



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José dos Campos
Instituto de Ciência e Tecnologia

ELIS ANDRADE DE LIMA ZUTIN

**EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS À
REMODELAÇÃO ÓSSEA NA FASE INICIAL DA
REABSORÇÃO DO REBORDO RESIDUAL EM
MANDÍBULAS HUMANAS**

2013

ELIS ANDRADE DE LIMA ZUTIN

**EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS À REMODELAÇÃO ÓSSEA
NA FASE INICIAL DA REABSORÇÃO DO REBORDO RESIDUAL EM
MANDÍBULAS HUMANAS**

Dissertação apresentada ao curso de Odontologia do Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP - Univ Estadual Paulista, Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE, pelo Programa de Pós- Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL, Área Patologia.

Orientador: Profº Tit. Antonio Olavo Cardoso Jorge
Co-orientadora: Profª Dra. Márcia Sampaio Campos

São José dos Campos
2013

Apresentação gráfica e normalização de acordo com:
Alvarez S, Coelho DCAG, Couto RAO, Durante APM. Guia prático para
Normalização de Trabalhos Acadêmicos do ICT. Rev. São José dos
Campos: ICT/UNESP; 2013.

Z89e Zutin, Elis Andrade de Lima

Expressão de genes relacionados à remodelação óssea na fase inicial da reabsorção do rebordo residual em mandíbulas humanas / Elis Andrade de Lima Zutin. - São José dos Campos: [s.n.], 2013.
83 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Biopatologia Bucal) Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista, 2013.

Orientador: Prof. Antonio Olavo Cardoso Jorge.

Co-Orientador: Márcia Sampaio Campos

1. Expressão gênica. 2. Perda óssea alveolar. 3. Formação óssea. 4. Remodelação óssea. 5. Mandíbula I. Jorge, Antonio Olavo Cardoso. II. Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista. III. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". IV. UNESP – Univ Estadual Paulista. V. Título

tD72

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação do
Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos – UNESP

AUTORIZAÇÃO

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

São José dos Campos, 19 de Dezembro de 2013.

E-mail: elis.anlima@yahoo.com.br

Assinatura: _____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Tit. Antonio Olavo Cardoso Jorge (Orientador)

Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos
UNESP – Univ Estadual Paulista

Prof.Tit. Yasmin Rodarte Carvalho

Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos
UNESP – Univ Estadual Paulista

Prof. Dra. Renata de Azevedo Canevari

Faculdade de Ciências da Saúde de São José dos Campos – FCS
UNIVAP – Universidade do Vale do Paraíba

São José dos Campos, 19 de dezembro de 2013.

DEDICATÓRIA

Aos meus queridos pais, que com muito sacrifício, perseverança, dedicação e esforço, me incentivaram, me apoiaram de maneira imensurável e sonharam comigo para que eu chegasse até aqui.

Às minhas belas irmãs, que pelo simples fato de existirem me deram forças para que eu prosseguisse, pelas palavras de apoio preocupação e por se prontificarem em me ajudar sempre.

Ao meu parceiro, companheiro, amigo e marido, que por inúmeras vezes me ajudou fazendo gráficos, tabelas, formatações e muitas outras coisas relacionadas à informática e que foram essenciais para que eu chegasse até aqui. Que sempre me apoiou nos momentos que precisei tomar decisões e nas horas mais difíceis.

Aos meus sogros, que a cada dia tenho mais certeza de que eles são como meus pais, pois com eles eu posso contar sempre.

À minha linda filha Manuela, que teve a capacidade de trazer para as nossas vidas somente alegrias. Que me ensinou a amar como eu nunca imaginei que conseguiria um dia, que fez dos meus dias e da minha vida uma verdadeira fonte de força, motivação e vontade de vencer.

À minha querida tia Aurinete, que participou da minha formação da melhor forma possível e que sempre torceu muito pelo meu sucesso profissional.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por permitir que eu viva e possa me tornar uma pessoa melhor a cada dia.

Ao meu querido professor e eternamente orientador Leonardo Marchini, que me mostrou o início de um longo caminho na carreira científica, que teve a idéia desse trabalho e que confiou em mim para executá-lo.

À toda minha família, que acreditou no meu potencial e me deu suporte para que eu sempre fosse adiante.

À colega e co-orientadora Márcia Sampaio Campos, que contribuiu na elaboração e na realização da metodologia do trabalho e que não hesitou em passar seu conhecimento para o meu crescimento profissional, pela sua paciência e comprometimento para que tudo ocorresse da melhor forma possível (<http://lattes.cnpq.br/4042603373489188>).

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) que concedeu a Bolsa (processo número 2011/15145-9) e Auxílio (processo número 2012/12161-6) para a realização desse projeto.

Ao Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos, pelo Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal e por toda infra-estrutura oferecida aos alunos para que possam realizar uma boa pesquisa.

Aos que compareceram ao meu Exame Geral de Qualificação, em especial às presenças ilustres do professor José Benedicto de Mello e das minhas tias Maria Aurinete Andrade Lopes e Maria do Socorro de Lima Brilhante.

Às minhas grandes amigas que me acompanharam nessa longa trajetória Noala Vicensoto Moreira Milhan e Laís Morandini Carvalho.

À todas os meus colegas da pós-graduação, que se tornaram verdadeiros amigos, que se preocuparam comigo e que já fazem parte da minha história.

Ao meu querido professor Luiz Ronaldo Picosse, ao professor Rogério de Lima Romeiro, Tatiana Ribeiro Friggi, Renato Koga, aos meus colegas Carlos Zaroni e Alecsandro Moura e ao Sr. Pedro por me ajudarem na coleta das amostras com muita prestatividade.

Ao querido professor Antônio Olavo Cardoso Jorge, por me aceitar de braços abertos como orientanda e me ajudar muito já na reta final da execução desse projeto.

À Profa.Adj. Juliana Campos Junqueira Coordenadora do Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal ICT CSJC/UNESP pela compreensão e apoio.

À doutoranda Patrícia Pimentel de Barros por me acompanhar em toda a parte experimental do trabalho, por me ensinar cada passo e cada detalhe da maneira mais correta. Pela sua competência, perseverança, compromisso e dedicação que foram essenciais para que tudo desse certo (<http://lattes.cnpq.br/2802486281558128>).

Ao meu grande amigo Valmir Campos por me ajudar na formatação de gráficos no mesmo instante em que precisei.

Ao Centro de Convivência Infantil (CCI) desta Instituição, por receber a minha princesinha com muito carinho e por cuidar dela da melhor forma possível enquanto eu realizava a pesquisa.

Aos pacientes que concordaram em participar dessa pesquisa e me permitiram analisar o que propusemos nesse estudo.

Aos técnicos do laboratório da Microbiologia Domingos e Sérgio, por terem me ajudado nos momentos que precisei de suas instruções.

À minha amiga Júnia Gamas (Hui), por torcer tanto por mim para que eu alcance meus objetivos profissionais.

“Não há saber mais ou saber menos: Há saberes diferentes”. Paulo Freire

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE QUADROS E TABELAS	11
RESUMO	13
<i>ABSTRACT</i>	14
1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DA LITERATURA	18
3 PROPOSIÇÃO	27
4 MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1 Sujeitos da pesquisa.....	28
4.2 Etapa cirúrgica.....	30
4.3 Extração de RNA	32
4.4 Síntese de cDNA (DNA complementar)	33
4.5 Análise de expressão gênica PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR).....	34
5 RESULTADOS.....	38
6 DISCUSSÃO	56
7 CONCLUSÃO	63
8 REFERÊNCIAS.....	64
ANEXOS.....	68

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Medidas utilizadas para cálculo do índice panorâmico mandibular (PMI), (Imirzagliolu et al., 2012).	30
Figura 2 – Imagens ilustrativas de procedimentos cirúrgicos de um dos sujeitos da pesquisa. A) últimos dentes mandibulares antes da remoção cirúrgica; B) rebordo alveolar cicatrizado 14 dias após a remoção cirúrgica dos dentes remanescentes; C) periósteo visível com áreas de remodelação óssea inicial; D) implantes instalados na região anterior da mandíbula.	31
Figura 3 - Tecido ósseo após coleta e armazenado em RNA Later.....	31
Figura 4 – Etapas da extração do RNA. A) material peneirado para eliminar o máximo de coágulos sanguíneos presentes; B) cadinho e bastão de vidro utilizados para macerar as amostras antes do processo de homogeneização; C) amostra com Qiazol antes de ser homogeneizada; D) processo de homogeneização da amostra com o Cole-Parmer homogenizer ; E) amostra transferida para um tubo de 2mL contendo 200µl de clorofórmio, após homogeneização; F) fase aquosa e mais superficial da amostra obtida após centrifugação; G) a fase aquosa da amostra (a qual contém o RNA), transferida para a coluna do tubo de coleta para realização das etapas subsequentes.....	33
Figura 5 - Gráfico da variação dos genes de referência (normalizadores) utilizados no estudo. São mostradas as médias dos Cycle thresholds (Cts) e desvio padrão.	40

Figura 6 - Gráfico da distribuição dos valores de Cycle Threshold (Ct) nas amostras estudadas. 41

Figura 7 - Expressão dos genes-alvo analisados em pacientes com remodelação óssea inicial e com remodelação óssea tardia (controle - calibrador)..... 42

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1 – Funções das proteínas codificadas pelos genes relacionados à remodelação óssea para avaliação da expressão (adaptado de Dimitriou et al., 2005; Giannoudis e; 2006; Bahar et al., 2007; Allori et al., 2008; Al-Aql et al., 2008; Callacci et al., 2009).....	23
Quadro 2 - Genes relacionados à remodelação óssea para avaliação da expressão (adaptado de Callacci et al., 2009).....	35
Quadro 3 – Desenho da plataforma Custom RT2 Profile PCR array	37
Quadro 4 - Dados clínicos e relacionados ao uso de prótese total mucossuportada (PTMS) entre os indivíduos	39
Quadro 5 – Comparação da expressão gênica entre os pacientes 1 e 6.....	44
Quadro 6 – Comparação da expressão gênica entre os pacientes 2 e 6.....	47
Quadro 7 – Comparação da expressão gênica entre os pacientes 3 e 6.....	49
Quadro 8 – Comparação da expressão gênica entre os pacientes 4 e 6.....	51

Quadro 9 – Comparação da expressão gênica entre os pacientes 5 e 6.....	54
---	----

Tabela 1 – Médias, desvio e desvio relativo da variação da expressão dos genes endógenos (Cycle threshold - Ct) avaliados no estudo	40
---	----

Zutin EAL. Expressão de genes relacionados à formação e reabsorção óssea na fase inicial e tardia da reabsorção do rebordo residual em mandíbulas humanas [dissertação]. São José dos Campos (SP): Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2013.

RESUMO

O entendimento da reabsorção do rebordo residual (RRR) pode fornecer uma base científica importante para melhorar tratamentos restauradores e terapêuticos de pacientes edêntulos. O presente estudo teve como objetivo principal buscar marcadores moleculares envolvidos com a remodelação óssea no tecido ósseo proveniente de mandíbulas que sofreram a extração dos dentes remanescentes em período inferior a dois meses (no qual a RRR é mais intensa). O grupo de amostras analisadas no estudo foi composto por cinco indivíduos que sofreram extração dentária na área operada há menos de dois meses e por um paciente que sofreu extração dentária na área operada há mais de cinco anos, que foi usado como calibrador. Todos os pacientes tiveram os seus dados clínicos anotados e a radiografia panorâmica dos pacientes foi utilizada para realização de traçados para avaliação de características anatômicas previamente relacionadas com RRR. O RNA das amostras foi extraído e apresentaram pureza entre 1,8 e 2,0. A síntese de cDNA foi realizada pela técnica do qRT-PCR. Para as análises quantitativas, todas as reações foram realizadas em placas customizadas de 96 poços específicas para PCR em tempo real, utilizando iniciadores de 40 genes envolvidos no metabolismo ósseo. Levando-se em consideração o nível de expressão e a menor variação entre os genes de referência, *HPRT1* foi o gene escolhido como normalizador. A média da idade dos indivíduos foi de $53,8 \pm 5,6$ anos e apenas um dos sujeitos da pesquisa era do gênero feminino. Em todas as amostras analisadas, ocorreu maior presença de genes-alvo sub-expressos (em verde), seguidos dos super-expressos (em vermelho) e dos moderadamente expressos (em preto). Foi observada intensa atividade de remodelação óssea nos pacientes com remodelação óssea inicial, os quais apresentavam grande heterogeneidade individual na expressão de genes de formação e reabsorção óssea. No entanto, não há correlações importantes entre os achados clínicos e laboratoriais para esse grupo de pacientes.

Palavras-chave: Expressão gênica. Perda óssea alveolar. Formação óssea. Remodelação óssea. Mandíbula.

Zutin EAL. *Related genes expression to the bone resorption and formation in the early phase and late residual ridge resorption in human jaws. [dissertation]* São José dos Campos (SP): Institute of Science and Technology, UNESP – Univ Estadual Paulista; 2013.

ABSTRACT

The understanding of residual ridge resorption (RRR) can provide an important scientific basis for improving restorative and therapeutic treatments of edentulous patients. The present study aimed to seek molecular markers involved in bone remodeling in bone tissue from jaws that suffered the extraction of remaining teeth in less than two months period (in which the RRR is more intense). The group of samples analyzed in this study was composed of five individuals who underwent tooth extraction operated in less than two months by area and one patient who underwent tooth extraction operated in the area for more than five years, which was used as calibrator. All patients had their recorded clinical data and panoramic radiographs of patients was used to perform set for evaluation of anatomical features previously related to RRR. The RNA samples were extracted and presented purity between 1.8 and 2.0. The preparation of cDNA was performed by qRT-PCR. For quantitative analysis, all reactions were performed at optical plates 96 wells for specific real-time PCR using primers of 40 genes involved in bone metabolism. Taking into account the level of expression and the lowest variation among the reference genes, HPRT1 was chosen as the normalizing gene. The mean age of subjects was 53.8 ± 5.6 years and only one of the subjects were female. In all samples, the greater presence of target genes under-expressed (green), followed by overexpressed (red) and moderately expressed (black) occurred. Intense activity of bone remodeling was observed in patients with initial bone remodeling, which had great individual heterogeneity in gene expression of bone formation and resorption. However, no significant correlations between clinical and laboratory findings for this group of patients.

Keywords: Gene expression. Alveolar bone loss. Osteogenesis. Bone remodeling. Mandible

1 INTRODUÇÃO

Após a extração dos dentes, segue-se uma fase de remodelação dos ossos alveolares que pode resultar em uma extensa perda na altura óssea dos maxilares, especialmente na mandíbula (Reich et al., 2011; Huuonen et al., 2012; Arati, 2013). Historicamente, este fenômeno foi de grande importância, pois foi à observação dos alvéolos dentários e do rebordo alveolar por John Hunter, em 1750, que o levou a considerar o osso como um tecido capaz de remodelação, ao invés de uma estrutura imutável e permanente, como havia sido pensado anteriormente (Cohen, 1993).

Após a extração dentária, o alvéolo é preenchido por coágulo sanguíneo que, junto às células osteoprogenitoras do ligamento periodontal diferenciadas em osteoblastos, formam o tecido ósseo. Muitos estudos mostram que a perda de altura óssea pós-extração é maior na região anterior dos ossos alveolares, que o padrão individual da perda óssea continua relativamente constante. Existe variação acentuada tanto no padrão quanto na intensidade da perda óssea entre os indivíduos (Kingsmill, 1999; Divaris, 2012).

A diminuição das funções do tecido ósseo podem levar a adaptações e variações esqueléticas e pode ser um indicativo das pressões ambientais que levam a mudanças evolutivas. Efeitos fisiológicos de adaptação no esqueleto craniofacial podem ser observados após a perda de dentes no processo de envelhecimento humano (Dechow et al., 2010). Arati (2013), afirmaram que essas alterações devem ocorrer ao longo da vida adulta e de forma contínua, mas a maior parte da perda óssea ocorre na fase inicial do processo atrófico, e que os ossos compacto e esponjoso são igualmente afetados pela reabsorção.

A reabsorção do rebordo residual (RRR) é um processo biológico complexo que ocorre após a perda dos elementos dentários. A atrofia do rebordo por desuso acontece de forma mais severa nas regiões posteriores das mandíbulas (que tendem a ser mais afetadas do que as maxilas independente da região e da faixa etária dos indivíduos) e nos primeiros 6 meses após a perda dos dentes. Aumenta significativamente com o avanço da idade e continua de maneira mais lenta, porém de uma forma progressiva posteriormente (Reich et al., 2011; Mundhe, 2011; Kim et al., 2012). O rebordo alveolar pode até mesmo desaparecer após um longo período de edentulismo, associado a outros fatores locais e/ou sistêmicos (Pietrokovski, 2013).

Em maxilas humanas o edentulismo causa uma significativa mudança na estrutura craniofacial, bem como a RRR e a perda da espessura da cortical, embora não comprometa totalmente a altura da face. A estrutura óssea dos vertebrados refletem tanto a história evolutiva das espécies quanto as adaptações comportamentais e fisiológicas causadas pelas mudanças ambientais em um organismo. (Manoj et al., 2011).

Na remodelação do rebordo residual pós-extração dentária a quantidade de tecido ósseo continuamente diminui, sugerindo catabolismo aumentado, com intensa atividade de osteoclastos, ou diminuição da atividade anabólica, com redução da atividade de osteoblastos (Jahangiri et al., 1998; Carlsson, 2004; Garret, 2004; Giorgio et al., 2012).

A RRR de maxilas edêntulas não aumenta quando a densidade óssea mineral diminui. Porém, severa manifestação óssea em mandíbulas edêntulas pode ser observada em pacientes com índice de massa corpórea diminuída (Ozola et al., 2011).

Diversos fatores hereditários e ambientais podem afetar a qualidade e a quantidade de tecido ósseo, por alterações nos eventos da

expressão gênica que ocorrem nas células ósseas durante o processo de remodelação (Jahangiri et al., 1998).

Desse modo, ferramentas para avaliação da expressão gênica aplicada aos rebordos residuais podem auxiliar na descoberta de marcadores moleculares que participam do processo da RRR, permitindo um melhor entendimento dos mecanismos que determinam a sua intensidade e talvez propiciar a oportunidade para melhor gerenciamento da RRR. Assim, estudos clínicos com a finalidade de avaliar a expressão gênica em pacientes que sofreram RRR podem trazer resultados importantes para o tratamento de pacientes desdentados (Garret, 2004).

Considerando a importância da RRR para o tratamento dos pacientes desdentados, a ausência de consenso quanto ao seu mecanismo de patogênese e a ausência também de trabalhos que utilizem a análise da expressão gênica para avaliar os eventos inerentes à RRR, o presente trabalho tem como objetivo buscar marcadores moleculares na fase inicial e tardia da remodelação óssea em amostras do tecido ósseo obtidas de mandíbulas que sofreram a extração dos dentes remanescentes em período inferior a 02 meses e superior a 05 anos (amostra utilizada como calibradora).

2 REVISÃO DA LITERATURA

Com o aumento da expectativa de vida humana, esforços tem sido feitos para que haja, concomitantemente, uma maior qualidade de vida. A redução da função mastigatória em decorrência da perda dos dentes, além de diminuir a qualidade de vida, pode levar a uma deficiência nutricional. Quando não há uma reabilitação adequada para o desdentado, a reabsorção do rebordo residual (RRR) pode ser agravada gerando função mastigatória ineficiente e insatisfação do paciente (Kim et al., 2012).

Nos ossos maxilares, a diminuição do rebordo residual leva a dificuldades na execução de próteses adequadas e pode levar a fraturas patológicas no esqueleto de suporte. Estudos sobre as mudanças estruturais craniofaciais após perdas dentárias concentraram-se principalmente nas estruturas alveolares devido à importância destas mudanças para restaurar a função perdida com a instalação de próteses dentárias (Dechow et al., 2010).

O entendimento da redução do tamanho do rebordo alveolar abaixo do mucoperiósteo, em função da RRR, pode fornecer base científica importante para melhorar tratamentos restauradores e terapêuticos da população de desdentados (Jahangiri et al., 1998; Mundhe, 2011). Também existem implicações da RRR quanto à colocação de próteses sobre implantes, para as quais é necessária uma altura óssea mínima à instalação do implante e sua posterior osseointegração (Arati, 2013). O uso de enxertos ósseos é uma terapia comumente adotada para a preservação das estruturas ósseas alveolares em combinação ou não com a colocação de implante imediatamente após a extração de dentes. Espera-se desta forma, maior preservação da altura

do rebordo após o processo de remodelação óssea nesses casos (Giorgio et al., 2012). No entanto, segundo Fenner et al. (2009), mesmo quando utiliza-se enxerto ósseo para a reabilitação protética com implantes, consegue-se uma maior previsibilidade em locais com alturas ósseas do rebordo alveolar entre 6 e 8 milímetros.

A RRR em mandíbulas edêntulas constitui importante problema clínico para a Odontologia, especialmente no atendimento a pacientes idosos. Para portadores de próteses totais inferiores, a RRR leva à instabilidade da prótese e desconforto para o paciente (Marchini e Cunha, 2010; Mundhe, 2011; Huuonen et al., 2012; Arati, 2013). Huuonen et al. (2012) relataram queixas subjetivas a respeito da baixa estabilidade das próteses totais inferiores entre usuários de prótese totais muco-suportadas (PTMS) e verificaram que essas queixas se relacionaram com a gravidade e intensidade da RRR, especialmente em mulheres.

Nos casos mais graves de RRR mandibular, a prótese pode expor o nervo mandibular, resultando em dor ou incapacidade de tolerar as próteses (Jeffcoat, 1993).

Próteses implantossuportadas apresentam efeito de maior preservação óssea quando comparadas à RRR em portadores de próteses totais convencionais ou próteses totais mucossuportadas e implanto-retidas (Kordatzis, 2003; Carlsson, 2004; Habib, 2011).

A remodelação óssea mantém a homeostase entre cálcio e fósforo, coordenando as fases de formação e de reabsorção. Uma série de condições como idade, doenças ósteo-metabólicas, mobilidade diminuída e ação de alguns fármacos entre outros, podem alterar o equilíbrio entre formação e reabsorção óssea, levando ao predomínio de um sobre o outro (Martin, 2000).

No entanto, pouco se sabe sobre a fisiologia da RRR e a razão para a ocorrência de uma grande variação individual em sua intensidade, pois a etiologia da RRR é complexa e ainda não totalmente

compreendida (Garret, 2004; Felton, 2009; Reich et al., 2011). Os dados existentes sugerem que pode haver participação de fatores locais, tanto funcionais quanto anatômicos e inflamatórios, como tempo decorrido do momento da extração, ausência ou presença de próteses dentárias, natureza e magnitude da força oclusal incidente sobre o rebordo, período de desgaste/ uso diário da prótese, tipo da prótese dentária, material utilizado na confecção da base de próteses mucossuportadas, tonicidade muscular, forma facial, tamanho inicial da mandíbula, profundidade inicial dos alvéolos dentários, qualidade óssea local, idade/ disponibilidade de células ósseas, qualidade dos tecidos moles, suprimento sanguíneo, anexos musculares, trauma ocorrido durante a extração, doença periodontal, inflamação da mucosa, mediadores inflamatórios e higiene da prótese, entre outros. No entanto, fatores sistêmicos (como gênero, idade, estado ósseo geral, hormônios reguladores ósseos, fatores metabólicos principalmente os relacionados às células do metabolismo ósseo e a dieta de cálcio) também parecem contribuir para este processo (Kingsmill, 1999).

O tempo decorrido do momento da extração dentária está relacionado à RRR, pois se observa comumente reabsorção óssea mais intensa em pacientes que perderam os dentes há mais tempo do que em outros que perderam há menos tempo. O uso de próteses dentárias parece ter um papel de maior preservação óssea quando comparado com a não utilização das mesmas por pacientes na mesma situação; o tipo de material e desgaste da base de próteses muco-suportadas podem agravar a reabsorção óssea devido à irritação/inflamação nos tecidos subjacentes e à falta de contato da base da prótese com o rebordo alveolar. Em usuários de próteses totais, o estresse mecânico exagerado promovido pela base das próteses junto ao rebordo alveolar, pode resultar em reabsorção óssea local devido à isquemia provocada pela pressão da base sobre os tecidos subjacentes (Bellavance, 2002; Dechow et al., 2010; Maruo et al., 2010).

A demanda das forças mecânicas estão entre os principais fatores capazes de influenciar na formação e na reabsorção óssea, pois podem causar reações que alteram o metabolismo responsável pela manutenção do volume, da estrutura e das propriedades físicas da cortical óssea, ou seja, da remodelação óssea. (Mundhe, 2011; Suenaga et.al., 2012; Wolff, 1986). Desta forma, seria possível diminuir a reabsorção óssea distribuindo ou reduzindo esse estresse mecânico, permitindo assim uma melhor circulação sanguínea na região. Muitos cirurgiões-dentistas tem sido induzidos a equiparar a prevalência da RRR na população edêntula com o aumento do estresse mecânico sobre os rebordos. Hábitos parafuncionais como bruxismo, tem sido sugeridos como variáveis potencialmente capazes de afetar a magnitude da redução do rebordo alveolar. Observações sugerem que a direção em que os sistemas de Havers são orientadas correspondem à direção de maior rigidez do osso (Bellavance, 2002; Dechow et al., 2010; Maruo et al., 2010).

Tonicidade muscular equilibrada e harmônica favorece a preservação óssea após a extração dos dentes. Indivíduos com faces mais alongadas tendem a apresentar naturalmente a crista óssea alveolar vestibular e lingual menos espessas do que indivíduos braquifaciais, que apresentam maior espessura óssea alveolar. O tamanho inicial da mandíbula e a profundidade inicial dos alvéolos dentários, relacionados à anatomia da face do paciente, devem ser observados antes do início da reabsorção óssea, pois muitas vezes, indivíduos com grande perda óssea também apresentavam grande quantidade óssea anterior ao processo de reabsorção, enquanto indivíduos com menores quantidades de tecido ósseo inicial apresentaram menos reabsorção óssea. No entanto, a RRR deve ser avaliada de acordo com a quantidade/densidade ósseas iniciais, para que haja como quantificar essa perda óssea (Kingsmill, 1999).

A qualidade óssea local e a idade/disponibilidade de células ósseas se relacionam com a RRR, pois sugerem a presença

principalmente de osteócitos, osteoblastos e osteoclastos de forma equilibrada como no processo de remodelação óssea e não de maior quantidade de osteoclastos, como ocorre no período do envelhecimento, levando à reabsorção óssea. A qualidade e o suprimento sanguíneo dos tecidos moles sobrejacentes ao osso alveolar devem estar adequados para que haja um efeito de proteção sobre a estrutura óssea, bem como a presença de anexos musculares. Traumas ósseos locais excessivos durante a extração dentária podem causar danos ainda maiores ao tecido ósseo e acentuar o processo de reabsorção óssea. Pacientes portadores de doença periodontal e inflamação da mucosa podem apresentar perda óssea mais intensa, pois os mediadores químicos da inflamação são capazes de desencadear, manter ou até mesmo ampliar diversos processos envolvidos na resposta inflamatória, podendo causar efeitos deletérios ao hospedeiro (Ferguson, 1991; Kingsmill, 1999; Mahapatra et al., 2004; Zmysłowska et al., 2007; Divaris et al., 2012; Imirzagliolu et al., 2012; Manoj et al., 2011; Huuonen et al., 2012; Pietrokovski; 2013).

As atividades osteoblásticas e osteoclásticas também estão sob influência de fatores sistêmicos como gênero, idade, estado ósseo geral, hormônios reguladores ósseos, dieta de cálcio, diabetes e uso prolongado de corticosteroides. Os principais hormônios sistêmicos que regulam o metabolismo ósseo incluem o hormônio paratiróideo (PTH), o metabólito ativo da vitamina D e a calcitonina. Além desses, o hormônio tiroideano juntamente com a insulina, o GH, os corticosteroides e os hormônios sexuais possuem profundos efeitos na fisiologia e estrutura ósseas (Kingsmill, 1999; Manoj et al., 2011).

Mulheres após a menopausa apresentam queda de um hormônio sexual chamado estrógeno, sua deficiência aumenta a formação de osteoclastos e a diminuição da síntese de osteoblastos levando a um desequilíbrio da remodelação óssea, havendo maior reabsorção em relação a neoformação óssea, o que pode determinar a ocorrência de osteoporose.

O aumento dos hormônios tireoidiano, paratormônio (PTH), uso prolongado de corticosteroides e a diminuição da calcitonina, da vitamina D, do hormônio do crescimento (GH), da insulina e dos hormônios sexuais favorecem a reabsorção óssea (Vieira, 1999; Gouveia, 2004).

O ambiente bioquímico ósseo é um sistema ativo e dinâmico que permite e promove as funções celulares que levam à produção da matriz extracelular e da ossificação. Cada componente é capaz de transmitir sinais regulatórios importantes para as células vizinhas, afetando, assim, a expressão do gene e as mudanças no nível estrutural celular. Várias moléculas de sinalização contribuem para a natureza ativa e dinâmica do sistema bioquímico (Allori et al., 2008). O quadro 1 apresenta os nomes de alguns genes relacionados à remodelação óssea e suas respectivas funções.

Quadro 1 – Funções das proteínas codificadas pelos genes relacionados à remodelação óssea para avaliação da expressão (adaptado de Dimitriou et al., 2005; Giannoudis, 2006; Bahar et al., 2007; Allori et al., 2008; Al-Aql et al., 2008; Callacci et al., 2009)

(continua)

Classificação	GENES	FUNÇÃO
Marcador Formação Óssea	<i>ALPL</i>	Mineralização da matriz
	<i>BGLAP</i>	Proteína altamente conservada e associada com matriz mineralizada
	<i>SPP1</i>	Envolvido na ligação de osteoclastos à matriz óssea mineralizada
Proteína Óssea Morfogenética	<i>BMP2</i>	Indução de formação óssea e cartilaginosa
	<i>BMP4</i>	Importante papel no aparecimento da formação óssea e endocondral em humanos
	<i>BMP5</i>	Diferenciação das células mesenquimais indiferenciadas em condrócitos e osteoblastos, e são osteoprogenitoras dos osteoblastos

Quadro 1 – Funções das proteínas codificadas pelos genes relacionados à remodelação óssea para avaliação da expressão (adaptado de Dimitriou et al., 2005; Giannoudis, 2006; Bahar et al., 2007; Allori et al., 2008; Al-Aql et al., 2008; Callacci et al., 2009)

(continuação)

Classificação	GENES	FUNÇÃO
Colágenos	<i>COL1A2</i>	Codifica a cadeia de colágeno do tipo I, que é um formador de fibrila de colágeno encontrada na maioria dos tecidos conjuntivos e é abundante em ossos, córnea, derme e tendão
	<i>COL2A1</i>	Codifica a cadeia do colágeno do tipo II, um colágeno fibrilar encontrado em cartilagens
	<i>COL4A1</i>	Codifica a principal cadeia de colágeno das membranas basais, o tipo IV
	<i>COL4A3</i>	Ligam-se às moléculas de colágeno nas membranas basais dos alvéolos e glomérulos
	<i>COL4A4</i>	Codifica uma das 6 subunidades do colágeno do tipo IV, essa sub-unidade particular é encontrada em um sub-conjunto de membranas basais
	<i>COL5A1</i>	Codifica uma cadeia de um dos colágenos fibrilares de baixa abundância, é encontrado em tecidos que contenham colágeno do tipo I, regulam as fibras de ambos os tipos I e V
	<i>COL6A2</i>	Organização de componentes da matriz extracelular
	<i>COL9A3</i>	Codifica uma das três cadeias a de colágeno tipo IX, o principal componente colágeno da cartilagem hialina, é geralmente encontrado em tecidos contendo colágeno do tipo II, um colágeno fibrilar
	<i>COL10A1</i>	Codifica a cadeia de colágeno do tipo X, expressa por condrócitos, hipertróficos durante a ossificação endocondral
	<i>COL15A1</i>	Tem uma ampla distribuição nos tecidos, mas a expressão é mais forte para as zonas localizadas na membrana basal por isso, podem funcionar para aderir membranas basais de estroma de tecido conjuntivo subjacente
	<i>COL18A1</i>	Codifica a cadeia do colágeno do tipo VIII, produz endostatina – proteína anti-angiogênica

Quadro 1 – Funções das proteínas codificadas pelos genes relacionados à remodelação óssea para avaliação da expressão (adaptado de Dimitriou et al., 2005; Giannoudis, 2006; Bahar et al., 2007; Allori et al., 2008; Al-Aql et al., 2008; Callacci et al., 2009)

(continuação)

Classificação	GENES	FUNÇÃO
Fatores de Crescimento	<i>FGFR1</i>	Interage com fatores de crescimento de fibroblastos, induzindo mitose e diferenciação
	<i>FGFR2</i>	Responsável por crescimento e diferenciação de várias células, incluindo condrócitos e osteoblastos
	<i>FGFR3</i>	Liga-se a um hormônio de crescimento de fibroblastos e desempenham um papel de desenvolvimento e manutenção do tecido ósseo
	<i>IGFL1</i>	Recrutamento e proliferação de células mesenquimais osteoprogenitoras, expressa durante a consolidação da fratura
	<i>IGF2</i>	Recrutamento e proliferação de células mesenquimais osteoprogenitoras – expressa durante a consolidação da fratura, aumenta o número de osteoblastos maduros
	<i>PDGFA</i>	Mitogênico e quimiotático para células mesenquimais, mitogênico para osteoblastos, quimiotático para células inflamatórias, participa dos primeiros estágios de consolidação da fratura
	<i>TGFB1</i>	Mitogênicos potentes e quimiotáticos para células formadoras de tecido ósseo; expressam desde os primeiros estágios durante a consolidação da fratura. Observados em áreas de osteogênese, potente promotor da produção de colágeno
	<i>TGFB2</i>	Desempenha um papel na regulação do crescimento e proliferação celular, podem ser vistos em áreas de condrogênese
	<i>TGFB3</i>	Envolvido na embriogênese e na diferenciação celular, observado em áreas de condrogênese
	<i>VEGFA</i>	Mitogênicos que atuam especificamente nas células endoteliais. Aumentam a permeabilidade vascular, induzem angiogênese, atuam no crescimento das células endoteliais, promovem migração de células e a inibição da apoptose. Expressam durante a formação endocondral e óssea

Quadro 1 – Funções das proteínas codificadas pelos genes relacionados à remodelação óssea para avaliação da expressão (adaptado de Dimitriou et al., 2005; Giannoudis, 2006; Bahar et al., 2007; Allori et al., 2008; Al-Aql et al., 2008; Callacci et al., 2009)

(conclusão)

Classificação	GENES	FUNÇÃO
Fatores de Crescimento	<i>VEGFB</i>	Este gene codifica um membro do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e da família do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). Os membros da família VEGF regulam a formação de vasos sanguíneos e estão envolvidos na fisiologia da célula endotelial. Expressam durante a formação endocondral e óssea
Outros Formação Óssea	<i>SOST</i>	Regulador da homeostase óssea
	<i>PTH1R</i>	Se liga a receptores de PTH em osteoblastos, e regulam o número de ligantes RANKL. Receptor para o hormônio da paratireóide (PTH), defeitos nesse receptor causam condrodisplasias. Sinaliza a estimulação da proliferação celular e reprime a diferenciação dos condrócitos
Sinalização/Reabsorção Óssea	<i>TNFSF11</i>	Ligante de osteoprotegerina e funciona como um fator-chave para a diferenciação e ativação dos osteoclastos. Envolvido na regulação da resposta imune dependente de células T. A ativação das células T induziu a expressão deste gene e levou a um aumento de osteoclastos e a perda óssea
	<i>TNFRSF11B</i>	É secretada por osteoblastos e funciona como um regulador negativo da reabsorção óssea. Liga-se especificamente a osteoprotegerina, ambos os quais são reguladores extracelulares fundamentais do desenvolvimento dos osteoclastos
Metaloproteinases	<i>MMP2</i>	Degradação da matriz extracelular e do colágeno do tipo IV – principal componente estrutural das membranas basais
	<i>MMP8</i>	Degrada colágeno do tipo I, II e III
	<i>MMP9</i>	Degrada colágeno do tipo IV e do tipo V
	<i>MMP13</i>	Degrada colágeno do tipo I
Citocinas	<i>IL6</i>	Potente indutor de osteoclastos e da reabsorção óssea
	<i>OSM</i>	Atua na fase tardia da reabsorção óssea
	<i>TNF</i>	Promove ativação de osteoclastos via produção de IL-1 e IL-6
Outros Reabsorção Óssea	<i>ACP5</i>	Marcador específico da reabsorção óssea

3 PROPOSIÇÃO

O presente estudo teve como objetivo principal buscar marcadores moleculares que estão envolvidos com a remodelação óssea no tecido ósseo proveniente de pacientes que foram submetidos à extração dos dentes remanescentes mandibulares em período inferior a 02 meses (no qual a RRR é mais intensa).

Como objetivo secundário, a expressão dos genes envolvidos com remodelação óssea foram analisadas quanto à suas possíveis associações com variáveis clínicas dos pacientes, como gênero, idade, uso de prótese e dados radiográficos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Sujeitos da pesquisa

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Instituto de Ciência e Tecnologia – CSJC/UNESP – Univ Estadual Paulista por meio da Plataforma Brasil (Anexo A).

As amostras de tecido ósseo empregadas nessa pesquisa foram coletadas de 11 pacientes, os quais foram submetidos à colocação de implantes osseointegráveis na região anterior da mandíbula, entre os forames mentonianos. Em dois desses 11 pacientes, conseguimos coletar tecido ósseo de duas áreas de remodelação óssea distintas, totalizando 13 amostras. Dentre elas, sete pertenceram ao grupo de pacientes que sofreram extração dentária há mais de cinco anos e seis delas ao grupo de pacientes que sofreram extração há menos de dois meses, antes da cirurgia para a instalação dos implantes dentários.

O grupo de amostras analisadas no estudo foi composto por cinco indivíduos que sofreram extração dentária na área operada há menos de dois meses e por um paciente que sofreu extração dentária na área operada há mais de cinco anos que foi utilizado para comparação na expressão de genes. Os pacientes receberam de quatro a seis perfurações cirúrgicas para a instalação de próteses totais mandibulares implantossuportadas, durante as quais as amostras foram colhidas, sem necessidade de qualquer procedimento cirúrgico adicional.

Participaram do estudo, pacientes previamente selecionados para colocação de implantes, mediante rigorosa anamnese,

exame clínico e radiográfico (radiografia panorâmica digital, em todos os casos; e tomografia computadorizada de feixe cônico, em alguns casos, na dependência das condições clínicas avaliadas durante o exame) e que, portanto, não apresentaram alterações bucais ou sistêmicas que contra indicassem a colocação de implantes. Não fizeram parte deste estudo pacientes que apresentavam qualquer patologia óssea, mesmo que em estágio não avançado, nem que estivessem ingerindo medicamentos que interferissem com o metabolismo ósseo.

Os pacientes que concordaram em participar da pesquisa assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo B) e tiveram os seus dados clínicos anotados em ficha própria (Anexo C).

A radiografia panorâmica dos pacientes foi também utilizada na realização de traçados para avaliação de características anatômicas previamente relacionadas com RRR, como o índice panorâmico mandibular (PMI) que corresponde à divisão da espessura da cortical mandibular (MCW) pela altura da região central do forame mentoniano até a cortical mandibular externa (h). $PMI = MCW/h$. Esse valor pode ser menor, maior ou igual a 0.30 e o MCW pode ser menor, igual ou maior que três milímetros (Imirzagliolu et al., 2012). Esses dados foram anotados em formulário próprio para posterior correlação com a expressão dos genes envolvidos no processo de remodelação óssea dos indivíduos. Eles são medidos em milímetros (mm) com uma régua comum.

A figura 1 mostra como é feita a medição dos índices radiográficos. A medida (h) é a altura da região do forame mentoniano, necessária para calcular o PMI (MCW/h) e a medida (MCW) indica a espessura da cortical mandibular.

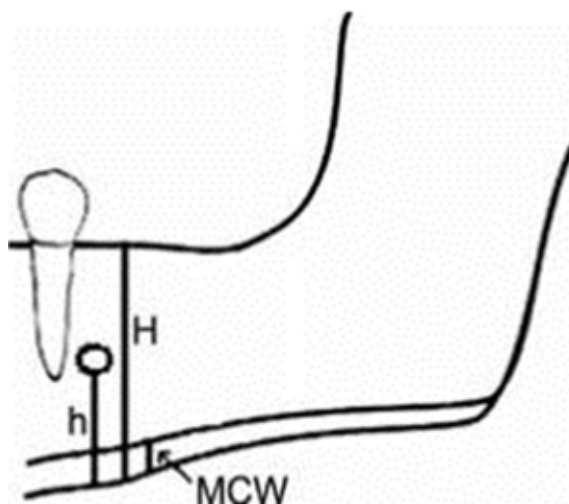


Figura 1 - Medidas utilizadas para cálculo do índice panorâmico mandibular (PMI), (Imirzagiolu et al., 2012).

4.2 Etapa cirúrgica

Durante a colocação cirúrgica dos implantes, após antisepsia realizada com solução bucal à base de Gluconato de Clorexidina a 0,12% (Colgate Periogard), anestesia de bloqueio regional mentoniano e terminal infiltrativa da região anterior da mandíbula e deslocamento do retalho muco-periostal, foi utilizado um sugador cirúrgico estéril com coletor de tecido ósseo para armazenar os raspados ósseos oriundos das etapas subsequentes, nas quais foram utilizadas diversas fresas para a instalação dos implantes. São elas: fresa lança, fresa 2.0, fresa 2/3, fresa 3.25 e 3.75.

Os raspados ósseos foram removidos das fresas cirúrgicas e também de dentro do sugador cirúrgico com coletor para tecido ósseo e foram armazenados em solução de *RNA Later* (Invitrogen, Life technologies) e mantidas em gelo. As amostras foram distribuídas em quatro Eppendorfs de 2 mL separadamente e devidamente identificados. Na figura 2 podemos observar imagens de procedimentos cirúrgicos de

um dos sujeitos da pesquisa. A figura 3 mostra o tecido ósseo coletado e armazenado em RNA Later.

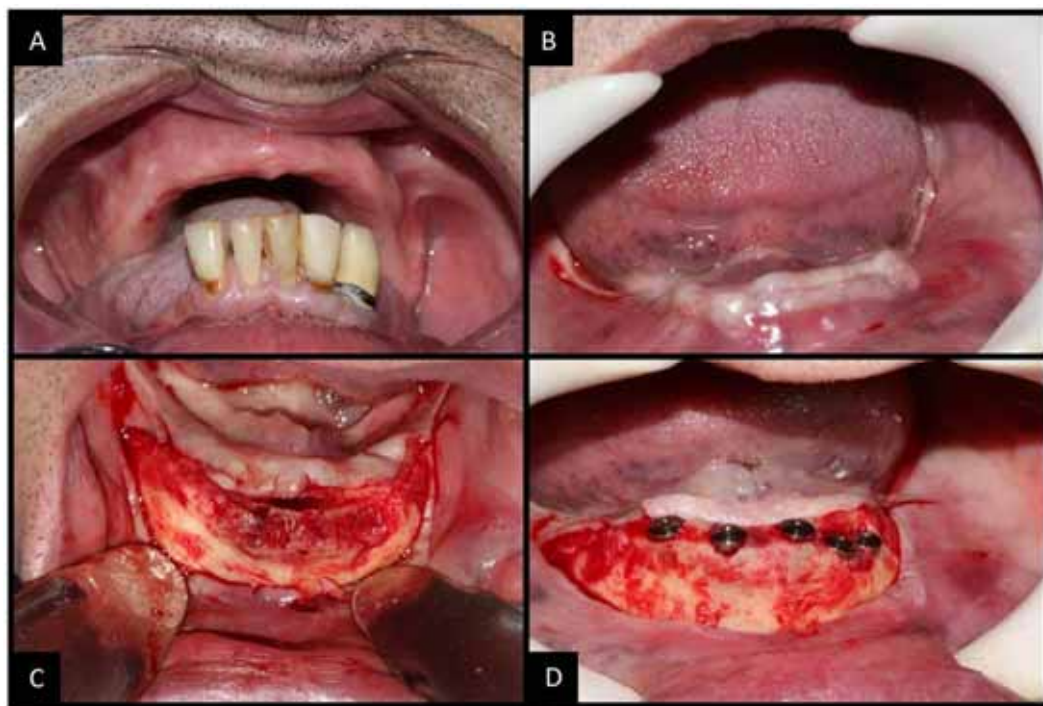


Figura 2 – Imagens ilustrativas de procedimentos cirúrgicos de um dos sujeitos da pesquisa. A) últimos dentes mandibulares antes da remoção cirúrgica; B) rebordo alveolar cicatrizado 14 dias após a remoção cirúrgica dos dentes remanescentes; C) perióstio visível com áreas de remodelação óssea inicial; D) implantes instalados na região anterior da mandíbula.

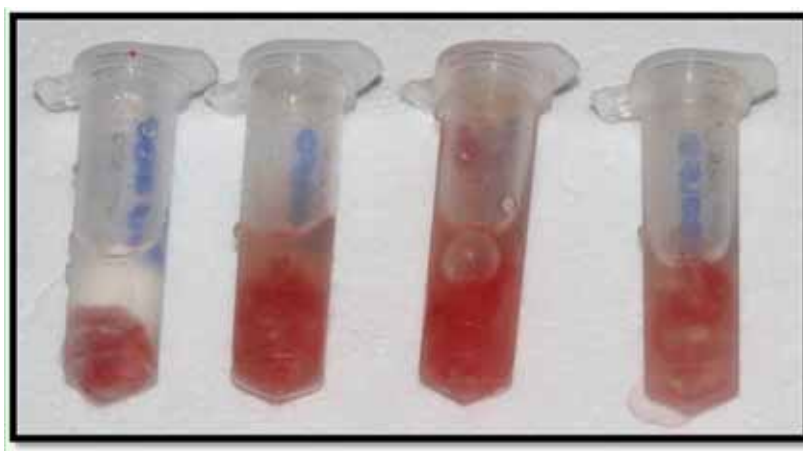


Figura 3 - Tecido ósseo após coleta e armazenado em RNA Later.

4.3 Extração de RNA

O RNA das amostras foi extraído utilizando o protocolo do *RNAeasy microarray tissue mini kit* (Qiagen) seguindo as recomendações do fabricante. As amostras armazenadas em *RNA later* foram trituradas com cadinho e bastão de vidro e homogenizadas (COLE PARMER 750-Watt Ultrasonic Homogenizers with Temperature Controller, 230 VAC). Seguimos a adição de 200 µl de clorofórmio e as amostras foram agitadas e mantidas durante 3 min a temperatura ambiente. Os tubos foram centrifugados a 12.000 xg, durante 15 min a 4 °C, a fase aquosa foi coletada, e então realizada lavagem com etanol 70%. O conteúdo foi transferido para uma coluna de *RNAeasy mini spin* e centrifugado a 8.000 xg por 15 s a temperatura ambiente por duas vezes. Seguimos com a adição de 700 µl do buffer RW1 e posterior centrifugação por 15 s a 8.000 xg. O procedimento foi repetido duas vezes com adição de 500 µl do buffer RPE e a última centrifugação foi realizada por 2 min. A coluna foi transferida para um tubo de coleta de 1,5 mL, ao qual foram adicionados 30 µl de água ultra pura e livre de nucleases, seguido de centrifugação por 1 min a 8.000 xg. A quantidade de RNA obtida foi verificada por meio de leitura em espectrofotômetro (Beckmann DU-640). A leitura da absorbância foi realizada e a produtividade da reação calculada pela fórmula: OD x diluição x 40/1000. Todos os RNAs utilizados apresentaram pureza entre 1,8 e 2,0 e foram tratados com DNase.

Dentre as 13 amostras coletadas, apenas seis delas apresentaram concentração de RNA – [RNA] em µg/µl suficientes (1µg), para a síntese do cDNA.

A figura 4 apresenta as etapas para a obtenção do RNA.

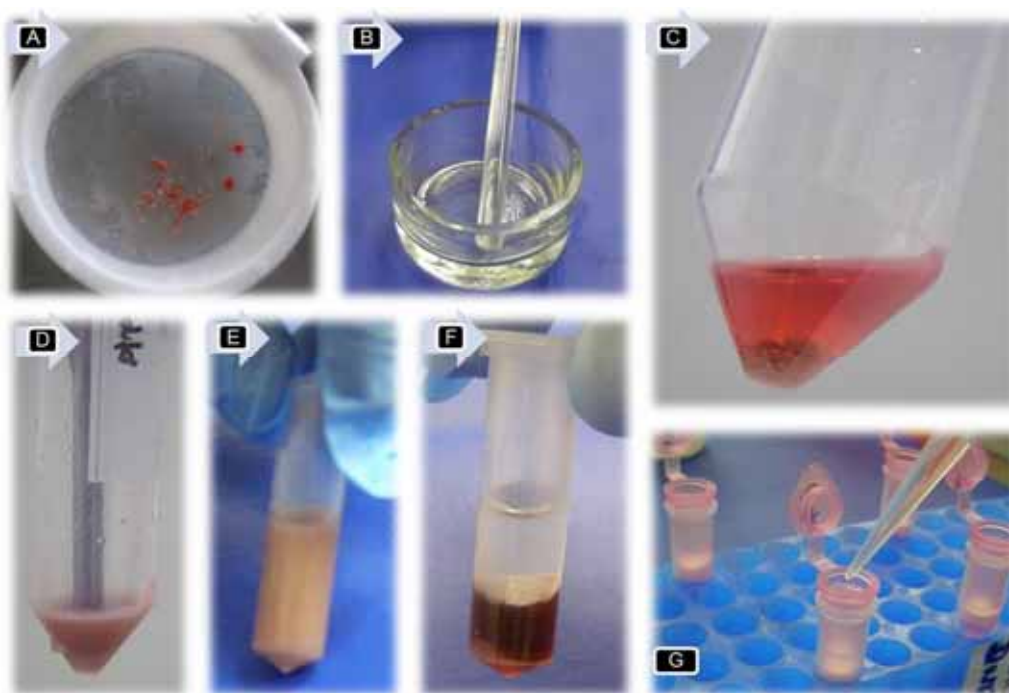


Figura 4 – Etapas da extração do RNA. A) material peneirado para eliminar o máximo de coágulos sanguíneos presentes; B) cadinho e bastão de vidro utilizados para macerar as amostras antes do processo de homogeneização; C) amostra com Qiazol antes de ser homogeneizada; D) processo de homogeneização da amostra com o Cole-Parmer homogenizer ; E) amostra transferida para um tubo de 2mL contendo 200µl de clorofórmio, após homogeneização; F) fase aquosa e mais superficial da amostra obtida após centrifugação; G) a fase aquosa da amostra (a qual contém o RNA), transferida para a coluna do tubo de coleta para realização das etapas subsequentes.

4.4 Síntese de cDNA (DNA complementar)

A síntese do cDNA foi realizada utilizando o kit *RT2 HT First Strand* (Qiagen). Inicialmente foi removido o DNA genômico utilizando o *DNA elimination mix*, nas proporções de 0,5 µg de RNA, 2 µl de *Buffer GE* e água livre de RNase em q.s.p. volume final de 10 µl, agitados. A solução resultante foi incubada a 42 °C por 5 min e então imediatamente colocada no gelo por 1 min.

A solução para transcrição reversa foi preparada na proporção de 4 µl de *5x Buffer BC3*, 1 µl de *Control P2*, 2 µl de *RE3 Reverse Transcriptase Mix*, 3 µl de água livre de RNase e 10 µl da solução resultante da remoção do DNA genômico, agitando-se por inversão. O tubo foi então incubado por 42 °C por exatos 15 min, após os quais foram incubados imediatamente a 95 °C por 5 min. Após a incubação, foram adicionados 91 µl de água livre de RNase a cada tubo, agitando-se por inversão. As amostras foram então armazenadas a -20 °C para posterior utilização.

4.5 Análise de expressão gênica PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR)

Para a análise de expressão gênica foi realizada a técnica de PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR). Um total de três placas de 96 poços customizadas (*Custom RT2 Profile PCR array*, *SABiosciences*, *Qiagen*), contendo os genes descritos no quadro abaixo foram utilizadas. A distribuição dos genes nas placas pode ser observado no esquema do quadro 4. As reações foram realizadas com o kit *RT2 qPCR SYBER Green/ROX Master Mix* (*Qiagen*). A ciclagem térmica foi realizada seguindo o protocolo padrão do equipamento *StepOnePlus™ Real-Time PCR System* (*Applied Biosystems*, *Life Technologies*): 50 °C por 2 min (incubação do UDG), 95 °C por 2 min, seguida de 40 ciclos a 95 °C por 15 s e 68 °C por 30 s. Um ciclo final de 10 min a 72 °C para a curva de dissociação foi realizado a fim de garantir as condições ótimas da reação e a confiabilidade dos resultados. Os dados foram normalizados com base na expressão do gene constitutivo mais estável para a condição experimental proposta no presente estudo e analisados utilizando o método do ΔC_t . Para seleção do controle endógeno mais

adequado, cinco genes de referência: *18SrRNA* (18S ribossomal RNA), *ACTB* (Actina de músculo liso-beta), *GAPDH* (Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase), *HPRT1* (Hipoxantina-fosforibosil-transferase 1) e *TUBB* (Tubulina) foram analisados sendo escolhido o mais estável, ou seja, aquele que apresentou menor variação nas condições experimentais conforme descrito. As reações de PCR em tempo real foram realizadas em triplicata.

Quadro 2 - Genes relacionados à remodelação óssea para avaliação da expressão (adaptado de Callacci et al., 2009)

(continua)

Genes relacionados à formação óssea	
Abreviação	Descrição
Marcadores de formação óssea	
<i>ALPL</i>	Fosfatase alcalina
<i>BGLAP</i>	Osteocalcina
<i>SPP1</i>	Osteopontina (OPN)
Proteínas ósseas morfogenéticas	
<i>BMP2</i>	Proteína óssea morfogenética 2
<i>BMP4</i>	Proteína óssea morfogenética 4
<i>BMP5</i>	Proteína óssea morfogenética 5
Colágenos	
<i>COL 1 A 2</i>	Pró-colágeno alfa 2(1)
<i>COL 2 A 1</i>	Pró-colágeno, tipo II, alfa 1
<i>COL 4 A 1</i>	Pró-colágeno, tipo IV, alfa 1
<i>COL 4 A 3</i>	Pró-colágeno, tipo IV, alfa 3
<i>COL 4 A 4</i>	Pró-colágeno, tipo IV, alfa 4

Quadro 2 - Genes relacionados à remodelação óssea para avaliação da expressão (adaptado de Callacci et al., 2009)

(continuação)

Genes relacionados à formação óssea	
Abreviação	Descrição
Colágenos	
<i>COL 5 A 1</i>	Colágeno, tipo V, alfa 1
<i>COL 6 A 2</i>	Pró-colágeno, tipo VI, alfa 2
<i>COL 9 A 3</i>	Pró-colágeno, tipo IX, alfa 3
<i>COL 10 A 1</i>	Colágeno alfa 1 tipo X
<i>COL 15 A 1</i>	Pró-colágeno, tipo XV
<i>COL 18 A 1</i>	Colágeno, tipo XVIII, alfa 1
Fatores de crescimento	
<i>FGFR 1</i>	Fator de crescimento de fibroblasto receptor 1
<i>FGFR 2</i>	Fator de crescimento de fibroblasto receptor 2
<i>FGFR 3</i>	Fator de crescimento de fibroblasto receptor 3
<i>IGFL1</i>	Fator de crescimento semelhante à insulina 1
<i>IGF2</i>	Fator de crescimento semelhante à insulina 2
<i>PDGFA</i>	Fator de crescimento derivados de plaquetas, alfa
<i>TGFB1</i>	Fator de crescimento transformador, beta 1
<i>TGFB2</i>	Fator de crescimento transformador, beta 2
<i>TGFB3</i>	Fator de crescimento transformador, beta 3
<i>VEGFA</i>	Fator de crescimento endotelial vascular
<i>VEGFB</i>	Fator de crescimento endotelial vascular C
Outros genes de formação óssea	
<i>SOST</i>	Selerostina
<i>PTH1R</i>	Hormônio da paratireoide receptor 1

Quadro 2 - Genes relacionados à remodelação óssea para avaliação da expressão (adaptado de Callacci et al., 2009)

(conclusão)

Genes relacionados à reabsorção óssea	
Abreviação	Descrição
Sinalização RANK-RANKL	
TNFSF11	Receptor ativador de NF- κ B ligante
TNFRSF11B	Osteoprotegerina
Metaloproteinase de matriz	
MMP2	Metaloproteinase de matriz 2
MMP8	Metaloproteinase de matriz 8
MMP9	Metaloproteinase de matriz 9
MMP13	Metaloproteinase de matriz 13
Citocinas	
IL6	Interleucina 6
OSM	Oncostatina M
TNF	Fator de necrose tumoral, super família, membro 2
Outros genes relacionados à reabsorção óssea	
ACP5	Fosfatase ácida tartarato resistente (TRAP)

Quadro 3 – Desenho da plataforma Custom RT2 Profile PCR array

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	ALPL 1	COL4A1 9	COL18A1 17	TGFB3 25	ACP5 33	TNF 41	ALPL 1	COL4A1 9	COL18A1 17	TGFB3 25	ACP5 33	TNF 41
B	BGLAP 2	COL4A3 10	FGFR1 18	SOST 26	18SrRNA 34	VEGFB 42	BGLAP 2	COL4A3 10	FGFR1 18	SOST 26	18SrRNA 34	VEGFB 42
C	SPP1 3	COL4A4 11	FGFR2 19	MMP2 27	TUBB 35	ACTB 43	SPP1 3	COL4A4 11	FGFR2 19	MMP2 27	TUBB 35	ACTB 43
D	BMP2 4	COL5A1 12	FGFR3 20	MMP8 28	IGFL1 36	HPRT1 44	BMP2 4	COL5A1 12	FGFR3 20	MMP8 28	IGFL1 36	HPRT1 44
E	BMP4 5	COL6A2 13	IGF2 21	MMP9 29	VEGFA 37	GAPDH 45	BMP4 5	COL6A2 13	IGF2 21	MMP9 29	VEGFA 37	GAPDH 45
F	BMP5 6	COL9A3 14	PDGFA 22	MMP13 30	PTH1R 38	HGDC 46	BMP5 6	COL9A3 14	PDGFA 22	MMP13 30	PTH1R 38	HGDC 46
G	COL1A2 7	COL10A1 15	TGFB1 23	IL6 31	TNFSF11 39	RTC 47	COL1A2 7	COL10A1 15	TGFB1 23	IL6 31	TNFSF11 39	RTC 47
H	COL2A1 8	COL15A1 16	TGFB2 24	OSM 32	TNFRSF11B 40	PPC 48	COL2A1 8	COL15A1 16	TGFB2 24	OSM 32	TNFRSF11B 40	PPC 48

5 RESULTADOS

Dentre os 11 pacientes que coletamos as amostras, em 02 deles conseguimos coletar tecido ósseo de 02 áreas de remodelação óssea distintas, totalizando 13 amostras. Dentre elas, 07 pertenceram ao grupo de pacientes que sofreram extração dentária há mais de 05 anos e 06 delas ao grupo de pacientes que sofreram extração há menos de 02 meses, antes da cirurgia para a instalação dos implantes dentários.

Das 13 amostras clínicas coletadas em 06 foi possível realizar a extração de quantidade suficiente de RNA e fizeram parte deste estudo. Uma delas foi de paciente com remodelação óssea tardia (extração dos últimos dentes mandibulares há mais de 05 anos); e, as outras 05 de pacientes com remodelação óssea inicial (extração dos últimos dentes mandibulares há menos de 02 meses). A média da idade dos indivíduos foi de $53,8 \pm 5,6$ anos e apenas um dos sujeitos da pesquisa era do gênero feminino. Três indivíduos eram usuários de prótese total mucossuportada (PTMS) superior e inferior e as próteses superiores apresentavam qualidade de adaptação adequada. Em apenas um indivíduo a qualidade da prótese inferior também estava adequada, nos outros dois a adaptação estava inadequada, provavelmente por serem próteses totais instaladas imediatamente após a extração dos dentes. Os outros três indivíduos não utilizavam PTMS inferior. Os valores do índice panorâmico mandibular (PMI) e da espessura da cortical mandibular (MCW) seguem junto aos dados clínicos e relacionados ao uso de PTMS dos indivíduos que foram avaliados no quadro 4.

Quadro 4 - Dados clínicos e relacionados ao uso de prótese total mucossuportada (PTMS) entre os indivíduos

Amostra	Idade	Sexo	Usuário (a) PTMS	Qualidade da PTMS inferior	Extração dos dentes mandibulares	PMI	MCW
1	62	M	Superior	-	5 semanas	0,3	4
2	53	M	Ambas	Boa	4 semanas	0,3	4
3	51	M	Não utiliza	-	4 semanas	0,3	5
4	59	M	Ambas	Inadequada	2 semanas	0,4	6
5	47	M	Superior	-	7 semanas	0,2	4
6	51	F	Ambas	Inadequada	Mais de 5 anos	0,2	4

PMI: Índice panorâmico mandibular; MCW: Espessura da cortical mandibular

A seleção do gene de referência a ser utilizado como normalizador das análises por PCR quantitativo foi realizada por meio da comparação da expressão de cinco genes de referência: *18SrRNA* (18S ribossomal RNA), *ACTB* (Actina de músculo liso-beta), *GAPDH* (Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase), *HPRT1* (Hipopoxantina-fosforibosil-transferase 1) e *TUBB* (Tubulina).

Conforme pode ser verificado na Figura 5 e Tabela 1, a análise dos cinco genes de referência utilizados no estudo revelou diferentes níveis de expressão entre eles. Individualmente, *ACTB* mostrou o maior nível de expressão seguido por *TUBB*, *HPRT1*, *GAPDH* e *18S rRNA*. Em relação ao desvio relativo à média, *18S rRNA* apresentou o menor desvio relativo seguido de *HPRT1*, *TUBB*, *GAPDH* e *ACTB* (Tabela 1). Levando-se em consideração o nível de expressão entre as amostras estudadas e a menor variação entre os genes de referência, *HPRT1* foi o gene escolhido como normalizador. Isso se deve ao fato de que a maioria dos genes-alvo do estudo apresentaram tendência de expressão abaixo do Ct (*"Cycle threshold"*) 25 ou entre 25 e 30. Ciclo *threshold* é o número do ciclo no qual a fluorescência gerada dentro de uma reação cruza a linha *threshold*.

Sendo assim, a escolha do gene de referência primou por um gene que também mostrou níveis de expressão semelhantes aos genes-alvo e que apresentou baixa variação, como pode ser verificado na Figura 6.

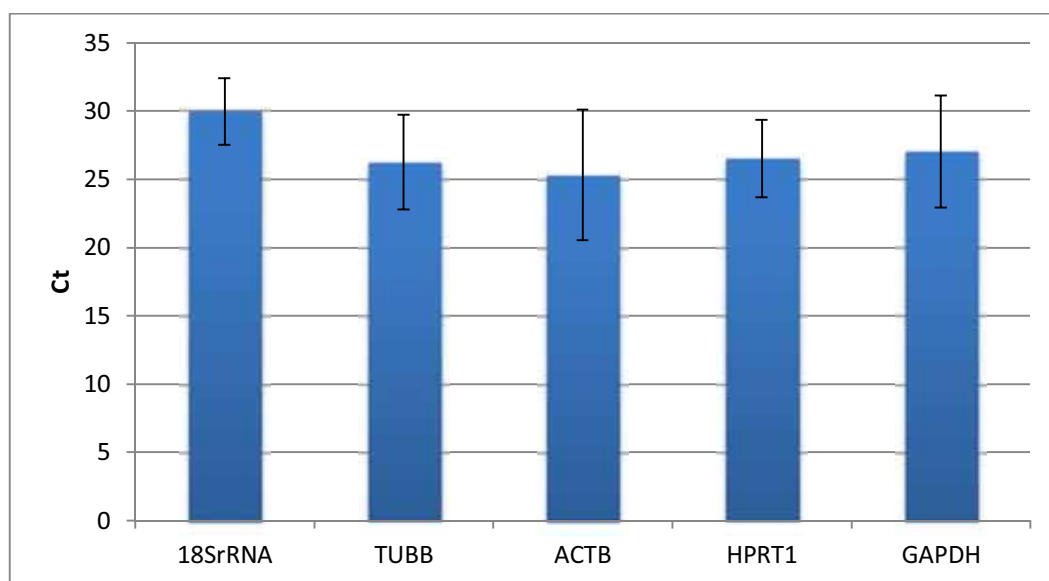


Figura 5 - Gráfico da variação dos genes de referência (normalizadores) utilizados no estudo. São mostradas as médias dos Cycle thresholds (Cts) e desvio padrão.

Tabela 1 – Médias, desvio e desvio relativo da variação da expressão dos genes endógenos (Cycle threshold - Ct) avaliados no estudo

Genes	Média	Desvio	Desvio relativo
18SrRNA	29,982	2,440	0,081
TUBB	26,260	3,456	0,132
ACTB	25,342	4,789	0,189
HPRT1	26,528	2,856	0,108
GAPDH	27,042	4,101	0,152

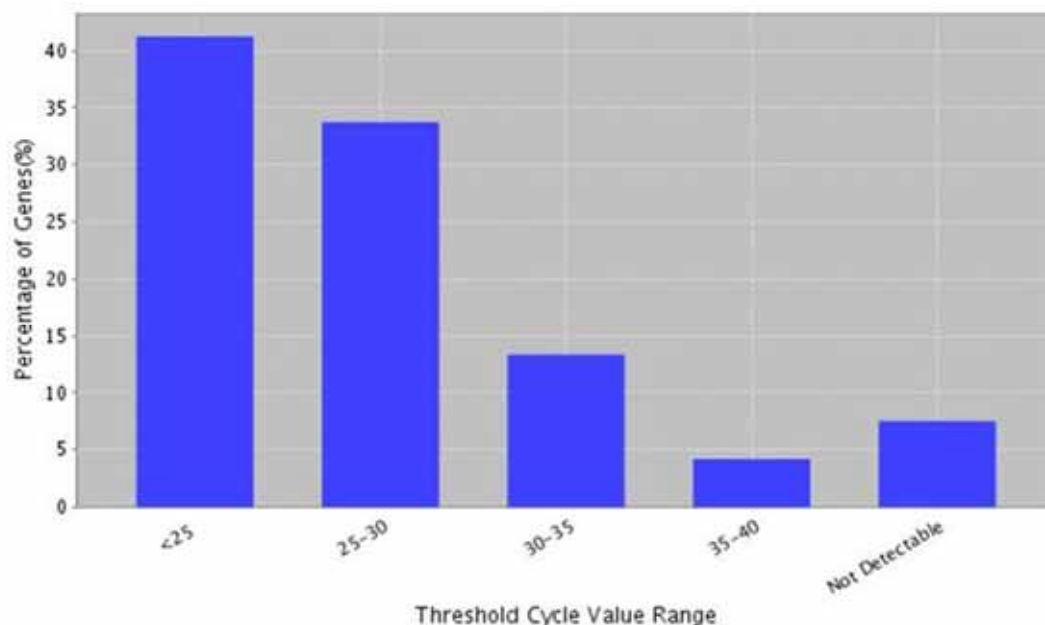


Figura 6 - Gráfico da distribuição dos valores de Cycle Threshold (Ct) nas amostras estudadas.

Para o presente trabalho, foram selecionados 40 genes-alvo envolvidos com remodelação óssea (30 relacionados à formação e 10 relacionados à reabsorção óssea) para serem estudados em amostras de pacientes com remodelação óssea inicial e tardia. Esses dados foram normalizados pelo gene de referência *HPRT1*, e a amostra pertencente ao paciente com remodelação óssea tardia foi utilizada como calibrador para o estabelecimento de comparações com os demais (de remodelação óssea inicial). As análises foram realizadas utilizando-se a ferramenta “RT2 Profiler PCR array Data Analysis” (versão 3.5)*. Foram realizados controles específicos de contaminação de DNA genômico (HGDC), da eficiência da transcrição reversa (RTC) e da eficiência da reação em cadeia da polimerase em tempo real (PPC). Os controles avaliados foram adequados.

* Disponível online pelo endereço <http://sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php>

De acordo com as análises, a expressão dos genes foi representada da seguinte maneira em relação ao calibrador: genes super-expressos ou com expressão aumentada (em vermelho), moderadamente expressos (em preto) e sub-expressos ou com expressão diminuída (em verde), conforme verificado na figura 7.

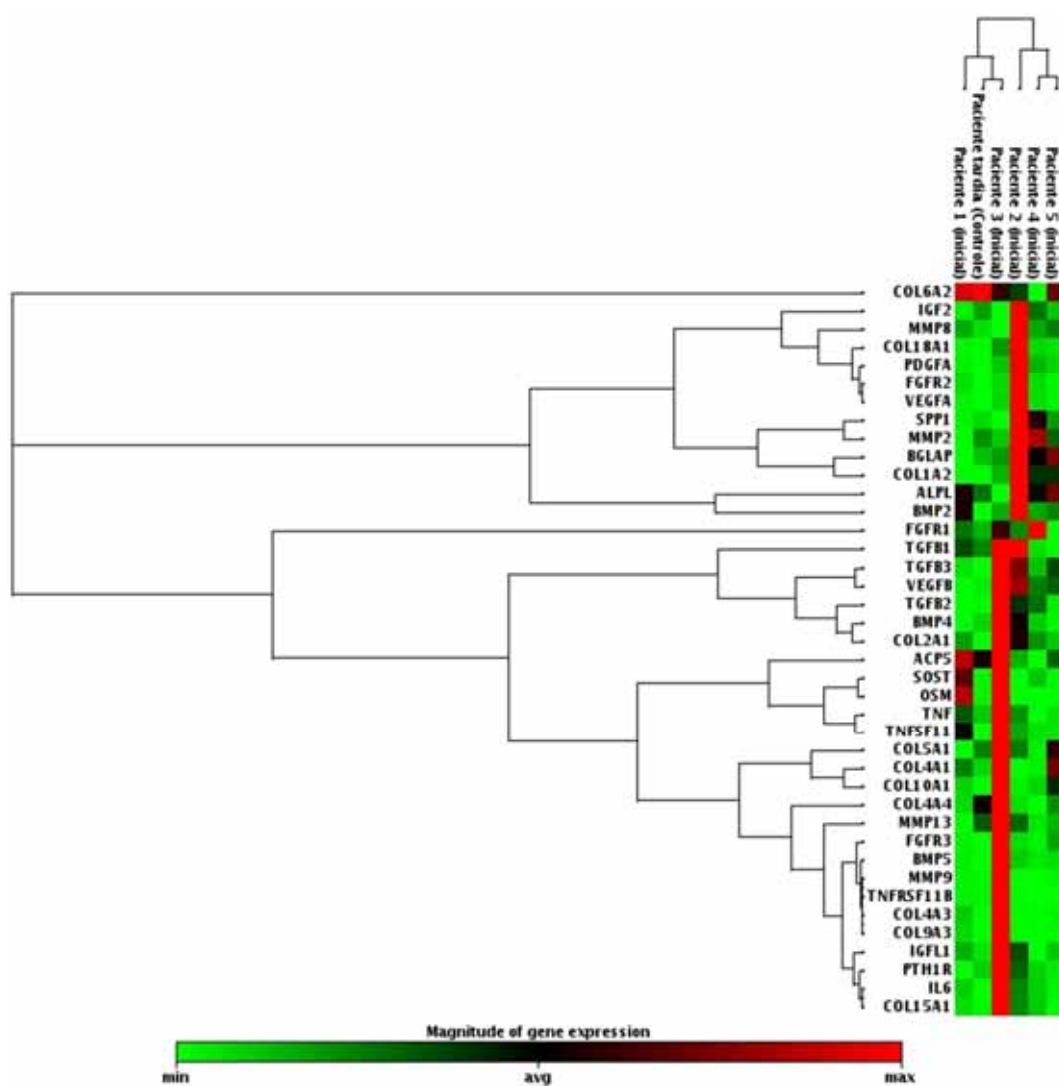


Figura 7 - Expressão dos genes-alvo analisados em pacientes com remodelação óssea inicial e com remodelação óssea tardia (controle - calibrador).

Em todas as amostras analisadas, ocorreu maior presença de genes-alvo sub-expressos (verde), seguidos dos super-expressos (vermelho) e dos moderadamente-expressos (preto). As exceções foram as amostras dos pacientes 2 e 3 que mostraram maior tendência a super-expressão (vermelho) comparadas aos outros pacientes. Essa maior tendência se observou no número de genes super-expressos em cada paciente e houve grande variação individual na expressão gênica, evidenciando uma correlação negativa entre eles.

Nos quadros a seguir podemos observar a que grupo os genes pertencem (formação ou reabsorção óssea); como são classificados (marcador de formação óssea, proteína óssea morfogenética, colágeno, fator de crescimento, outro gene relacionado à formação óssea, sinalização de reabsorção óssea *RANK-RANKL*, metaloproteinase de matriz, citocina, ou outro gene relacionado à reabsorção óssea) e que nomes recebem, na comparação entre pacientes com remodelação óssea na fase inicial (pacientes 1 a 5) e com remodelação óssea na fase tardia (paciente 6 - calibrador).

No paciente 6, somente o colágeno *COL6A2* foi super-expresso; o colágeno *COL4A4* e o gene *ACP5* foram moderadamente expressos e todos os outros genes foram sub-expressos nesse indivíduo. Os colágenos são relacionados à formação óssea e o *ACP5* à reabsorção óssea.

O paciente 1 apresentou moderada expressão do marcador de formação óssea *ALPL*, da proteína óssea morfogenética *BMP2* e do gene de sinalização da reabsorção óssea *TNFRSF11B*. Apresentou super-expressão do colágeno *COL6A2*, de outro gene relacionado à formação óssea *SOST*, da citocina *OSM* e de outro gene relacionado à reabsorção óssea *ACP5*. Os genes *ALPL*, *BMP2*, *COL6A2* e *SOST* são relacionados à formação óssea e os *TNFRSF11B*, *OSM* e *ACP5* são relacionados à reabsorção óssea.

Entre os genes que se expressaram de forma diferente no paciente 1 quando comparado ao paciente 6; os genes relacionados à formação óssea foram: o *ALPL* e o *BMP2* que se expressaram de forma moderada. Os relacionados à reabsorção óssea foram: o *OSM* que foi super-expresso e o *TNFRSF11B* que foi moderadamente expresso. Os pacientes 1 e 6 apresentaram semelhança na super-expressão do gene *COL6A2*. O gene *ACP5* foi super-expresso no paciente 1 e moderadamente expresso no paciente 6.

Os genes sub-expressos comumente observados nos pacientes 1 e 6 e relacionados à formação óssea foram: os marcadores de formação óssea *BGLAP* e *SPP1*, as proteínas ósseas morfogênicas *BMP4* e *BMP5*, os colágenos *COL1A2*, *COL2A1*, *COL4A1*, *COL4A3*, *COL5A1*, *COL9A3*, *COL10A1*, *COL15A1* e *COL18A1*, os fatores de crescimento *FGFR1*, *FGFR2*, *FGFR3*, *IGFL1*, *IGF2*, *PDGFA*, *TGFB1*, *TGFB2*, *TGFB3*, *VEGFA*, *VEGFB* e outro gene relacionado à formação óssea *PTH1R*. Os relacionados à reabsorção óssea foram: o sinalizador da reabsorção óssea *TNFSF11*, as metaloproteinases de matriz *MMP2*, *MMP8*, *MMP9* e *MMP13* e as citocinas *IL6* e *TNF*.

O quadro 5 compara a expressão gênica entre os pacientes 1 (remodelação óssea inicial) e o paciente 6 (calibrador, remodelação óssea tardia).

Quadro 5 – Comparação da expressão gênica entre os pacientes 1 e 6

(continua)

GRUPOS	Classificação	GENES	Pacientes	
			1	6
Formação	Marcador Formação	<i>ALPL</i>		
		<i>BGLAP</i>		
		<i>SPP1</i>		
	Proteína Morfogênica	<i>BMP2</i>		
		<i>BMP4</i>		

Quadro 5 – Comparação da expressão gênica entre os pacientes 1 e 6

(conclusão)

GRUPOS	Classificação	GENES	Pacientes	
			1	6
Formação	Proteína Morfogenética	<i>BMP5</i>		
	Colágenos	<i>COL1A2</i>		
		<i>COL2A1</i>		
		<i>COL4A1</i>		
		<i>COL4A3</i>		
		<i>COL4A4</i>		
		<i>COL5A1</i>		
		<i>COL6A2</i>		
		<i>COL9A3</i>		
		<i>COL10A1</i>		
		<i>COL15A1</i>		
		<i>COL18A1</i>		
	Fatores Crescimento	<i>FGFR1</i>		
		<i>FGFR2</i>		
		<i>FGFR3</i>		
		<i>IGFL1</i>		
		<i>IGF2</i>		
		<i>PDGFA</i>		
		<i>TGFB1</i>		
		<i>TGFB2</i>		
		<i>TGFB3</i>		
		<i>VEGFA</i>		
		<i>VEGFB</i>		
	Outros Formação	<i>SOST</i>		
		<i>PTH1R</i>		
Reabsorção	Sinalização/Reabsorção	<i>TNFSF11</i>		
		<i>TNFRSF11B</i>		
	Metaloproteinase	<i>MMP2</i>		
		<i>MMP8</i>		
		<i>MMP9</i>		
		<i>MMP13</i>		
Reabsorção	Citocinas	<i>IL6</i>		
		<i>OSM</i>		
		<i>TNF</i>		
	Outros Reabsorção	<i>ACP5</i>		

Verde: genes alvo sub-expressos; Preto: genes alvo moderadamente expressos; Vermelho: genes alvo super-expressos.

O paciente 2 apresentou super-expressão dos colágenos *COL18A1* e do *COL1A2* e moderada expressão do *COL2A1*. Super-expressão dos fatores de crescimento *FGFR1*, *FGFR2*, *IGF2*, *PDGFA*, *TGFB1*, *TGFB3*, *VEGFA* e *VEGFB*. Apresentou super-expressão dos marcadores de formação óssea *ALPL*, *BGLAP* e *SPP1*, da proteína óssea morfogênica *BMP2*, moderada expressão da proteína óssea morfogênica *BMP4* e super-expressão das metaloproteinases de matriz *MMP2* e *MMP8*.

A maior parte dos genes-alvo super-expressos no paciente 2 são relacionados à formação óssea, apenas as metaloproteinases de matriz (*MMP2* e *MMP8*) são relacionadas à reabsorção óssea e também apresentaram-se super-expressas nesse paciente.

Entre os genes que se expressaram de forma diferente no paciente 2 quando comparado ao paciente 6, os relacionados à formação óssea foram: *COL1A2*, *COL18A1*, *FGFR1*, *FGFR2*, *IGF2*, *PDGFA*, *TGFB1*, *TGFB3*, *VEGFA*, *VEGFB*, *ALPL*, *BGLAP*, *SPP1* e *BMP2* (apresentaram-se super-expressos) e os genes *COL2A1* e *BMP4* (apresentaram-se moderadamente expressos). Os relacionados à reabsorção óssea foram o *MMP2* e o *MMP8*, ambos apresentaram-se super-expressos.

Os genes sub-expressos comumente observados entre os pacientes 2 e 6 relacionados à formação óssea foram: *BMP5*, *COL4A1*, *COL4A3*, *COL5A1*, *COL9A3*, *COL10A1*, *COL15A1*; *FGFR3*, *IGFL1*, *TGFB2*, *SOST* e *PTH1R*. Os relacionados à reabsorção óssea foram: *TNFSF11*, *TNFRSF11B*, *MMP9*, *MMP13*, *ILS*, *OSM* e *TNF*.

O quadro 6 compara a expressão gênica entre o paciente 2 (remodelação óssea inicial) e o paciente 6 (calibrador, remodelação óssea tardia).

Quadro 6 – Comparação da expressão gênica entre os pacientes 2 e 6
(continua)

GRUPOS	Classificação	GENES	Pacientes	
			2	6
Formação	Marcador Formação	<i>ALPL</i>		
		<i>BGLAP</i>		
		<i>SPP1</i>		
	Proteína Morfogenética	<i>BMP2</i>		
		<i>BMP4</i>		
		<i>BMP5</i>		
	Colágenos	<i>COL1A2</i>		
		<i>COL2A1</i>		
		<i>COL4A1</i>		
		<i>COL4A3</i>		
		<i>COL4A4</i>		
		<i>COL5A1</i>		
		<i>COL6A2</i>		
		<i>COL9A3</i>		
		<i>COL10A1</i>		
		<i>COL15A1</i>		
		<i>COL18A1</i>		
	Fatores Crescimento	<i>FGFR1</i>		
		<i>FGFR2</i>		
		<i>FGFR3</i>		
		<i>IGFL1</i>		
		<i>IGF2</i>		
		<i>PDGFA</i>		
		<i>TGFB1</i>		
		<i>TGFB2</i>		
		<i>TGFB3</i>		
		<i>VEGFA</i>		
		<i>VEGFB</i>		
	Outros Formação	<i>SOST</i>		
		<i>PTH1R</i>		
Reabsorção	Sinalização/Reabsorção	<i>TNFSF11</i>		
		<i>TNFRSF11B</i>		
	Metaloproteinase	<i>MMP2</i>		
		<i>MMP8</i>		
		<i>MMP9</i>		
		<i>MMP13</i>		

Quadro 6 – Comparação da expressão gênica entre os pacientes 2 e 6

(conclusão)

GRUPOS	Classificação	GENES	Pacientes	
			2	6
Reabsorção	Citocinas	<i>IL6</i>		
		<i>OSM</i>		
		<i>TNF</i>		
	Outros Reabsorção	<i>ACP5</i>		

Verde: genes alvo sub-expressos; Preto: genes alvo moderadamente expressos; Vermelho: genes alvo super-expressos.

O paciente 3 apresentou super-expressão das proteínas ósseas morfogenéticas *BMP4* e *BMP5*, dos colágenos *COL2A1*, *COL4A1*, *COL4A3*, *COL4A4*, *COL5A1*, *COL9A3*, *COL10A1* e *COL15A1* e moderada expressão do *COL6A2*. Super-expressão dos fatores de crescimento *FGFR1*, *FGFR3*, *IGFL1*, *TGFB1*, *TGFB2*, *TGFB3*, *VEGFB*. Apresentou super-expressão de outros genes de formação óssea como o *SOST* e o *PTH1R*. Super-expressão dos genes de sinalização de reabsorção óssea *RANK-RANKL*, *TNFSF11* e *TNFRSF11B*, das metaloproteinases de matriz *MMP9*, *MMP13*, das citocinas *IL6*, *OSM*, *TNF* e de outro gene relacionado à reabsorção óssea, o *ACP5*. O paciente 3 apresentou o maior nível de super-expressão de genes de uma maneira geral entre os indivíduos.

Apenas as metaloproteinases de matriz (*MMP2* e *MMP8*) dos genes relacionados à reabsorção óssea analisados apresentaram-se sub-expressos nesse indivíduo.

Entre os genes que se expressaram de forma diferente no paciente 3 quando comparado ao paciente 6, os relacionados à formação óssea foram: *BMP4*, *BMP5*, *COL2A1*, *COL4A1*, *COL4A4*, *COL5A1*, *COL9A3*, *COL10A1*, *COL15A1*, *FGFR1*, *FGFR3*, *IGFL1*, *TGFB1*, *TGFB2*, *TGFB3*, *VEGFB*, *SOST* e o *PTH1R*. Todos eles apresentaram-se super

expressos. O *COL6A2* apresentou moderada expressão e também está relacionado à formação óssea. Os genes *TNFSF11*, *TNFRSF11B*, *MMP9*, *MMP13*; *IL6*, *OSM*, *TNF* e o *ACP5*, apresentaram-se super-expressos e estão relacionados à reabsorção óssea.

Os genes sub-expressos comumente observados entre os pacientes 3 e 6 relacionados à formação óssea foram: *ALPL*, *BGLAP*, *SPP1*, *BMP2*, *COL1A2*, *COL18A1*, *FGFR2*, *IGF2*, *PDGFA*, *VEGFA*, e os relacionados à reabsorção óssea são *MMP2* e *MMP8*.

O quadro 7 compara a expressão gênica entre o paciente 3 (remodelação óssea inicial) e o paciente 6 (calibrador, remodelação óssea tardia).

Quadro 7 – Comparação da expressão gênica entre os pacientes 3 e 6
(continua)

GRUPOS	Classificação	GENES	Pacientes	
			3	6
Formação	Marcador Formação	<i>ALPL</i>		
		<i>BGLAP</i>		
		<i>SPP1</i>		
	Proteína Morfogenética	<i>BMP2</i>		
		<i>BMP4</i>		
		<i>BMP5</i>		
	Colágenos	<i>COL1A2</i>		
		<i>COL2A1</i>		
		<i>COL4A1</i>		
		<i>COL4A3</i>		
		<i>COL4A4</i>		
		<i>COL5A1</i>		
		<i>COL6A2</i>		
		<i>COL9A3</i>		
		<i>COL10A1</i>		
		<i>COL15A1</i>		
		<i>COL18A1</i>		

Quadro 7 – Comparação da expressão gênica entre os pacientes 3 e 6

(conclusão)

GRUPOS	Classificação	GENES	Pacientes	
			3	6
Formação	Fatores Crescimento	<i>FGFR1</i>		
		<i>FGFR2</i>		
		<i>FGFR3</i>		
		<i>IGFL1</i>		
		<i>IGF2</i>		
		<i>PDGFA</i>		
		<i>TGFB1</i>		
		<i>TGFB2</i>		
		<i>TGFB3</i>		
		<i>VEGFA</i>		
		<i>VEGFB</i>		
	Outros Formação	<i>SOST</i>		
		<i>PTH1R</i>		
Reabsorção	Sinalização/Reabsorção	<i>TNFSF11</i>		
		<i>TNFRSF11B</i>		
	Metaloproteinase	<i>MMP2</i>		
		<i>MMP8</i>		
		<i>MMP9</i>		
		<i>MMP13</i>		
	Citocinas	<i>IL6</i>		
		<i>OSM</i>		
		<i>TNF</i>		
	Outros Reabsorção	<i>ACP5</i>		

Verde: genes alvo sub-expressos; Preto: genes alvo moderadamente expressos; Vermelho: genes alvo super-expressos.

O paciente 4 apresentou moderada expressão dos marcadores de formação óssea *ALPL*, *BGLAP*, *SPP1* e super-expressão do fator de crescimento *FGFR1*. A metaloproteinase de matriz *MMP2* foi o único gene relacionado à reabsorção óssea que apresentou super-expressão.

Entre os genes que se expressaram de forma diferente no paciente 4 quando comparado ao paciente 6, o *BGLAP* está relacionado à

formação óssea e foi moderadamente expresso. Os relacionados à reabsorção óssea foram: o *MMP2* que foi super-expresso e o *SPP1* que foi moderadamente expresso.

Os genes comumente sub-expressos entre os pacientes 4 e 6 relacionados à formação óssea foram: as proteínas ósseas morfogênicas *BMP2*, *BMP4* e *BMP5*, os colágenos *COL1A2*, *COL2A1*, *COL4A1*, *COL4A3*, *COL5A1*, *COL9A3*, *COL10A1*, *COL15A1* e *COL18A1*, os fatores de crescimento *FGFR2*, *FGFR3*, *IGFL1*, *IGF2*, *PDGFA*, *TGFB1*, *TGFB2*, *TGFB3*, *VEGFA*, *VEGFB* e outros genes relacionados à formação óssea como o *SOST* e o *PTH1R*. Os relacionados à reabsorção óssea foram: os genes de sinalização *TNFSF11*, *TNFRSF11B*, as metaloproteinases de matriz *MMP8*, *MMP9*, *MMP13*, as citocinas *IL6*, *OSM* e *TNF*.

O quadro 8 compara a expressão gênica entre o paciente 4 (remodelação óssea inicial) e o paciente 6 (calibrador, remodelação óssea tardia).

Quadro 8 – Comparação da expressão gênica entre os pacientes 4 e 6

(continua)

GRUPOS	Classificação	GENES	Pacientes	
			4	6
Formação	Marcador Formação	<i>ALPL</i>		
		<i>BGLAP</i>		
		<i>SPP1</i>		
	Proteína Morfogênica	<i>BMP2</i>		
		<i>BMP4</i>		
		<i>BMP5</i>		
	Colágenos	<i>COL1A2</i>		
		<i>COL2A1</i>		
		<i>COL4A1</i>		
		<i>COL4A3</i>		
		<i>COL4A4</i>		
		<i>COL5A1</i>		

Quadro 8 – Comparação da expressão gênica entre os pacientes 4 e 6

(conclusão)

GRUPOS	Classificação	GENES	Pacientes	
			4	6
Formação	Colágenos	COL6A2		
		COL9A3		
		COL10A1		
		COL15A1		
		COL18A1		
	Fatores Crescimento	FGFR1		
		FGFR2		
		FGFR3		
		IGFL1		
Formação	Fatores Crescimento	IGF2		
		PDGFA		
		TGFB1		
		TGFB2		
		TGFB3		
		VEGFA		
		VEGFB		
	Outros Formação	SOST		
Reabsorção	Sinalização/Reabsorção	TNFSF11		
		TNFRSF11B		
	Metaloproteinase	MMP2		
		MMP8		
		MMP9		
		MMP13		
	Citocinas	IL6		
		OSM		
		TNF		
	Outros Reabsorção	ACP5		

Verde: genes alvo sub-expressos; Preto: genes alvo moderadamente expressos;
Vermelho: genes alvo super-expressos.

O paciente 5 apresentou super-expressão dos marcadores ósseos *ALPL* e *BGLAP* e dos colágenos *COL4A1*, *COL5A1* e *COL6A2*. Esses genes são relacionados à formação óssea. E todos os outros genes-alvo analisados nesse paciente apresentaram-se sub-expressos.

Os paciente 5 e 6 apresentaram semelhança na super-expressão do gene *COL6A2*.

Entre os genes que se expressaram de forma diferente no paciente 5 quando comparado ao paciente 6, todos eles estão relacionados à formação óssea e apresentaram-se super expressos, foram eles: *COL4A1*, *COL5A1*, *ALPL* e o *BGLAP*.

Os genes comumente sub-expressos entre os pacientes 5 e 6 relacionados à formação óssea são: o marcador de formação óssea *SPP1*, as proteínas ósseas morfogenéticas *BMP2*, *BMP4* e *BMP5*, os colágenos *COL1A2*, *COL2A1*, *COL4A3*, *COL9A3*, *COL10A1*, *COL15A1* e *COL18A1*, os fatores de crescimento *FGFR1*, *FGFR2*, *FGFR3*, *IGFL1*, *IGF2*, *PDGFA*, *TGFB1*, *TGFB2*, *TGFB3*, *VEGFA*, *VEGFB* e os genes *SOST* e *PTH1R* que são classificados como outros genes de formação óssea. Os relacionados à reabsorção óssea são: os genes-alvo de sinalização da reabsorção óssea *TNFSF11*, *TNFRSF11B*, as metaloproteinases de matriz *MMP2*, *MMP8*, *MMP9* e *MMP13* e as citocinas *IL6*, *OSM* e *TNF*.

O quadro 9 compara a expressão gênica entre o paciente 5 (remodelação óssea inicial) e o paciente 6 (calibrador, remodelação óssea tardia).

Quadro 9 – Comparação da expressão gênica entre os pacientes 5 e 6
(continua)

GRUPOS	Classificação	GENES	Pacientes	
			5	6
Formação	Marcador Formação	<i>ALPL</i>		
		<i>BGLAP</i>		
		<i>SPP1</i>		
	Proteína Morfogenética	<i>BMP2</i>		
		<i>BMP4</i>		
		<i>BMP5</i>		
	Colágenos	<i>COL1A2</i>		
		<i>COL2A1</i>		
		<i>COL4A1</i>		
		<i>COL4A3</i>		
		<i>COL4A4</i>		
		<i>COL5A1</i>		
		<i>COL6A2</i>		
		<i>COL9A3</i>		
		<i>COL10A1</i>		
		<i>COL15A1</i>		
		<i>COL18A1</i>		
	Fatores Crescimento	<i>FGFR1</i>		
		<i>FGFR2</i>		
		<i>FGFR3</i>		
		<i>IGFL1</i>		
		<i>IGF2</i>		
		<i>PDGFA</i>		
		<i>TGFB1</i>		
		<i>TGFB2</i>		
		<i>TGFB3</i>		
		<i>VEGFA</i>		
		<i>VEGFB</i>		
	Outros Formação	<i>SOST</i>		
		<i>PTH1R</i>		
Reabsorção	Sinalização/Reabsorção	<i>TNFSF11</i>		
		<i>TNFRSF11B</i>		
	Metaloproteinase	<i>MMP2</i>		
		<i>MMP8</i>		
		<i>MMP9</i>		
		<i>MMP13</i>		

Quadro 9 – Comparação da expressão gênica entre os pacientes 5 e 6

(conclusão)

GRUPOS	Classificação	GENES	Pacientes	
			5	6
Reabsorção	Citocinas	<i>IL6</i>		
		<i>OSM</i>		
		<i>TNF</i>		
	Outros Reabsorção	<i>ACP5</i>		

Verde: genes alvo sub-expressos; Preto: genes alvo moderadamente expressos;
Vermelho: genes alvo super-expressos.

6 DISCUSSÃO

Entre as seis amostras clínicas que foram analisadas, uma amostra pertencia a um paciente do gênero feminino, que sofreu extração dentária dos últimos dentes mandibulares há mais de cinco anos. As outras cinco amostras são de pacientes que sofreram a extração dos dentes há menos de dois meses e foram provenientes de pacientes do gênero masculino. A média de idade entre os indivíduos foi de 53,8 anos, diferente da média encontrada no estudo de Arati (2013) que foi de 69,8 anos. Esses autores avaliaram indivíduos desdentados totais, o que pode estar relacionado à maior média de idade encontrada entre esses indivíduos.

Dentre os pacientes deste estudo, três são usuários de PTMS superior e inferior, sendo que dois deles eram usuários de PTMS superior entre zero e cinco anos e um deles há mais de 10 anos. Em apenas um dos pacientes, a qualidade de adaptação da prótese mandibular apresentava-se adequada, semelhante ao encontrado nos usuários de PTMS do estudo de Huuonen et al. (2012), onde os pacientes queixam-se de dificuldades no uso de suas próteses devido à baixa estabilidade das mesmas e à intensa RRR.

Os valores do PMI encontrados foram semelhantes ao valor mínimo esperados por Imirzagliolu et al. (2012) que é de 0.3 mm. Para o PMI encontramos 0.3 para três de nossos pacientes, 0.2 para outros dois indivíduos e 0.4 para o outro indivíduo, nos quais o rebordo alveolar encontrava-se mais reabsorvido. Para o MCW obtivemos 4 mm em quatro casos, 5 mm e 6 mm em outros dois casos, respectivamente. Estes resultados indicam uma RRR menos intensa do que os resultados encontrados por Imirzagliolu et al. (2011), onde a RRR foi mais

frequentemente observada em pacientes com valores do PMI menores que 0.30 e em pacientes com valores do MCW menores que 3 mm.

As três primeiras amostras coletadas, na tentativa de conseguirmos apenas tecido ósseo, foram realizadas com gaze estéril na cânula do sugador cirúrgico convencional, porém de maneira ineficaz. Estas amostras apresentaram as menores quantidades de RNA total dentre todas as outras, e por não termos conseguido quantidade de RNA suficiente para a etapa posterior, foram descartadas.

A realização da coleta das amostras com um sugador cirúrgico descartável com coletor de tecido ósseo, otimizou a etapa para os pacientes subsequentes, já que o material conseguido desta forma não era tão escasso. A qualidade das amostras obtidas para posterior processamento variou muito entre os indivíduos, por serem provenientes da oportunidade cirúrgica e por terem sido coletadas de forma mais eficaz com sugador cirúrgico com coletor para tecido ósseo. No material obtido havia também saliva e coágulo sanguíneo em quantidades variadas, o que dificultava a separação do tecido ósseo.

Com relação às funções das proteínas codificadas pelos genes, o colágeno é um elemento central da matriz extracelular, está intimamente envolvido no desenvolvimento, na remodelação, na reparação e confere elevada resistência à tração de tecidos. São genes que codificam proteínas que fazem parte da matriz proteica do tecido ósseo, participando do processo de formação óssea (Shoseyov et. al., 2013). O paciente 3 apresentou o maior nível de super-expressão desses genes.

A principal função dos fatores de crescimento é a regulação do crescimento e das funções celulares. Os do grupo *TGF- β* são mitogênicos potentes e quimiotáticos para células formadoras de tecido ósseo, quando secretados associam-se com glicoproteínas e proteoglicanos da matriz, protegendo-as de degradação precoce. A expressão dos *TGF- β* é alta no tecido ósseo especialmente durante a

secreção da matriz. Modelos animais (ratos) in vivo demonstraram que os osteoblastos e osteoclastos expressaram especialmente *TGFB1* de forma aumentada 3 horas após a osteotomia, mas permanece elevado durante todo o período de consolidação da fratura (Allori et al., 2008). Os fatores de crescimento do grupo *PDGF* são mitogênicos para células mesenquimais e osteoblastos, são quimiotáticos para células inflamatórias e mesenquimais, e os do grupo dos *FGFs* são angiogênicos e mitogênicos para células epiteliais, mesenquimais, osteoblastos e condrócitos – o *FGF-α* atua principalmente na proliferação de condrócitos e o *FGF-β* (mais potente) é envolvido na maturação dos condrócitos e na reabsorção óssea. Os fatores de crescimento do grupo *VEGFs* são potentes estimuladores de proliferação de células endoteliais e são expressos durante a formação óssea e endocondral. Os fatores de crescimento se expressam na fase inicial da reparação óssea, de 1 a 4 dias após a fratura (Giannoudis, 2006; Bahar et al., 2007). Os pacientes 2 e 3 apresentaram maior nível de super-expressão desses genes.

A proteínas ósseas morfogenéticas (*BMPs*) controlam a diferenciação das células mesenquimais pluripotentes em osteoblastos. Produzem osteoprotegerina (*OPG*), um receptor de osteoblastos que se liga especificamente ao fator de diferenciação de osteoclastos e inibe a maturação deles, são capazes de induzir a diferenciação dos osteoblastos em vários tipos de células como células mesenquimais e fibroblastos e continuam a promover a diferenciação dos osteoblastos e condrócitos. Durante o período de latência de 4 dias, as *BMP2* e *BMP4* apresentaram padrões semelhantes de expressão intensa nas células ósseas e condróides em ossos longos de ratos (Sato et al., 1999). A *BMP2*, a *BMP4* e o *TGF-β* tem um pico de expressão durante a fase inicial da fratura para estimular a formação óssea em resposta à tensão causada pela distração. Na fase de consolidação da fratura as *BMP2* e *BMP4* vão gradualmente diminuindo a expressão (Al-Aql et al., 2008). Novamente, esses genes foram mais expressos nos pacientes 2 e 3.

Os marcadores de formação óssea (*ALPL*, *BGLAP*, *SPP1*) estão relacionados com a mineralização da matriz extracelular e são expressos quando há formação óssea (Callaci et al., 2009). Eles foram sub-expressos no paciente 6, nos pacientes 1 e 4 o *ALPL*, foi moderadamente expresso e no paciente 5 foi super-expresso. O *BGLAP* foi moderadamente expresso no paciente 4 e super-expresso no paciente 5 e o *SPP1* também foi moderadamente expresso no paciente 4.

As citocinas apresentam efeito quimiotático para células inflamatórias, estimulação da síntese da matriz extracelular, angiogênese, recrutamento de células fibrogênicas endógenas para o local da lesão e em fases posteriores da reabsorção óssea, há aumento dos níveis nos dias 1 a 3 após a fratura e durante a remodelação óssea. Apresentam um papel importante no início do processo de reparo tecidual. O *TNF- α* aumenta acentuadamente no fim da fase de consolidação da fratura e a *IL6* é mais expressa na fase inicial em resposta ao estresse, após a osteotomia (Giannoudis, 2006 e Al-Aql et al., 2008). O paciente 3 apresentou maior número de citocinas super-expressas.

As metaloproteinases de matriz degradam cartilagem e tecido ósseo, permitindo a invasão de vasos sanguíneos durante os estágios finais de ossificação e remodelação óssea. Nos pacientes 2 e 3, esse grupo de genes foi mais expresso. Os genes pertencentes ao grupo de sinalização da reabsorção óssea *RANK-RANKL* são fatores-chave na regulação da osteoclastogênese, aumentam após o início da remodelação óssea e durante o período de reabsorção de cartilagem mineralizada (Dimitriou et al., 2005). Gerstenfeld et al., (2003) observou super-expressão desses genes 10 dias após a fratura óssea em modelos experimentais de ratos. Isto ocorreu no final do período em que a cartilagem endocondral mineralizada foi removida e se iniciou a formação óssea primária. O paciente 3 apresentou super-expressão desse grupo de genes.

Foi possível observar nos resultados deste estudo um padrão de expressão mais acentuado entre os pacientes com remodelação óssea inicial (1 a 5) do que no paciente com remodelação óssea tardia (6), evidenciando maior atividade de remodelação óssea (reabsorção e formação) nos pacientes de 1 a 5. Uma atividade mais intensa de remodelação óssea é realmente esperada para este grupo, uma vez que é neste período que se observa clinicamente maior modificação do tecido ósseo (Kingsmill, 1999; Carlsson, 2004; Reich et al., 2011; Kim et al., 2012; Arati, 2013). No entanto, este também é o período em que a reabsorção do rebordo residual mandibular é mais intensa (Jahangiri et al., 1998; Garret, 2004; Mundhe et al. 2011; Giorgio et al., 2012) e não foi possível observar modificação significativa na expressão da maior parte dos genes ligados à reabsorção nos pacientes dos dois grupos. A exceção foi apenas o *TNSF11* (receptor ativador de NF- κ B ligante) que parece ter sido menos expresso no paciente de remodelação óssea tardia comparado ao grupo de remodelação inicial, o que indica um possível papel importante deste gene no processo de reabsorção inicial, a ser comprovado em pesquisas futuras.

Adicionalmente, não ocorreram semelhanças na expressão gênica entre os pacientes do mesmo grupo (1 ao 5), nenhum gene foi igualmente expresso nos 5 pacientes (remodelação óssea inicial). Houve acentuada heterogeneidade entre os indivíduos do grupo de remodelação óssea inicial relacionada à expressão gênica. O tempo da extração dentária dos últimos dentes mandibulares variou entre os indivíduos, isto pode estar relacionado à alta variação entre eles quanto à expressão gênica. No paciente 1 o tempo de extração dos últimos dentes mandibulares foi de cinco semanas, nos pacientes 2 e 3 o tempo foi de quatro semanas e eles apresentaram maior tendência à super-expressão dos genes alvo analisados, no paciente 4 foi de duas semanas, no paciente 5 foi de sete semanas e no paciente 6 foi acima de cinco anos. Apesar de os pacientes 2 e 3 apresentarem uma maior tendência à super-

expressão gênica, os genes com expressão aumentada foram diferentes entre eles, demonstrando mais uma vez a grande variação individual, que foi característica deste grupo. Esta grande variação na expressão gênica, no momento no qual a remodelação óssea é mais intensa, pode explicar a grande variação na magnitude da RRR entre diferentes pacientes que é observada nos pacientes desdentados clinicamente (Kingsmill, 1999; Garret, 2004; Felton, 2009; Divaris, 2012; Reich et al., 2011).

Todos os pacientes com remodelação óssea inicial eram do gênero masculino com idades entre 47 e 62 anos. O uso de PTMS é um fator local que pode estar relacionado com uma maior preservação do rebordo residual. Três dos cinco pacientes deste grupo não utilizavam PTMS inferior e apresentaram PMIs: 0.3, 0.3 e 0.2. Quando comparamos o PMI de outros dois pacientes do mesmo grupo que eram usuários de PTMS inferior e que apresentaram PMIs 0.3 e 0.4., pudemos perceber que entre os pacientes que não utilizam PTMS inferior, os valores de PMI foram ligeiramente mais baixos, indicando uma possível tendência à uma RRR mais intensa, de acordo com Imirzagliolu et al., (2012). No entanto, não há correlações importantes entre os achados clínicos e laboratoriais para esse grupo de pacientes.

Devido ao pequeno número de amostras clínicas avaliadas e por apenas uma dessas amostras pertencerem a um paciente do gênero feminino e coincidentemente ao grupo de remodelação óssea tardia, não pudemos fazer comparações clínicas relevantes, o que deve ser corrigido em estudos futuros.

Tendo em vista a metodologia utilizada no presente trabalho, ocorreu intensa atividade de remodelação óssea nos pacientes com remodelação óssea inicial, os quais apresentavam grande heterogeneidade individual na expressão de genes de formação e reabsorção óssea.

No entanto, este trabalho é o primeiro a utilizar ferramentas de expressão gênica para avaliar a RRR e trouxe algumas novas e importantes perguntas para estudo futuros.

7 CONCLUSÃO

Tendo em vista a metodologia utilizada no presente trabalho, pode-se concluir que ocorreu intensa atividade de remodelação óssea nos pacientes com remodelação óssea inicial, os quais apresentavam grande heterogeneidade individual na expressão de genes de formação e reabsorção óssea.

8 REFERÊNCIAS[†]

Al-Aql ZS, Alagl AS, Graves DT, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Molecular mechanisms controlling bone formation during fracture healing and distraction osteogenesis. *J Dent Res*. 2008;87(2):107-18.

Allori AC, Sillon AM, Warren SM. Biological basis of bone formation, remodeling, and repair — Part I: Biochemical signaling molecules. *Tissue Eng Part B Rev*. 2008;14(3):275-83.

Arati SP. Quantitative estimation of vertical heights of maxillary and mandibular jawbones in elderly dentate and edentulous subjects. *Spec Care Dentist*. 2013;33(2):62-9.

Bahar H, Benayahu D, Yaffe A, Binderman I. Molecular signaling in bone regeneration. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. 2007;17(2):87–101.

Callaci JJ, Himes R, Lauing K, Wezeman FH, Brownson K. Binge alcohol-induced bone damage is accompanied by differential expression of bone remodeling-related genes in rat vertebral bone. *Calcif Tissue Int*. 2009;84(6):474-84.

Campos MS, Rodini CO, Pinto-Júnior DS, Nunes FD. GAPD and tubulin are suitable internal controls for qPCR analysis of oral squamous cell carcinoma cell lines. *Oral Oncol*. 2009;45(2):121-6.

Carlsson GE. Responses of jawbone to pressure. *Gerodontology*. 2004 Jun;21(2):65-70.

Cohen B. John Hunter, pathologist. *J R Soc Med*. 1993;(10) 587-92.

Dechow PC, Wang Q, Peterson J. Edentulation alters material properties of cortical bone in the human craniofacial skeleton: functional implications for craniofacial structure in primate evolution. *Anat Rec (Hoboken)*. 2010;293:618–29.

[†] Baseado em: International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [homepage na Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [disponibilidade em 2008 ago; citado em 25 ago.] Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Devlin H, Ferguson MW. Alveolar ridge resorption and mandibular atrophy. A review of the role of local and systemic factors. *Br Dent J.* 1991;170(3): 101-4.

Dimitriou R, Tisiridis E, Giannoudis PV. Current concepts of molecular aspects of bone healing. *Injury, Int J Care Injured.* 2005;36:1392-404.

Divaris K, Ntounis A, Marinis A, Polyzois G, Polychronopoulou A. Loss of natural dentition: multi-level effects among a geriatric population. *Gerodontology.* 2012;29(2):192-9.

Elsyad MA, Habib AA. Implant-supported versus implant-retained distal extension mandibular partial overdentures and residual ridge resorption: a 5-year retrospective radiographic study in men. *Int J Prosthodont.* 2011; 24(4):306-13.

Felton DA. Edentulism and comorbid factors. *J Prosthodont.* 2009;18(2): 88-96.

Fenner M, Vairaktaris E, Fischer K, Schlegel K A, Neukam FW, Nkenke E. Influence of residual alveolar bone height on osseointegration of implants in the maxilla: a pilot study. *Clin Oral Implants Res.* 2009;20(6):555-9.

Gerstenfeld LC, Cullinane DM, Barnes GL, Graves DT, Einhorn TA. Fracture healing as a post-natal developmental process: molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation. *J Cell Biochem.* 2003; 88(5):873–84.

Giorgio P, Gaia P, William VG, Giulio R. Postextraction alveolar ridge preservation: biological basis and treatments. *Int J Dent.* 2012;2012:151030. doi10.1155/2012/151030.

Gouveia CHA. The Molecular and structural effects of thyroid hormone in the skeleton. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2004;48(1):183-95.

Huumonen S, Haikola B, Oikarinen K, Soderholm A-L, Remes-Ilyly T, Sipila K. Residual ridge resorption, lower denture stability and subjective complaints among edentulous individuals. *J Oral Rehabil.* 2012; 39(5):384-90.

Imirzagliolu P, Yuzugullu B, Gulsahi A. Correlation between residual ridge resorption and radiomorphometric indices. *Gerodontology.* 2012; 29(2):536-42.

Jahangiri L, Devlin H, Ting K, Nishimura I. Current perspectives in residual ridge remodeling and its clinical implications: a review. *J Prosthet Dent*. 1998;80(2):224-37.

Jeffcoat MK. Bone loss in the oral cavity. *J Bone Miner Res*. 1993; 8 Suppl 2:S467-73.

Kim JH, Oh MY, Paek J, Lee J. Association between FGFR1OP2/wit3.0 polymorphisms and residual ridge resorption of mandible in korean population. *PLoS One*. 2012; 7(8):e42734.

Kingsmill VJ. Post-extraction remodeling of the adult mandible. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1999;10(3):384-404.

Kordatzis K, Wright PS, Meijer HJ. Posterior mandibular residual ridge resorption in patients with conventional dentures and implant overdentures. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2003;18(3):447-52.

Mahapatra GK, Nar OP, Joshi SN. Evaluation of radiographic predictors to assess the rate of mandibular residual ridge resorption. *Indian J Dent Res*. 2004;15(1):24-7.

Manoj SS, Chitre V, Aras M. Management of Compromised Ridges: a case report. *J Indian Prosthodont Soc*. 2011;11(2):125–9.

Marchini L, Cunha VPP. Introdução. In: Cunha VPP, Marchini L. *Prótese total implantossuportada*. São Paulo: Santos; 2010. p.1-9.

Marković D, Krstić M. Current knowledge on resorption of the edentulous alveolar ridge. *Med Pregl*. 1999;52(9-10):357-61.

Martin RB. Toward a unifying theory of bone remodeling. *Bone*. 2000; 26(1):1-6.

Maruo Y, Nishigawa G, Irie M, Oka M, Hara T, Suzuki K, et al. Stress distribution prevents ischaemia and bone resorption in residual ridge. *Arch Oral Biol*. 2010;55(11):873-8.

Mercier P, Bellavance F. Effect of artificial tooth material on mandibular residual ridge resorption. *J Can Dent Assoc*. 2002;68(6):346-50.

Nishimura I, Garrett N. Impact of human genome project on treatment of frail and edentulous patients. *Gerodontology*. 2004; 21(1):3-9.

Ozola B, Slaidina A, Laurina L, Soboleva U, Lejnieks A. The influence of bone mineral density and body mass index on resorption of edentulous jaws. *Stomatologija*. 2011;13(1):19-24.

Pietrokovski J. The residual edentulous arches. Foundation for implants and for removable dentures: some clinical considerations: A review of the literature 1954-2012. *Refuat Hapeh Vehashinayim*. 2013;30(1):14-24, 68.

Radke U, Mundhe D. Hollow Maxillary Complete Denture. *J Indian Prosthodont Soc*. 2011; 11(4):246–9.

Reich KM , Huber CD, Lippnig WR, Ulm C, Watzek G, Tangl S. Atrophy of the residual alveolar ridge following tooth loss in an historical population. *Oral Dis*. 2011;(1):17:33–44.

Sato M, Ochi T, Nakase T, Hirota S, Kitamura Y, Nomura S, et al. Mechanical tension-stress induces expression of bone morphogenetic protein (BMP)-2 and BMP-4, but not BMP-6, BMP-7, and GDF-5 mRNA, during distraction osteogenesis. *J Bone Miner Res*. 1999;14:1084-95.

Shoseyov O, Posen Y, Grynspan F. Human collagen produced in plants: more than just another molecule. *Bioengineered*. 2013; (1):9;5.

Suenaga H, Yokoyama M, Yamaguchi K, Sasaki K. Time course of bone metabolism at the residual ridge beneath dentures observed using ¹⁸F-fluoride positron emission computerized-tomography/computed tomography (PET/CT). *Ann Nucl Med*. 2012;26:817–22.

Tsiridis E, Giannoudis PV. Transcriptomics and proteomics: Advancing the understanding of genetic basis of fracture healing. *Injury*. 2006;37 Suppl 1:513-9.

Vieira JGH. Considerations on the biochemical markers of bone metabolism and its practical use. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 1999;43(6): 415-22.

Wolff J. The law of bone remodeling. Berlin: Springer; 1986.

Zmysłowska E, Ledzion S, Jedrzejewski K. Factors affecting mandibular residual ridge resorption in edentulous patients: a preliminary report. *Folia Morphol (Warsz)*. 2007;66(4):346-52.

ANEXO A - Parecer consubstanciado do comitê de ética em pesquisa

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS-UNESP 								
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP								
DADOS DO PROJETO DE PESQUISA Título da Pesquisa: Expressão de genes relacionados à formação e reabsorção óssea na fase inicial e tardia da reabsorção do rebordo residual em mandíbulas humanas Pesquisador: Elis Andrade de Lima Zutin Área Temática: Área 1. Genética Humana. (Trata-se de pesquisa envolvendo genética humana não contemplada acima.); Versão: 2 CAAE: 10657012.0.0000.0077 Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos Patrocinador Principal: Fundação de Amparo a Pesquisa de São Paulo ((FAPESP)) DADOS DO PARECER Número do Parecer: 208.365 Data da Relatoria: 19/02/2013 Apresentação do Projeto: O projeto "Expressão de genes relacionados à formação e reabsorção óssea na fase inicial e tardia da reabsorção do rebordo residual em mandíbulas humanas" apresenta-se adequado Objetivo da Pesquisa: O presente projeto tem como objetivo principal comparar o padrão de expressão dos genes relacionados à formação e à reabsorção óssea no tecido ósseo proveniente de mandíbulas que sofreram a extração dos dentes remanescentes em período inferior a 02 meses e superior a cinco anos. Como objetivo secundário, estas características serão analisadas quanto à suas possíveis associações com outras variáveis clínicas de interesse, como gênero, idade, uso de prótese e dados radiográficos. Avaliação dos Riscos e Benefícios: Não há riscos para o paciente decorrente da participação. O procedimento cirúrgico será realizado para tratamento com colocação de implantes. Os benefícios serão do estudo dos genes envolvidos na neoformação e na reabsorção do rebordo residual em mandíbulas.								
<table style="width: 100%; border: none;"><tr><td style="border: none;">Endereço: Av. Engº Francisco José Longo 777</td><td style="border: none; text-align: right;">CEP: 12.245-000</td></tr><tr><td style="border: none;">Bairro: Jardim São Dimas</td><td style="border: none; text-align: right;">Município: SAO JOSE DOS CAMPOS</td></tr><tr><td style="border: none;">UF: SP</td><td style="border: none; text-align: right;">E-mail: cep@fojoc.unesp.br</td></tr><tr><td style="border: none;">Telefone: (12-)3947-9076</td><td style="border: none; text-align: right;">Fax: (12-)3947-9010</td></tr></table>	Endereço: Av. Engº Francisco José Longo 777	CEP: 12.245-000	Bairro: Jardim São Dimas	Município: SAO JOSE DOS CAMPOS	UF: SP	E-mail: cep@fojoc.unesp.br	Telefone: (12-)3947-9076	Fax: (12-)3947-9010
Endereço: Av. Engº Francisco José Longo 777	CEP: 12.245-000							
Bairro: Jardim São Dimas	Município: SAO JOSE DOS CAMPOS							
UF: SP	E-mail: cep@fojoc.unesp.br							
Telefone: (12-)3947-9076	Fax: (12-)3947-9010							

**FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE SÃO JOSÉ
DOS CAMPOS-UNESP**



Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa está bem fundamentada e pode trazer benefícios no futuro, após análise dos resultados e possível correlação clínica e radiográfica dos achados

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O TCLE foi adequado sendo considerado aprovado

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto está adequado

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O Colegiado de acordo com o parecer do relator aprova o projeto.

SAO JOSE DOS CAMPOS, 28 de Fevereiro de 2013

Assinado por:
JANETE DIAS ALMEIDA
(Coordenador)

Endereço: Av. Eng.º Francisco José Longo 777
 Bairro: Jardim São Dimas CEP: 12.245-000
 UF: SP Município: SAO JOSE DOS CAMPOS
 Telefone: (12-33947-9076 Fax: (12-33947-9010 E-mail: cep@fajc.unesp.br

ANEXO B - Termo de consentimento livre e esclarecido

Pesquisadores Responsáveis: Elis Andrade de Lima Zutin
e Antonio Olavo Cardoso Jorge

O Sr. (a) está sendo convidado (a) como voluntário (a) a participar da pesquisa: “Expressão de genes relacionados à remodelação óssea na fase inicial da reabsorção do rebordo residual em mandíbulas humanas”. Neste estudo pretendemos gerar conhecimento para aprimorar e orientar o tratamento dos pacientes que não tem dentes inferiores e desejam usar próteses para repor esses dentes.

Para este estudo serão avaliadas amostras de osso mandibular de indivíduos que quiseram fazer implantes para conseguir mastigar melhor. Para colocar o implante, o cirurgião–dentista precisa usar materiais próprios para perfurar o osso e quando isso acontece o paciente perde naturalmente algumas raspinhas de osso. Essas raspas de osso serão utilizadas para estudo nessa pesquisa. Dois grupos com seis pessoas cada participarão da pesquisa: um de pacientes que perderam os dentes há pouco tempo e outro de pacientes que perderam os dentes há 5 anos ou mais. O material genético obtido das raspas de osso desses pacientes serão comparados entre os dois grupos para saber quais são os genes envolvidos na reabsorção do osso depois de o indivíduo perder os dentes.

Para participar deste estudo você não terá nenhum custo, nem receberá qualquer vantagem financeira. Você será esclarecido (a) sobre o estudo em qualquer aspecto que desejar e estará livre para

participar ou recusar-se a participar. Poderá retirar seu consentimento ou interromper a participação a qualquer momento. A sua participação é voluntária e a recusa em participar não acarretará qualquer penalidade ou modificação na forma em que é atendido pelo pesquisador

O pesquisador irá tratar a sua identidade com padrões profissionais de sigilo.

Os resultados da pesquisa estarão à sua disposição quando finalizada. Seu nome ou o material que indique sua participação não será liberado sem a sua permissão.

O (A) Sr (a) não será identificado em nenhuma publicação que possa resultar deste estudo.

Este termo de consentimento encontra-se impresso em duas vias, sendo que uma cópia será arquivada pelo pesquisador responsável, no Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos-UNESP, situado à Av. eng. Francisco José Longo, 777, São José dos Campos-SP e a outra será fornecida a você.

Caso haja danos decorrentes dos riscos previstos, o pesquisador assumirá a responsabilidade pelos mesmos.

Eu, _____,
portador do documento de Identidade _____ fui
informado (a) dos objetivos do estudo “Expressão de genes relacionados à formação e reabsorção óssea na fase inicial e tardia da reabsorção do rebordo residual em mandíbulas humanas”, de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar

novas informações e modificar minha decisão de participar se assim o desejar.

Declaro que concordo em participar desse estudo. Recebi uma cópia deste termo de consentimento livre e esclarecido e me foi dada à oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

São José dos Campos, _____ de _____ de 2013.

Nome Assinatura participante Data

Nome Assinatura pesquisador Data

Nome Assinatura testemunha Data

Em caso de dúvidas com respeito aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos-UNESP, situado à Av. eng. Francisco José Longo, 777, São José dos Campos-SP, telefone 3947-9078.

ANEXO C - Formulário clínico

Nome: _____

Idade: _____

Sexo: _____

Usuário (a) de prótese total: () Superior () Inferior () Ambas

Há quanto tempo usa a prótese?

Há quanto tempo foi realizada a extração dentária dos dentes inferiores anteriores?

() Há menos de 02 meses () Há mais de 05 anos

Qualidade de adaptação da prótese mandibular:

() boa () adequada () ruim

Dados radiográficos:

MCW:

PMI:
