-analytic approach replicated the associations of rs2973015 with ANS-Me, rs2277071 with Pm1-A', and rs6920141 with Go-Pg. **Conclusions:** Our results provide further evidence that *GHR* contributes to the determination of mandibular morphology. In addition, we report that *IGF2R* is a possible gene associated with variations in craniofacial dimensions. Applying meta-analytic approaches to genetic variation data originating from likely underpowered samples may provide additional insight regarding genotype and/or phenotype associations. (*Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2020;158:722-30)

Various proteins and their encoding genes have been implicated in fetal, neonatal, and postnatal development. Among them, the growth

hormone (GH), insulin-like growth factors 1 and 2 (IGF1 and IGF2), and their associated receptors (GH receptor [GHR], insulin-like growth factors 1 receptor

<sup>a</sup>Department of Pediatric Dentistry, School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil.

<sup>b</sup>Department of Oral Biology, School of Dental Medicine, University of Pittsburgh, Pittsburgh, Pa.

<sup>c</sup>Amazonian Education Institute, Afimópolis, Manaus, Amazonas, Brazil.

<sup>d</sup>Department of Restorative Dentistry, School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil.

<sup>e</sup>Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Federal University of Paraná, and Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Positivo University, Curitiba, Paraná, Brazil.

<sup>f</sup>Graduate program, School of Dentistry, Fluminense Federal University, Niterói, Rio de Janeiro, Brazil.

<sup>g</sup>Graduate program, School of Dentistry, Fluminense Federal University, Niterói, Rio de Janeiro, Brazil, and Department of Specific Formation, School of Dentistry, Fluminense Federal University, Nova Friburgo, Rio de Janeiro, Brazil.

<sup>h</sup>Department of Specific Formation, School of Dentistry, Fluminense Federal University, Nova Friburgo, Rio de Janeiro, Brazil, and Oral Research Unit, School of Dentistry, Fluminense Federal University, Niterói, Rio de Janeiro, Brazil.

<sup>i</sup>Department of Pediatric Dentistry, School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil, and Department of Dentistry, Positivo University, Curitiba, Paraná, Brazil.

All authors have completed and submitted the ICMJE Form for Disclosure of Potential Conflicts of Interest, and none were reported.

This work was supported by the São Paulo Research Foundation (grants 2019/06866-5, 2019/01146-1, and 2013/01690-0).

Address correspondence to: Alexandre R. Vieira, Department of Oral Biology, School of Dental Medicine, University of Pittsburgh, 412 S.B. Powell, 336 Schenckland St, Pittsburgh, PA 15261 (e-mail: alexandre\_vieira@pitt.edu) or Erika C. Küchler, Department of Pediatric Dentistry, School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, USP Campus, Av. Itália, 579, Ribeirão Preto, São Paulo 14060-906, Brazil; e-mail: erika.culves@gmail.com.

Submitted 4 April 2019; revised and accepted 4 October 2019.  
0889-5407/20.000

© 2020 by the American Association of Orthodontists. All rights reserved.  
<https://doi.org/10.1016/j.ajodo.2019.10.020>

**ANEXO B****TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

(Resolução 466/2012 – Conselho Nacional de Saúde)

Eu, Beatriz Bandeira Dantas de Araújo, doutoranda da Universidade de São Paulo (FORP/USP) DINTER, responsável pelo projeto **“POLIFORMISMO NO GENE RECEPTOR DO HORMONIO DO CRESCIMENTO”**, convido você \_\_\_\_\_, a participar do referido projeto de pesquisa, que será realizado sob orientação do Prof<sup>a</sup> Dra. Erika Calvano Kuchler na Faculdade do Amazonas (IAES-AM). Este termo consta 2 (duas) vias idênticas, as quais serão assinadas por todos os pesquisadores e por você, participante da pesquisa. Uma via ficará com você e a outra será arquivada pelo pesquisador.

Este trabalho tem como objetivo avaliar se a genética tem associação com o tipo de face (rosto) dos pacientes que estão em tratamento na especialização de ortodontia da Faculdade do Amazonas (IAES-AM). Para tanto, será necessário que o paciente faça um bochecho com soro fisiológico e depois cuspa. Com esta saliva avaliaremos a genética do paciente e o tipo facial será avaliado pela documentação ortodôntica que o paciente já possui.

Você e o participante de pesquisa virão a Clínica do IAES-AM, para atendimento ortodôntico e será coletada a saliva no dia da consulta. Você está sendo esclarecido que esta pesquisa pode oferecer incômodos, como desconforto ao cuspir e aumento de permanência na Faculdade no dia da consulta ao ortodontista.

Os participantes da pesquisa não terão ganhos diretos com os resultados da mesma, mas terão como benefício orientação sobre técnica de higiene bucal. A participação de vocês nesta pesquisa é muito importante, pois os resultados encontrados poderão trazer vários benefícios à ciência e ajudar outras pessoas. Não será oferecido nenhum tipo de pagamento pela participação de vocês na pesquisa, e todo o atendimento ao participante da pesquisa será gratuito. A sua identidade, bem como a do participante da pesquisa serão mantidos em segredo, mas participando da pesquisa você autoriza que os resultados obtidos sejam divulgados e publicados em revistas científicas e terá, por parte dos pesquisadores, a garantia do sigilo (segredo) que garantem a privacidade de vocês.

Você terá total liberdade para pedir maiores esclarecimentos antes e durante o desenvolvimento da pesquisa.

Se tiver alguma dúvida poderá ligar para o pesquisador para pedir qualquer informação (Beatriz Bandeira Dantas de Araújo – Avenida Maceió, 861 – Faculdade do Amazonas- IAES-AM).

\_\_\_\_\_  
Rubrica do participante

\_\_\_\_\_  
Rubrica do pesquisador

Se tiver alguma dúvida poderá ligar para o pesquisador para pedir qualquer informação (Beatriz Bandeira Dantas de Araújo – Avenida Maceió, 861 – Faculdade do Amazonas- IAES-AM. – Tel: (92) 3584-6066). Suas reclamações e/ou insatisfações relacionadas à sua participação na pesquisa poderão ser comunicadas por escrito à secretaria do IAES-AM (92) 3584-6066 - Horário de atendimento das 8h às 12h, de segunda a sexta-feira, devendo conter seu nome, o qual será mantido em sigilo. A participação de vocês não é obrigatória, e vocês poderão desistir a qualquer momento, retirando sua autorização. A não autorização para participação neste trabalho não trará nenhum prejuízo a vocês, bem como a sua relação com o pesquisador ou com a Faculdade do Amazonas - IAES.

Eu \_\_\_\_\_, portador do RG \_\_\_\_\_, CPF \_\_\_\_\_, residente a \_\_\_\_\_, número \_\_\_\_\_, na cidade de \_\_\_\_\_ no Estado \_\_\_\_\_, Telefone \_\_\_\_\_, data de nascimento \_\_\_\_\_ declaro que li, compreendi e concordo com o presente Termo. Por isso, assino este documento de livre e espontânea vontade.

Manaus, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20 \_\_\_\_.

\_\_\_\_\_  
**Assinatura do participante da pesquisa**

Beatriz Bandeira Dantas de Araújo.  
CPF: 803.980.902-97  
Pesquisador responsável.

Prof.: Dr. Paulo Nelson Filho  
CPF: 156.200.398-46  
Pesquisador Orientador.

## ANEXO C

### TERMO DE ASSENTIMENTO

Você, \_\_\_\_\_ está sendo convidado (a) por mim, Beatriz Bandeira Dantas de Araújo, doutoranda da Universidade de São Paulo (FORP/USP) (DINTER), responsável pelo projeto **“POLIFORMISMO NO GENE RECEPTOR DO HORMONIO DO CRESCIMENTO”**, a concordar em participar da pesquisa. Este papel tem duas vias idênticas (folhas iguais), que será assinada por você, pelo seu responsável legal e por mim. Uma via (folha) ficará com você e a outra será guardada por mim.

Esta pesquisa quer saber se o formato do seu rosto tem relação com a genética. Nós vamos analisar o formato do seu rosto pela documentação ortodôntica (pasta que fez para colocar aparelho) que já possui e as genéticas serão identificadas através da sua saliva.

Você e o seu responsável legal virão à Clínica de Especialização para atendimento ortodôntico (que cuida dos dentes desalinhados, colocando aparelho) e no mesmo dia será coletada saliva, se assim permitirem. Se você quiser participar deste projeto de pesquisa, seu responsável também terá que concordar. Mas se você não quiser, mesmo que seu responsável concorde, você poderá falar que não quer. Você pode conversar com seu responsável antes de decidir se quer ou não participar. Pode ter algumas palavras que você não entenda ou coisas que você quer que eu explique mais, porque você ficou interessado ou preocupado. Por favor, peça que eu pare, a qualquer momento, e explique novamente. Ninguém ficará bravo com você se você disser não: a escolha é sua.

Esta pesquisa não machuca, não causa dor e não causa danos. Poderá haver apenas o desconforto durante a coleta da saliva, que terá que cuspir. A sua participação é muito importante, pois os resultados encontrados poderão trazer vários benefícios à ciência e ajudar outras pessoas. O seu nome, bem como o do seu responsável serão mantidas em segredo, mas participando da pesquisa você autoriza que os resultados obtidos sejam divulgados e publicados em revistas científicas e terá, por parte dos pesquisadores, a garantia do sigilo (segredo) que garantem a privacidade de vocês.

Se tiver alguma dúvida poderá ligar para o pesquisador para pedir qualquer informação (Beatriz Bandeira Dantas de Araújo – Avenida Maceió, 861 – Faculdade do Amazonas- IAES-AM. – Tel: (92) 3584-6066). Suas reclamações e/ou insatisfações relacionadas à sua participação na pesquisa poderão ser comunicadas por escrito à secretaria do IAES-AM (92- 3584-6066 - Horário de atendimento das 8h às 12h e de 14h às 18h de segunda a sexta-feira), devendo conter seu nome que será mantido em sigilo.

Manaus, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20 \_\_\_\_.

Nome do responsável legal: \_\_\_\_\_.

Assinatura e CPF: \_\_\_\_\_.

Nome da criança ou adolescente: \_\_\_\_\_.

Assinatura: \_\_\_\_\_.

---

Beatriz Bandeira Dantas de Araújo  
CPF: 803.980.902-97

Pesquisadora responsável