

UNIVERSIDADE DE UBERABA
MESTRADO ACADÊMICO EM ODONTOLOGIA
SUELYN DANIELE HENKLEIN

**AVALIAÇÃO DOS FATORES ASSOCIADOS AOS DENTES DECÍDUOS
PERSISTENTES EM CRIANÇAS ALEMÃS**

UBERABA – MG

2023

SUELYN DANIELE HENKLEIN

**AVALIAÇÃO DOS FATORES ASSOCIADOS AOS DENTES DECÍDUOS
PERSISTENTES EM CRIANÇAS ALEMÃS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia – Mestrado Acadêmico da Universidade de Uberaba, como requisito para obtenção do título de Mestre em Odontologia, na área de concentração Clínica Odontológica Integrada.

Orientadoras: Prof. Dra. Maria Angélica Hueb
de Menezes Oliveira

Prof: Erika Calvano Kuchler

UBERABA – MG

2023

Catálogo elaborado pelo Setor de Referência da Biblioteca Central UNIUBE

Henklein, Suelyn Daniele.
H389a Avaliação dos fatores associados aos dentes decíduos persistentes em
crianças alemãs / Suelyn Daniele Henklein. – Uberaba-MG, 2023.
60 f. : il. color.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de Uberaba. Programa de
Pós-Graduação em Odontologia. Área de concentração Clínica
Odontológica Integrada.

Orientadoras: Prof. Dra. Maria Angélica Hueb de Menezes Oliveira,
Prof. Erika Calvano Küchler.

1. Dentes decíduos. 2. Odontopediatria. II. Universidade de Uberaba.
Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de concentração Clínica
Odontológica Integrada. II. Título.

CDD: 617.645

SUELYN DANIELLE HENKLEIN

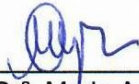
**AVALIAÇÃO DOS FATORES ASSOCIADOS AOS DENTES DEDÍDUOS
PERSISTENTES EM CRIANÇAS ALEMÃS**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia do Programa de Pós-Graduação em Odontologia - Mestrado da Universidade de Uberaba.

Área de concentração: Clínica Odontológica Integrada

Aprovado (a) em: 28/02/2023


BANCA EXAMINADORA:



Prof^a. Dr^a. Maria Angélica Hueb de M. Oliveira
Orientadora
Universidade de Uberaba



Prof^a. Dr^a. Erika Calvano Küchler
Universidade de Uberaba



Prof^a. Dr^a. Daniela Silva Barroso de Oliveira
Universidade Federal de Alfenas

DEDICATÓRIA

O resultado deste trabalho de pesquisa é dedicado ao meu marido Lennon Onofre Garcia Machado pelo apoio incondicional oferecido em todos os momentos, e minha filha tão esperada, Lorena Henklein Machado que, esteve em meu ventre desde o momento em que comecei a escrevê-lo, e neste momento completa seu primeiro ano de vida ao final desta jornada.

AGRADECIMENTOS

À Universidade de Uberaba, pela oportunidade de crescimento intelectual;

À Pró-Reitoria de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão da Universidade de Uberaba, na pessoa do Pró-Reitor Prof. Dr. André Luís Teixeira Fernandes;

À Fundação Alexander von Humboldt pelo apoio técnico e suporte financeiro;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) – Código de Financiamento 001;

À Instituição Universidade de Regensburg, por ter possibilitado aprofundar os estudos por meio da parceria com a Universidade de Uberaba;

À professora Dra. Maria Angélica Hueb de Menezes Oliveira, pela orientação, pelos ensinamentos, preocupação e amizade que conduziram o meu aprendizado;

À professora Dra. Erika Calvano Küchler, pela coorientação, por ter desempenhado tal função com dedicação, paciência e amizade que guiaram o meu aprendizado;

À todos, que de uma forma direta ou indireta participaram deste processo de aprendizado.

RESUMO

O dente decíduo persistente (DDP) é uma condição clínica prevalente que ocorre quando um dente decíduo é retido além do período estabelecido de seu tempo normal de esfoliação, permanecendo na cavidade bucal. Muitos fatores podem estar envolvidos no risco de DDP. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar a prevalência de dentes decíduos persistentes e os fatores locais e genéticos associados a essa condição em crianças alemãs. Crianças Alemãs foram triadas, os exames de imagem (panorâmicas) foram acessados para avaliar o DDP de acordo com o estágio Nolla de seu sucessor permanente. Um dente decíduo foi considerado retido quando seu dente permanente sucessor estava no estágio 8 de Nolla e abaixo da cripta alveolar, estágio 9 de Nolla ou estágio 10 de Nolla. As radiografias panorâmicas foram utilizadas para avaliar os fatores locais associados com DDP e DNA extraído da saliva foi utilizado na avaliação dos fatores genéticos. Foi realizada PCR em tempo real de dois polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) em COX2: rs689466 (-1195G/A) e rs5275 (+665 T/C). O teste do qui-quadrado foi usado com um alfa de 5%. Um total de 100 crianças foram incluídas no estudo. Cinquenta e uma tiveram pelo menos um DDP, enquanto 49 crianças foram classificadas como controle. A maioria dos casos de DDP foi considerada idiopática (n=51, 51%). O número de dentes persistentes na cavidade oral variou de 1 a 8. A distribuição do genótipo foi associada ao DDP no modelo codominante ($p=0,006$) para o SNP rs5275. Indivíduos que carregam dois alelos T (TT) comparados com indivíduos que carregam pelo menos um alelo C (C+TC) tiveram chance quase três vezes maior de apresentar DDP ($p=0,012$; OR = 2,99 / IC95% 1,28 a 6,95 – modelo recessivo). O haplótipo CA para os SNPs rs5275 e rs689466, respectivamente, foi significativamente associado ($p=0,042$). Conclui-se que a prevalência de DDP foi alta na população estudada e a maioria dos casos eram idiopáticos ou estavam associados com causas relacionadas à doença cárie (como lesões de cárie, restaurações e tratamento endodôntico). Os SNPs no gene que codifica COX2 foram associados à DDP idiopática.

Palavras-chave: crianças, dente decíduo, genes

ABSTRACT

Persistent primary tooth (PPT) is a prevalent clinical condition that occurs when a primary tooth is retained beyond the established period of its normal exfoliation time, remaining in the oral cavity. Many factors may be involved in the risk of PPT, therefore, the aim of this study was to assess the prevalence of persistent deciduous teeth and the local and genetic factors associated with this condition in German children. German children were screened, imaging (panoramic) scans were accessed to assess PPT according to the Nolla stage of his permanent successor. A deciduous tooth was considered impacted when its successor permanent tooth was in Nolla stage 8 and below the alveolar crypt, Nolla stage 9 or Nolla stage 10. Panoramic radiographs were used to assess local factors associated with PPT and DNA extracted from saliva was used to assess genetic factors. Real-time PCR of two single nucleotide polymorphisms (SNPs) in *COX2* was performed: rs689466 (-1195G/A) and rs5275 (+665 T/C). The chi-square test was used with an alpha of 5%. A total of 100 children were included in the study. Fifty-one had at least one DDP, while 49 children were classified as controls. Most cases of PPT were considered idiopathic (n= 51, 51%). The number of persistent teeth in the oral cavity ranged from 1 to 8. Genotype distribution was associated with PPT in the codominant model (p=0.006) for SNP rs5275. Individuals who carry two T alleles (TT) compared to individuals who carry at least one C allele (C+TC) were almost three times more likely to have PPT (p=0.012; OR = 2.99 / 95%CI 1.28 to 6.95 – recessive model). The CA haplotype for SNPs rs5275 and rs689466, respectively, was significantly associated (p=0.042). It is concluded that the prevalence of PPT was high in the studied population and most cases were idiopathic or associated with causes related to caries disease (such as caries lesions, restorations and endodontic treatment). SNPs in the gene encoding *COX2* have been associated with idiopathic PPT.

Key-words: children; primary tooth; genes

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Estágios de desenvolvimento de Nolla, 6, 7, 8, 9 e 10 em pré-molares permanentes. A-Estágio 6 (coroa completa); B- Estágio 7 (1/3 raiz completa); C-Estágio 8 (2/3 raiz completa); D- Estágio 9 (raiz completa com ápice aberto) e E-Estágio 10 (raiz completa e forame apical fechado). OBS: A seta indica onde está a cripta alveolar. 18

FIGURA 2: Classificação de DDP de acordo com o grau de rizólise radicular e estágio de desenvolvimento de Nolla 18

FIGURA 3: Distribuição do tipo de dente segundo o grupo de DDP e sem DDP. Foi observada uma diferença estatística para grupo de caninos, seguido dos molares ($p < 0,001$). 23

FIGURA 4: Diagrama de fluxo da amostra 24

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Descrição dos SNPs estudados no gene <i>COX 2</i>	20
TABELA 2 - Característica da população estudada de acordo com os grupos.....	22
TABELA 3 - Distribuição de DDP de acordo com o tipo de dentes e arcada dentária	22
TABELA 4 - Distribuição de DDP de acordo com o tipo de dentes e arcada dentária	23
TABELA 5 - Distribuição dos genótipos e alelos de acordo com o grupo DDP	25
TABELA 6 - Análise de associação de haplótipos entre grupo controle e DDP	25

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍGLAS E SÍMBOLOS

COX-2 ciclooxigenase-2

c-MYB fator de transcrição nuclear

DDP dente decíduo persistente

DNA ácido desoxirribonucléico

et al. E colaboradores

IC intervalos de confiança

mRNA (RNA mensageiro) ácido ribonucleico de fita simples

OR odds ratio

OPG osteoprotegerina

PTGS2 prostaglandina-endoperóxido sintase 2

PTH hormônio da paratireoide

RNA Ácido Ribonucleico

RANK receptor ativador do fator nuclear Kappa-Beta

RANKL RANK ligante

SPN polimorfismo de nucleotídeo simples

URT regiões não traduzidas de uma molécula de mRNA

% Percentual

n frequência absoluta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS	16
2.1 Objetivo geral	16
2.2 Objetivos específicos	16
3. MATERIAIS E MÉTODOS	17
3.1. Amostra para levantamento dos pacientes	17
3.2. Avaliação radiográfica e caracterização do DDP	17
3.3 Avaliação dos fatores associados	19
3.4 Extração de DNA genômico e análise de discriminação alélica de <i>COX2</i>	19
3.5 Análise estatística	20
4 RESULTADOS	21
5 DISCUSSÃO	26
6 CONCLUSÃO	30
REFERÊNCIAS	31
ANEXOS	

1 INTRODUÇÃO

A erupção dentária é definida como um movimento axial/oclusal do dente desde sua posição de desenvolvimento nos maxilares até sua posição funcional no plano oclusal (BHASKAR, 1991). É um processo fisiológico contínuo que consiste em movimento pré-eruptivo, erupção intraóssea, penetração na mucosa, erupção pré-oclusal e pós-oclusal (YU *et al.*, 2021). Os processos coordenados de formação e reabsorção óssea ocorrem durante a erupção dentária através da estimulação de osteoblastos e osteoclastos, respectivamente (MARKS *et al.*, 1995., WISE *et al.*, 2002; BRODETSKA *et al.*, 2020). A cronologia e a sequência de erupção dos dentes podem ser influenciadas por diversos fatores, sejam locais, sistêmicos ou genéticos.

As células da linhagem monócito-macrófago (precursoras de osteoclastos) devem ser recrutadas para que o processo de erupção ocorra adequadamente para o folículo dentário durante a fase pré-eruptiva. O processo de sua fusão ocorre para formar osteoclastos multinucleares ativos que serão responsáveis pela formação de uma via eruptiva no osso alveolar (BRODETSKA *et al.*, 2020). A força de erupção é exercida na base do dente em erupção, movendo-o ao longo do canal de erupção. A formação óssea na base do dente, a regulação do folículo dentário do dente permanente e a interação com a membrana periodontal são essenciais no processo de erupção dental. É um processo fisiológico que promove o estabelecimento adequado da oclusão, a qual é fundamental para o contorno facial, função e estética (YU *et al.*, 2021).

Todo o processo de reabsorção dos tecidos duros para a erupção dos dentes permanentes resulta da ação de fatores regulatórios locais e sistêmicos. Os eventos relacionados ao processo de reabsorção dentária fisiológica em dentes decíduos iniciam-se da apoptose (morte celular programada) dos cementoblastos e odontoblastos, que revestem a porção externa e interna das raízes dentárias, respectivamente, expondo a superfície radicular mineralizada; na sequência instalam-se unidades osteorremodeladoras, formadas por células clásticas (LOURENÇO & CONSOLARO, 1997). Os principais fatores responsáveis pelo processo da rizólise, ocorrem pela apoptose em células isoladas, promovendo alterações nucleares como condensação da cromatina, fragmentação do DNA seguido pelo rompimento do núcleo. No citoplasma, as organelas mostram-se mais densas e intactas. Em concomitância, a célula perde líquidos, encolhe-se e rompe o contato com as células contíguas. Os corpos apoptóticos são resultados da contração da célula e posterior invaginação da membrana, imediatamente reconhecidos e

fagocitados pelos macrófagos. Subsequente, ocorre a instalação de odontoclastos sobre a superfície radicular descoberta, os quais liberam enzimas que dissolvem a matriz mineral. Desta forma, o mecanismo da morte celular programada funciona como o gatilho biológico da rizólise (CONSOLARO, 2002).

A reabsorção radicular tem uma regulação semelhante à reabsorção óssea e ambos os processos compartilham os mesmos mecanismos moleculares. A principal diferença biológica entre raiz e osso é o que o osso sofre constante renovação fisiológica, enquanto nos dentes a única reabsorção fisiológica é a que ocorre nos dentes decíduos (HASEGAWA *et al.*, 2002; LINSUWANONT *et al.*, 2002). O mecanismo de reabsorção radicular é semelhante à reabsorção óssea (HASEGAWA *et al.*, 2002; LOW *et al.*, 2005). Além disso, odontoclastos, cementoclastos e osteoclastos compartilham características semelhantes, um perfil de expressão gênica semelhante e atividade de reabsorção tecidual mineralizada (HASEGAWA *et al.*, 2002).

O Dente Decíduo Persistente (DDP) é uma condição clínica prevalente em crianças e adolescentes que ocorre quando um dente decíduo é retido além do seu período normal de esfoliação, permanecendo na cavidade bucal da criança e levando a um atraso na erupção do seu sucessor permanente (BADAUY, 2001; AKTAN *et al.*, 2011; XAVIER, 2016). Pode causar más oclusões, periodontite, anquilose e insatisfação do paciente (XAVIER *et al.*, 2021).

O DDP impacta o ciclo eruptivo dos dentes sucessores permanentes e, quando não diagnosticado e tratado adequadamente, pode causar distúrbios infecciosos, mecânicos e neoplásicos (CAPPELLETTE *et al.*, 2008; FIGUEIRA 2018). A etiologia da DDP ainda não está totalmente elucidada, quando na ausência de antecedentes traumáticos ou fatores locais associados, torna-se mais complexo determinar sua causa, podendo estar associado a fatores sistêmicos. Dentre os fatores sistêmicos que podem influenciar no processo de esfoliação dos dentes decíduos destacam-se os, baixo peso ao nascer, Síndrome de Down, deficiências hormonais e nutricionais, displasia ectoderma, hipofostasia e disostose cleidocraniana. Já os fatores locais que podem influenciar diretamente na retenção prolongada de dentes decíduos destacam-se a anquilose dentária, presença de dentes supranumerários, odontomas, dilaceração, falta de espaço, lesões de cárie dentária, erupção ectópica do dente permanente, fibrose gengival, hematoma de erupção e perda dental precoce (FIGUEIRA, 2018).

Outro fator importante que pode determinar a etiologia da DDP são genes codificadores. Sabe-se que, o processo de remodelação óssea e reabsorção radicular primária ocorrem também

por meio do envolvimento desses genes que podem levar a retenção prolongada dos dentes decíduos (SCHELLACK, 2006). A retenção prolongada dos dentes decíduos tem relação com o processo de remodelação óssea e de reabsorção radicular primária podendo ser justificados pelo envolvimento de genes codificadores incluindo a ciclooxigenase-2 (COX-2), também conhecida como prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (PTGS2), responsável pelos fenômenos da inflamação e produção das prostaglandinas, responsáveis pela proteção estomacal no corpo humano (SCHELLACK, 2006). Difere-se da COX-1, a qual encontramos em todo organismo, a COX2 só é apresentada em áreas de inflamação e no endotélio (XIE, 1991). Este gene desempenha um papel fundamental no processo de reabsorção óssea alveolar (TAZAWA *et al.*, 1994).

O gene *COX2* está localizado no cromossomo 1q25.2-q25.3, o qual contém 10 éxons e codifica uma proteína de 604 aminoácidos (TAZAWA *et al.*, 1994). Há um tipo de variante genética bastante comum em humanos que envolve alterações em um único par de bases no genoma chamados de polimorfismos de nucleotídeos único (SNPs). Essas variantes podem esclarecer diferenças na predisposição individual a apresentar características complexas, como os dentes decíduos persistentes (TEAMA, 2018).

Além dos fatores genéticos, também foi observado que a erupção pode variar entre os gêneros, etnia, alterações sistêmicas, aspectos socioeconômicos, estado nutricional e prematuridade (DUARTE *et al.*, 2011). O estado nutricional influencia diretamente na erupção dentária, visto que a desnutrição crônica que se estende além da primeira infância está associada ao atraso na erupção dental. Em contrapartida, a obesidade está associada à maturidade precoce das crianças e à erupção dentária acelerada. A condição socioeconômica tem sido relacionada a variações no tempo e padrão da erupção dentária na dentição decídua em algumas populações. Crianças que apresentam um nível socioeconômico elevado demonstraram ter uma erupção dentária acelerada em comparação com crianças de nível socioeconômico baixo (KUTESA *et al.*, 2019).

O diagnóstico da DDP é realizado através da anamnese, exame clínico e radiográfico. Estes exames permitem o conhecimento do posicionamento, localização e associação dos dentes às estruturas ósseas e aos dentes adjacentes. As radiografias oclusais auxiliam na determinação vestibulo-lingual do dente, as periapicais permitem observar a presença e a extensão do folículo dentário além de evidenciar a integridade da raiz e da coroa do dente. Já as radiografias panorâmicas determinam a posição do dente em dois planos, além de permitir

observar a altura e a relação dos dentes com o plano sagital. As telerradiografias são capazes de determinar a posição do dente, de maneira a relacioná-lo com as estruturas adjacentes, como o assoalho da cavidade nasal e o seio maxilar (FIGUEIRA, 2018).

Embora a DDP seja uma condição comum na prática clínica, especialmente na prática ortodôntica e odontológica pediátrica, poucos estudos em diferentes populações foram realizados até agora explorando a prevalência e os fatores associados a essa condição (BJERKLIN & BENNETT, 2000; ITH-HANSEN & KJAER, 2000; HASELDEN *et al.*, 2001; SLETTEN *et al.*, 2003; BJERKLIN *et al.*, 2008; KJAER *et al.*, 2008; ROBINSON & CHAN, 2009; AKTAN *et al.*, 2011; XAVIER, 2016; ARID *et al.*, 2017). O diagnóstico e a intervenção precoces são relevantes para evitar ou diminuir danos à oclusão, entretanto, estabelecer a etiologia para o diagnóstico da DDP podem contribuir para a correta função e equilíbrio do sistema estomatognático, visto que elas podem estar associadas à fatores locais, sistêmicos e/ou genéticos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a prevalência de dentes decíduos persistentes e os fatores associados a essa condição em crianças alemãs submetidas a tratamento ortodôntico.

2.2 Objetivos Específicos

- Verificar através de radiografias panorâmicas a presença e frequência de dentes decíduos persistentes;
- Verificar os fatores locais associados a DDP;
- Avaliar se os se SNPs no gene *COX2* estão associados a DDP não associados a fatores locais.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostra para levantamento dos pacientes

Após aprovação pelo Comitê de Ética do Hospital Universitário Regensburg, Alemanha (ID 19-1549-101), todos os participantes e/ou responsáveis legais deram seu consentimento informado por escrito para participar do estudo. As recomendações do STROBE foram seguidas para o relatório de pesquisa.

Foram triadas 108 radiografias panorâmicas de pacientes, de ambos os sexos, com idade entre 8 e 17 anos em tratamento odontológico do Hospital Univesitário de Regensburg e de dois consultórios odontológicos privados para a realização deste estudo transversal retrospectivo. Para determinar a legibilidade deste estudo foram selecionados pacientes no período de 2009 a 2021. Foram avaliados pacientes alemães, de ascendência centro-europeia que dispunham de radiografias panorâmicas durante o tratamento ortodôntico. Pacientes com agenesia dentária (excluindo agenesia de terceiro molar), trauma facial, lábio leporino e/ou fenda palatina, síndromes subjacentes e/ou doenças sistêmicas foram excluídos do estudo. Apenas uma criança por família foi incluída para evitar viés.

3.2 Avaliação radiográfica e caracterização do DDP

As radiografias panorâmicas foram avaliadas por um único examinador. Previamente, foi realizada uma calibração, na qual foram avaliadas 10 radiografias panorâmicas duas vezes com um intervalo de duas semanas. A calibração intraexaminador foi avaliada pelo Teste de Kappa. O valor de Kappa foi de 0,98 para o estágio de Nolla e 0,82 para reabsorção radicular dos dentes decíduos.

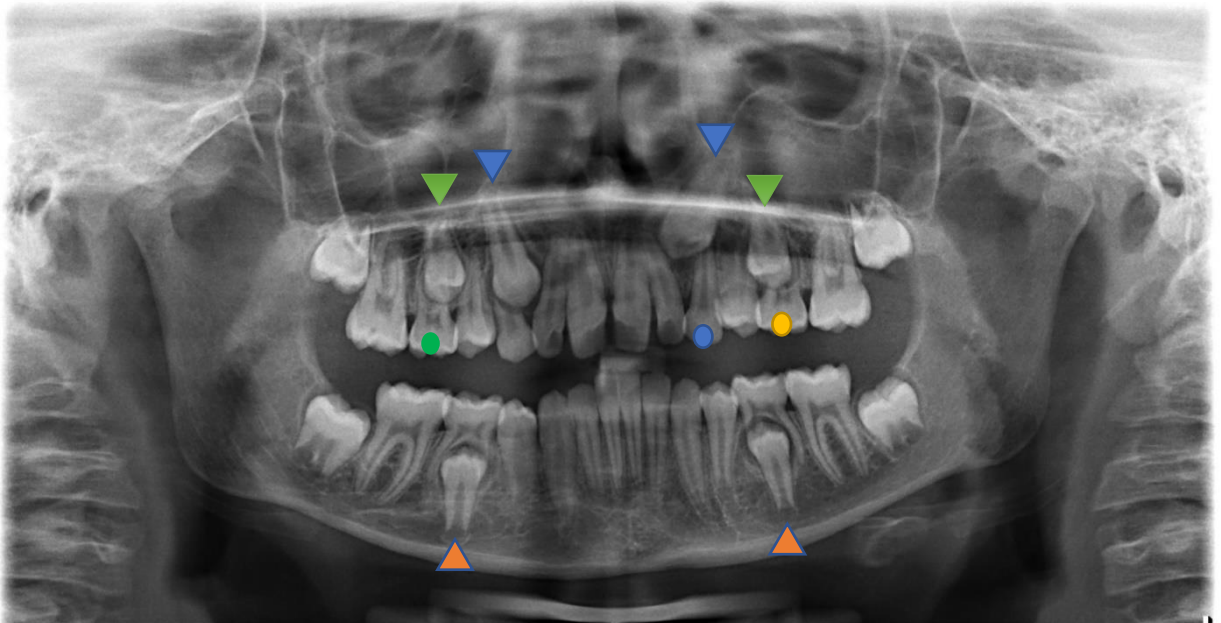
O desenvolvimento dentário dos sucessores permanentes de cada dente decíduo ainda presente na cavidade b foi avaliado de acordo com os estágios de Nolla. Em síntese, a técnica introduzida por Nolla atribui a cada dente um certo estágio de 0 (ausência de cripta) a 10 (raiz completamente formada e ápice fechado) (NOLLA, 1960). Exemplos dos estágios 6, 7, 8, 9 e 10 de Nolla podem ser observados na Figura 1. O estágio 8 de Nolla é caracterizado pela formação de dois terços completos da raiz do dente (NOLLA, 1960; ZIRCK *et al.*, 2021), sendo que neste estágio o dente permanente deve atingir a cripta alveolar e emergir na cavidade oral (PINTO, 2016). Sendo assim, o dente decíduo foi considerado persistente quando seu dente

permanente sucessor se encontrava nos estágios 8, 9 ou 10 de Nolla e abaixo da cripta óssea alveolar.



FIGURA 1: Estágios de desenvolvimento de Nolla, 6, 7, 8, 9 e 10 em pré-molares permanentes. A- Estágio 6 (coroa completa); B- Estágio 7 (1/3 raiz completa); C- Estágio 8 (2/3 raiz completa); D- Estágio 9 (raiz completa com ápice aberto) e E- Estágio 10 (raiz completa e forame apical fechado). OBS: A seta indica onde está a cripta alveolar.

A raiz de cada dente decíduo que foi classificada como DDP também foi avaliada de acordo com o grau de rizólise radicular (Figura 2).



LEGENDA: ● Reabsorção no terço apical; ● Reabsorção no terço médio; ● Reabsorção no terço apical; ▲ Estágio 7 de Nolla; ▲ Estágio 8 de Nolla; ▲ Estágio 9 de Nolla.

FIGURA 2: Classificação de DDP de acordo com o grau de rizólise radicular e estágio de desenvolvimento de Nolla.

3.3 Avaliação de fatores associados

As radiografias panorâmicas também foram utilizadas para avaliar os seguintes fatores:

- Erupção dentária ectópica, como translação ou transmigração dos dentes permanentes sucessores;
- Existência de patologia, como cistos, tumores e odontoma sob dente decíduo que resulta na impacção dos dentes sucessores;
- Presença de dentes supranumerários;
- Dente anquilosado/infraoclusão;
- Lesão de Cárie não tratada com e sem envolvimento pulpar;
- Presença de restaurações;
- Tratamento endodôntico (pulpotomia ou pulpectomia).

3.4 Extração de DNA genômico e análise dos SNPs em *COX2*

Para a realização da extração de DNA foi coletada uma amostra de células bucais de cada criança com o auxílio de um *cytobrush* descartável estéril, o qual foi passado 2-3 vezes na mucosa interna da bochecha (esquerda e direita) e contra a base da língua. Em seguida, as amostras foram armazenadas a -20°C até o momento de extração do DNA. A extração do DNA genômico seguiu um protocolo estabelecido (KÜCHLER, 2019). A solução de extração resumida (Tris-HCL 10mm, Ph 7,8; EDTA 5mm; SDS 0,5%) contendo proteinase K (100 ng/mL) foi adicionada com o objetivo de causar a lise das células e proteínas da amostra de saliva. As proteínas não digeridas foram removidas utilizando acetato de amônio e o DNA foi precipitado com isopropanol. Posteriormente o DNA foi ressuspense em tampão TE (10 mm Tris (pH 7,8) e 1 mm EDTA), e armazenado a -20°C para futuras análises. A concentração do DNA (estimada pela medição da absorbância em 260 nm) e pureza (estimada pela medição da razão de absorbância em 260 nm e 280 nm) foram avaliadas por espectrofotometria usando NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, DE).

As características dos SNPs selecionados são apresentadas na Tabela 1. As reações em cadeia de polimerase (PCR) em tempo real foram realizadas em um volume total de 3 mL, como segue: 4 ng de DNA/reação em 1,5 mL de água estéril; 1,5 mL TaqMan® PCR Master Mix e 0,075 ensaios de genotipagem TaqMan®SNP personalizados específicos para cada SNP

estudado. Um controle negativo sem DNA foi utilizado. Além disso, a ciclagem térmica foi realizada iniciando com um ciclo de manutenção de 95° por 10 minutos, seguido por 45 ciclos de amplificação de 92° por 15 segundos e 60° por 1 minuto. O examinador do laboratório de biologia molecular desconhecia o grupo das amostras durante a análise de genotipagem. Os pacientes cujas amostras de DNA falharam na reação de genotipagem duas vezes, foram excluídos da análise posterior.

TABELA 1 - Descrição dos SNPs estudados no gene COX 2.

SNP	Tipo	Função	Frequência Global do alelo menor	Hardy-Weinberg χ^2
rs689466	-1195G/A	Variante a montante	0,227	1,36
rs5275	+665 T/C	3' região UTR	0,400	2,07

3.5 Análise estatística

Para realizar a análise dos dados foi utilizado o GraphPad Prism 5.0 (Graph-Pad, San Diego, CA, EUA). O teste do qui-quadrado foi realizado para comparar o DDP entre os sexos e tais dados foram apresentados como frequência absoluta (n) e relativas (%). O odds ratio (OR) e intervalos de confiança de 95% (IC 95%) foi utilizado para calcular a chance relativa entre os grupos. A idade de cada paciente foi calculada, tendo como referência a data de nascimento e a data da realização do exame radiográfico. O teste T foi utilizado para comparar a idade entre os sexos e tais dados foram apresentados como média e desvio padrão (DP).

Para a análise estatística genética, inicialmente, o Equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) foi avaliado para cada SNP pelo teste Qui - quadrado (wpcalc.com/en/equilibrium-hardy-weinberg). O teste qui-quadrado também foi utilizado para comparar as distribuições de alelos e genótipos (no modelo codominante e no modelo recessivo) entre os grupos controle e DDP usando o software Epi Info 7.2. A análise de haplótipos também foi realizada. OR) e IC95% foram calculados. O teste T foi utilizado para a comparação das médias e desvios padrão (DP) entre os grupos.

O nível de significância foi estabelecido como $p < 0,05$ (alfa de 5%) para todas as comparações.

4 RESULTADOS

Para melhor compreensão dos resultados, estes serão apresentados por tópicos, de acordo com os artigos publicados 1 e 2.

1) Fatores locais associados com DDP

Nesta etapa do estudo foram incluídos 102 participantes incluídos no estudo, 48 (47,0%) eram meninas e 54 (53,0%) eram meninos. A idade dos pacientes variou de 8 a 17 anos.

2) Avaliação da associação entre *COX2* e DDP

Nesta etapa do estudo foram incluídos 100 participantes incluídos no estudo, 47 (47,0%) eram meninas e 53 (53,0%) eram meninos. A idade dos pacientes variou de 8 a 14 anos. Nesta etapa do estudo foram excluídos 02 participantes com idade superior a 14 anos.

Diante das radiografias panorâmicas dos participantes, foram avaliados um total de 574 dentes decíduos e seus sucessores permanentes. O número médio de dentes decíduos na cavidade oral foi de 5,6 (com desvio padrão de 4,3), o qual variou de 0 a 14 dentes. Nenhuma das crianças apresentou dentição decídua, 80 (77,6%) apresentaram dentição mista e 22 (22,4%) apresentavam dentição permanente.

Dos 574 dentes analisados, 192 foram classificados como dente decíduo persistente. Sessenta e um (59,8%) crianças apresentaram um ou mais DDP. Em 15 (14,7%) o DDP foi associado ao baixo índice de reabsorção radicular (máximo de um terço de rizólise da raiz).

As características da amostra estudada podem ser observadas na Tabela 2, e a distribuição do tipo de dente e arcada dentária de acordo com os grupos de DDP e controle (ausência de DDP) é apresentada na Tabela 3. Foi possível observar neste estudo a maior incidência de DDP nos dentes molares e caninos na distribuição do tipo de dente segundo o grupo de DDP e sem DDP, representa pela Figura 3. A idade não foi associada a presença de DDP. O gênero não foi estatisticamente diferente entre os grupos ($p=0,838$; Odds Ratio =0,95, intervalo de confiança de 95% = 0,44 a 2,16).

As patologias e anomalias mais observadas no dente decíduo persistente foram restaurações dentárias (19,3%), seguidas de lesões de cárie dentária (4,6%) e erupção ectópica

(2,1%). Observou-se que 68,7% dos dentes decíduos persistentes não apresentavam uma possível causa que pudesse justificar a retenção prolongada desses dentes decíduos e foram classificados como idiopáticos. Tais resultados podem ser observados na Tabela 4.

TABELA 2 - Característica da população estudada de acordo com os grupos.

Variável	Total	DDP	Controle	p-value*
Sexo n (%)				
Meninos	54 (53,0%)	32 (52,45)	22 (53,7%)	0,905
Meninas	48 (47,0%)	29 (47,5%)	19 (43,3%)	
Idade média e desvio padrão (DP) em meses				
Meses	132,8	132,8	132,9	0,983
DP	20,6	21,3	19,7	

*comparações realizadas entre DDP e controle.

TABELA 3 - Distribuição de DDP de acordo com o tipo de dentes e arcada dentária

Variável	Total	DDP
Número total de dentes decíduos	574 (100%)	192 (34,4%)
Arco dentário afetado		
Maxila	316 (51,1%)	115 (36,4%)
Mandíbula	258 (44,9%)	77 (29,8%)
Grupo de dentes afetados		
Incisivos	1 (0,2%)	0 (0,0%)
Caninos	167 (29,1%)	92 (55,1%)
Molares	406 (70,7%)	100 (24,6%)

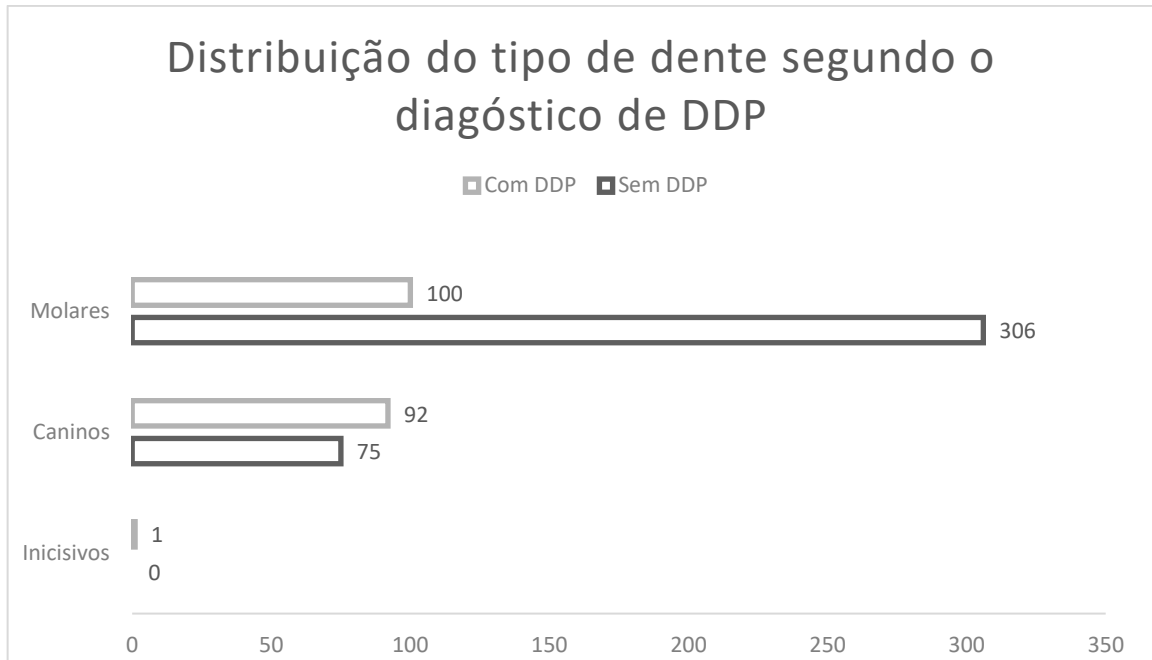


FIGURA 3: Distribuição do tipo de dente segundo o grupo de DDP e sem DDP. Foi observada uma diferença estatística para grupo de caninos, seguido dos molares ($p < 0,001$).

TABELA 4 - Distribuição das variáveis no grupo DDP e na amostra total de dentes.

Variável	DDP (192)	Amostra total (574)
Lesão de cárie não tratada	9 (4,6%)	15 (2,6%)
Restauração dentária	37 (19,3%)	66 (11,5%)
Tratamento endodôntico	2 (1,0%)	2 (0,3%)
Erupção ectópica	4 (2,1%)	4 (0,7%)
*Outros	8 (4,2%)	8 (0,7%)
DDP Idiopático	138 (68,7%)	-

* Duas lesões cariosas não tratadas afetaram a polpa dentária. Tratamento endodôntico significa 1 pulpotomia e 1 pulpectomia. *Outros significa 2 dentes em infra-oclusão, 1 cisto, 3 alterações no ligamento periodontal, 1 transposição e 1 anquilose dentária.

Cinquenta e uma crianças tiveram ao menos um dente decíduo persistente por fatores idiopáticos e foram alocadas no grupo de DDP. Quarenta e nove crianças apresentaram DDP por fatores locais ou não apresentaram DDP e foram classificadas como controle para avaliação do gene *COX2* (Figura 4).

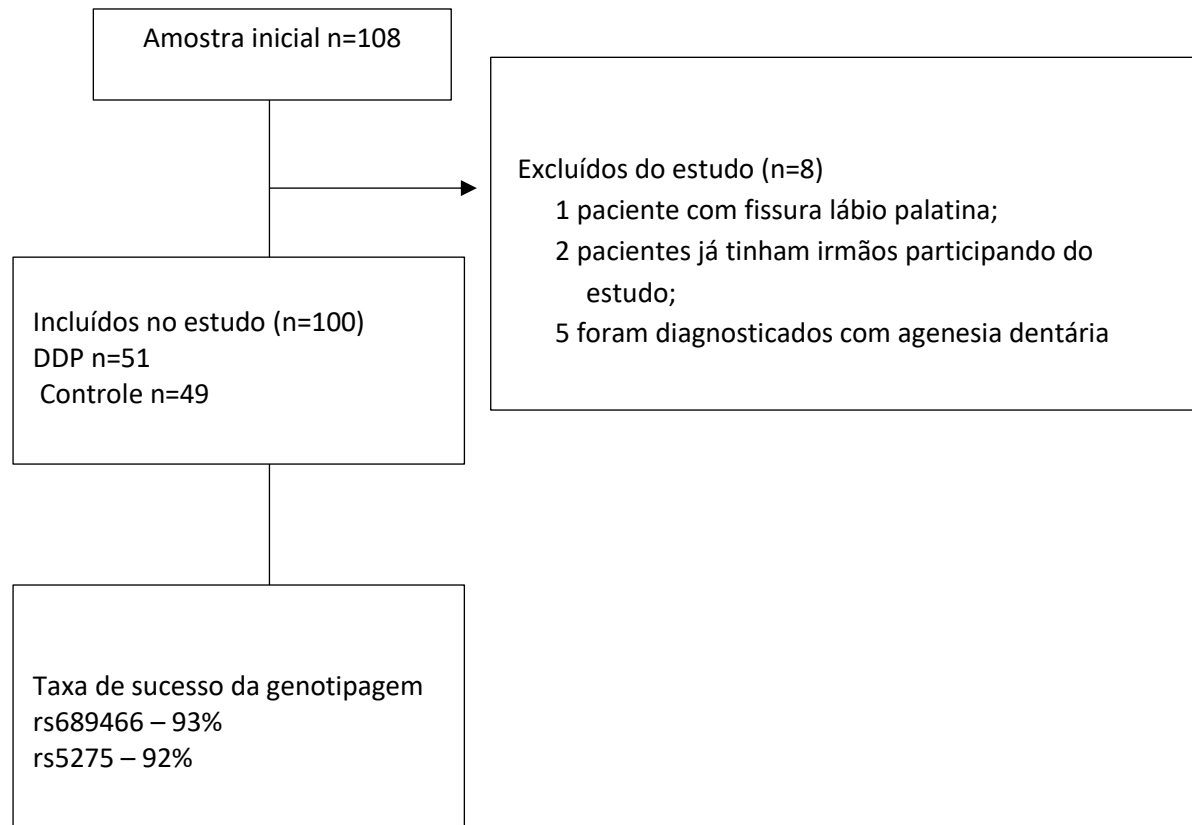


FIGURA 4: Diagrama de fluxo da amostra.

No grupo de DDP, o número de dentes persistentes na cavidade bucal variou de 1 a 8. A média foi de 1,56 (DP=2,01). Ambos os SNPs estudados foram consistentes com o Equilíbrio de Hardy-Weinberg: HWE qui-quadrado = 2,07 para o rs5275 e HWE qui-quadrado = 0,666 para rs689466.

As distribuições de genótipos e alelos de acordo com o grupo de DDP e grupo controle são apresentados na tabela 5. A distribuição do genótipo foi associada ao dente decíduo persistente no modelo codominante comparando TC versus TT ($p=0,666$; OR =0,28; IC 95% = 0,11-0,71) para o SNP rs5275. Os indivíduos que carregam dois alelos T (TT) em comparação com os indivíduos que carregam pelo menos um alelo C (C + TC) tiveram quase três vezes mais chances de apresentar DDP ($p= 0,012$; OR=2,99; IC 95% =1,28 a 6,95 – modelo recessivo) também para o SNP rs 5275. Para o SNP rs689466 não foi observada diferença de significância estatística em nenhum dos modelos.

TABELA 5 - Distribuição dos genótipos e alelos de acordo com o grupo DDP e controle.

SNP	Genótipo	Controle n (%)	DDP n (%)	P - valor	OR (CI 95%)
rs689466 (-1195 G/A)	AA	26 (57,8)	26 (54,1)		Referência
	GA	17 (37,8)	20 (41,7)	0,706	1,17 (0,51-2,76)
	GG	2 (4,4)	2 (4,2)	>0,999	1,00 (0,14-6,75)
	A	69 (76,6)	72 (75,0)		Referência
	G	21 (23,3)	24 (25,0)	0,790	1,09 (0,57-2,13)
rs5275 (+665 T/C)	TT	12 (26,7)	25 (52,1)		Referência
	TC	30 (66,7)	18 (37,5)	0,006	0,28 (0,11-0,71)
	CC	3 (6,6)	5 (10,4)	0,782	1,25 (0,29-6,31)
	T	54 (60,0)	68 (70,8)		Referência
	C	36 (40,0)	28 (29,2)	0,098	0,67 (0,36-1,23)

*OR significa odds ratio; CI significa intervalo de confiança. A forma em negrito indica uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Os haplótipos dos dois SNPs foram analisados e estão apresentados na Tabela 6. O haplótipo C-A para os SNPs rs5275 e rs689466, respectivamente, foi mais frequente no grupo controle e foi significativamente associado ao dente decíduo persistente ($p=0,042$).

TABELA 6 - Análise de associação de haplótipos entre grupo controle e DDP.

Haplótipo	Frequência		P - valor
	Controle	DDP	
rs5275 - rs689466			
T - G	0,387	0,392	0,836
T - A	0,816	0,784	0,885
C - A	0,653	0,450	0,042
CG	0,245	0,156	0,271

* A forma em negrito indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

5 DISCUSSÃO

Nos últimos anos, alguns estudos investigaram diferentes condições associadas aos distúrbios de erupção dentária, porém nenhum estudo presente discutiu avaliar a prevalência de DDP e condição local associada em crianças alemãs que já passaram por tratamento ortodôntico. Observamos que a prevalência de crianças com DDP foi alta, em que 61% apresentaram pelo menos um DDP. É importante ressaltar que este estudo foi realizado em crianças que já foram atendidas em tratamento ortodôntico e tiveram acompanhamento adequado e pediátrico. Comumente estas crianças chegam à clínica de ortodontia através da percepção de alguma alteração na cavidade bucal dos seus cuidadores, e essa prevalência pode ser menor na população em geral.

A diminuição do metabolismo do organismo gera um retardo no crescimento podendo ocasionar a retenção prolongada de dentes decíduos e, por conseguinte, um atraso na erupção do dente sucessor permanente (AKTAN *et al.*, 2012). Os fatores sistêmicos associados aos dentes decíduos persistentes incluem deficiências hormonais, displasia ectodérmica, disostose cleidocraniana, baixo peso ao nascer, síndrome de Down e deficiências nutricionais (RAMOS *et al.*, 2006; FIGUEIRA, 2018). Esses são fatores que podem influenciar no processo de rizólise radicular dos dentes decíduos e um retardo na erupção dos dentes permanentes sucessores (FIGUEIRA, 2018). Assim, no presente estudo foram excluídos pacientes com comprometimentos sistêmicos a fim de avaliar apenas a condição local sem fatores confundidores.

Os fatores locais incluem dentes supranumerários, anquilose (FIGUEIRA, 2018), odontoma (MARRA *et al.*, 2021), perda dentária precoce, falta de espaço, erupção ectópica permanente, hematoma de erupção, fibrose gengival, cárie dentária e agenesia dentária (AKTAN *et al.*, 2011). Em seu estudo, Aktan *et al.* (2011) observaram que a causa mais comum para o dente decíduo persistente foi a ausência dos dentes sucessores permanentes. Corroborando com a pesquisa realizada por Bjerklin & Bennett, (2000), Ith-Hansen & Kjaer (2000), Haselden *et al.* (2001) e Bjerklin *et al.* (2008). Utilizamos o estágio de Nolla dos dentes permanentes sucessores como método para diagnóstico de DDP, portanto casos com agenesia foram excluídos deste estudo.

Em seu estudo, Badauy (2001) averiguou a prevalência de retenção prolongada de dentes decíduos em uma amostra de 10.220 pacientes. De acordo com este estudo a prevalência

segundo molar decíduo inferior e o canino superior corresponderam a 61,1% dos casos. A prevalência do segundo molar decíduo também foi observada por Otsuka *et al.* (2001), Aktan *et al.* (2011), Ith-Hansen & Kjaer (2000), Hvaring & Birkeland (2019) e Hvaring *et al.* (2014). No presente estudo, os dentes que apresentaram a maior incidência de retenção prolongada foram os molares e os caninos.

O método dos estágios de Nolla também é utilizado para medir a maturidade, visto que representa uma série de mudanças reconhecíveis que ocorrem na mesma sequência de um evento inicial a um ponto final constante e também para investigar a idade cronológica (TOMÁS *et al.*, 2014; MELO & ATA-ALI, 2017; YILMAZ *et al.*, 2018). O sistema de estágios de desenvolvimento estabelecidos por Nolla na década de 60 é bem reconhecido na literatura odontológica. Em tal método existem 10 estágios de desenvolvimento do dente. Neste estudo, os dentes pertencentes aos estágios 8, 9 ou 10 foram classificados como dentes decíduos persistentes, uma vez que nestes estágios de desenvolvimento os dentes permanentes sucessores já deveriam estar emergidos na cavidade bucal e, por conseguinte, os dentes decíduos correspondentes já deveriam apresentar rizólise completa da raiz (NOLLA, 1960; ZIRCK *et al.*, 2021).

A perda precoce dos dentes decíduos pode acelerar ou retardar a erupção de seu sucessor permanente dependendo do estágio de Nolla em que se encontra. Segundo estes autores, quando a perda do dente decíduo ocorra antes que o seu sucessor permanente se encontre no estágio 6 de Nolla, haverá um atraso na erupção deste dente, devido a presença de osso que recobre a região coronal do dente em erupção, dificultando desta forma seu irrompimento (KORYTNICKI, 1994). Ainda, segundo Lima *et al.* (2008) a velocidade de erupção dos dentes permanentes é maior no estágio 8 do que nos estágios 6 e 7 de Nolla. Pinto (2016) ressalta que os estágios mais significantes são o 2, 6 e 8 de Nolla. O estágio 2 informa o início da calcificação de um dente, ao passo que, o estágio 6 indica que ocorreu a calcificação completa da coroa de um dente e é nessa fase que se inicia o movimento eruptivo intra-ósseo. Contudo, somente no estágio 8 de Nolla que o dente consegue atingir a cripta alveolar e emergir na cavidade bucal.

Os fatores patológicos mais comuns associados aos dentes decíduos persistentes foram associados à cárie dentária não tratada, restaurações dentárias e tratamento endodôntico conservador e radical. Contudo, ressalta-se que a maioria dos casos analisados no presente estudo não apresentaram nenhuma causa conhecida, seja ela local ou sistêmica. É provável que os mesmos fatores moleculares estejam envolvidos nesses casos. Estudos anteriores observaram

que fatores genéticos estão envolvidos no atraso da erupção dos dentes permanentes (ARID *et al.*, 2017; EVANGELISTA *et al.*, 2019).

A erupção dentária incompleta é um distúrbio incomum, e pode ser justificado pela etiologia genética, por mais que haja uma via de erupção clara, atualmente tem sido investigada em algumas pesquisas. Em seu estudo Hanisch *et al.* (2018), identificaram que um total de 51 variações diferentes do gene PTHIR (receptor do paratormônio 1) estavam associadas à falha primária de erupção. Outros estudos também sugeriram que as formas leves de alterações de erupção dentária, como erupção dentária tardia, com ou sem DDP, também possuem em sua etiologia um fundo genético envolvido (XAVIER *et al.*, 2021; ARID *et al.*, 2019; MADALENA *et al.*, 2021). Variações (SNPs) em genes como o receptor ativador do ligante NF- κ B (RANKL) (ARID *et al.*, 2019) e matrix metaloproteases 8 (MMP8) (EVANGELISTA *et al.*, 2019) podem estar envolvidos nessa condição comum.

Embora, todos os casos de agenesia dentária tenham sido excluídos neste estudo, vale destacar que concomitante aos fatores de DDP ocorrem também o atraso na erupção do dente permanente sucessor. Portanto, no presente estudo, investigamos se os SNPs comuns em *COX2* estão envolvidos no DDP associado ao risco de erupção tardia do dente permanente.

Os marcadores moleculares SNPs podem ser utilizados para detectar uma associação entre um gene e uma doença. No presente estudo, buscou-se possíveis genes candidatos e SNPs para DDP, visto que é de suma importância para o cirurgião dentista compreender os mecanismos genéticos envolvidos na erupção dentária. Neste estudo investigou-se um novo gene, levantamos a hipótese de que *COX2* poderia estar envolvido em um maior risco de DDP.

As células do ligamento periodontal de dentes decíduos também expressam *COX2*. Um estudo compara o ligamento periodontal de dentes decíduos e permanentes humanos observou que os dentes decíduos apresentaram maior expressão de *COX2* e menor expressão de OPG. Os autores concluíram que a imunorreação mais intensa à *COX2* e a ocorrência de células clásticas e macrófagos ativos podem indicar que citocinas pró-inflamatórias estão presentes no ligamento periodontal, estimulando a baixa regulação de OPG (Osteoprotegerin) e alta regulação de RANKL, e ativando reabsorção dos tecidos dentários (MAYAHARA *et al.*, CORDEIRO *et al.*, 2011). A sinalização RANKL regula a formação, ativação e sobrevivência dos osteoclastos na modelagem e remodelação óssea normal, enquanto a OPG protege o osso da reabsorção excessiva ligando-se ao RANKL e impedindo-o de se ligar ao RANK (ativador de NF- κ B)

(BOYCE & XING 2008). Embora mais de 100 milhões de SNPs tenham sido identificados até agora na população geral, e o gene *COX2* seja altamente polimórfico (NACIONAL LIBRARY OF MEDICINE, 2021) e apenas alguns SNPs foram associados a condições clínicas até o momento. Neste estudo, observou-se que o SNP rs5275 em *COX2* e o haplótipo C - A em rs5275 - rs689466 poderiam estar envolvidos em maior risco de apresentar DDP. O rs5275 é um SNP localizado na região 3' UTR (região não traduzida). A regulação pós-transcricional da *COX-2* depende, em parte, das sequências dentro da 3' UTR do mRNA da *COX2* (RNA mensageiro). Portanto, supõe-se que o rs5275 afete a estabilidade do mRNA e/ou a eficiência da tradução (COK & MORRISON, 2001). Em uma meta-análise realizada agrupando estudos que investigaram o SNP rs5275 e a periodontite, foi observada uma associação deste SNP com a doença periodontal (ZHANG *et al.*, 2005). Embora a doença periodontal e a DDP sejam condições diferentes, os resultados observados na meta-análise suportam o papel do rs5275 SNP na reabsorção do osso alveolar/dente. A bioinformática mostrou que o SNP rs689466 cria um sítio de ligação c-MYB, o que resulta em maior atividade transcricional do gene *COX2* (AKTAN *et al.*, 2011) No presente estudo este SNP foi associado ao DDP apenas na análise de haplótipos. Esses resultados sugerem que é o SNP rs5275 que influencia a atividade do promotor *COX-2* no contexto de DDP.

O presente estudo é um dos pioneiros a explorar genes envolvidos em DDP. Entretanto é importante ressaltar que o número populacional estudado é relativamente baixo para detectar pequenas associações. Além disso, como apenas alguns SNPs no gene *COX2* têm a frequência do alelo menor superior a 20%, não conseguimos selecionar SNPs que representam a maioria das variações de sequência do gene. Ressalta-se que, os resultados desta pesquisa devem ser replicados em grupos de estudo com número populacional superior.

Resumidamente, mais estudos sobre dentes decíduos persistentes devem ser realizados, devido aos comprometimentos clínicos como má oclusões, periodontite e anquilose (AKTAN *et al.*, 2011). O DDP também pode impedir a erupção normal dos sucessores permanentes, causando mordida cruzada e perda de espaço na região anterior, devido à migração de dentes adjacentes (VIEIRA *et al.*, 2013; FIGUEIRA, 2018). Os resultados deste estudo respaldam a hipótese de que SNPs comuns na via de sinalização *COX2* podem atuar como potenciais preditores de risco de DDP. Com crescente conhecimento científico dos SNPs e seu envolvimento em diferentes condições, espera-se identificar crianças em maior risco para problemas bucais.

6 CONCLUSÃO

Diante do presente estudo, foi possível observar que:

- 1- Os dentes decíduos persistentes apresentam uma alta prevalência em pacientes alemães submetidos a tratamento ortodôntico.
- 2- A maioria dos casos de DDP eram por fatores não locais e a condição patológica local mais comum associada ao DDP foi as lesões da doença cárie dentária não tratada, restaurações dentárias e tratamento endodôntico.
- 3- Nos casos dos fatores não locais de DDP, pode-se constatar que o rs5275 e um haplótipo no gene que codifica COX2 estão associados à DDP e consequentemente um possível atraso na erupção do dente permanente sucessor.

REFERÊNCIAS

AKTAN, A.M.; KARA, I.; SENER, I.; BERKET, C.; CELIK, S.; KIRTAY, M.; CIFTÇI, M.E.; ARICI, N.A.N. evaluation of factors associated with retained primary teeth. *Eur. J. Orthod.* 2012, 34, 208–212.

ARID, J.; XAVIER, T.A.; SILVA, R.A.B.; ROSSI, A.; SILVA, L.A.B.; QUEIROZ, A.M. GALO R.; ANTUNES L.A.A.; SILVA M.J.; ANTUNES L.S.; ABBASOGLU Z.; FILHO P.N. RANKL is associated with persistent primary teeth and delayed permanent tooth emergence. *Int J Paediatr Dent.*, v.29, n.3, p.294-300, 2019.

BADAUY, C.B. Estudo Epidemiológico da retenção Prolongada em dentes decíduos. *Rev. Odontol.*, v.3, n.2, p. 35-39, 2001.

BHASKAR, S.N. Orban's oral histology and embryology. Mosby Incorporated; 1991.

BJERKLIN, K.; AL-NAJJAR, M.; KARESTEDT, H.; ANDREN, A. Agenesis of mandibular second premolars with retained primary molars: a longitudinal radiographic study of 99 subjects from 12 years of age to adulthood. *European Journal of Orthodontics.*, v.30, n.3, p.254-261, 2008.

BJERKLIN, K.; BENNETT, J. The long-term survival of lower second primary molars in subjects with agenesis of the premolars. *European Journal of Orthodontics.*, v.22, n.3, p.245-255, 2000.

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

BRODETSKA, L.; NATRUS, L.; LISAKOVSKA, O.; KANIURA, O.; IAKOVENKO, L.; SKRYPNYK, I. FLIS, P. The regulatory of the RANKL/RANK/OPG signaling pathway in the mechanisms of tooth eruption in patients with impacted teeth. *BMC Oral Health*, v.18, n.20, p.261, 2020.

CAPPELLETTE, M.; CAPPELLETTE JR, M.; FERNANDES, L.C.M.; OLIVEIRA, A.P.; YAMAMOTO, L.H.; SHIDO, F.T. OLIVEIRA W.C. Caninos permanentes retidos por palatino: diagnóstico e terapêutica – uma sugestão técnica de tratamento. *Dent Press Ortodon Ortop Facial.*, v.13, n.1, p.60-73, 2008.

COK, S.J.; MORRISON, A.R. The 3'-untranslated region of murine cyclooxygenase-2 contains multiple regulatory elements that alter message stability and translational efficiency. *J. Biol. Chem.* 2001, 276, 23179–23185.

CONSOLARO, A. Reabsorções dentárias nas especialidades odontológicas. Maringá: **Dental Press**; 2002. 448 p.

CORDEIRO, M.M.R.; SANTOS, B.Z.; REYES-CARMONA, J.F.; FIGUEIREDO, C.P. Primary teeth show less protecting factors against root resorption. **Int J Paediatr Dent.**, v.21, n.5, p.361-368, 2011.

DUARTE, M.E.Q.; ANDRADE, M.A.; FARIA, P.C.; MARQUES, L.S.; JORGE, M.L.R. Fatores associados à cronologia de erupção de dentes decíduos – revisão de literatura: erupção de dentes decíduos e fatores associados. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v.9, n.1, p.139-151, 2011.

EVANGELISTA, S.S.; ARID, J.; VASCONCELOS, K.R.F.; CRUZ, G.V.; DUTRA, A.L.T.; SILVA, L.A.B. *et al.* Association between genetic polymorphisms in metalloproteinases of the matrix and delayed tooth emergence: a cross-sectional study. **Journal of Advanced Oral Research**, v.10, n.2, p.91-96, 2019.

FIGUEIRA, M.C.P.R. **Retenção dentária prolongada: etiologia, diagnóstico e tratamento. Revisão narrativa.** Porto. Tese [Mestrado em Medicina Dentária] – Universidade Fernando Pessoa; 2018.

HANISCH, M.; HANISCH, L.; KLEINHEINZ, J.; JUNG, S. Primary failure of eruption (PFE): a systematic review. **Head Face Med.**, v.14, n.1, p.1-9, 2018.

HASEGAWA, T.; KIKUIRI, T.; TAKEYAMA, S.; YOSHIMURA, Y.; MITOME, M.; OGUCHI, J. SHIRAKAWA, T. Human periodontal ligament cells derived from deciduous teeth induce osteoclastogenesis in vitro. **Tissue Cell.**, v.34, n.1, p.44-51, 2002.

HASELDEN, K.; HOBKIRK, J.A.; GOODMAN, J.R.; JONES, S.P.; HEMMINGS, K.W. Root resorption in retained deciduous canine and molar teeth without permanent successors in patients with severe hypodontia. **International Journal of Paediatric Dentistry.**, v.11, n.3, p.171-178, 2001.

HVARING, C.; OGAARD, B.; STENVIK, A.; BIRKELAND, K. The prognosis of retained primary molars without successors: infraocclusion, root resorption and restorations in 111 patients. **European Journal of Orthodontics**, v. 36, n.1, p.26-30, 2014.

HVARING, C.L.; BIRKELAND, K. The long-term of persisting deciduous molars and canines in 42 patients with severe hypodontia: a 12-years follow-up. **European Journal of Orthodontics**, v.42, n.6, p.1-6, 2019.

ITH-HANSEN, K.; KJAER, I. Persistence of deciduous molars in subjects with agenesis of the second premolars. **European Journal of Orthodontics.**, v. 22, n.3, p.239-243, 2000.

KJAER, I.; NIELSEN, M.H.; SKOVGAARD, L.T. Can persistence of primary molars be predicted in subjects with multiple tooth agenesis? **European Journal of Orthodontics.**, v.30, n.3, p.249-253, 2008.

KORYTNICKI, D; NASPITZ, N; FALTIN J.K. Consequências e tratamentos das perdas precoces de dentes deciduos. **R.APCD.** Sao Paulo, v. 48, n. 3, p. 1323-1329, maio/ jun., 1994.

KÜCHLER, E.C.; SCHRÖDER, A.; CORSO, P.; SCARIOT, R.; SPANIER, G.; PROFF, P.; KIRSCHNECK, C. Genetic polymorphisms influence gene expression of human periodontal ligament fibroblasts in the early phases of orthodontic tooth movement. **Odontology.**, v.108, n.3, p.493-502, 2019.

KUTESA, A.N.; NDAGIRE, N.; NABAGGALA, G.S.; MWESIGWA, C.L.; KALYANGO, J.; RWENYONYI, C.M. Socioeconomic and nutritional factors associated with age of eruption of third molar tooth among Ugandan adolescents. **Journal of Forensic Dental Sciences**, v.11, n.1, p.22-27, 2019.

LIMA, E.M.; ARAÚJO, L.L.; SOUZA, R.M.; VIEIRA, G.; ARAUJO, V.P. Velocidade de erupção de caninos permanentes superiores e segundos pré-molares inferiores de acordo com os Estágios de Nolla. **Revista Ortodontia Gaúcha**, v.12, n.1, p. 5-11, 2008.

LINSUWANONT, B.; TAKAGI, Y.; OHYA, K.; SHIMOKAWA, H. Expression of matrix metalloproteinase-9 mRNA and protein during deciduous tooth resorption in bovine odontoclasts. **Bone**, v.31, n.4, p.472-478, 2002.

LOURENÇO, S. Q. C.; CONSOLARO, A. Apoptosis in odontogenesis: dental lamina, hertwigs epithelial sheath and reduced ameloblasts. 1997, Anais. Maceió: UFA, 1997

LOW, E.; ZOELLNER, H.; KHARBANDA, O.P.; DARENDELILER, M.A. Expression of mRNA for osteoprotegerin and receptor activator of nuclear fator kappa beta ligand (RANKL) during root resorption induced by the application of heavy orthodontic forces on rat molars. **Am J Orthod Dentofacial Orthop.**, v.128, n.4, p.497-503, 2005.

MADALENA, I.R.; REIS, C.L.B.; OLIVEIRA, D.S.B.; PECHARKI, G.B.; TREVILATTO, P.C.; ANDRADES, K.M.R. CARELLI, J.; SILVA V.L.B.; BARATTO-FILHO F.; KÜCHLER E.C.; BRANCHER J.A. Lack of association between delayed tooth emergence and single nucleotide polymorphisms in estrogen receptors. **Braz Dent J.**, v.32, n.6, p. 107-114, 2021.

MARKS, S.C. JR.; GORSKI, J.P.; WISE, G.E. The mechanisms and mediators of tooth eruption—models for developmental biologists. **Int J Dev Biol.** 1995, 39, 223-230.

MARRA, P.M.; NUCCI, L.; ITRO, A.; SANTORO, R.; MARRA, A.; PERILLO, L GRASSIA V. Prevalence of retained/transmigrated permanente and persistente of primary teeh associated with odontomas in Young children. **Eur J Paediatr Dent.**, v.22, n.3, p.215-218, 2021.

MAYAHARA, K.; KOBAYASHI, Y.; TAKIMOTO, K.; SUZUKI, N.; MITSUI, N.; SHIMIZU, N. Aging stimulates cyclooxygenase-2 expression and prostaglandina E2 production in human periodontal ligament cells after the application of compressive force. **J Periodontal Res.**, v.42, n.1, p.8-14, 2007.

MELO, M.; ATA-ALI, J. Accuracy of the estimation of dental age in comparison with chronological age in a Spanish sample of 2641 living subjects using the Demirjian and Nolla methods. **Forensic Sci Int.**, v.270, p.276e1-276e7, 2017.

NACIONAL LIBRARY OF MEDICINE. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. acesso 05 abr 2021.

NOLLA, C.M. The development of permanent teeth. **Journal of Dentistry for Children.**, v.27, p.254-266, 1960.

OTSUKA, Y.; MITOMI, T.; TOMIZAWA, M.; NODA, T. A review of clinical features in 13 cases of impacted primary teeth. **International Journal of Pediatric Dentistry**, v.11, p.57-63, 2001.

PINTO, A.C.G. **Odontopediatria**. 6.ed. São Paulo (SP): Santos, 2016. 943 p.

RAMOS, S.R.P.; GUGISCH, R.C.; FRAIZ, F.C. The influence of gestational age and birth weight of the newborn on tooth eruption. **J Appl Oral Sci.**, v.14, n.4, p.228-232, 2006.

ROBINSON, S.; CHAN, M.F. New teeth from old: treatment options for retained primary teeth. **British Dental Journal.**, v.207, n.7, p.315-320, 2008.

SCHELLACK, G. Farmacologia na prática clínica da área de saúde. São Paulo: **Fundamento Educacional**, 2006

SLETTEN, D.W.; SMITH, B.M.; SOUTHARD, K.A.; CASKO, J.S.; SOUTHARD, T.E. Retained deciduous mandibular molars in adults: a radiographic study of long-term changes. **American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics.**, v. 124, n. 6, p. 625-630, 2003

TAZAWA, R.; XU, X.M.; WU, K.K.; WANG, L.H. Characterization of the genomic structure, chromosomal location and promoter of human prostaglandin H synthase-2 gene. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 203, n.1, p.190-199, 1994.

TEAMA, S. DNA polymorphisms: DNA-based molecular markers and their application in medicine. **Genetic Diversity and Disease Susceptibility**, p.25-40, 2018.

TOMÁS, L.F.; MÓNICO, L.S.M.; TOMÁS, I.; VARELA-PATIÑO, P.; MARTIN-BIEDMA, B. The accuracy of estimating chronological age from Demirjian and Nolla methods in a Portuguese and Spanish sample. **BMC Oral Health**, v.14, p.160, 2014.

VIEIRA, B.B.; SANGUINO, A.C.M.; MOREIRA, M.R.; MORIZONO, E.M.; MATSUMOTO, M.A.N. Surgical-orthodontic treatment of Class III malocclusion with agenesis of lateral incisor and unerupted canine. **Dental Press Journal of Orthodontics**, v.18, n.3, p.94-100, 2013.

WISE, G.E.; FRAZIER-BOWERS, S.; D'SOUZA, R.N. Cellular, molecular, and genetic determinants of tooth eruption. **Crit Rev Oral Biol Med**, v.13, n.4, p.323-334, 2002.

XAVIER, T.A. **Retenção prolongada de dentes decíduos: possíveis fatores etiológicos locais e sistêmicos**. 2016. 72 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Odontologia, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

XAVIER, T.A.; MADALENA, I.R.; SILVA, R.A.B.; SILVA, L.A.B.; ROSSI, A.; KUCHLER, E.C. *et al.* Vitamin D deficiency is a risk factor for delayed tooth eruption associated with persistent primary tooth. **Acta Odontologica Scandinavica**, v.79, n.8, p.600-605, 2021.

XIE, W.L.; CHIPMAN, J.G.; ROBERTSON, D.L.; ERIKSON, R.L.; SIMMONS, D.L. Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 88 (7): 2692-6, 1991

YILMAZ, S.G.; HARORLI, A.; KILIÇ, M.; BAYRAKDAR, S. Evaluation of the relationship between the Demirjian and Nolla methods and the pubertal growth support stage predicted by skeletal maturation indicators in Turkish children aged 10-15: investigation study. **Acta Odont Scand**, v.77, n.2, p.107-113, 2018.

YU, Y.; CUI, C.; GUAN, S.Y.; XU, R.S.; ZHENG, L.W.; ZHOU, X.D. FAN, Y. Function of orofacial stem cells in tooth eruption: an evolving perspective. **Chinese Journal of Dental Research**, v.24, n.3, p.143-152, 2021

ZHANG, X.; MIAO, X.; TAN, W.; NING, B.; LIU, Z.; HONG, Y.; SONG, W.; GUO, Y. ZANG, X.; SHEN Y.; *et al.* Identification of functional genetic variants in cyclooxygenase-2 and their association with risk of esophageal cancer. **Gastroenterology**. 2005, 129, 565– 576.

ZIRCK, M.; ZOELLER, J.E.; LENTZEN, M.P.; BERGEEST, L.; BULLER, J.; ZINSER, M.Z. Comparison of two established 2D staging techniques to their appliance in 3D cone beam computer-tomography for dental age estimation. **Sci Rep.**, v.11, n.9024, 2021.

ANEXOS

ANEXO I – CEP



Universität Regensburg

**Ethikkommission
an der Universität Regensburg**

Ethikkommission · Universität Regensburg · 93040 Regensburg

Universitätsklinikum Regensburg
Poliklinik für Kieferorthopädie
Dr. med. dent. Christian Kirschnock
Franz-Josef-Strauß-Allee 11
93053 Regensburg

Prof. Edward K. Geissler, PhD, Vorsitzender

Ass. jur. Jan von Hassel, Geschäftsführer

Geschäftsstelle:
Telefon +49 941 943-5370
Telefax +49 941 943-5369
Postanschrift:
Universität Regensburg
ETHIKKOMMISSION
D-93040 Regensburg

ethikkommission@klinik.uni-regensburg.de
<http://ethikkommission.uni-regensburg.de>

13.11.2019

Unser Zeichen: 19-1549-101

Beratung nach § 15 Abs. 1 Berufsordnung für die Ärzte Bayerns

für das Forschungsvorhaben:

Studientitel: AUFDECKUNG MÖGLICHER ÄTIOLOGISCHER ZUSAMMENHÄNGE ZWISCHEN BIOLOGISCHEN FAKTOREN BZW. GENETISCHEN POLYMORPHISMEN UND DENTOFAZIALEN SOWIE KIEFEROR-THOPÄDISCHEN PHÄNOTYPEN

Antragssteller: Dr. med. dent. Christian Kirschnock

Die Ethikkommission der Universität Regensburg hat in Ihrer Sitzung am 13.11.2019 über das o.g. Forschungsvorhaben auf Grundlage der im Anhang aufgeführten Unterlagen beraten. Es ergeben sich daraus keine berufsethischen oder rechtlichen Bedenken gegen das vorgelegte Forschungsvorhaben.

Es wird auf folgendes grundsätzlich hingewiesen:

1. Unabhängig vom Beratungsergebnis verbleibt die ärztliche und juristische Verantwortung beim Forscher und seinen Mitarbeitern. Eine Nichtbeachtung des Beratungsergebnisses kann berufs- und haftungsrechtliche Folgen nach sich ziehen.
2. Die Auflagen der Deklaration von Helsinki des Weltärztebundes in ihrer aktuellen Fassung hinsichtlich ethischen und rechtlichen Aspekten biomedizinischer Forschung am Menschen sind strikt zu beachten.
3. Die Ethikkommission erwartet bei Interventionsstudien, dass ihr alle schwerwiegenden oder unerwarteten unerwünschten Ereignisse (u.a. Todesfälle), die während der Studie auftreten und die Sicherheit der Studienteilnehmer oder die Durchführung der Studie beeinträchtigen können, unverzüglich schriftlich mitgeteilt werden. Dieses sollte in Verbindung mit einer Stellungnahme des Antragsstellers geschehen, ob aus seiner Sicht die Nutzen-Risiko-Relation des Vorhabens verändert ist.
4. Die Ethikkommission bittet darum, dass ihr der Abbruch oder Abschluss einer Studie mitgeteilt werden.

2

5. Dieses Schreiben ist mit den Studienunterlagen jederzeit sorgfältig aufzubewahren. Duplikate oder Abschriften dieses Schreibens können im Nachhinein nicht erstellt werden.
Auf die Rechtspflichten zum Umgang mit dienstlichem Schriftgut bzw. Urkunden wird verwiesen.
6. Auf Grundlage dieser rein berufsrechtlichen Beratung können Sie nachträgliche Änderungen am Protokoll dieses Forschungsvorhabens vornehmen, ohne dafür eine erneute Beratung (umgangssprachlich 'Amendmentvotum') durch die Ethikkommission beantragen zu müssen. Zur Begrenzung rechtlicher Risiken wird eine solche Beratung aber gleichwohl dringend empfohlen.

Sobald Sie jedoch ein neues Forschungsvorhaben durchführen wollen, müssen Sie dieses einer eigenständigen Beratung durch die Ethikkommission zuführen. Hierfür gilt gemäß Grundsatzbeschluss unserer Ethikkommission vom 02.08.2016:

In der Regel handelt es sich noch um ein und dasselbe Forschungsvorhaben ohne eine erneute Beratungspflicht, wenn sich lediglich ergänzende Fragestellungen im Rahmen der selben Hypothese, methodische Erweiterungen oder Beschränkungen oder Erweiterungen oder Beschränkungen in der Studienpopulation nachträglich ergeben. Um ein neues Forschungsvorhaben handelt es sich aber in der Regel, wenn die Formulierung einer neuen Hypothese, wesentliche Änderungen am Studiengegenstand bzw. der Entität sowie wesentliche Änderungen an der wissenschaftlichen oder technischen Vorgehensweise vorgenommen werden sollen, was dann eine Pflicht zur neuerlichen Beratung durch die Ethikkommission begründet. Gesetzliche Vorschriften bleiben unberührt.

7. Die Ethikkommission bestätigt die Bearbeitung gemäß der GCP/ICH-Richtlinien.
8. Die Ethikkommission empfiehlt im Einklang mit der Deklaration von Helsinki nachdrücklich die Registrierung der Studie vor Studienbeginn in einem öffentlich zugänglichen Register, das die von der WHO geforderten Voraussetzungen erfüllt.
9. Falls kein gesetzlicher Kostenbefreiungstatbestand greift, wird ein gesonderter Kostenbescheid für die Gebühren und Auslagen der Ethikkommission ergehen.
10. Die Übermittlung personenbezogener Daten einschließlich DNA-tragender Biomaterialien in datenschutzrechtlich unsichere Drittstaaten, wie etwa die USA, bedarf einer gesonderten datenschutzrechtlichen Beurteilung und Risikoaufklärung.
11. Datenschutzrecht wird durch die Ethikkommission grundsätzlich nur cursorisch geprüft. Dieses Votum ersetzt mithin nicht die Konsultation des zuständigen Datenschutzbeauftragten.



Prof. Edward K. Geissler, PhD
Vorsitzender der Ethikkommission

Liste der eingereichten Unterlagen:

Anlageelement	Datei-Name	Eingangsdatum
Prüfplan	01 Protokoll.pdf	23.09.2019
Gegenstand des Forschungsvorhabens	02 Gegenstand des Forschungsvorhabens.pdf	23.09.2019
Angaben zum Nutzen für die Heilkunde/ wissenschaftl. Erkenntniswert	03 Angaben zum Nutzen für die Heilkunde bzw. wissenschaftlicher Erkenntniswert.pdf	23.09.2019
Nutzen-Risiko-Bewertung	04 Informationen zu Abwägung zwischen Risiko und Nutzen für den Patienten bzw. Probanden.pdf	23.09.2019
Angaben zu Anzahl, Alter und Geschlecht	05 Angaben zu Anzahl, Alter und Geschlecht der Versuchspersonen.pdf	23.09.2019
Angaben zur ethischen Problematik	06 Angaben zur ethischen Problematik.pdf	23.09.2019
Vereinbarungen zur Vergütung	07 Angaben zum Honorar für Versuchspersonen.pdf	23.09.2019
Patienteninformation	08 Aufklärungsdokument.pdf	23.09.2019
Patienteninformation	08 Aufklärungsdokument Kinder.pdf	23.09.2019
Patienteneinwilligung	09 Einwilligungsdokument.pdf	23.09.2019
Vorgesehene Untersuchungsmethoden/ Abweichung von der üblichen Praxis	10 Beschreibung der vorgesehenen Untersuchungsmethoden und eventuelle Abweichungen von den in der medizinischen Praxis üblichen Untersuchungen.pdf	23.09.2019
Literaturverzeichnis	11 Literaturverzeichnis.pdf	23.09.2019
Angaben zur Methodik der Erfassung/ Verarbeitung personenbezogener Daten	12 Angaben zur Methodik der Erfassung und Verarbeitung personenbezogener oder personenbeziehbarer Daten.pdf	23.09.2019
Kurzbeschreibung	Kurzbeschreibung.pdf	23.09.2019

4

An dieser Entscheidung der Ethikkommission in Ihrer Sitzung vom 13.11.2019
haben mitgewirkt:

Prof. Dr. Karin Pfister

Prof. Dr. Karl Peter Ittner

RiAG Dr. Wolfhard Meindl

Prof. Dr. Michael Melter

Prof. Dr. Stefan Wüst

Dr. Sophie Schlosser

RAR Werner Stelzl

PD Dr. Anja-Kathrin Wege

PD Dr. Anika Bundscherer

Michael Ertl

ANEXO II – ARTIGO 1

Prevalence of Persistent Primary Teeth and Associated Conditions in German Children

Abstract

This study aimed to evaluate the prevalence of persistent primary teeth (PPT) and the factors associated with this condition in German children. **Materials and Methods:** This is a cross-sectional retrospective study that evaluated panoramic radiographies from orthodontic patients. The diagnosis of PPT was established according to the Nolla's stage. The primary tooth was considered persistent when its successor permanent tooth was in the Nolla's stage 8, 9 or 10. A statistical analysis was performed with an established alpha of 5. A total of 102 children (48 girls and 54 boys), and 574 primary teeth and their permanent successor teeth were evaluated. One hundred ninety-two teeth were classified as PPT. Sixty-one (59.8%) children presented one or more PPT. Gender was not statistically different among PPT and control groups ($p=0.838$; Odds Ratio=0.95, Confidence interval 95%= 0.44 to 2.16). The pathological problems most commonly observed associated with PPT were dental fillings (19.3%), followed by dental caries (4.6%) and ectopic tooth eruption (2.1%). The majority of the PPT cases (68.7%) did not present a possible cause that could justify the prolonged retention. In conclusion, PPT in German children is high and the most common pathological condition associated with PPT was factors associated with dental caries.

Key-words: Persistent primary teeth. Prolonged retention. Tooth eruption.

Introduction

The tooth eruption is defined as “the axial (or) occlusal movement of the tooth from its position of development in the jaws to its functional position in the occlusal plane” (Bhaskar, 1991). The tooth eruption phenomenon is physiological, the timing of which a permanent tooth emerges in the oral cavity depends on numerous factors. During tooth eruption, the resorption of the alveolar bone and the root of the corresponding primary tooth occurs (Wise et al., 2002). Persistent primary tooth (PPT) is a common condition that occurs when a primary tooth is retained beyond the period of its normal exfoliation remaining in the oral cavity (Badauy, 2001; Aktan et al., 2011; Xavier 2016).

PPT impacts the eruptive cycle of permanent successor teeth and, when not diagnosed and properly treated, can cause infectious, mechanical and neoplastic disorders (Cappellette et al., 2008; Figueira 2018). In patients with PPT, orthodontic-surgical treatment is indicated when the impacted teeth are at an intraosseous level (Figueira 2018). Although PPT is a common condition in the clinical practice, especially in the orthodontic and pediatric dental practice, only few studies in different population were performed so far exploring the prevalence and the factors associated with this condition (Bjerklin, Bennett, 2000; Ith-Hansen, Kjaer, 2000; Haselden et al., 2001; Sletten et al., 2003; Bjerklin et al., 2008; Kjaer et al., 2008; Robinson, Chan, 2009; Aktan et al., 2011; Xavier 2016; Arid et al. 2017). The aim of this study is to assess the prevalence of persistent primary teeth and the local factors associated with this condition in German children undergoing to orthodontic treatment.

Method

Ethics and sample description

The research protocol was previously approved by the Ethics Committee from the University Hospital Regensburg, Germany (ID 19-1549-101). All participants and/or legal guardians gave their written informed consent to take part in the study. STROBE recommendations were followed for the research report (ref).

Patients undergoing dental treatment at the University Hospital Regensburg and two collaborating private orthodontic practices between 2009 and 2021 were screened to determine their eligibility. German patients who had panoramic radiographs during the orthodontic treatment were selected evaluated. Patients with tooth agenesis, syndromes and/or systemic diseases were excluded from the study. Only children age ranging between 8 to 17 were included.

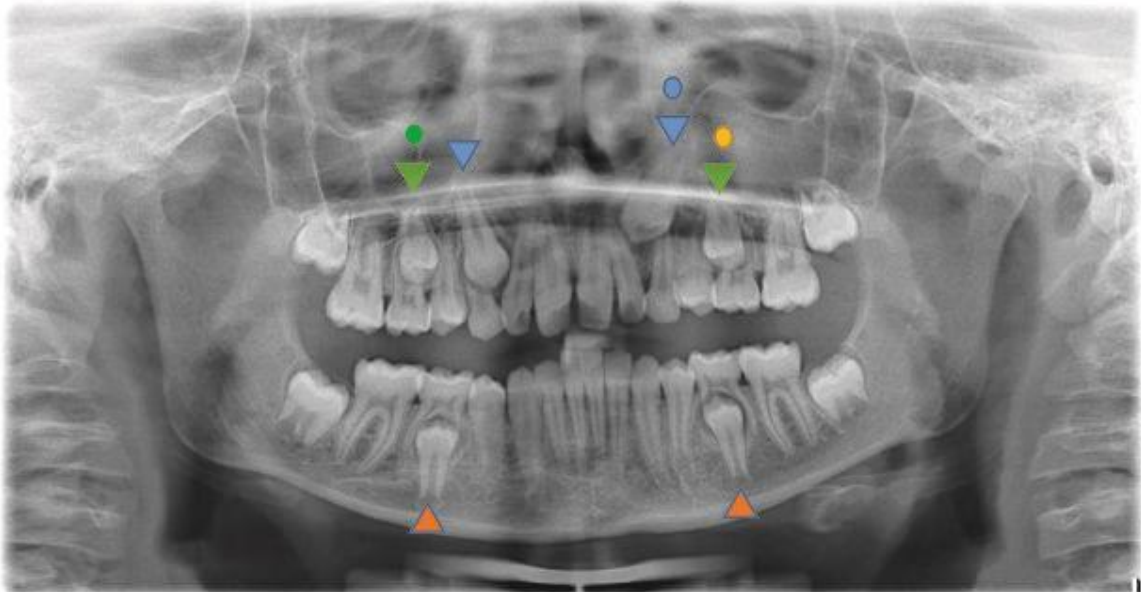
Radiographic evaluation and characterization of PPT

The panoramic radiographs were evaluated by a single examiner (SH). Previously, a calibration was performed, in which 10 panoramic radiographs were evaluated twice two weeks apart. The intra-examiner calibration was evaluated by the Kappa Test. Kappa value was 0.98 for Nolla's stage and 0.82 for primary teeth root resorption.

The dental development of the permanent successors of each primary teeth still present in the oral cavity were evaluate according to Nolla's stage. Briefly, the technique introduced by Nolla assigns each tooth a certain stage from 0 (absence of crypt) to 10 (apical end of the tooth root canal completed) (Nolla, 1960). Nolla's stage 8 is characterized by having two thirds of the root completed (Zirck et al., 2021; Nolla, 1960), and at this stage the permanent tooth should reach the alveolar crypt and emerged in the

oral cavity (Pinto, 2016). Therefore, the primary tooth was considered persistent when its successor permanent tooth was in the Nolla's stage 8, 9 or 10.

The root of each primary teeth classified as PPT was also evaluated according to the amount of the root resorption (Figure 1).



Note: ● Resorption in the apical third; ● Resorption in the middle third; ● Resorption in the cervical third; ▲ Nolla's stage 7; ▲ Nolla's stage 8; ▲ Nolla's stage 9.

Associated factors

The panoramic radiographs were also used to evaluate the following factors:

- Ectopic tooth eruption such as translation or transmigration of successor teeth,
- Existence of pathology, such as cysts, tumours, and odontoma under the primary tooth that results in the impaction of successor teeth,
- Presence of supernumerary teeth

- Ankylosed/infra-occlusion primary tooth
- Untreated caries with and without pulp involvement
- Dental restoration (fillings)
- Endodontic treatment (pulpotomy or pulpectomy).

Statistical analysis

GraphPad Prism 5.0 (Graph-Pad, San Diego, CA, USA) was used to analyze data. Chi-square test was used to compare PPT among gender and these data are presented as absolute (n) and relative (%) frequencies. Odds ratio was used to calculate the relative chance among groups. The patient's age was calculated, using the date of birth and the date on which the radiographic examination was performed as a reference. T test was used to compare age among genders and these data are presented as the mean and standard deviations (SD). The established Alpha was 5%.

Results

Among the 102 included children, 48 (47.0%) were girls and 54 (53.0%) were boys. The age of the patients ranged from 8 to 17 years old.

A total of 574 primary teeth and their permanent successor teeth were evaluated. The mean number of primary teeth in the oral cavity was 5.6 (standard deviation 4.3) and ranged from 0 to 14 teeth. None of the children presented primary dentition, 80 (77.6%) presented mixed dentition and 22 (22.4%) presented permanent dentition.

One hundred ninety-two teeth were classified as PPT. Sixty-one (59.8%) children presented one or more PPT.

In 15 (14.7%) children PPT was associated with low resorption rate of the root (maximum of one-third of the root resorption).

The characteristics of the studied sample is shown in the table 1 and 2, and the type of tooth distribution according PPT and control (non PPT) groups is shown in the Figure 2. A statistical difference was observed. Age was not associated with PPT. Gender was not statistically different among groups ($p=0.838$; Odds Ratio=0.95, Confidence interval 95%= 0.44 to 2.16).

The pathological problems most commonly observed in PPT were dental fillings (19.3%), followed by dental caries (4.6%) and ectopic tooth eruption (2.1%). It was observed that 68.7% the PPT did not present a possible cause that could justify the prolonged retention of these primary teeth and they were classified as idiopathic. These results are presented in the Table 3.

Table 1. Characteristics of the studied population according to the groups

Variable	Total	PPT	Controls	p-value*
Sex n (%)				
Boys	54 (53.0%)	32 (52.5%)	22 (53.7%)	0.905
Girls	48 (47.0%)	29 (47.5%)	19 (43.3%)	
Mean age and standard deviation (SD) in months				
Mean	132.8	132.8	132.9	0.983
SD	20.6	21.3	19.7	

Note: *comparisons were performed between PPT and controls.

The distribution of the factors associated with PPT is presented in the Figure 1.

Table 2. PPT distribution according to the type of teeth and dental arch

Variable	Total	PPT
Total number primary teeth	574 (100%)	192 (34.4%)
Affected dental arch		
Maxilla	316 (51.1%)	115 (36.4%)
Mandible	258 (44.9%)	77 (29.8%)
Affected group of teeth		
Incisors	1 (0.2%)	0 (0.0%)

Canines	167 (29.1%)	92 (55.1%)
Molars	406 (70.7%)	100 (24.6%)

The distribution of the factors associated with PPT is presented in the Figure 2.

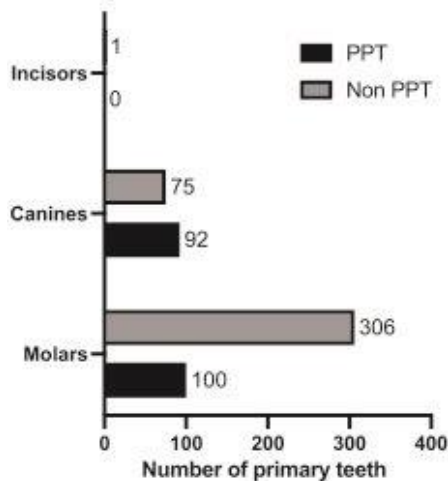


Figure 2. Type of tooth distribution according PPT and non PPT group. A statistical difference was observed ($p < 0.001$).

Table 3. Variables distribution in the PPT group and in the total sample

Variable	PPT (192)	Total sample (574)
Untreated caries	9 (4.6%)	15 (2.6%)
Dental restoration (filling)	37 (19.3%)	66 (11.5%)
Endodontic treatment	2 (1.0%)	2 (0.3%)
Ectopic eruption	4 (2.1%)	4 (0.7%)
*Others	8 (4.2%)	8 (0.7%)
Idiopathic PPT	132 (68.7%)	-

Note: Two untreated caries lesion affected the dental pulp. Endodontic treatment means 1 pulpotomy and 1 pulpectomy. *Others means 2 infra-occlusion, 1 cyst, 3 alteration in the periodontal ligament, 1 transposition, 1 dental ankyloses.

Discussion

In the present study we decided to evaluate the prevalence of PPT and associated local condition in German children undergoing to orthodontic treatment. We observed that

the prevalence of children with PPT was high, in which 59.8% presented at least one PPT. It is important to highlight that this study was performed in children undergoing to orthodontic treatment and this prevalence could be lower in the general population.

The etiology of PPT is associated with both local and systemic factors. The systemic associated with PPT include hormonal deficiencies, ectoderm dysplasia, cleidocranial dysostosis, low birth weight, Down syndrome and nutritional deficiencies (Ramos et al., 2006; Figueira, 2018). These are factors can influence the process of tooth eruption leading to a PPT and delayed formation of the permanent successor teeth (Figueira, 2018). Therefore, in our study we excluded patients with systemic conditions in order to evaluate only local condition without confounding factors.

Local factors include supernumerary teeth, ankylosis (Figueira, 2018), odontoma (Marra et al., 2021), early tooth loss, lack of space, permanent ectopic eruption, eruption hematoma, gingival fibrosis, dental caries and tooth agenesis (Aktan et al, 2011). In the study performed by Aktan et al. (2011) the congenital absence of the permanent successor teeth was found to be the most common reason for the PPT. This association was also reported by Bjerklin and Bennett, (2000); Ith-Hansen and Kjaer (2000) and Haselden et al. (2001); Bjerklin et al. (2008). In our study, tooth agenesis cases were excluded due to the fact that the diagnosis of PPT was performed using the Nolla's stage of the permanent successor teeth.

The Nolla's developmental stages system established by Nolla (1960) is well-known in the dental literature. In nolla's method there are 10 stages of tooth development. In our study we classified teeth in the stage 8, 9 or 10 as PPT, once is expected the permant teeth development at these stages are already emerged in the oral cavity (Zirck et al.,

2021; Nolla, 1960) and therefore, the corresponding primary teeth exfoliated. Nolla's stage method is also useful to measure the maturity, since it represents a series of recognizable changes that occur in the same sequence from an initial event to a constant end point and also to investigate the chronological age (Yilmaz et al., 2018; Melo, Ata-Ali, 2017; Tomás et al., 2014).

The most common pathological factors associated with PPT were the ones associated with dental caries, such as untreated dental caries, dental fillings and endodontic treatment. However, it is also important to report that the majority of the cases did not present any known cause (nor local or systemic). It is possible that same molecular factors are involved in these cases. Previous studies observed that genetic factors are involved in delayed permanent tooth emergence (Arid et al. 2017; Evangelista et al., 2019). More studies regarding PPT should be performed once it can cause clinical problems such as malocclusions, periodontitis and ankylosis (Aktan et al., 2011), besides patient dissatisfaction (Bin-Shuwaish, 2017). PPT can also prevent the normal eruption of permanent successors, causing crossbite and loss of space in the anterior region, due to migration of adjacent teeth (Vieira et al., 2013; Figueira, 2018).

Conclusion

Persistent primary tooth is highly prevalent in German undergoing to orthodontic treatment. The most common pathological condition associated with PPT was factors associated with dental caries, such as untreated caries, dental fillings and endodontic treatment.

References

- Bhaskar SN. Orban's oral histology and embryology. Mosby Incorporated; 1991.
- Wise GE, Frazier-Bowers S, D'Souza RN. Cellular, molecular, and genetic determinants of tooth eruption. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2002;13(4):323-34.
- Badauy CB. Estudo Epidemiológico da retenção Prolongada em dentes decíduos. *Rev. Odontol.* 2001; 3(2):35-39.
- Aktan AM, Kara I, Sener I, Bereket C, Celik S, Kirtay M et al. An evaluation of factors associated with persistente primary teeth. *Eur J Orthod.* 2011(2): 208-212.
- Xavier TA. Retenção prolongada de dentes decíduos: possíveis fatores etiológicos locais e sistêmicos. Ribeirão Preto. Tese [Mestrado em Ciências - Odontopediatria] – Universidade de São Paulo; 2016.
- Cappellette M, Cappellette Jr M, Fernandes LCM, Oliveira AP, Yamamoto LH, Shido FT et al. Caninos permanentes retidos por palatino: diagnóstico e terapêutica – uma sugestão técnica de tratamento. *Dent Press Ortodon Ortop Facial.* 2008; 13(1): 60-73.
- Figueira MCP. Retenção dentária prolongada: etiologia, diagnóstico e tratamento. Revisão narrativa. Porto. Tese [Mestrado em Medicina Dentária] – Universidade Fernando Pessoa; 2018.
- Bjerklin K, Bennett J. The long-term survival of lower second primary molars in subjects with agenesis of the premolars. *European Journal of Orthodontics.* 2000; 22(3): 245–255.
- Ith-Hansen K, Kjaer I. Persistence of deciduous molars in subjects with agenesis of the second premolars. *European Journal of Orthodontics.* 2000; 22(3): 239–243.
- Haselden K, Hobkirk JA, Goodman JR, Jones SP, Hemmings KW. Root resorption in retained deciduous canine and molar teeth without permanent successors in patients with severe hypodontia. *International Journal of Paediatric Dentistry.* 2001; 11(3): 171–178
- Sletten DW, Smith BM, Southard KA, Casco JS, Southard TE. Retained deciduous mandibular molars in adults: a radiographic study of long-term changes. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics.* 2003; 124: 625–630.

Bjerklin K, Al-Najjar M, Karestedt H, Andren A. Agenesi of mandibular second premolars with retained primary molars: a longitudinal radiographic study of 99 subjects from 12 years of age to adulthood. *European Journal of Orthodontics*. 2008; 30(3): 254–261.

Kjaer I, Nielsen MH, Skovgaard LT. Can persistence of primary molars be predicted in subjects with multiple tooth agenesi? *European Journal of Orthodontics*. 2008; 30: 249–253.

Robinson S, Chan MF. New teeth from old: treatment options for retained primary teeth. *British Dental Journal*. 2008; 207: 315–320.

Arid J, Vitiello C, Silva RAB, et al.. Nutritional status is associated with permanent tooth eruption chronology. *BJOS*. 2017;16:e17065.

Nolla CM. The development of permanent teeth. *Journal of Dentistry for Children*. 1960; 27, 254-266.

Zirck M, Zoeller JE, Lentzen MP, Bergeest L, Buller J, Zinser M. Comparison of two established 2D staging techniques to their appliance in 3D cone beam computer-tomography for dental age estimation. *Sci Rep*. 2021; 11: 9024.

Pinto ACG. **Odontopediatria**. 6.ed. São Paulo (SP): Santos, 2016. 943 p.

Ramos SRP, Gugisch RC, Fraiz FC. The influence of gestational age and birth weight of the newborn on tooth eruption. *J Appl Oral Sci*. 2006;14(4):228-232.

Marra PM, Nucci L, Itró A, Santoro R, Marra A, Perillo L et al. Prevalence of retained/transmigrated permanente and persistente of primary teeht associated with odontomas in Young children. *Eur J Paediatr Dent*. 2021; 22(3): 215-218.

Yilmaz SG, Harorli A, Kiliç M, Bayrakdar S. Evaluation of the relationship between the Demirjian and Nolla methods and the pubertal growth suport stage predicted by skeletal maturarion indicators in Turkish children aged 10-15: investigation study. *Acta Odont Scand*. 2018; 77(2): 107-113.

Melo M, Ata-Ali J. Accuracy of the estimation of dental age in comparison with chronological age in a Spanish sample of 2641 living subjects using the Demirjian and Nolla methods. *Forensic Sci Int*. 2017; 270: 276e1-276e7.

Tomás LF, Mónico LSM, Tomás I, Varela-Patiño P, Martín-Biedma B. The accuracy of estimating chronological age from Demirjian and Nolla methods in a Portuguese and Spanish sample. *BMC Oral Health*, 2014; 14: 160.

Bin-Shuwaish MS. Ceramic veneers for esthetic restoration of retained primary teeth: a 4-year follow-up case report. *Oper Dent*. 2017; 42(2):133–142.

Vieira BB, Sanguino ACM, Moreira MR, Morizono EM, Matsumoto MAN. Surgical-orthodontic treatment of Class III malocclusion with agenesi of lateral incisor and unerupted canine. *Dental Press Journal of Orthodontics*. 2013; 18(3): 94–100.



Article

Single Nucleotide Polymorphisms in *COX2* Is Associated with Persistent Primary Tooth and Delayed Permanent Tooth Eruption

Erika Calvano Küchler ^{1,2,*}, Suelyn Danielle Henklein ³, Peter Proff ¹, César Penazzo Lepri ³,
Camila Paiva Perin ², Eva Paddenberg ¹, Liliiane Roskamp ², Flares Baratto-Filho ^{2,4},
Maria Angélica Hueb de Menezes-Oliveira ³ and Christian Kirschnack ^{1,*}

¹ Department of Orthodontics, University of Regensburg, Franz-Josef-Strauss-Allee 11, 93053 Regensburg, Germany

² School of Dentistry, Tuiuti University of Paraná, Rua Sydnei Antonio Rangel Santos, 238-Santo Inacio, Curitiba 82010-330, PR, Brazil

³ Department of Biomaterials, University of Uberaba-UNIUBE, Uberaba 38010-200, MG, Brazil

⁴ School of Dentistry, Univille University, Rua Paulo Malschitzki, 10, Zona Industrial Norte, Joinville 89219-710, SC, Brazil

* Correspondence: erikacalvano@gmail.com (E.C.K.); christian.kirschnack@klinik.uni-regensburg.de (C.K.)



Citation: Küchler, E.C.;

Henklein, S.D.; Proff, P.; Lepri, C.P.;

Perin, C.P.; Paddenberg, E.;

Roskamp, L.; Baratto-Filho, F.;

de Menezes-Oliveira, M.A.H.;

Kirschnack, C. Single Nucleotide

Polymorphisms in *COX2* Is

Associated with Persistent Primary

Tooth and Delayed Permanent Tooth

Eruption. *Int. J. Environ. Res. Public*

Health **2022**, *19*, 10047. [https://](https://doi.org/10.3390/ijerph191610047)

doi.org/10.3390/ijerph191610047

Academic Editor: Paul B. Tchounwou

Received: 7 July 2022

Accepted: 12 August 2022

Published: 15 August 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors.

Licensee MDPI, Basel, Switzerland.

This article is an open access article

distributed under the terms and

conditions of the Creative Commons

Attribution (CC BY) license ([https://](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

[creativecommons.org/licenses/by/](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

[4.0/](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)).

Abstract: Persistent primary tooth (PPT) is a prevalent clinical condition that occurs when a primary tooth is over-retained beyond the established period of its normal exfoliation time, remaining in the oral cavity. Many factors could be involved in the risk of PPT; therefore, the aim of this study was to evaluate if single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the *COX2* gene are associated with PPT. Children undergoing orthodontic treatment were screened. Orthopantomographs were assessed to evaluate PPT according to the Nolla stage of its permanent successor. The primary tooth was considered retained when its successor permanent tooth was in Nolla stage 8 and below the alveolar crypt, Nolla stage 9, or Nolla stage 10. A saliva sample from each child was collected and used for DNA extraction. A real-time PCR of two SNPs, rs689466 (−1195 G/A) and rs5275 (+665 T/C), was performed. A chi-square test was used to compare the allele and genotype distribution. Haplotype analysis was also performed. A total of 100 children were included in the study. Fifty-one had at least one PPT, while 49 children were classified as a control. The number of teeth persistent in the oral cavity ranged from 1 to 8. The genotype distribution was associated with PPT in the co-dominant model ($p = 0.006$) for SNP rs5275. The individuals that carry two T alleles (TT) compared with the individuals that carry at least one C allele (C + TC) had an almost three times higher chance of presenting with PPT ($p = 0.012$; OR = 2.99, CI95% 1.28 to 6.95—recessive model). The haplotype C-A for the SNPs rs5275 and rs689466, respectively, was significantly associated ($p = 0.042$). In conclusion, single nucleotide polymorphisms in the gene encoding for *COX2* are associated with persistent primary tooth and may delay permanent tooth eruption.

Keywords: children; primary tooth; genes

1. Introduction

Permanent and primary tooth eruptions are both fundamental developmental and physiologic processes that occur during a child's growth and development. Permanent and primary tooth eruption and root elongation during dental development require the resorption of surrounding alveolar bone to occur. In some permanent teeth (incisors, canines, and premolars) eruption, the root resorption of the corresponding primary tooth also occurs [1]. Root resorption of the primary tooth is a physiological process in the life span of a primary tooth and results in its exfoliation leading to the eruption of its successor tooth [2]. Additionally, bone remodeling during the establishment of the eruption pathway involves bone resorption on the occlusal surface and bone formation in the basal region of the developing root [1]. The root resorption of the primary tooth is a process

regulated similarly to the bone remodeling process at the molecular level, sharing several common genes [2].

Persistent primary tooth (PPT) is a prevalent clinical condition in children and teenagers that occurs when a primary tooth is over-retained beyond the established period of its normal exfoliation time, remaining in the child's oral cavity and commonly leading to a delay in the permanent successor tooth [3,4]. Many encoding genes involved in the bone remodeling process and primary root resorption process are candidate genes for PPT, including Cyclooxygenase-2 (COX2), which is an important enzyme mediating prostaglandin synthesis. COX2 is encoded by the Prostaglandin-Endoperoxide Synthase 2 (*PTGS2*) gene, which can also be called the *COX2* gene. COX2 is well-known to play a key role in the alveolar bone resorption process [5]. In a study evaluating the periodontal ligament of human permanent teeth and primary teeth undergoing root resorption, Howship lacunae were found only in primary teeth and were associated with the presence of TRAP-positive cells and an increase in COX2 expression [6].

The COX2 gene is located on chromosome 1q25.2–q25.3 and contains 10 exons and encodes a 604-amino-acid protein [5]. Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) are a type of genetic variant involving changes of a single base pair in the genome. This is the most common type of genetic variation in humans, and these variants could explain the differences in an individual's predisposition to present with complex traits [7] such as PPT. Although the etiology of PPT has been poorly investigated, the studies showing the molecular background of tooth eruption clearly support the assumption that SNPs in key genes could be involved in PPT. In this study, we hypothesize that common SNPs in the COX2 signaling pathway may act as potential predictors of PPT risk. Therefore, we evaluated two well-known SNPs in the COX2 encoding gene in a group of children with PPT associated with delayed permanent tooth eruption.

2. Materials and Methods

2.1. Ethics and Sample Description

This study was previously approved by the Ethics Committee of the University Hospital Regensburg, Germany (ID 19-1549-101). All of the included children and teenagers and/or their legal guardians were informed about all aspects of the research. The patients were included in the study after their legal guardians signed the informed consent form and the literate children signed an assent form. All of the patients were treated in accordance with the Declaration of Helsinki. The STrengthening the REporting of Genetic Association Studies (STREGA) statement checklist was followed to design this study protocol and to report the results presented here [8].

Biologically-unrelated children undergoing orthodontic treatment at the Orthodontic Department at the University of Regensburg and two collaborating private orthodontic practices in the area (Regensburg, Germany), between 2019 and 2021, were screened, selected, and included in the study. Only children aged between 8 and 14 years with a Central-European ancestry (at maximum one grandparent not from Central Europe) were selected. Patients with tooth agenesis (excluding third molar agenesis), facial trauma, cleft lip and/or cleft palate, underlying syndromes, and/or systemic diseases were excluded from the study. Only one child per family was included to avoid bias.

2.2. Panoramic Radiographs Evaluation and Characterization of PPT

Panoramic radiographs (orthopantomographs) of each child were assessed by a single examiner, who is a senior pediatric dentist. First, a calibration was performed using 10 panoramic radiographs, which were evaluated twice, two weeks apart. The intra-examiner calibration was calculated, and the Kappa value was 0.98 for Nolla's stage.

The primary teeth associated with the following conditions were excluded from the analysis, and they were not considered to be PPT: Ectopic tooth eruption of the successor's tooth (translation or transmigration), associated pathologies (such as cysts, tumors, and odontoma under the primary tooth), the presence of supernumerary teeth in the sur-

rounding area, a primary tooth with ankyloses/infra-occlusion, untreated dental caries (dental cavities) with or without pulp involvement, endodontic treatment (pulpotomy or pulpectomy), and dental fillings/dental restorations.

The dental development of the permanent successors of each included primary tooth was assessed according to Nolla's stage. The technique introduced by Nolla assigns each tooth a certain stage from 0 (absence of crypt) to 10 (apical end of the tooth root canal completed) [9]. Examples of Nolla's stages 5, 6, 7, 8 and 9 are demonstrated in Figure 1. Nolla stage 8 is described as having two-thirds of the root completed [9,10], and the tooth has emerged into the oral cavity. Therefore, the primary tooth was considered retained when its successor permanent tooth was in Nolla stage 8 and below the alveolar crypt, Nolla stage 9 or Nolla, stage 10. The cases of Nolla stage 8 with the permanent tooth already reaching the alveolar crypt (alveolar crest) were not considered to be PPT, as demonstrated in Figure 2.

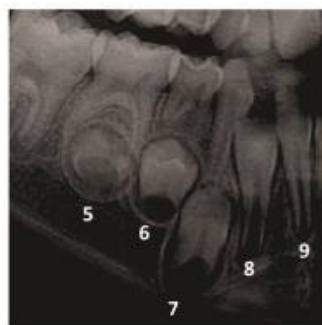


Figure 1. Nolla's developmental stages 5, 6, 7, 8 and 9 in permanent premolars. Stage 5—crown almost completed; Stage 6—crown completed. Stage 7—1/3 root completed; Stage 8—2/3 root completed; and Stage 9—Root completed with the apex open.

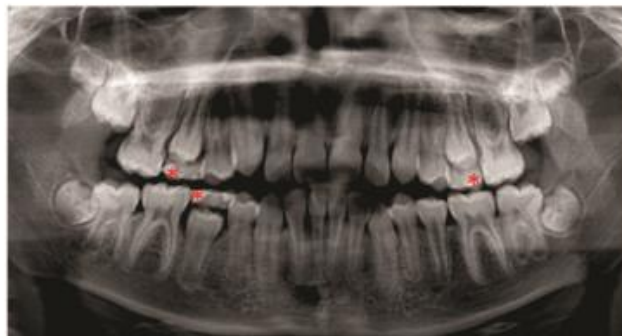


Figure 2. Orthopantomograph of a child in mixed dentition. * demonstrated primary teeth with the successor premolar in the Nolla's stage 8; however, no alveolar crypt was observed, and teeth were not considered PPT.

Therefore, only idiopathic cases of PPT associated with the delayed permanent tooth eruption of its successor's tooth were considered.

2.3. Genomic DNA Extraction and Allelic Discrimination Analysis of COX2

A sample of buccal cells was collected from each of the included children for DNA analysis using sterile disposable cytobrushes. The samples were collected by swiping and rolling a cytobrush over the side (right and left), 2–3 times on the inner mucosa of the cheek and against the base of the tongue. Then, the samples were stored at -20°C until processing for DNA extraction. The genomic DNA extraction followed an established

protocol. Briefly, an extraction solution (Tris-HCl 10 mM, pH 7.8; EDTA 5 mM; SDS 0.5%) containing proteinase K (100 ng/mL) was added to cause the lysis of the cells and proteins from the saliva samples. The non-digested proteins were removed using ammonium acetate, and the DNA was precipitated with isopropanol. Later the DNA was resuspended in a TE buffer (10 mM Tris (pH 7.8) and 1 mM EDTA) and stored at -20°C for future analysis. More details on DNA extraction and purification can be found in K uchler et al. [11]. The DNA's concentration (estimated by measuring the absorbance at 260 nm) and purity (estimated by measuring the ratio of absorbance at 260 nm and 280 nm) were evaluated by spectrophotometry using NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, DE, Waltham, MA, USA).

The potential SNPs in *COX2* (chromosome 1) were screened from the dbSNP database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/> (4 April 2022)) and SNPinfo (<http://snpinfo.niehs.nih.gov/> (4 April 2022)). The SNP selection was based on their MAF (minor allele frequency) of $\geq 10\%$ in the global population and the possible clinical impact, taken from previous publications (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/> (4 April 2022)). Therefore, genotyping analyses were performed to investigate two SNPs in *COX2*: an upstream variant (rs689466; -1195 G/A) and an untranslated region (rs5275; $+665\text{ T/C}$). The characteristics of the selected SNPs are presented in Table 1. The allelic discrimination reactions were carried out using real-time polymerase chain reactions (PCR), TaqMan technology (Applied Biosystems[®], StepOnePlus Real-Time PCR System, Thermo Fisher Scientific, Foster City, CA, USA). The real-time PCR reactions were performed in a total volume of 3 mL per well as follows: 4 ng DNA/reaction in 1.5 mL of sterile water, 1.5 mL of TaqMan[®] Universal PCR Master Mix, and 0.075 of custom TaqMan[®] SNP genotyping assays (Applied Biosystems) specific to each SNP studied. The probes and master mix were obtained from Applied Biosystem (Foster City, CA, USA). A negative control without template DNA was used in each run. In addition, 20% of the sample was randomly selected for repeated analysis and demonstrated a concordance of 100%.

Table 1. Description of the studied SNPs in *COX2* gene.

SNP	Also Known	Function	Global Minor Allele Frequency	Hardy-Weinberg χ^2
rs689466	-1195 G/A	Upstream Variant	0.217	1.36
rs5275	$+665\text{ T/C}$	3' UTR region	0.400	2.07

Thermal cycling was performed by starting with a holding cycle of 95° for 10 min, followed by 45 amplification cycles of 92° for 15 s and 60° for 1 min. The examiner in the molecular biology laboratory was blinded to the samples' group during the genotyping analysis.

Patients whose DNA samples failed twice in the genotyping reaction were excluded from further analysis.

2.4. Statistical Analysis

For statistical analysis, a child was assigned to the PPT group when they had at least one tooth diagnosed as PPT. The Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE) was assessed for each studied SNP by a chi-square test (wpcalc.com/en/equilibrium-hardy-weinberg (22 May 2022)). A chi-square test was also used to compare the allele and genotype distributions (in the co-dominant model and recessive model) among the control and PPT groups using the software Epi Info 7.2. Haplotype analysis was also performed. The odds ratio (OR) and 95% Confidence Intervals (CI) were calculated. A T-test was used for the comparison of the means and standard deviations (SD) among the groups. The significance level was established as $p < 0.05$ (alpha of 5%) for all comparisons.

3. Results

Among the 108 patients initially screened, one patient with cleft lip and palate and two patients that had brothers already enrolled in the study were excluded in the anamnesis

stage. Five patients had tooth agenesis diagnosed in the radiographic analysis and were also excluded. Therefore, a total of 100 children were finally included in the study. Fifty-one children had at least one PPT and were allocated to the PPT group, while 49 children did not present with PPT and were classified as controls (Figure 3).

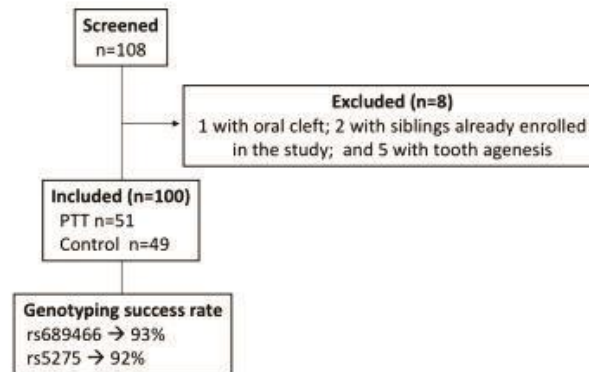


Figure 3. Flow diagram.

The characteristics of the PPT and control groups and the comparisons among them are presented in Table 2. The number of primary teeth presented in the oral cavity ranged from 0 to 13 (mean of 4.3; SD = 4.7) in the control group and from 1 to 12 (mean of 7.0; SD = 3.8) in the PPT group, in which there was a statistically significant difference between the groups ($p = 0.002$). Age and gender were not statistically significant among the different control and PPT groups ($p = 0.446$ and $p = 0.548$, respectively).

Table 2. Characteristics and comparisons of groups.

Variables	Control (n = 49)	PPT (n = 51)	p-Value
Age in months Mean (SD)	133.1 (SD 19.4)	130.3 (SD 16.9)	0.446 *
Number of primary teeth Mean (SD)	4.3 (SD 4.7)	7.0 (SD 3.8)	0.002 *
Gender n (%)			
Male	26 (53.1%)	24 (47.1%)	0.548 #
Female	23 (46.9%)	27 (52.9%)	

Note: * *t*-test was used. # Chi-square was used. Bold form indicates a statistically significant difference ($p < 0.05$).

In the PPT group, the number of teeth persistent in the oral cavity ranged from one to eight. The mean was 1.56 (SD = 2.01).

Both studied SNPs were consistent with the Hardy-Weinberg Equilibrium: HWE $\chi^2 = 2.07$ for the rs5275 and HWE $\chi^2 = 0.666$ for rs689466.

The genotype and allele distributions according to the PPT group and control group are presented in Table 3. The genotype distribution was associated with PPT in the co-dominant model comparing TC versus TT ($p = 0.006$; OR = 0.28, CI 95% = 0.11–0.71) for the SNP rs5275. The individuals that carry two T alleles (TT) compared with individuals that carry at least one C allele (C + TC) had an almost three times higher chance of presenting with PPT ($p = 0.012$; OR = 2.99, CI 95% = 1.28 to 6.95—recessive model) also for the SNP rs5275.

For the SNP rs689466, a statistically significant difference was not observed in any of the models: allele distribution genotype distribution in the co-dominant and in the recessive models ($p > 0.05$).

Haplotypes of the two SNPs were analyzed and are presented in Table 4. The haplotype C-A for the SNPs rs5275 and rs689466, respectively, was more frequent in the control group and was significantly associated with PPT ($p = 0.042$).

Table 3. Genotype and allele distribution according to PPT and controls.

SNP	Genotype	Control n (%)	PPT n (%)	p-Value	OR (CI 95%)
rs689466 (−1195 G/A)	AA	26 (57.8)	26 (54.1)		Reference
	GA	17 (37.8)	20 (41.7)	0.706	1.17 (0.51–2.76)
	GG	2 (4.4)	2 (4.2)	>0.999	1.00 (0.14–6.75)
	A	69 (76.6)	72 (75.0)		Reference
	G	21 (23.3)	24 (25.0)	0.790	1.09 (0.57–2.13)
rs5275 (+665 T/C)	TT	12 (26.7)	25 (52.1)		Reference
	TC	30 (66.7)	18 (37.5)	0.006	0.28 (0.11–0.71)
	CC	3 (6.6)	5 (10.4)	0.782	1.25 (0.29–6.31)
	T	54 (60.0)	68 (70.8)		Reference
	C	36 (40.0)	28 (29.2)	0.098	0.67 (0.36–1.23)

Note: OR means odds ratio; CI means confidence interval. Bold form indicates a statistically significant difference ($p < 0.05$).

Table 4. Haplotype association analysis between controls and PPT groups.

Haplotype	Frequency		p-Value
	Control	PPT	
rs5275-rs689466			
T-G	0.387	0.392	0.836
T-A	0.816	0.784	0.885
C-A	0.653	0.450	0.042
C-G	0.245	0.156	0.271

Note: Bold form indicates a statistically significant difference ($p < 0.05$).

4. Discussion

The eruption of both primary and permanent teeth is a physiological process during childhood; however, the time at which a primary tooth exfoliates and a tooth erupts into the oral cavity varies according to each child [3]. Although some systemic and local factors have been associated with PPT, the fact that the majority of the cases are idiopathic [4] suggests that genetic factors can influence the presence of PPT. In fact, in recent decades, some studies have attempted to investigate different conditions associated with tooth eruption disturbances. The genetic etiology behind a primary failure of eruption, which is a rare disorder defined as incomplete tooth eruption despite the presence of a clear eruption pathway, has been explored by some research groups. A systematic review pooled and critically revised some studies and their results. The authors identified that a total of 51 different variations of the *PTH1R* (parathyroid hormone 1 receptor) gene were associated with the primary failure of eruption [12]. More recently, some studies have also raised the suggestion that the mild forms of tooth eruption alterations, such as delayed tooth eruption with or without PPT, also have a genetic background involved in its etiology [4,13–15]. Variations (SNPs) in genes such as the receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) [13] and Matrix metalloproteinases 8 (MMP8) [14] could be involved in this common condition. Since all cases of tooth agenesis (excluding third molars agenesis) were excluded from our study, it is worth mentioning that all PPT cases also present with the delayed permanent tooth eruption of its successor. Therefore, in the present study, we investigated if common SNPs in *COX2* are involved in PPT associated with delayed permanent tooth eruption risk.

SNPs can be used as genetic markers to detect an association between a gene and a disease [7]. In our study, we were searching for possible candidate genes and SNPs for PPT, as the understanding of the genetic mechanisms involved in tooth eruption is important for dentists, especially orthodontists and pediatric dentists. In our study, we decided then to investigate a novel gene once we hypothesized that *COX2* could be involved in a higher risk of PPT due to its role in the resorption process. Primary root resorption and bone resorption and remodeling are required for the eruption of the majority of permanent teeth. Root

resorption has a regulation similar to bone resorption, and both processes share the same molecular background. The main biological difference between root and bone is that bone undergoes constant physiological renovation, whereas, in teeth, the only resorption that is physiological is the one that occurs in primary teeth [16,17]. Some studies investigated the mechanism of root resorption and found that the process is similar to bone resorption [16,18]. Additionally, odontoclasts, cementoclasts, and osteoclasts share similar characteristics, a similar gene expression profile, and mineralized-tissue-resorbing activity [16]. *COX2* plays a well-known role in bone resorption. Some studies showed that during orthodontic tooth movement, *COX2* is expressed and plays an important role. *COX2* is involved in tooth movement during orthodontic treatment through alveolar bone remodeling resorption processes [19,20]. Both clinical and in vitro experiments showed that *COX2* is expressed by human periodontal ligament cells [20,21]. The periodontal ligament cells of primary teeth also express *COX2*. A study comparing the periodontal ligament of human primary and permanent teeth observed that primary teeth had higher *COX2* expression and a lower expression of OPG. The authors concluded that the more intense immunoreaction to *COX2* and the occurrence of clastic cells and active macrophages might indicate that proinflammatory cytokines are present in the periodontal ligament, stimulating a down-regulation of OPG (Osteoprotegerin) and an up-regulation of RANKL, and activating resorption of tooth tissues [6]. RANKL signaling regulates osteoclast formation, activation, and survival in normal bone modeling and remodeling, while OPG protects bone from excessive resorption by binding to RANKL and preventing it from binding to RANK (receptor activator of NF- κ B) [22].

Although the *COX2* gene is highly polymorphic and many SNPs have been identified until now (www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/) (1 July 2022), only a few SNPs have been associated with clinical conditions so far. In our study, we found that the SNP rs5275 in *COX2* and the haplotype C-A in rs5275-rs689466 could be involved in a higher risk to present PPT. The rs5275 is an SNP located within the 3' UTR region (untranslated region). The post-transcriptional regulation of *COX2* is dependent, in part, on sequences within the 3' UTR of the *COX2* mRNA (messenger RNA). Therefore, the rs5275 is supposed to affect mRNA stability and/or translation efficiency [23]. A meta-analysis performed pooling studies that investigated the SNP rs5275 and periodontitis, and an association of this SNP with periodontal disease was observed [24]. Although periodontal disease and PPT are different conditions, the results observed in the meta-analysis support the role of rs5275 SNP in alveolar bone/tooth resorption. Bioinformatics showed that the SNP rs689466 creates a c-MYB binding site, which results in higher transcriptional activity of the *COX2* gene [25]. In our study, this SNP was associated with PPT only in the haplotype analysis. These results suggest that it is the SNP rs5275 that influences *COX2* promoter activity in the context of PPT.

Our study has some weaknesses and strengths. This is one of the first studies to explore genes involved in PPT. However, it is important to highlight that our study is not a population-based study large enough to have sufficient power to detect small associations. Furthermore, because only a few SNPs in the *COX2* gene have a minor allele frequency higher than 20%, we were not able to select SNPs that represent the majority of the sequence variations of the gene. We emphasize that our findings must be replicated in independent study groups.

Briefly, our results support the hypothesis that common SNPs in the *COX2* signaling pathway may act as potential predictors of PPT risk associated with delayed permanent tooth eruption. With our growing knowledge of SNPs and their involvement in different conditions, we will be able to identify children at a higher risk for oral conditions.

5. Conclusions

Our study demonstrated that a single nucleotide polymorphism rs5275 and a haplotype in the gene encoding *COX2* are associated with persistent primary tooth and delayed eruption of the permanent successor tooth.

Author Contributions: Conceptualization, E.C.K., F.B.-F., M.A.H.d.M.-O. and C.K.; methodology, S.D.H., C.P.P. and E.P.; software, F.B.-F.; validation, S.D.H., L.R. and E.P.; formal analysis, E.C.K., P.P. and C.P.L.; investigation, S.D.H., C.P.P. and E.P.; resources, P.P., C.K. and M.A.H.d.M.-O.; data curation, E.C.K. and C.K.; writing—original draft preparation, E.C.K.; writing—review and editing, E.C.K., F.B.-F., M.A.H.d.M.-O., E.P., S.D.H., C.P.P., C.K., P.P., L.R. and C.P.L.; visualization, E.C.K., L.R. and P.P.; supervision, E.C.K. and M.A.H.d.M.-O.; project administration, E.C.K. and C.K.; funding acquisition, E.C.K. and C.K. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior—Brasil (CAPES)—Finance Code 001 and Alexander-von-Humboldt-Foundation (Küchler/Kirschneck accepted in 4 July 2019).

Institutional Review Board Statement: The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, and approved by the Institutional Review Board from the University of Regensburg (protocol code 19-1549-101 an 13 November 2019).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: Data are available from the corresponding author upon reasonable request.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Marks, S.C., Jr.; Gorski, J.P.; Wise, G.E. The mechanisms and mediators of tooth eruption—models for developmental biologists. *Int. J. Dev. Biol.* **1995**, *39*, 223–230. [PubMed]
2. Harokopakis-Hajishengallis, E. Physiologic root resorption in primary teeth: Molecular and histological events. *J. Oral Sci.* **2007**, *49*, 1–12. [CrossRef] [PubMed]
3. Aktan, A.M.; Kara, I.; Sener, I.; Bereket, C.; Celik, S.; Kirtay, M.; Ciftçi, M.E.; Arici, N. An evaluation of factors associated with retained primary teeth. *Eur. J. Orthod.* **2012**, *34*, 208–212. [CrossRef] [PubMed]
4. Xavier, T.A.; Madalena, I.R.; da Silva, R.A.B.; da Silva, L.A.B.; Silva, M.J.B.; De Rossi, A.; Küchler, E.C.; Fukada, S.Y. Vitamin D deficiency is a risk factor for delayed tooth eruption associated with retained primary tooth. *Acta Odontol. Scand.* **2021**, *79*, 600–605. [CrossRef] [PubMed]
5. Tazawa, R.; Xu, X.M.; Wu, K.K.; Wang, L.H. Characterization of the genomic structure, chromosomal location and promoter of human prostaglandin H synthase-2 gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1994**, *203*, 190–199. [CrossRef]
6. Cordeiro, M.M.R.; Santos, B.Z.; Reyes-Carmona, J.F.; Figueiredo, C.P. Primary teeth show less protecting factors against root resorption. *Int. J. Paediatr. Dent.* **2011**, *21*, 361–368. [CrossRef] [PubMed]
7. Teama, S. DNA polymorphisms: DNA-based molecular markers and their application in medicine. In *Genetic Diversity and Disease Susceptibility*; IntechOpen: London, UK, 2018; pp. 25–40.
8. Little, J.; Higgins, J.P.; Ioannidis, J.P.; Moher, D.; Gagnon, F.; von Elm, E.; Khoury, M.J.; Cohen, B.; Davey-Smith, G.; Grimshaw, J.; et al. Strengthening the Reporting of Genetic Association studies (STREGA)—an extension of the STROBE statement. *Genet. Epidemiol.* **2009**, *33*, 581–598. [CrossRef] [PubMed]
9. Nolla, C.M. The development of permanent teeth. *J. Dent. Child.* **1960**, *27*, 254–266.
10. Zirck, M.; Zoeller, J.E.; Lentzen, M.P.; Bergeest, L.; Buller, J.; Zinser, M. Comparison of two established 2D staging techniques to their appliance in 3D cone beam computer-tomography for dental age estimation. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 9024. [CrossRef]
11. Küchler, E.C.; Tannure, P.N.; Falagan-Lotsch, P.; Silva Lopes, T.; Granjeiro, M.J.; Amorim, L.M. Buccal cells DNA extraction to obtain high quality human genomic DNA suitable for polymorphism genotyping by PCR-RFLP and Real-Time PCR. *J. Appl. Oral Sci.* **2012**, *20*, 467–471. [CrossRef] [PubMed]
12. Hanisch, M.; Hanisch, L.; Kleinheinz, J.; Jung, S. Primary failure of eruption (PFE): A systematic review. *Head Face Med.* **2018**, *14*, 5. [CrossRef] [PubMed]
13. Arid, J.; Xavier, T.A.; da Silva, R.A.B.; de Rossi, A.; da Silva, L.A.B.; de Queiroz, A.M.; Galo, R.; Antunes, L.A.A.; Silva, M.J.B.; Antunes, L.S.; et al. RANKL is associated with persistent primary teeth and delayed permanent tooth emergence. *Int. J. Paediatr. Dent.* **2019**, *29*, 294–300. [CrossRef] [PubMed]
14. Evangelista, S.S.; Arid, J.; Vasconcelos, K.R.F.; Cruz, G.V.; Dutra, A.L.T.; da Silva, L.A.B.; Silva, R.A.B.; Nelson-Filho, P.; Vieira, A.R.; Queiroz, A.M.; et al. Association between genetic polymorphisms in metalloproteinases of the matrix and delayed tooth emergence: A cross-sectional study. *J. Adv. Oral Res.* **2019**, *10*, 91–96. [CrossRef]
15. Madalena, I.R.; Reis, C.L.B.; Oliveira, D.S.B.; Pechariki, G.D.; Trevilatto, P.C.; Andrades, K.M.R.; Carelli, J.; Silva, V.L.B.D.; Baratto-Filho, F.; Küchler, E.C.; et al. Lack of association between delayed tooth emergence and single nucleotide polymorphisms in estrogen receptors. *Braz. Dent. J.* **2021**, *32*, 107–114. [CrossRef]
16. Hasegawa, T.; Kikui, T.; Takeyama, S.; Yoshimura, Y.; Mitome, M.; Oguchi, H.; Shirakawa, T. Human periodontal ligament cells derived from deciduous teeth induce osteoclastogenesis in vitro. *Tissue Cell* **2002**, *34*, 44–51. [CrossRef]

17. Linsuwanont, B.; Takagi, Y.; Ohya, K.; Shimokawa, H. Expression of matrix metalloproteinase-9 mRNA and protein during deciduous tooth resorption in bovine odontoclasts. *Bone* **2002**, *31*, 472–476. [CrossRef]
18. Low, E.; Zoellner, H.; Kharbanda, O.P.; Darendeliler, M.A. Expression of mRNA for osteoprotegerin and receptor activator of nuclear factor kappa B ligand (RANKL) during root resorption induced by the application of heavy orthodontic forces on rat molars. *Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop.* **2005**, *128*, 497–503. [CrossRef]
19. Vansant, L.; de Llano-Pérula, M.C.; Verdonck, A.; Willems, G. Expression of biological mediators during orthodontic tooth movement: A systematic review. *Arch. Oral Biol.* **2018**, *95*, 170–186. [CrossRef]
20. Mayahara, K.; Kobayashi, Y.; Takimoto, K.; Suzuki, N.; Mitsui, N.; Shimizu, N. Aging stimulates cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E 2 production in human periodontal ligament cells after the application of compressive force. *J. Periodontol Res.* **2007**, *42*, 8–14. [CrossRef] [PubMed]
21. Kùchler, E.C.; Schröder, A.; Corso, P.; Scariot, R.; Spanier, G.; Proff, P.; Kirschneck, C. Genetic polymorphisms influence gene expression of human periodontal ligament fibroblasts in the early phases of orthodontic tooth movement. *Odontology* **2019**, *108*, 493–502. [CrossRef] [PubMed]
22. Foyce, B.F.; Xing, L. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Arch. Biochem. Biophys.* **2008**, *15*, 139–146.
23. Cok, S.J.; Morrison, A.R. The 3'-untranslated region of murine cyclooxygenase-2 contains multiple regulatory elements that alter message stability and translational efficiency. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 23179–23185. [CrossRef] [PubMed]
24. Prakash, G.; Umar, M.; Ajay, S.; Bali, D.; Upadhyay, R.; Gupta, K.K.; Dixit, J.; Mittal, B. COX-2 gene polymorphisms and risk of chronic periodontitis: A case-control study and meta-analysis. *Oral Dis.* **2015**, *21*, 38–45. [CrossRef]
25. Zhang, X.; Miao, X.; Tan, W.; Ning, B.; Liu, Z.; Hong, Y.; Song, W.; Guo, Y.; Zang, X.; Shen, Y.; et al. Identification of functional genetic variants in cyclooxygenase-2 and their association with risk of esophageal cancer. *Gastroenterology* **2005**, *129*, 565–576. [CrossRef] [PubMed]