

**LUIZA FOLTRAN DE AZEVEDO**

**Aspectos sociocomportamentais e biológicos na determinação  
do risco à cárie dentária em escolares de 12 anos  
em uma escola particular de Curitiba**

**CURITIBA**

**2005**

**LUIZA FOLTRAN DE AZEVEDO**

**Aspectos sociocomportamentais e biológicos na determinação  
do risco à cárie dentária em escolares de 12 anos  
em uma escola particular de Curitiba**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia, Área de Concentração Estomatologia.

**Orientadora: Profa. Dra. Paula Cristina Trevilatto**

**Co-orientador: Prof. Dr. Fábio Rueda Faucz**

**CURITIBA**

**2005**



## **DEDICO**

Ao meu marido, Rubens, pelo apoio, incentivo e confiança. Quando duas pessoas se amam, elas não se submetem e não se dominam, apenas se completam. Obrigada por confiar e acreditar na minha capacidade. Binho, as minhas conquistas pertencem também a você.

Ao meu pai e minha mãe, Luiz e Célia, pela presença constante, amor e dedicação. A educação que vocês me ensinaram e a proteção e cuidados que me transmitiram fizeram de mim uma pessoa segura e determinada. Os seus abraços sempre abertos são uma fortaleza, que sempre me fizeram ver o mundo com olhos otimistas. Vocês são exemplo de vida, de força. Amo vocês.

Ao meu irmão Lúcio e minha cunhada Fabíola, pela alegria, desprendimento e doação. Admiro a preocupação de vocês, a capacidade de ajudar qualquer um, a qualquer momento. Vocês são iluminados, maravilhosos e admiráveis. A presença de vocês e a amizade me tornam uma pessoa privilegiada.

À minha irmã Paula e meu cunhado Rogério, pela alegria, amor e companhia. O sorriso largo de vocês alegra as pessoas. Vocês são um elo de união, estão sempre aproximando as pessoas, encontrando maneiras de estarmos sempre por perto. Vocês foram um presente na minha vida.

## **AGRADECIMENTOS ESPECIAIS**

A Profa. Dra. Paula Cristina Trevilatto, que mais que orientação me mostrou muito conhecimento, nunca me deixou desistir e sempre incentivou minhas atitudes. As palavras amigas em momentos difíceis foram importantes para que meus objetivos fossem alcançados. Admiro sua capacidade intelectual e sua força de conquista. Agradeço sua dedicação e apoio para que eu chegasse até este momento

Ao Prof. Dr. Fábio Rueda Faucz, que muito mais do que um co-orientador, foi para mim um exemplo como pessoa e mestre. Sua paciência e dedicação com tudo aquilo que lhe é solicitado, com as palavras de apoio e seu alto astral nunca me fizeram desistir dos meus objetivos. Obrigada por compartilhar seus conhecimentos, e pelas palavras de apoio e encorajamento.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus, que nunca me abandonou, me mostrando o caminho de luz nos momentos de escuridão, e me dando oportunidades especiais na vida.

À Pontifícia Universidade Católica do Paraná, pela oportunidade de realizar este Curso de Mestrado, colaborando com meu desenvolvimento profissional.

Aos colegas do mestrado Acir, Ana Cláudia, José Antônio, Larissa, Lúcia, Magna, Melissa e Tatiana, agradeço pela amizade, pela ajuda, pelos momentos que passamos juntos e pelos conhecimentos que dividimos.

Ao professor João Armando, pelo carinho e atenção na realização deste trabalho.

Meu agradecimento a todos os professores do programa de Pós-graduação em Odontologia, Área de Concentração em Estomatologia da PUCPR, Adilson Soares Lima, Maria Ângela Naval Machado, Wilson Denis, Marina Ribas, Paulo Henrique Couto, Beatriz Helena S. França, Simone Tetu Moysés, Samuel Jorge Moysés, Júlio César Bisinelli, Ana Maria Grégio e aos queridos professores de graduação, que contribuíram muito em minha formação profissional e são referências de experiência, dedicação e competência.

Aos professores de áreas conexas, pelo convívio e contribuições para a formação neste curso de mestrado.

Aos amigos e familiares, que pacientemente dividiram os momentos pelos quais vivi, neste período de curso de mestrado, agradeço pelo incentivo e apoio.

À vó Margarida, agradeço pelas palavras e orações de apoio. À memória da tia Maria, que se aqui estivesse, vibraria por esta vitória.

Às secretárias Neide Reis Borges, Flávia Roberta dos Reis e aos funcionários Diamir, Marcos e Cleomar do CAT, pela dedicação aos alunos, pela paciência e pela disponibilidade; e aos demais funcionários da Clínica de Odontologia da PUCPR, pelo apoio e acolhimento, contribuindo para a realização deste trabalho, direta ou indiretamente.

Ao Coordenador do curso de Pós-Graduação em Odontologia na PUCPR, Prof. Dr. Sérgio Vieira, meu agradecimento pela atenção sempre dispensada.

Ao professor Sérgio Aparecido Ignácio, pela genialidade e competência na realização da análise estatística deste estudo.

A todos que de alguma maneira auxiliaram para a realização deste trabalho.

Aprender é a única coisa que a mente nunca se cansa,  
nunca tem medo e nunca se arrepende.

Leonardo da Vinci

# Sumário

---

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	ix
<b>ABSTRACT</b> .....	x
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	01
<b>2. PROPOSIÇÃO</b> .....	05
<b>3. CAPÍTULO 1</b> .....	07
<b>4. CAPÍTULO 2</b> .....	24
<b>5. CONCLUSÃO</b> .....	45
<b>6. REFERÊNCIAS</b> .....	47
<b>7 ANEXOS</b> .....	54
7.1. Material e Método detalhado.....	55
7.2. Análise Estatística detalhada.....	60
7.3. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	69
7.4. Questionários.....	70
7.4.1. Questionário I.....	70
7.4.2. Questionário II.....	71
7.4.3. Questionário III - ficha de avaliação.....	72
7.5. Carta de aceite do Comitê de Ética em Pesquisa .....	73
7.6. Normas das revistas para onde os artigos serão enviados.....	74
7.6.1. <i>Revista de Clínica e Pesquisa Odontológica</i> .....	74
7.6.2. <i>Acta Odontologica Scandinavica</i> .....	81

## RESUMO

A cárie dentária é uma doença infecciosa e de etiologia multifatorial, relacionada à microbiota, à dieta e ao hospedeiro. O número de indivíduos acometidos pela cárie dentária tem reduzido sobremaneira, mas ainda é substancial, mesmo em áreas favorecidas socioeconomicamente e abastecidas com água fluoretada. A saliva apresenta fatores determinantes da cárie dentária, como proteínas que podem modular a microbiota bucal. A lactoferrina (LF) é um exemplo de proteína que possui atividade antibacteriana, inclusive contra *Streptococcus mutans*. **Objetivo:** O objetivo do presente trabalho foi investigar a associação de fatores sociocomportamentais e biológicos com o risco/atividade de cárie dentária em escolares de 12 anos de idade. **Material e Métodos:** Cento e treze (113) escolares de 12 anos de idade, caucasóides, não-aparentados, de ambos os sexos, estudantes de uma escola particular de Curitiba-PR, foram categorizados em baixo (grupo 1, n = 51) e alto (grupo 2, n = 62) risco/atividade de cárie dentária, por meio do índice de dentes cariados, perdidos e restaurados (CPO-D). Os dados acerca de aspectos socioeconômicos e hábitos de saúde bucal (frequência de escovação, uso de fio dental, uso de flúor, frequência de visitas ao dentista e dieta) foram extraídos de questionários. Para medir a presença de biofilme, foi utilizado o índice de placa visível (IPV). Os parâmetros salivares analisados foram pH, capacidade tampão e fluxo salivar. Para a análise do polimorfismo genético no éxon 2 do gene da LF, o DNA foi obtido de 110 escolares (baixo risco, n = 48 e alto risco, n = 62) a partir de um bochecho com solução de glicose a 3%, seguido de raspagem da mucosa jugal. Após a purificação do DNA, procedeu-se a técnica de PCR/SSCP (Reação em Cadeia da Polimerase/Análise de Polimorfismo de Conformação de Fita Simples) para a evidenciação do polimorfismo. **Resultados:** Em relação a aspectos socioeconômicos e hábitos de saúde bucal, os resultados mostraram que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos. A presença de biofilme apresentou tendência de associação ao grupo de alto risco/atividade de cárie, porém não estatisticamente significativa ( $p = 0,08$ ). Quanto aos aspectos salivares, o fluxo salivar diminuído relacionou-se à maior atividade de cárie ( $p = 0,00$ ). Não houve diferença significativa nas frequências alélicas ( $p = 0,07$ ) e genotípicas ( $p = 0,19$ ) do polimorfismo entre os grupos. **Conclusão:** Concluiu-se que apenas o parâmetro fluxo salivar correlacionou-se à experiência de cárie dentária em um grupo homogêneo de crianças de 12 anos de idade. A presença de biofilme e do alelo 2 do polimorfismo estudado correlacionaram-se fracamente com o risco/atividade de cárie na população estudada.

**Palavras-chave:** cárie dentária; polimorfismo genético; lactoferrina

## ABSTRACT

Dental caries is an infectious disease, with a multifactorial etiology, determined by three factors: microbiota, diet and host. The number of people who present caries has been reducing, but it is still high even in areas with good socioeconomical level and water fluoridation. One of the determinants of dental caries is saliva. Saliva contains a large number of proteins that can modulate microbiota, like lactoferrin (LF), which shows antibacterial activity. *Objective:* The aim of this study was to compare socioeconomic factors, oral health hygiene (tooth brushing and use of dental floss), use of fluoride, visit to dentist, diet, dental plaque index, salivary parameters and genetic aspects between groups of low and high risk/activity of dental caries. *Material and Methods:* One hundred-thirteen (113) 12-year-old, Caucasian, non-related, both-sex students of a private school in Curitiba-PR, were categorized in low (group 1, n = 51) and high (group 2, n = 62) risk/activity of dental caries by DMF-T index. Data about socioeconomic aspects and oral health habits, like tooth brushing, use of dental floss, use of fluoride, diet and visit to dentist, were taken from questionnaires. For the presence of biofilm, the Visible Plaque Index (VPI) was used. The following salivary parameters were analyzed and compared between the groups: pH, salivary buffer and flow. To investigate the genetic polymorphism in exon 2 of LF gene, DNA was obtained from 110 students (group 1, n = 48 and group 2, n = 62) through a mouthwash with 3% glucose, followed by scraping of oral mucosa. After DNA purification, PCR/SSCP (Polymerase Chain Reaction/Single Strand Conformational Polymorphism) technique was used. *Results:* Socioeconomic aspects and oral health habits showed no statistically significant differences between the low and high risk groups. The presence of biofilm showed a tendency of association with the high risk group, but not statistically significant ( $p = 0.08$ ). In relation to salivary aspects, decreased salivary flow was associated with high dental caries experience ( $p = 0.00$ ). There was no statistically significant difference in allele ( $p = 0.07$ ) and genotype ( $p = 0.19$ ) frequencies of the study polymorphism between the low and high risk groups. *Conclusion:* It was concluded that salivary flow was associated with experience of dental caries in 12-year-old students. The presence of biofilm and allele 2 of the study polymorphism was weakly related to risk/activity of dental caries in the population studied.

**Keewords:** caries; lactoferrin; polymorphism; genotype; allele

# Introdução

---

## 1. INTRODUÇÃO

A partir da década de 70 vem ocorrendo uma expressiva redução na prevalência da cárie dentária infantil na maioria dos países desenvolvidos (PETERSSON & BRATTHALL, 1996; KÖNIG, 2004; MARTHALER, 2004). Esse fato também tem sido observado em estudos epidemiológicos nacionais (SOUZA, 1996; PERES et al., 2000). A redução da cárie dentária ocorre acompanhada de um fenômeno conhecido como polarização da doença, caracterizado pela concentração dos mais altos índices de cárie em pequenos grupos (BURT, 1994; DOWNER, 1994). Os fatores associados ao fenômeno de queda dos níveis da doença estão principalmente relacionados a aspectos socioeconômicos e comportamentais (RESINE & PSOTER, 2001; JOHNSON, 2004), à maior disponibilidade de fluoretos na água de abastecimento (KRASSE, 1996; KÖNIG, 2004), à presença de flúor nos dentífrícios (MILGRON, 2001; MARTHALER, 2004) e ao maior grau de instrução sobre higiene bucal (MILGRON, 2001; RESINE & PSOTER, 2001). Apesar dessa redução, grupos de crianças continuam apresentando alta atividade de cárie (KASTE et al., 1996), principalmente em países pouco desenvolvidos (KÖNIG, 2004).

A cárie é uma doença infecciosa, de etiologia multifatorial (ISMAIL et al., 2001), resultante de um desequilíbrio entre os processos de desmineralização e remineralização do esmalte (FEJERSKOV, 1998; FEATHERSTONE, 2004), e não representa um processo único, mas uma sucessão de eventos em determinado tempo (NARIYAMA et al., 2004). As lesões cariosas podem aparecer em um indivíduo se os pré-requisitos microrganismos cariogênicos (ADJI et al., 2002; CONRADS, 2002) e carboidratos fermentáveis (BURT & PAI, 2001) estiverem presentes em um hospedeiro suscetível (SINGH et al., 2002), durante um determinado período de tempo na cavidade bucal.

Ao longo dos anos, pesquisas revelaram uma multiplicidade de fatores biológicos ou determinantes que podem influenciar a cariogenicidade do biofilme (KIDD & FEJERSKOV, 2004). Uma alta exposição a carboidratos fermentáveis pode modificar a composição do biofilme, favorecendo sua cariogenicidade (CURY et al., 2000; NOBRE dos SANTOS et al., 2002). A composição e a secreção da saliva parecem influenciar o ambiente intrabucal, protegendo os tecidos (VAN NIEUW AMERONGEN & VEERMAN, 2002; FEJERSKOV, 2004). Um fluxo constante de saliva elimina eficazmente microrganismos da cavidade bucal e um fluxo reduzido (hipossalivação) leva a uma proliferação de bactérias, seguida de inflamação gengival (ATKINSON & BAUM, 2001; TENOVUO, 2002).

A saliva apresenta um sistema de tamponamento para a rápida neutralização de ácidos (LEONE & OPPNHEIM 2001) e diversas proteínas com ação antimicrobiana, como a lisozima, a lactoperoxidase, imunoglobulinas, aglutininas, mucinas e a lactoferrina ( VAN NIEUW AMERONGEN & VEERMAN, 2002; VAN NIEUW AMERONGEN et al., 2004). Em nível molecular há redundância funcional dessas diferentes proteínas (LEONE & OPPNHEIM, 2001; JENTSCH et al., 2004), o que denota sua relevância biológica.

A lactoferrina (LF) é uma proteína ligada ao ferro, pertencente ao grupo das metaloproteínas (FINE et al., 2002) e das transferrinas (BAKER & BAKER, 2004). O tecido normal humano expressa variada quantidade de lactoferrina (TENG, 2002; LIU et al., 2003) em diferentes órgãos e em diferentes condições fisiológicas (PANELLA et al., 1991). A maior concentração de LF é encontrada no colostro (WARD & CONNELLY, 2004) e, em menor quantidade, em fluidos do organismo, como a saliva, a lágrima, o sêmen, o suor, o leite e secreções nasais (TENG, 2002; VAN VEEN et al., 2002; WARD & CONNELLY, 2004). A LF apresenta diversas funções biológicas: antiviral, antifúngica, antiinflamatória e antibacteriana (BROCK, 2002). O efeito antiviral, está relacionado à atuação contra o citomegalovírus, o vírus da herpes simples e o vírus da imunodeficiência humana (HIV) (BERKHOUT et al., 2002). A LF inibe a *Candida albicans*, que normalmente está presente em pacientes portadores de próteses odontológicas (LUPETTI et al., 2003). A LF pode regular diretamente a resposta inflamatória (SINGH et al., 2002), ligando-se a endotoxinas, como o lipopolissacarídeo (LPS), mediador central da resposta inflamatória em infecções bacterianas (BROCK, 2002; VAN VEEN et al., 2002). A LF estimula a produção de citocinas (VAN VEEN et al., 2002), que são responsáveis por coordenar a resposta celular humana, atuando na maturação e ativação de macrófagos e neutrófilos, podendo sua deficiência causar supressão no sistema imunológico, e seu excesso, uma exacerbada resposta imune (SON et al., 2002). Os leucócitos polimorfonucleares são ricos em LF (PANELLA et al., 1991), que agem como fator de proteção contra diversas infecções (ORSI, 2004; WARD & CONNEELY, 2004). A ação antibacteriana da LF é atribuída à propriedade de quelar o íon ferro, privando, assim, os microrganismos de seu elemento essencial (BAKER & BAKER, 2004; VAN NIEUW AMERONGEN et al., 2004; SINGH, 2004).

A LF possui efeito bactericida contra vários microrganismos, inclusive o *Streptococcus mutans* (OHO et al., 2002; FRANCESCA et al., 2004), o que pode fornecer subsídios para a importância dessa molécula na etiopatogênese da cárie dentária. A LF pode modular a agregação e o desenvolvimento do biofilme dental, inibindo a adesão de *S. mutans* (OHO et al., 2002;

FRANCESCA et al., 2004). Uma associação significativa foi encontrada entre o índice de superfícies cariadas e a concentração de lactoferrina salivar (SIKORSKA et al., 2002).

O gene da lactoferrina apresenta 17 éxons, com comprimento total de 24,5 kb. Está localizado no cromossomo humano 3, na posição 3p21 (KIM et al., 1998).

Polimorfismo genético é uma variação gerada por uma mutação, cuja frequência do alelo mais raro é maior ou igual a 1 %. Polimorfismos no gene da LF têm sido descritos (LIU et al., 2002) e relacionados a diversas patologias, como a doença de Parkinson (BORIE et al., 2002), o câncer de mama (PENCO et al., 1999), a leucemia (LIU et al., 2002) e a periodontite agressiva localizada (VELLYAGOUNDER et al., 2003). Um polimorfismo (A/G) (rs no. 1126478), no segundo éxon do gene da lactoferrina, é responsável pela substituição de um aminoácido lisina (Lys) por arginina (Arg), na posição 29. A variante contendo o resíduo Lys esteve associada a uma maior atividade antibacteriana em *S. mutans* (VELLYAGOUNDER et al., 2003).

Polimorfismos funcionais em regiões gênicas que alteram aminoácido podem modificar as proteínas correspondentes, modulando sua função, exacerbando ou reduzindo sua ação (POCIOT et al., 1992). No entanto, até o momento não há estudos de identificação de polimorfismos no gene da LF, na tentativa de analisar a sua associação com a cárie dentária.

# Proposição

---

## **2. PROPOSIÇÃO**

### *Objetivo geral*

O objetivo do presente estudo foi investigar a associação de fatores sociocomportamentais e biológicos com o risco/atividade de cárie dentária em escolares de 12 anos de uma escola particular de Curitiba-PR.

### *Objetivos específicos*

1. Investigar a associação entre fatores socioeconômicos e o risco/atividade de cárie;
2. Comparar hábitos de saúde bucal entre os grupos alto e baixo risco/atividade de cárie: frequência de escovação, uso de fio dental, uso de flúor, frequência de visita ao dentista e frequência de ingestão de açúcar entre as refeições;
3. Analisar a presença de biofilme e sua associação com o risco/atividade de cárie;
4. Avaliar e comparar parâmetros salivares entre os grupos alto e baixo risco/atividade de cárie: pH, capacidade tampão e fluxo salivar;
5. Investigar se alelos e/ou genótipos específicos do polimorfismo A/G (rs no. 1126478), no segundo éxon do gene da lactoferrina, estão associados a um maior risco/atividade de cárie dentária.

# Capítulo 1

---

**Avaliação de aspectos socioeconômicos, hábitos de higiene bucal e fatores salivares  
na determinação do risco à cárie dentária em escolares de 12 anos em uma escola  
particular de Curitiba/PR**

Luiza Foltran Azevedo<sup>1</sup> Eduardo Silva Arruda<sup>2</sup>, Thatiani Bandeira dos Santos<sup>2</sup>, João Armando Brancher<sup>3</sup>, Sérgio Aparecido Ignácio<sup>4</sup>, Giovana Daniela Pecharki<sup>5</sup>, Fabio Rueda Faucz<sup>6</sup>, Simone Tetu Moysés<sup>7</sup>, Paula Cristina Trevilatto<sup>8</sup>

<sup>1</sup> Aluna de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da PUC-PR – Área de Estomatologia

<sup>2</sup> Alunos de Graduação em Odontologia da PUC-PR

<sup>3</sup> Mestre em Bioquímica, Professor Assistente Nível I da PUC-PR

<sup>4</sup> Doutor em Ciências Florestais pela Universidade Federal do Paraná/UFPR, Professor Titular de Probabilidade Estatística da PUC-PR

<sup>5</sup> Mestre em Odontologia, Área de Concentração em Cariologia pela FOP-UNICAMP, Professora Substituta da UFPR

<sup>6</sup> Doutor em Genética pela Universidade Federal do Paraná, Professor Adjunto I da PUC-PR

<sup>7</sup> Doutora em Epidemiologia e Saúde Pública pela Universidade de Londres, Professora Titular da PUC-PR

<sup>8</sup> Doutora em Biologia Buco-Dental pela Faculdade de Odontologia de Piracicaba/UNICAMP, Professora Adjunta I da PUC-PR

Autor correspondente:

Dra. Paula Cristina Trevilatto  
Pontifícia Universidade Católica do Paraná  
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde  
Pós-graduação em Ciências da Saúde  
Rua Imaculada Conceição, 1155  
80215-901  
Curitiba, PR  
Brazil  
55-41-271-1515, r.2618  
e-mail: [pctrev@yahoo.com.br](mailto:pctrev@yahoo.com.br)

Palavras-chave: cárie dentária; fatores de risco; fluxo salivar.

## RESUMO

O número de indivíduos acometidos pela cárie dentária tem reduzido sobremaneira, mas ainda é substancial mesmo em áreas favorecidas socioeconomicamente e abastecidas com água fluoretada. Identificar fatores de risco para a cárie dentária em diferentes populações pode permitir adequar os cuidados de saúde bucal e re-orientar gastos em prevenção. Cento e treze (113) escolares de 12 anos de idade, caucasóides, não-aparentados, de ambos os sexos, estudantes de uma escola particular de Curitiba-PR, foram categorizados em baixo e alto risco à cárie dentária por meio do índice CPO-D, objetivando comparar aspectos socioeconômicos, hábitos de saúde bucal, dieta, índice de placa e parâmetros salivares. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos baixo e alto risco à cárie dentária em relação a hábitos de higiene bucal (frequência de escovação e uso de fio dental), uso de flúor, dieta, visita ao dentista e classe socioeconômica. A presença de biofilme apresentou uma tendência de associação ao grupo de alto risco à cárie, porém não estatisticamente significativa ( $p = 0,08$ ). Com relação aos aspectos salivares, o fluxo salivar diminuído relacionou-se à maior atividade de cárie ( $p = 0,00$ ). Concluiu-se que o parâmetro fluxo salivar correlacionou-se à presença de cárie dentária em um grupo homogêneo de crianças de 12 anos de uma escola particular de Curitiba-PR.

Estudos têm mostrado uma consistente redução da prevalência e da severidade da cárie dentária nos países desenvolvidos nas últimas décadas (1-3). No Brasil, levantamentos epidemiológicos realizados pelo Ministério da Saúde em 1986 e 1996 sugerem a redução de 53,2% no índice dentes cariados, perdidos e obturados (CPO-D) nesses 10 anos (4-6). Na população infantil, a partir da década de 70, vem ocorrendo significativa redução na prevalência da cárie dentária na maioria dos países desenvolvidos (2,3). Esse fato tem sido também observado no Brasil. Estudos epidemiológicos realizados em diferentes municípios, ao longo da última década, mostraram que, nas regiões Sul e Sudeste, uma expressiva redução da doença vem ocorrendo. Em municípios como Santos (SP) (7), em 1995, e Blumenau (SC) (8), em 1998, 45,4% e 47,39% respectivamente das crianças de 12 anos de idade estavam livres de cárie.

A partir da constatação de queda na prevalência da cárie dentária, muito tem sido discutido quanto aos fatores associados a esse processo, tais como aspectos socioeconômicos e comportamentais. A questão socioeconômica é relevante, pois existem evidências científicas de que, em geral, dentro das sociedades desenvolvidas ou em desenvolvimento, quanto mais baixos os padrões materiais de vida, pior é o nível de saúde da população, independentemente do indicador utilizado. Isto tem sido claramente demonstrado em relação à saúde geral em nível individual (8,10). Associações entre a condição socioeconômica e hábitos de saúde bucal têm sido relatadas (11,12), permitindo concluir que quanto maior o nível socioeconômico, maior é a condição de controle da cárie (hábitos de higiene bucal, alimentares, acesso a cuidado profissional).

A cárie é uma doença infecciosa resultante de um desequilíbrio entre os processos de mineralização e desmineralização do esmalte. Esta se inicia a partir da presença de um biofilme cariogênico, associada a uma dieta inadequada e à deficiência de higiene bucal, levando a perdas irreversíveis dos tecidos dentários (13). Apesar de FEJERSKOV (1998) (14) considerar a cárie dentária como reflexo de uma atividade bacteriana localizada, esta doença não representa um processo único, mas uma sucessão de eventos ocorrendo em determinado tempo. São vários os

fatores determinantes associados à cárie dentária, sendo os de especial importância relacionados à saliva e à colonização/metabolismo dos microrganismos do biofilme dental (15). Com relação aos determinantes salivares, a composição da saliva, bem como a sua disponibilidade, parecem ser fatores relevantes na etiopatogênese e progressão da cárie (16). Um fluxo constante de saliva elimina eficazmente restos alimentares e microrganismos da cavidade bucal, e um fluxo reduzido (hipossalivação) leva a uma proliferação de bactérias, seguida de inflamação da gengiva e de uma rápida deteriorização dos dentes (17). A saliva contém fatores de defesa inatos ou adquiridos, capazes de inibir o crescimento e/ou o metabolismo bacteriano, por meio de diferentes mecanismos (18), como a inibição da aderência bacteriana e da produção de ácido por estreptococos bucais.

Há vários fatores de desequilíbrio na saliva que podem ser avaliados, como o fluxo salivar, a capacidade tampão e o pH. O fluxo salivar representa a quantidade de saliva secretada em determinado tempo. Quanto mais saliva, maior é a proteção contra a cárie (19,20). A capacidade tampão da saliva é a capacidade de modificar o pH ácido do meio para o pH neutro. Se o meio bucal for muito ácido por tempos prolongados, ocorre a desmineralização do esmalte, aumentando o risco e atividade cariogênica (21). O valor do pH é um parâmetro razoavelmente constante. Um indivíduo com elevado pH bucal apresenta repetidas leituras de altos valores. Quando usados em conjunto com outros indicadores de risco à cárie, o fluxo salivar, a capacidade de tamponamento e o pH da saliva podem ser úteis para diagnosticar o potencial de atividade cariogênica e prognosticar o risco à cárie de um indivíduo (20).

A possibilidade de conhecer fatores de risco para a cárie dentária em diferentes populações pode permitir adequar os cuidados de saúde bucal e re-orientar gastos em prevenção, respeitando-se assim o princípio da equidade (23).

O presente estudo teve como objetivo comparar parâmetros salivares e aspectos socioeconômicos e de saúde bucal entre escolares de 12 anos de baixo e alto risco à cárie dentária, em uma escola particular de Curitiba-PR.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### ***Seleção da amostra***

A amostra foi constituída de cento e treze ( $n = 113$ ) escolares de 12 anos de idade, caucasóides, não-aparentados, de ambos os sexos, estudantes de uma escola particular do bairro do Portão, na cidade de Curitiba-PR. Os responsáveis pelos escolares assinaram um termo de consentimento informado, de acordo com as normas do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS) da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUC-PR), conforme a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, aprovado sob registro nº 104.

Escolares foram excluídos quando fumantes, usuários de aparelhos ortodônticos, doentes crônicos, usuários crônicos de antiinflamatórios e de antibióticos nos últimos seis meses.

Os escolares foram diagnosticados de acordo com o índice de dentes cariados perdidos e obturados (CPO-D) (24). Foram considerados cariados os dentes que apresentavam tanto cavitação quanto lesão de mancha branca. Os indivíduos foram divididos em dois grupos:

Grupo 1: Cinquenta e um (51) escolares de baixo risco à cárie dentária (CPO-D = 0);

Grupo 2: Sessenta e dois (62) escolares de alto risco à cárie dentária (CPO-D  $\geq 1$ ).

Os grupos foram assim categorizados devido ao valor do índice CPO-D médio do bairro ser baixo (1,31), conforme levantamento epidemiológico do Ministério da Saúde (25). Além disso, o bairro apresentava população de classe média e era abastecido com água fluoretada. Dessa forma, a região foi considerada de baixo desafio à cárie dentária, sendo que indivíduos que a apresentavam foram relatados de alto risco à cárie.

Os examinadores foram previamente calibrados. Para esse treinamento, empregou-se a técnica do consenso (24). Segundo essa técnica, havendo discordância, os examinadores discutem até chegar em um consenso quanto à interpretação do critério relativo a uma dada condição.

Os exames clínicos foram realizados na própria escola, com o auxílio de iluminação natural, espátula de madeira, gaze e luvas. Não foram realizados exames radiográficos.

Foram respondidos questionários acerca de hábitos dietéticos e de higiene bucal (frequência de escovação e uso de fio dental), uso de flúor, frequência de visita ao dentista e condição socioeconômica (26).

#### *Avaliação da presença de placa*

A presença de biofilme foi evidenciada pelo Índice de Placa Visível (IPV, modificado), após a secagem dos incisivos centrais e laterais superiores (27).

#### **Avaliação dos parâmetros salivares**

##### *Sialometria (Fluxo Salivar)*

Para a coleta de saliva estimulada, os escolares mastigavam durante 6 minutos (min) uma tira de látex de 1 cm<sup>2</sup> (28), sendo que no primeiro minuto a saliva era desprezada. Toda a saliva coletada era depositada em frascos coletores que haviam sido previamente pesados. Após a coleta, os frascos eram fechados hermeticamente e novamente pesados. A diferença de peso antes e após a coleta proporcionava o volume em mililitros (mL) de saliva expelida. Cada 1,0 g de massa de saliva correspondia a 1,0 mL de saliva (29).

##### *Medição de pH*

O pH salivar foi mensurado pelo método comparativo da fita de pH (*Merck*). A fita foi mantida no frasco contendo saliva por 5 min. Após este período a fita era retirada do frasco e colocada ao lado da tabela de cores, cada qual correspondente a um valor de pH.

### *Capacidade de Tamponamento Salivar (CTS)*

A determinação da CTS fez-se por titulometria, medindo-se o volume de ácido láctico 0,1 N necessário para baixar o pH salivar até o valor de 3,9 (22).

### *Análise estatística*

As variáveis comparadas entre os grupos com baixo e alto risco à cárie dentária foram:

1. Hábitos de higiene bucal: frequência de escovação e uso do fio dental (questionário);
2. Uso de flúor (questionário);
3. Frequência de visita ao dentista (questionário);
4. Frequência de ingestão de açúcar entre as refeições (dieta) (questionário);
5. Presença de biofilme dental (análise clínica, IPV);
6. Parâmetros salivares: pH, capacidade tampão e fluxo salivar (análise clinicolaboratorial);
7. Aspectos socioeconômicos: classe socioeconômica [questionário, Critério de Classificação Econômica Brasil (26)].

Diferenças estatisticamente significantes entre os grupos analisados foram acessadas por meio do teste qui-quadrado ( $\chi^2$ ) ao nível de probabilidade  $p \leq 0,05$ . Nos casos em que ocorreram frequências esperadas menores que 5, em tabelas 2X2, utilizou-se, juntamente com o  $\chi^2$ , o teste exato de Fisher. Visando testar se havia diferenças entre os valores médios das variáveis: pH, capacidade tampão e fluxo salivar, em função dos grupos, utilizou-se o teste não-paramétrico U de Mann-Whitney, uma vez que as variáveis não apresentaram distribuição normal em relação aos dois grupos.

## **RESULTADOS**

A população de escolares estudada mostrou-se homogênea no tangente a aspectos socioeconômicos e comportamentais. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os

grupos baixo e alto risco à cárie dentária em relação a hábitos de higiene bucal (frequência de escovação e uso de fio dental), uso de flúor, dieta, visita ao dentista e classe socioeconômica. O índice CPO-D médio da população estudada ( $n = 113$ ) foi de 1,7 (Fig. 1) e no grupo 2 ( $n = 62$ ), de 3,1 (Fig. 2). A presença de biofilme, estimada pelo IPV, apresentou uma tendência de associação ao grupo de alto risco/atividade de cárie, porém não estatisticamente significativa ( $p = 0,08$ ). Com relação a aspectos salivares, apenas o parâmetro fluxo salivar mostrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos alto e baixo risco/atividade de cárie dentária ( $p = 0,00$ ) (Fig. 3).

## DISCUSSÃO

Em estudo epidemiológico de abrangência nacional sobre saúde bucal, realizado em 1986 pelo Ministério da Saúde, detectou-se que a cárie dentária atingia um índice CPO-D de 6,7 aos 12 anos de idade, sendo sua prevalência superior a 90% (4). Essa situação era distanciada da meta preconizada pela OMS para o ano 2000 (CPO-D aos 12 anos de idade menor ou igual a 3,0) (30). Estudo mais recente apontou significativa queda na severidade da cárie aos 12 anos no país, com CPO-D médio de 3,1 e prevalência de 75% (6,24). Ambos os estudos foram realizados apenas em capitais. Em Curitiba, a partir de outubro de 1958, quando foi iniciada a fluoretação da água da estação de tratamento do Tarumã, servindo parte representativa da população da cidade, o Serviço de Higiene Dentária da Secretaria de Saúde Pública do Paraná passou a realizar levantamentos do índice de prevalência de cárie nos pré-escolares e escolares. O CPO-D médio aos 12 anos, em 1958, era de 8,2. Em 1997 e 1998, para uma amostra de 380 escolares de 12 anos de ambos os sexos, sorteados em 24 escolas públicas e privadas, a média do CPO-D foi de 1,81: CPO-D = 1,95 para escolas públicas e CPO-D = 1,54 para escolas privadas (31). Finalmente, o último estudo epidemiológico em Curitiba, conduzido em 2003, mostrou um índice CPO-D médio de 1,27 para esta idade (25).

No presente estudo, a escola particular, na qual a amostra foi selecionada, localizava-se em um bairro de classe média, abastecido com água fluoretada, cujo índice CPO-D médio apresentava valor de 1,31 (25), considerado recomendável pela OMS (24).

O índice CPO-D médio da população de escolares foi de 1,7. Dos escolares analisados, a maioria (55,7%) pertencia à classe média-média, 24% à classe média-alta, 18,6% à classe média-baixa e 1,76% à classe pobre.

Não houve diferenças entre os grupos quanto à frequência de escovação, uso de fio dental e uso de flúor. A grande maioria dos indivíduos dos dois grupos escovava os dentes pelo menos uma vez ao dia (87,6%) e mais da metade dos escolares dos dois grupos não fazia uso do fio dental (57,5%). No grupo de alto risco à cárie (grupo 2) houve dependência entre as variáveis: frequência de escovação e uso do fio dental ( $p = 0,04$ ), indicando que indivíduos que escovavam mais de uma vez ao dia faziam uso de fio dental. Dos escolares dos dois grupos, 62% não faziam uso de flúor.

As visitas ao cirurgião-dentista eram realizadas pelo menos uma vez ao ano por 95,5% dos indivíduos dos dois grupos.

A ingestão de alimentos (salgadinhos, bolacha, lanches) fora das refeições era realizada até três vezes ao dia por 68% dos indivíduos.

Com relação aos parâmetros salivares, não houve associação do pH e da capacidade tampão salivar com o risco à cárie. Observou-se diferença estatística apenas no parâmetro fluxo salivar. Fluxo salivar diminuído relacionou-se à maior atividade de cárie ( $p = 0,00$ ), o que pode estar refletindo a importância da maior remoção mecânica de resíduos alimentares e bactérias potencialmente cariogênicas, assim como a presença aumentada de componentes salivares protetores, como a lactoferrina e a imunoglobulina A (IgA). De fato, um fluxo salivar reduzido está fortemente associado à alta atividade cariogênica, como observada em pacientes diabéticos (32) e submetidos à radioterapia (33), condições que resultam em marcante hipossalivação.

Apesar de a cárie dentária apresentar diversos determinantes etiopatológicos (alguns deles avaliados neste estudo, com distribuição equilibrada entre os dois grupos), o fluxo salivar indubitavelmente correlacionou-se fortemente ao risco à cárie dentária na população estudada, mostrando-se eficaz no diagnóstico de suscetibilidade. Estes resultados apontam para evidências de que a suscetibilidade à cárie em grupos homogêneos (em termos socioeconômicos e comportamentais) esteja relacionada a fatores biológicos individuais do hospedeiro.

Indivíduos com fluxo salivar reduzido devem ser aconselhados a manter padrões aceitáveis de higiene bucal, reduzir a frequência de ingestão de açúcar e, adicionalmente, ser avaliados periodicamente pelo cirurgião-dentista.

Muito embora seja evidente a redução dos índices de cárie de maneira global no Brasil, mesmo em áreas favorecidas socioeconomicamente e abastecidas com água fluoretada, ainda é grande o número de indivíduos que apresentam tal enfermidade.

Programas escolares de diagnóstico de suscetibilidade à cárie dentária devem ser instituídos para a determinação dos fatores de maior predisposição em cada população, visando à identificação de indivíduos de maior risco, cuja conscientização sobre higiene bucal e o acompanhamento individual são desejáveis.

## **AGRADECIMENTO**

Bolsa PIBIC/CNPq.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

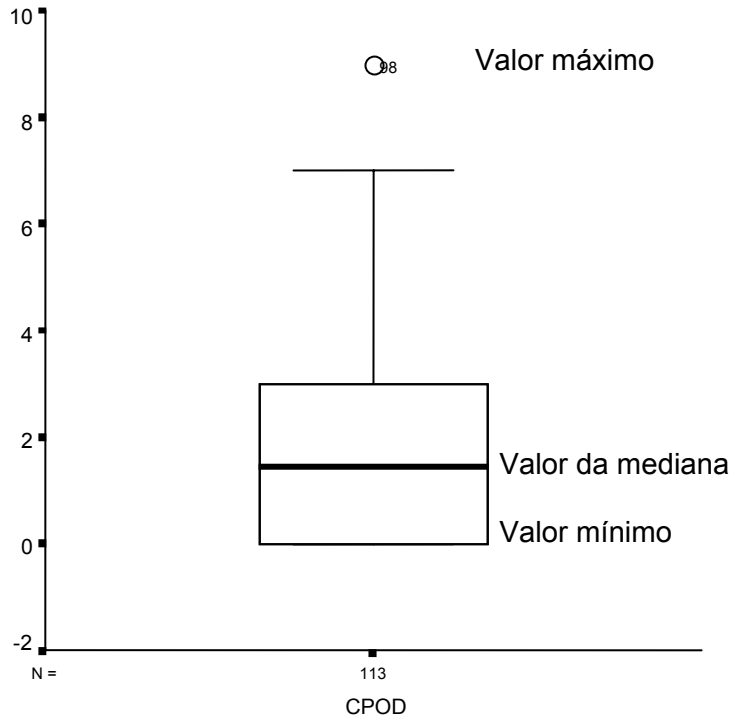
1. Petersson HG, Bratthall D. The caries decline: a review of reviews. *Eur J Oral Sci* 1996; 104:436-43.
2. Burt BA. Trends in caries prevalence in North American Children. *Int Dent J* 1994; 44:403-13.
3. Downer MC. Caries prevalence in the United Kingdom. *Int Dent J* 1994; 44:365-70.

4. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Programas Especiais de Saúde. Divisão Nacional de Saúde Bucal. Levantamento Epidemiológico em Saúde Bucal: Brasil, zona urbana, 1986 Brasília (DF): Centro de Documentação do Ministério da Saúde; 1988.
5. Souza SMD. CPO-D brasileiro aos 12 anos tem redução de 53,22%. J ABO Nacional 1996: 8.
6. Brasil. Projeto SB Brasil. Condições de saúde bucal da população brasileira 2002-2003. Resultados principais. Brasília: MS/Coordenação Nacional de Saúde Bucal. 51p. [Online]. 2004 [citado em 20 jun. 2004]: Disponível em: URL: [http://www.cfo.org.br/download/relatorio\\_SB\\_brasil\\_2003.pdf](http://www.cfo.org.br/download/relatorio_SB_brasil_2003.pdf).
7. Manfredini MA. Santos: Cidade sorriso. In: Cadernos de Resumo do ENATESPO XII Congresso Brasileiro de Saúde Bucal Coletiva. Curitiba, Brasil; 1996.
8. Traebert JL, Peres MA, Galesso ER, Zobot NE, Marcenes W. Prevalência e severidade da cárie dentária em escolares de seis e doze anos de idade. Rev Saúde Pública. 2001; 35:283-8.
9. Marmot MG, Smith GD, Stansfeld S, Patel C, North F, Healt J, et al Health inequalities among British civil servants: The Whitehall II study. Lancet 1991; 337:1387-93.
10. Acheson D. Independent Inquiry into Inequalities in Health. Chairman, Sir Donald Acheson. London: Statinary Office; 1998.
11. Whittle JG, Davies KW. A classification of residential neighbourhoods (ACORN) in relation to dental health and dental health behaviours. Community Dent Health 1992; 9:217-24.
12. Peres KGA, Bastos JRM, Latorre MRDO. Severidade de cárie em crianças e relação com aspectos sociais e comportamentais. Rev Saúde Pública 2000; 34:402-8.
13. Newbrun E, Huber R, Tenebaum G, Sela MN. The effect of previous diet on plaque pH response to different foods. J Dent Res 1988; 11:1434-7.
14. Fejerskov O. Concepts of dental caries and their consequences for understanding the disease. Community Dent Oral Epidemiol 1998; 25:5-12.

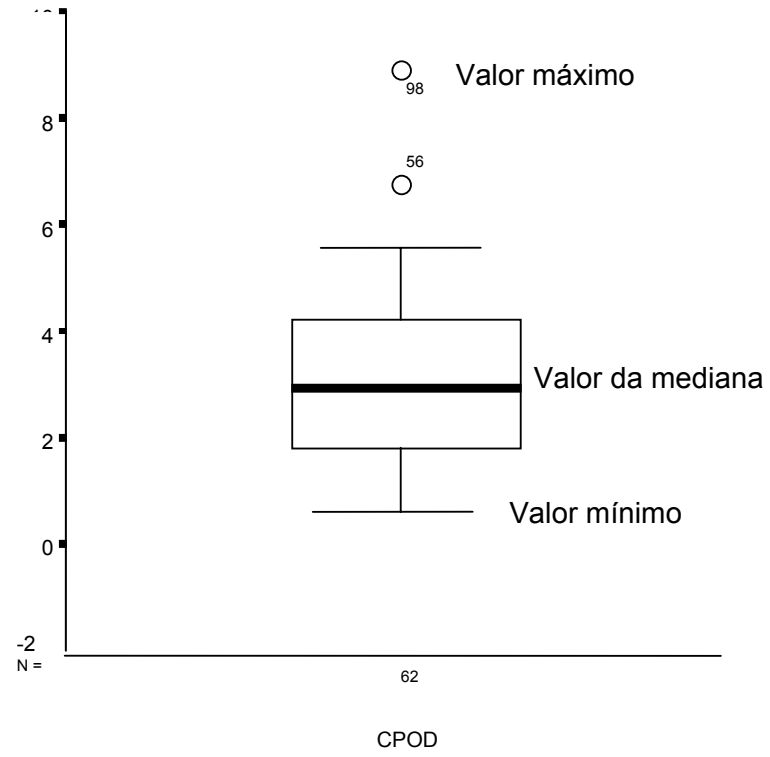
15. Buischi YP. Promoção de saúde bucal na clínica odontológica. São Paulo: Artes Médicas; 2000.
16. Thylstrup A, Fejerskov O. Cariologia Clínica. São Paulo: Santos; 1995 .
17. Herrera JL, Lyons MF, Johnson LF. Saliva: It's role in health and disease. J Clin Gastron Enterol 1988; 10:569-78.
18. van Nieuw Amerongen A, Bolscher JG, Veerman EC. Salivary proteins: protective and diagnostic value in cariology? Caries Res 2004; 38:247-53.
19. Sundin B, Granath L, Birkhed D. Variation of posterior proximal caries incidence with consumption of sweets with regard to other caries related factors in 15-18-year-olds. Community Dent Oral Epidemiol 1992; 20:76-80.
20. Lenander-Lumikari M, Loimaranta V. Saliva and dental caries. Adv Dent Res 2000; 14: 40-7.
21. Genestra MS, Souza MR. Avaliação da capacidade-tampão da saliva por titulometria - Estudo comparativo. Medcenter [Online] 2000 Mar [citado em 25 abr. 2004]. Disponível em: URL: <http://www.odontologia.com.br/artigos.asp?id=82&idesp=12&ler=s>.
22. Aranha FL. Bioquímica Odontológica. 1ª ed. São Paulo: Sarvier; 1996.
23. Pinto VG. A Odontologia no município: guia para organização de serviços e treinamento de profissionais em nível local. Porto Alegre: RGO; 1996.
24. Organização Mundial de Saúde. Levantamento epidemiológico de saúde bucal: Manual de Instruções. 3ª ed. São Paulo: Santos; 1991.
25. Secretaria Municipal da Saúde de Curitiba. Condições de saúde bucal da população de Curitiba; dados preliminares. [Online]. 2004 [citado em 14 mai. 2004]. Disponível em: URL: [http://www.curitiba.pr.gov.br/saude/areastematicas/saude\\_bucal/indicadores\\_saude\\_bucal.htm](http://www.curitiba.pr.gov.br/saude/areastematicas/saude_bucal/indicadores_saude_bucal.htm).
26. Associação Brasileira de Empresas de Pesquisa – ABEP. Critério de Classificação Econômica Brasil. [Online]. 2004 [citado em 16 ago. 2004]. Disponível em: URL: <http://www.anep.org.br/codigosguias/CCEB.pdf>.

- 27.** Opperman, RV; Rösing, CK. Prevenção e Tratamento das Doenças Periodontais. In: Kriger, L *et al.* Promoção de saúde bucal: paradigma, ciência, humanização. São Paulo: Artes Médicas, ABOPREV; 2003. p.265-86.
- 28.** Dawes C. Physiological factors affecting salivary flow rate, oral sugar clearance and the sensation of dry mouth in man. *J. Dent Res* 1987; 64:8-53.
- 29.** Banderas, Tarabay JA, Gonzales, Begne M, Sanches, Garduno M. Flujo y concentración de proteínas en saliva total humana. *Salud Publica México* 1997; 39:433-41.
- 30.** FDI/WHO. Global goals for oral health by the year 2000. *Int Dent J* 1982; 32:74-7.
- 31.** Moysés SJ coord. Os dizeres da boca em Curitiba: Boca Maldita, Boqueirão, Bocas saudáveis. Rio de Janeiro: CEBES; 2002. p.70-7.
- 32.** Mattson JS, Cerutis DR. Diabetes mellitus: a review of the literature and dental implications. *Compend Contin Educ Dent* 2001; 22:757-60.
- 33.** Cassolato SF, Turnbull RS. Xerostomia: clinical aspects and treatment. *Gerodontology* 2003; 20:64-77.

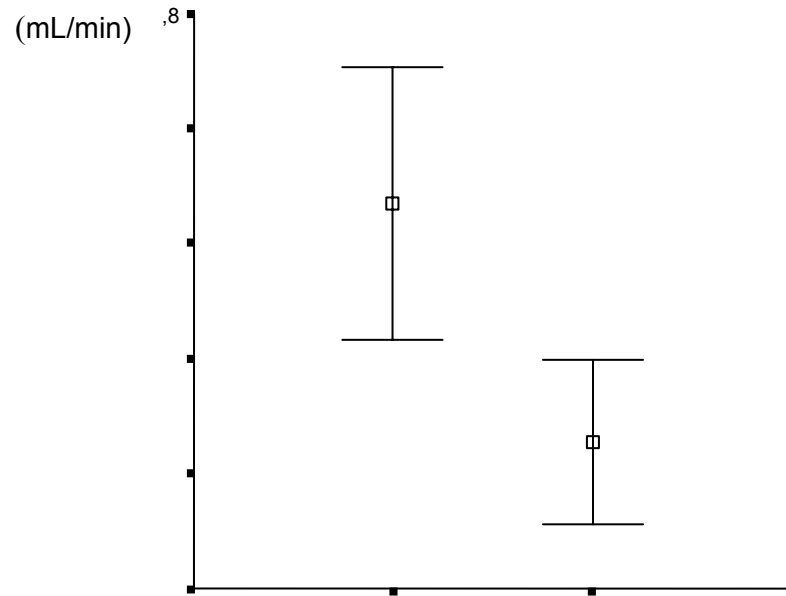
**Fig. 1** - Box-Plot do índice CPO-D na população de escolares, n = 113.



**Fig. 2** - Box-Plot do índice CPO-D no grupo 2, n = 62.



**Fig. 3** - Intervalo de confiança do fluxo salivar nos grupos baixo (1) e alto (2) risco à cárie dentária.



# Capítulo 2

---

## **Análise da Associação entre o Polimorfismo A/G (Lys/Arg) no Éxon 2 do Gene da Lactoferrina (LF) e a Cárie Dentária em Escolares de 12 Anos**

Luiza Foltran Azevedo<sup>1</sup>, João Armando Brancher<sup>2</sup>, Simone Tetu Moysés<sup>3</sup>, Fabio Rueda Faucz<sup>4</sup>, Paula Cristina Trevilatto<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Aluna de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da PUC-PR - Área de Estomatologia, Curitiba/PR

<sup>2</sup> Mestre em Bioquímica, Professor Assistente Nível I da PUC-PR Curitiba/PR

<sup>3</sup> Doutora em Epidemiologia e Saúde Pública pela Universidade de Londres, Professora Titular da PUC-PR, Curitiba/PR

<sup>4</sup> Doutor em Genética pela Universidade Federal do Paraná, Adjunto I da PUC/PR, Curitiba/PR

<sup>5</sup> Doutora em Biologia Buco-Dental pela Faculdade de Odontologia de Piracicaba/UNICAMP, Professora Adjunta I da PUC-PR

Autor correspondente:

Dra. Paula Cristina Trevilatto  
Pontifícia Universidade Católica do Paraná  
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde  
Pós-graduação em Ciências da Saúde  
Rua Imaculada Conceição, 1155  
80215-901  
Curitiba, PR  
Brazil  
55-41-271-1515, r.2618  
e-mail: pctrev@yahoo.com.br

## Resumo

A cárie dentária é uma doença infecciosa multifatorial, modulada por fatores do hospedeiro. A saliva apresenta componentes que podem modificar o biofilme, como a lactoferrina (LF). A LF é uma proteína salivar do grupo das metaloproteínas que apresenta diversas atividades biológicas, inclusive antibacteriana. Polimorfismos no gene da LF podem modificar a função dessa proteína e estar associados à suscetibilidade à cárie dentária. O presente estudo teve por objetivo avaliar a correlação entre a cárie dentária e o polimorfismo A/G no 2º éxon do gene da lactoferrina, que leva a uma modificação do resíduo lisina (Lys) pela arginina (Arg). Foram avaliados 110 indivíduos de 12 anos de idade, divididos em 2 grupos: grupo 1 (48 indivíduos sem cárie) e grupo 2 (62 indivíduos com cárie), estudantes de uma escola particular do sul do Brasil. O DNA foi obtido a partir de um bochecho com solução de glicose a 3 %, seguido de raspagem da mucosa jugal. Após a purificação, procedeu-se a técnica de PCR-SSCP das amostras. Do grupo 1 (n = 48), 19 indivíduos (39,6%) apresentaram genótipo homozigoto 1/1, 22 escolares (45,8%) mostraram-se heterozigotos 1/2 e 7 (14,6%) tiveram genótipo homozigoto 2/2. Do grupo 2 (n = 62), 16 indivíduos (25,8%) apresentaram genótipo homozigoto 1/1, 30 escolares (48,4%) tiveram genótipo heterozigoto 1/2 e 16 (25,8%) mostraram-se homozigotos 2/2. Não houve diferença significativa nas frequências alélicas ( $p = 0,07$ ) e genotípicas ( $p = 0,19$ ) entre os grupos de baixo e alto risco/atividade de cárie dentária. Concluiu-se que o polimorfismo A/G no éxon 2 do gene da LF não esteve associado à suscetibilidade à cárie dentária em escolares de 12 anos.

Palavras-chave: cárie dentária, lactoferrina, polimorfismo genético.

## Introdução

A cárie dentária é uma doença infecciosa e possui etiologia focada em aspectos multifatoriais, relacionados à microbiota (1,2), à dieta (3-5) e ao hospedeiro (6,7). A cárie é iniciada pela ação de ácidos produzidos por bactérias que aderem ao esmalte dental, formando o biofilme cariogênico (8). As lesões cariosas podem aparecer em um indivíduo se microrganismos cariogênicos e carboidratos fermentáveis estiverem presentes em um hospedeiro suscetível, durante um período de tempo significativo na cavidade bucal (4,7). Ao longo dos anos, pesquisas revelaram uma multiplicidade de fatores biológicos determinantes que podem influenciar a cariogenicidade do biofilme (5,8), como a composição e a secreção da saliva (9,10). Um fluxo constante de saliva elimina eficazmente microrganismos da cavidade bucal e um fluxo reduzido facilmente leva a um supercrescimento microbiano, seguido de inflamação das mucosas e rápida deteriorização dos dentes (11,12). A saliva contém fatores de defesa inatos ou adquiridos, capazes de inibir a invasão microbiana e o crescimento e/ou metabolismo bacteriano, por meio de diferentes mecanismos (10,12-14), como a inibição da aderência bacteriana e da produção de ácido por estreptococos bucais (15). A saliva apresenta componentes, como carbonatos e bicarbonatos (16), que formam um sistema de tamponamento para a rápida neutralização de ácidos, e proteínas específicas, que formam uma camada protetora sobre a superfície do esmalte, funcionando como barreira para a difusão de ácidos (17). Existem diversas proteínas salivares com ação antimicrobiana, como a lisozima, a lactoperoxidase, imunoglobulinas, aglutininas, mucinas e a lactoferrina (11,17). Em nível molecular há redundância funcional entre essas diferentes proteínas (14,16).

A lactoferrina (LF) é uma proteína multifuncional (18), do grupo das metaloproteínas (19), pertencente à família das transferrinas (20). Possui massa molecular de 80 kD e um núcleo porfirínico semelhante ao da hemoglobina, realizando através dele o transporte de ferro (21). A LF é expressa em mucosas, endométrio (20,22), no epitélio vaginal, próstata e vesícula seminal

(22). Está presente em vários fluidos do organismo, como a saliva, a lágrima, o sêmen, o suor, o colostro, o leite e secreções nasais (22-24). A LF é considerada uma citocina, responsável por coordenar a resposta celular humana, atuando na maturação e ativação de macrófagos e neutrófilos, podendo sua deficiência causar supressão do sistema imunológico e seu excesso, uma exacerbada resposta imune (25). Os leucócitos polimorfonucleares são ricos em LF (26), que agem como fator de proteção contra diversas infecções (18,24). A LF pode regular diretamente a resposta inflamatória (6), podendo se ligar a endotoxinas bacterianas, como o lipopolissacarídeo (LPS), mediador central da resposta inflamatória em infecções bacterianas (23,27,28). Sua ação antimicrobiana é atribuída à propriedade de quelar o íon ferro, privando, assim, os microrganismos de seu elemento essencial (13,17,29). A LF pode modular a agregação e o desenvolvimento do biofilme dental, inibindo a adesão de *Streptococcus mutans* (30,31). Uma associação significativa foi encontrada entre o índice de superfícies cariadas e a concentração de lactoferrina salivar (32).

O gene da lactoferrina apresenta 17 éxons, tendo comprimento total de 24,5 kb. Está localizado no cromossomo humano 3, na posição 3p21 (33). Quando ocorre uma mutação na região reguladora do gene da lactoferrina, uma expressão alterada da proteína é esperada (34). Se a frequência do alelo mais raro gerado por essa mutação for maior que 1%, esse processo é denominado de polimorfismo. Um polimorfismo (A/G) (rs no. 1126478), no segundo éxon do gene da lactoferrina, é responsável pela substituição de um aminoácido lisina (Lys) por arginina (Arg), na posição 29. A variante contendo o resíduo Lys esteve associada a uma maior atividade antibacteriana em *S. mutans* (35).

O objetivo do presente trabalho é investigar a presença do polimorfismo A/G (Lys/Arg), no segundo éxon do gene da lactoferrina, e sua associação com a cárie dentária em escolares de 12 anos de idade.

## **Materiais e Métodos**

### *Seleção da amostra*

A amostra foi constituída de 110 escolares de 12 anos de idade, caucasóides, não-aparentados, de ambos os sexos, estudantes de uma escola particular da cidade de Curitiba-PR. Os responsáveis pelos escolares assinaram um termo de consentimento informado, de acordo com as normas do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS) da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUC-PR), conforme a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, aprovado sob registro nº 104.

Escolares foram excluídos quando fumantes, usuários de aparelhos ortodônticos, doentes crônicos, usuários crônicos de antiinflamatórios e de antibióticos nos últimos seis meses.

Os escolares foram diagnosticados de acordo com o índice de dentes cariados perdidos e obturados (CPO-D). Foram considerados cariados os dentes que apresentavam tanto cavitação quanto lesão de mancha branca. Os indivíduos foram divididos em dois grupos:

Grupo 1: Quarenta e oito (48) escolares de baixo risco à cárie dentária (CPO-D = 0)

Grupo 2: Sessenta e dois (62) escolares de alto risco à cárie dentária (CPO-D  $\geq$  1).

Os grupos foram assim categorizados devido ao valor do índice CPO-D médio do bairro ser de 1,31, conforme levantamento epidemiológico do Ministério da Saúde (36). Além disso, o bairro apresentava população de classe média e era abastecido com água fluoretada. Dessa forma, a região foi considerada de baixo desafio à cárie dentária, sendo que indivíduos que a apresentavam foram relatados de alto risco à cárie.

Os examinadores foram previamente calibrados. Para esse treinamento, empregou-se a técnica do consenso (37). Segundo essa técnica, havendo discordância, os examinadores discutem até chegar em um consenso quanto à interpretação do critério relativo a uma dada condição.

### *Obtenção de DNA*

O DNA foi obtido a partir de células epiteliais da mucosa bucal, por um bochecho com solução de glicose a 3 %, por 1 minuto (min), e leve raspagem da mucosa jugal com espátula de madeira esterilizada (38). O DNA foi colhido em duplicata. Após a coleta, as amostras foram processadas da seguinte forma:

1. As amostras eram centrifugadas a uma velocidade de 2000 rpm por 10 min;
2. Descartado o sobrenadante, as células eram homogeneizadas com 1.300  $\mu$ L de solução de extração (TE 10 mM, EDTA 1 mM, SDS 0,5%);
3. Dez (10)  $\mu$ L de proteinase K (20  $\mu$ g/mL) eram adicionados em cada frasco para que houvesse hidrólise das proteínas contidas nas amostras;
4. Os frascos foram mantidos em banho-maria a uma temperatura de 50°C *overnight* (ON);
5. As amostras eram transferidas para tubos do tipo *ependorf* com volume de 2 mL;
6. Eram adicionados 500  $\mu$ L de acetato de amônio;
7. As amostras eram levadas ao vórtex por aproximadamente 5 min para a agitação da solução. Em seguida eram centrifugadas por 10 min a uma velocidade de 17.000 g;
8. Após a centrifugação, a solução era dividida em dois *ependorfs* de 1,5 mL, contendo cada um a quantidade de 900  $\mu$ L de solução;
9. A estes frascos foram acrescentados 540  $\mu$ L de isopropanol para a precipitação do DNA. Após os frascos serem invertidos por vinte vezes, eram centrifugados por 5 min a 17.000 g. Após este período, o isopropanol era descartado (o *pellet* continha o DNA);
10. Acrescentava-se etanol a 70 %, com posterior centrifugação por 5 min a 17.000 g;
11. O etanol era descartado e o *pellet* mantido. Os frascos eram mantidos abertos para evaporação do etanol. Após secos em temperatura ambiente, eram adicionados 50  $\mu$ L de TE (Tris 10mM, EDTA 1 mM, pH 7,8) para a ressuspensão do DNA.

*Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)/Análise de Polimorfismo de Conformação de Fita Simples (SSCP).*

Para as reações de PCR-SSCP eram confeccionados volumes finais de reação de 10,8  $\mu\text{L}$ . Um (1)  $\mu\text{L}$  de DNA era adicionado a 9,4  $\mu\text{L}$  de *PCR Supermix*<sup>®</sup> e 0,2  $\mu\text{L}$  (5 *pmol*) de cada *primer*. Os *primers* utilizados foram 5' CTTACTCCTTGGCCCCTCTC 3' (*forward*) e 5' TCTCCCTTCCATTCAGCTTG 3' (*reverse*), e amplificavam uma seqüência de 238 pares de base (pb), localizada no segundo (2<sup>o</sup>) éxon do gene da lactoferrina (Fig.1).

As amplificações foram realizadas em um termociclador (*Eppendorf Master Cycle Gradiente*) e as condições de reação foram: desnaturação inicial a 96°C por 3 min, seguida de 40 ciclos com desnaturação a 94°C por 30 s, anelamento a 60°C por 30 s e extensão a 72°C por 30 s, com uma extensão final de 10 min a 72°C.

Ao fim da reação, procedeu-se a detecção do produto de PCR amplificado, por meio da técnica de SSCP, que consistiu na desnaturação do DNA a 94°C por 5 min, seguida de rápida permanência em gelo. As amostras foram colocadas em gel de poliacrilamida (39:1) a 7%, ao qual foi adicionado glicerol em concentração final de 5%. As amostras correram a 200 V, por um período de 5 h.

A coloração dos géis com nitrato de prata foi baseada na técnica descrita por Sammons et al. (1981) (39).

A técnica de SSCP não permite identificar alelos. Apenas o seqüenciamento permite sua identificação. No caso deste estudo, os alelos são A e G, mas serão denominados 1 e 2, pela impossibilidade de sua determinação pela técnica utilizada (Fig. 2).

*Análise estatística*

A fim de testar diferenças entre os grupos com baixo e alto risco/atividade de cárie dentária, em relação às freqüências alélicas e genotípicas do polimorfismo estudado, utilizou-se o teste Qui-quadrado ( $\chi^2$ ), considerando a significância de 0,05.

## Resultados

Foram analisados 110 escolares de 12 anos de idade de baixo ( $n = 48$ ) e alto ( $n = 62$ ) risco/atividade de cárie dentária. Dos escolares com baixo risco/atividade de cárie dentária (grupo 1), 19/48 indivíduos (39,6%) apresentaram genótipo homozigoto 1/1, 22/48 escolares mostraram-se heterozigotos 1/2 (45,8%) e 7/48 (14,6%) tiveram genótipo homozigoto 2/2. Com relação ao grupo com alto risco/atividade de cárie dentária (grupo 2), 16/62 indivíduos (25,8%) apresentaram genótipo homozigoto 1/1, 30/62 escolares (48,4%) tiveram genótipo heterozigoto 1/2 e 16/62 (25,8%) mostraram-se homozigotos 2/2 (tabela 1). A frequência do alelo 1 no grupo de baixo risco/atividade de cárie foi de 62,5% (60/96) e do alelo 2 foi de 37,5% (36/96). No grupo com alta experiência de cárie, a frequência dos alelos 1 e 2 foi de 50% (62/124). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos alto e baixo risco/atividade de cárie dentária nas frequências genotípicas ( $p = 0,19$ ) e alélicas ( $p = 0,07$ ).

## Discussão

Resultados prévios realizados na população deste estudo mostraram correlação entre fluxo salivar e risco/atividade de cárie dentária (40). Um fluxo salivar reduzido esteve associado com uma maior experiência de cárie, apontando para fatores do hospedeiro, especialmente associados a parâmetros salivares, na determinação do risco à cárie dentária em populações homogêneas quanto a aspectos socioeconômicos e comportamentais. Segundo Atkison & Baum (2001) (11), pacientes com reduzido fluxo salivar estão sujeitos a maiores índices CPO-D e infecções gengivais. Jentsh et al. (2004) (14) observaram baixos níveis de dentes cariados relacionados a um alto fluxo salivar. Neste mesmo trabalho, os autores avaliaram a concentração de lactoferrina (LF) e outras proteínas salivares em relação ao índice CPO-D, e valores baixos de dentes cariados estiveram associados à baixa concentração de LF. O mesmo foi observado no trabalho de Sikorska et al. (2002) (32), no qual um fluxo salivar elevado mostrou-se correlacionar com baixa concentração de LF.

A saliva e seus componentes orgânicos e inorgânicos têm sido exaustivamente estudados (12,41-43), sem, no entanto, suas funções serem definitivamente estabelecidas. Ainda, os resultados publicados são algumas vezes contraditórios, como no tangente à lactoferrina que, apesar do seu reconhecido papel antibacteriano (18,24,27,28), apresenta-se pouco expressa na saliva de pacientes com CPO-D reduzido (14,32). A LF possui efeito bactericida contra vários microrganismos e pode modular a agregação e o desenvolvimento do biofilme dental, inibindo a adesão de *S. mutans* (30,31). Uma forte associação entre o índice de superfícies cariadas e a concentração de lactoferrina salivar foi observada (32).

Polimorfismos no gene da LF têm sido descritos (34,44) e relacionados a diversas patologias, como a doença de Parkinson (45), o câncer de mama (46), a leucemia (34) e a periodontite agressiva localizada (35). No entanto, até o momento não há estudos de identificação de polimorfismos no gene da LF, na tentativa de analisar sua associação com a cárie dentária.

Polimorfismos funcionais em regiões gênicas que alteram aminoácido podem modificar as proteínas correspondentes, modulando sua função, exacerbando ou reduzindo sua ação (47).

No presente trabalho não foi observada correlação estatisticamente significativa entre o polimorfismo A/G (Lys/Arg), no éxon 2 do gene da lactoferrina, e o risco à cárie dentária, em escolares de 12 anos de uma escola particular do sul do Brasil ( $p = 0,07$ ). No entanto, observou-se uma diminuição na frequência do alelo 2 no grupo de baixo risco/atividade de cárie dentária (tabela 2), o que sugere que esse alelo pode estar contribuindo para o aumento de suscetibilidade à cárie dentária, da mesma maneira que o alelo 1 pode estar protegendo contra o risco/atividade da doença.

O polimorfismo estudado resulta em troca de aminoácido (Lys por Arg), sendo que a variante contendo o resíduo Lys apresenta maior atividade antibacteriana contra microrganismos gram-positivos, inclusive *S. mutans* (35). No entanto, a técnica de PCR-SSCP não possibilita a identificação dos alelos. Dessa forma, não é possível determinar se o alelo 2, que mostrou fracamente predispor os indivíduos à cárie, representa a variante Arg. Além disso, a técnica limita a interpretação dos resultados no quesito migração das bandas, pois uma fita de DNA simples pode migrar, algumas vezes, de duas ou mais formas diferentes. Assim, é necessária a confirmação dos alelos e genótipos pela técnica de seqüenciamento, o que garantirá a confiabilidade dos resultados obtidos. No entanto, a utilização da técnica de SSCP é justificável por permitir que padrões semelhantes de migração de bandas leve ao seqüenciamento de apenas uma amostra que represente esse padrão, o que reduz custos financeiros.

Concluiu-se, dentro das limitações técnicas do estudo, que o alelo 2 do polimorfismo A/G, no éxon 2 do gene da LF, associou-se fracamente à suscetibilidade à cárie dentária em escolares de 12 anos. É possível que em estudo em populações de maior número amostral, a correlação entre o polimorfismo estudado e a suscetibilidade à cárie dentária mostre-se significativa. Ainda, outros polimorfismos em diferentes locais do gene da lactoferrina podem ser também

responsáveis por alterações na função da LF. Seqüências de DNA no promotor do gene da LF são especiais candidatas para a análise de polimorfismos e associação com a suscetibilidade à cárie dentária, uma vez que essas seqüências podem estar relacionadas a um aumento na expressão do produto gênico. Além disso, polimorfismos em genes que codificam outras proteínas salivares com função antibacteriana, que regulam a concentração dessas proteínas na saliva, podem também estar contribuindo para a suscetibilidade à cárie dentária.

## Referências Bibliográficas

1. Ajdi D, Mcshan Wm, Mclaughlin RE, Savi G, Chang J, Carson MB, Primeaux C, Tian R, Kenton S, Jia H, Lin S, Qian Y, Li S, Zhu H, Najjar F, Lai H, White J, Roe BA, Ferreti JI. Genome sequence of *Streptococcus Mutans* UA159, a cariogenic dental pathogen. Proc Natl Acad Sci 2002;99(22):14434-9.
2. Conrads G. DNA probes and primers in dental practice. Clin Infec Dis 2002;35 (supplement):72-7.
3. Burt BA, Pai S. Sugar consumption and caries risk: a systematic review. J Dent Educ 2001;65(10):1017-27.
4. Featherstone JDB. The Continuum of dental caries - Evidence for a dynamic disease process. J Dent Res 2004;83:39-42.
5. Zero DT. Sugars – The arch criminal?. Caries Res 2004;38:277-85.
6. Singh PK, Parsek MR, Greenberg EP, Welsh MJ. A component of innate immunity prevents bacterial biofilm development. Nature 2002;417(6888):552-555.
7. Nariyama M, Shimizu K, Uematsu T, Maeda, T. Identification of chromosomes associated with dental caries susceptibility using quantitative trait locus analysis in mice. Caries Res 2004;38:79-84.
8. Kidd EAM, Fejerskov O. What constitutes dental caries? Histopathology of carious enamel and dentin related to the action of cariogenic biofilms. J Dent Res 2004;83(special issue):35-8.
9. Fejerskov O. Changing paradigms in concepts on dental caries: consequences for oral health care. Caries Res 2004;38(3):182-9.
10. Van Nieuw Amerongen A, Veerman EC. Saliva -The defender of oral cavity. Oral Disease 2002;8(1):12-22.

11. Atkison JC, Baum B. Salivary enhancement: current status and future therapies. *J Dent Educ* 2001;65(10):1096-1101.
12. Tenovuo J. Clinical applications of antimicrobial host proteins lactoperoxidase, lysozyme and lactoferrin in xerostomia: efficacy and safety. *Oral disease* 2002;8(1): 23-9.
13. Singh PK. Iron sequestration by human lactoferrin stimulates *P. aeruginosa* surface motility and blocks biofilm formation. *Biometals* 2004;17:267-70.
14. Jentsch H, Beetke E, Gocke R. Salivary analyses and caries increment over 4 years an approach by cluster analysis. *Clin Oral Invest* 2004;8:156-60.
15. Iacono VI, Mackay BI, Dirienzi S, Pollock JJ. Selective antibacterial properties of lysozyme for oral microorganisms. *Infect Immun* 1980;29(2):623-32.
16. Leone C, Oppenheim F. Physical and chemical aspects of saliva as indicators of risk for dental caries in humans. *J Dent Educ* 2001;65(10):1054-61.
17. Van Nieuw Amerongen A, Bolscher JG, Veerman EC. Salivary proteins: protective and diagnostic value in cariology?. *Caries Res* 2004;38(3):247-53.
18. Orsi N. The antimicrobial activity of lactoferrin: current status and perspectives. *Biometals* 2004;17(3):189-196.
19. Fine DH, Furgan D, Beydoun F. Lactoferrin iron levels are reduced in saliva of patients with local aggressive periodontitis. *J Periodontol* 2002;73(6):624-30.
20. Liu D, Wang X, Zhang Z, Teng CT. An intronic alternative promoter of the human lactoferrin gene is activated by Ets. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;301:472-79.
21. Testa, U. Proteins of iron metabolism. Rome: CRC press; 2002. p.71-139.
22. Teng CT. Lactoferrin gene expression and regulation: an overview. *Biochem Cell Biol* 2002; 80(1): 7-16.

23. Van Veen HA, Geerts MEJ, Van Berkel PHC, Nuijens JH. Analytical cation-exchange chromatography to assess the identity, purity, and N-terminal integrity of human lactoferrin. *Anal Biochem* 2002;309:60-66.
24. Ward PP, Conneely OM. Lactoferrin: role in iron homeostasis and host defense against microbial infection. *Biometals* 2004;17(3):203-8.
25. Son KN, Park J, Chung DK, Yu DY; Lee KK, Kim J. Human lactoferrin activates transcription of IL-1beta gene in mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;290(1):236-41.
26. Panella TI, Liu Y, Huang AT, Teng Ct. Polymorphism and altered methylation of the lactoferrin gene in normal leukocytes, leukemic cells, and breast cancer. *Cancer Res* 1991;51:3037-43.
27. Brock JH. The physiology of lactoferrin. *Biochem Cell Biol* 2002;80:1-6.
28. Kruzel MI, Harari Y, Mailman D, Actor JK, Zimecki M. Differential effects of prophylactic, concurrent and therapeutic lactoferrin treatment on LPS-induced inflammatory response in mice. *Clin and Exp Immunol* 2002;130(1):25-31.
29. Baker HM, Baker EN. Lactoferrin and iron: structural and dynamic aspects of binding and release. *Biometals* 2004;17:209-16.
30. Oho T, Mitoma M, Koga T. Functional domain of bovine milk lactoferrin which inhibits the adherence of *Streptococcus mutans* cells to a salivary film. *Infect Immun* 2002;70(9):5279-82.
31. Francesca B, Ajello M, Bosso P, Morea C, Andrea P, Giovanni A, Piera V. Both lactoferrin and iron influence aggregation and biofilm formation in *Streptococcus mutans*. *Biometals* 2004;17(3):271-8.

32. Sikorska MH, Mielnik-Blaszczak M, Kapec E. The relationship between the levels of SigA, lactoferrin and alpha(1) proteinase inhibitor in saliva and permanent dentition caries in 15-year-olds. *Oral Microbiol Immunol* 2002;17(5):272-6.
33. Kim SI, Yu DY, Pak KW, Jeong S, Kim SW, Lee KK. Structure of the human lactoferrin gene and its chromosomal localization. *Mol Cells* 1998;8(6):663-8.
34. Liu LH, Gladwell W, Teng CT. Detection of exon polymorphisms in the human lactoferrin gene. *Biochem Cell Bio* 2002;80(1):p17-22.
35. Velliyagounder K, Kaplan JB, Furgang D, Legarda D, Diamond G, Parkin RE, Fine DH. One of two human lactoferrin variants exhibits increased antibacterial and transcriptional activation activities and is associated with localized juvenile periodontitis. *Infect Immun* 2003;71(11):6141-7.
36. Brazil. Projeto SB Brasil. Buccal health conditions of Brazilian population 2002-2003. Main results. Brasília: Health Ministry/ National Buccal Health Coordination. 51p. [Online]. 2004 [cited 2004 Jun 20]: Available from: URL: [http://www.cfo.org.br/download/relatorio\\_SB\\_brasil\\_2003.pdf](http://www.cfo.org.br/download/relatorio_SB_brasil_2003.pdf).
37. World Health Organization. Epidemiologic survey of buccal health: Instruction Manual. 3<sup>rd</sup> ed. São Paulo: Santos; 1991.
38. Trevilatto PC, Line SR. Use of buccal epithelial cells for PCR amplification of large DNA fragments. *Forensic Odontostomatol* 2000;12(1):6-9.
39. Sammons DW, Adams LD, Nishizawa EE. Silver staining in PAGE. *Electrophoresis* 1981;2:135-41.
40. Azevedo LF, Arruda ES, Santos TB, Brancher JA, Ignácio AS, Faucz FR, Moysés ST, Trevilatto PC. Evaluation of socioeconomic aspects, salivary factors and oral habits on the caries risk determination in 12-year-old students of a private school in Curitiba, PR, Brazil. *Journal of Dental Clinics and Researchs* 2005, *in press*. [article in Portuguese]

41. Tenovuo J, Lumikari M, Soukka T. Salivary lysozyme, lactoferrin and peroxidase: antibacterial effects on cariogenic bacteria and clinical applications in preventive dentistry. *Proc Finn Dent Soc* 1991;87(2):197-208.
42. Johansson I, Lumikari LM, Saellstrom AK. Saliva composition in Indian children with chronic protein energy malnutrition. *J Dent Res* 1994;73(1):11-9.
43. Almstahl A, Wikstrom M, Groenink J. Lactoferrin, amylase and mucin MUC5B and their relation to the oral microflora in hyposalivation of different origins. *Oral Microbiol Immunol* 2001;18:345-2.
44. Klintworth GK, Sommer JR, Obrian G, Han L, Ahmed MN, Qumsiueh MB, Lin PY, Bati S, Reddy MK, Kanai A, Hotta Y, Suar J, Kumaramanickavel G, Munier, F; Schorderet, DF; Matri, LE; Iwata, F; Kupfer, MK; Nagata, M; Nakayasu K, Hejtmancik JF; Teng CT. Familial subepithelial corneal amyloidosis (gelatinous drop-like corneal dystrophy): exclusion of linkage to lactoferrin gene. *Mol Vis* 1998;4:31-8.
45. Borie C, Gasparini F, Verpillat P, Bonnet AM, Agid Y, Hetet G, Brice A, Durr A, Grandchamp B. Association study between iron-related genes polymorphisms and Parkinson's disease. *J Neurol* 2002; 249(7):801-4.
46. Penco S, Caligo MA, Cipollini G, Bevilacqua G, Garre C. Lactoferrin expression in human breast cancer. *Cancer Biochem Biophys* 1999;17(1/2):163-178.
47. Pociot F, Molvig J, Wogensen L, Worsaae H, Nerup J. A TaqI polymorphism in the human interleukin-1 beta (IL-1 beta) gene correlates with IL-1 beta secretion in vitro. *Eur J Clin Invest* 1992;22(6):396-402.

Tabela 1: Distribuição dos genótipos nos grupos de baixo (grupo 1) e alto (grupo 2) risco/atividade de cárie dentária (n = número de indivíduos), PUCPR – 2005.

Genótipo	Grupo 1		Grupo 2		Valor de <i>p</i>
	n = 48	(%)	n = 62	(%)	
1/1	19	(39,6)	16	(25,8)	0,1939
1/2	22	(45,8)	30	(48,4)	
2/2	7	(14,6)	16	(25,8)	

Fonte: Dados da pesquisa.

Tabela 2: Freqüências alélicas nos grupos de baixo (grupo 1) e alto (grupo 2) risco/atividade de cárie dentária (n = número de alelos), PUCPR - 2005.

Alelo	Grupo 1		Grupo 2		Valor de p
	n = 96	(%)	n = 124	(%)	
1	60	(62,5)	62	(50)	0,0758
2	36	(37,5)	62	(50)	

Fonte: Dados da pesquisa.

cagtcagtggtggaatccttactcctggcccctctctcccagGACTGTGTCTGGCTGGCCGTAGGAGGAGTGTTCA  
 GTGGTGCGCCGTATCCCAACCCGAGGCCACAAAATGCTTCCAATGGCAAAGGAATATGAGAA  
RAGTGCGTGGCCCTCCTGTCAGCTGCATAAAGAGAGACTCCCCATCCAGTGTATCCAGGCC  
 ATTGCGgtgagtcaatgccgggtgtggtgggaccaagctgaatggaagggagagagaaatggaaaaagatagaacacgagct  
 ctcttactcctctgcttcacctgtgggcaacgaagtgaggagccgtcctctc

Fig.1 – Seqüência do gene da LF contendo o polimorfismo A/G indicado pela letra **R**. As letras em caixa alta referem-se ao 2° éxon, e as letras em caixa baixa, ao 2° e 3° íntrons. Sublinhados estão representados os *primers* que delimitam a seqüência amplificada.

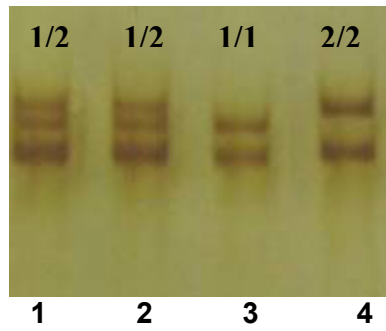


Fig 2: Gel de poliacrilamida a 7 % corado pela prata. Canaletas 1 e 2: padrão heterozigoto (1/2) de corrida (SSCP). Canaleta 3: padrão homozigoto denominado 1/1. Canaleta 4: padrão homozigoto denominado 2/2.

# Conclusão

---

## 5. CONCLUSÃO

Concluiu-se que na população de indivíduos de 12 anos de idade de uma escola particular de Curitiba:

1. Houve associação entre baixo risco/atividade de cárie dentária e elevado fluxo salivar.
2. Houve uma tendência de associação entre alto risco/atividade de cárie dentária e:
  - a. presença de biofilme,
  - b. presença do alelo 2 do polimorfismo A/G no éxon 2 do gene da LF.
3. Não houve associação entre risco/atividade de cárie dentária e:
  - a. fatores socioeconômicos,
  - b. hábitos de saúde bucal: frequência de escovação e uso de fio dental,
  - c. uso de flúor,
  - d. frequência de visita ao dentista,
  - e. frequência de ingestão de açúcar entre as refeições,
  - f. os parâmetros salivares: pH e capacidade tampão

# Referências

---

## 6. REFERÊNCIAS \*

AJDI, D; McSHAN, WM; McLAUGHLIN, RE; SAVI, G; CHANG, J; CARSON, MB; PRIMEAUX, C; TIAN, R; KENTON, S; JIA, H; LIN, S; QIAN, Y; LI, S; ZHU, H; NAJAR, F; LAI, H; WHITE, J; ROE, BA; FERRETI, JJ. Genome sequence of *Streptococcus mutans* UA159, a cariogenic dental pathogen. *Proc Natl Acad Sci*, v.99, n.22, p14434-9, 2002.

ATKISON, JC; BAUM, B. Salivary enhancement: current status and future therapies. *J Dent Educ* v.65, n.10, p1096-1101, 2001.

BAKER, H.M; BAKER,E.N. Lactoferrin and iron: structural and dynamic aspects if binding and release. *Biometals*, v.17, p209-16, 2004.

BERKHOUT, B; VAN WAMEL, JL; BELJAARS, L; MEIJER, DK; VISSER,S; FLORIS, R. Characeterization of the anti-HIV effects of native lactoferrin and other milk proteins and protein-derived peptides. *Antiviral Res*, v.55, n.2, p 341-55, 2002.

BORIE, C; GASPARINI, F; VERPILLAT, P; BONNET, AM; AGID, Y; HETET, G; BRICE, A; DURR, A; GRANDCHAMP, B. Association study between iron-related genes polymorphisms and Parkinson's disease. *J Neurol*, v.249, n.7, p801-4, 2002.

BROCK, JH. The physiology of lactoferrin. *Biochem Cell Biol*, v.80, p1-6, 2002.

BURT, BA. Trends in caries prevalence in North American children. *Int Dent J*, v.44, n.1, p403-13, 1994.

BURT, BA; PAI, S. Sugar consumption and caries risk: a systematic review. *J Dental Educ*, v.65, n.10, p1017-27, 2001.

CONRADS,G. DNA probes and primers in dental practice. *Clin Infect Dis*, v.35 (supplement), p72-7, 2002.

CURY, JA; REBELO, MA; DEL BEL CURY, AA; DERBYSHIRE, MT; TABCHOURY, CP. Biochemical composition and cariogenicity of dental plaque formed in presence of sucrose or glucose and fructose. *Caries Res*, v.34, n.6, p491-7, 2000

DOWNER, DM. The 1993 national survey of children's dental health: a commentary on the preliminary report. *Br Dent J*, v.176, n.6, p209-14, 1994.

FEATHERSTONE, JDB. The Continuum of dental caries-Evidence for a dynamic disease process. *J Dent Res*, v.83, p39-42, 2004.

FEJERSKOV, O. Changing paradigms in concepts on dental caries: consequences for oral health care. *Caries Res*, v.38, n.3, p182-9, 2004.

FEJERSKOV, O. Conceito de cárie dental e suas conseqüências. *Encarte Científico. Associação Brasileira de Odontologia de Promoção de Saúde*, 1998.

FINE, D.H; FURGAN, D; BEYDOUIN, F. Lactoferrin iron levels are reduced in saliva of patients with local aggressive periodontites. *J Periodontol*, v.73, n.6, p624-30, 2002.

FRANCESCA, B; AJELLO, M; BOSSO, P; MOREA, C; ANDREA, P; GIOVANNI, A; PIERA V. Both lactoferrin and iron influence aggregation and biofilm formation in *Streptococcus mutans*. *Biometals*, v.17, n.3, p271-8, 2004.

ISMAIL, AI; HASSON, H; SOHN, W. Dental caries in the second millennium. *J Dent Educ*, v.65, n.10, p953-9, 2001.

JENTSCH, H; BEETKE, E; GOCKE, R. Salivary analyses and caries increment over 4 years an approach by cluster analysis. *Clin Oral Invest*, v.8, p156-60, 2004.

JOHNSON, MF. The role of risk factors in the identification of appropriate subjects for caries clinical trials: design considerations. *J Dent Res*, v.83, special issue, c116-8, 2004

KASTE, LM; SELWITZ, RH; OLDAKOWSKI, RJ; BRUNELLE, JA; WINN, DM; BROWN, LJ. Coronal caries in the primary and permanent dentition of children and adolescents 1-17 years of age: United States, 1988-1991. *J Dent Res*, v.75, special number, p631-41, 1996.

KRASSE, B. The caries decline: is the effect of fluoride toothpaste overrated? *Eur J oral Sci*, v.104, n.4, p426-9, 1996.

KIDD, EAM; FEJERSKOV, O. What constitutes dental caries? Histopathology of carious enamel and dentin related to the action of cariogenic biofilms. *J Dent Res*, v.83, special issue, C35-8, 2004.

KIM, SJ; YU, DY; PAK, KW; JEONG, S; KIM, SW; LEE, KK. Structure of the human lactoferrin gene and its chromosomal localization. *Mol Cells*, v.8, n.6, p663-8, 1998.

KÖNIG KG. Clinical manifestations and treatment of caries from 1953 to global changes in the 20<sup>th</sup> century. *Caries Res*, v.38, p168-72, 2004.

LEONE, C; OPPNHEIM, F. Physical and chemical aspects of saliva as indicators of risk for dental caries in humans. *J Dent Educ*, v.65, n.10, p1054-61, 2001.

LUPETTI, A; ANNEMMA, PA; WELLING, MM; BALLERING HD, BROUWNER, CP; SENESI, S; VAN DISSEL, JT; NIBBERING, PH. Synergist activity of the N-terminal peptide of human lactoferrin and fluconazole against *Candida* species. *Antimicrob Agents Chemother*, v.47, n.1, p262-7, 2003.

LIU, LH; GLADWELL, W; TENG, CT. Detection of exon polymorphisms in the human lactoferrin gene. *Biochem Cell Bio*, v.80, n.1, p17-22, 2002.

LIU, D; WANG, X; ZHANG, Z; TENG, CT. An intronic alternative promoter of the human lactoferrin gene is activated by Ets. *Biochem Biophys Res Commun*, v.301, p472-9, 2003

MARTHALER, TM. Changes in dental caries 1953-2003. *Caries Res*, v.38, p173-81, 2004

MILGRON, P. The impact of behavioral technology on dental caries. *J Dent Educ*, v.65, n.10, p1102-06, 2001.

NARIYAMA, M; SHIMIZU, K; UEMATSU, T; MAEDA, T. Identification of chromosomes associated with dental caries susceptibility using quantitative trait locus analysis in mice. *Caries Res*, v.38, p79-84, 2004.

NOBRE dos SANTOS, M; MELO dos SANTOS, L; FRANCISCO, SB; CURY, JA. Relationship among dental plaque composition, daily sugar exposure and caries in the primary dentition. *Caries Res*, v.36, n.5, p347-52, 2002.

OHO, T; MITOMA, M; KOGA, T. Functional domain of bovine milk lactoferrin which inhibits the adherence of *Streptococcus mutans* cells to a salivary film. *Infect Immun*, v.70, n.9, p5279-82, 2002.

ORSI, N. The antimicrobial activity of lactoferrin: current status and perspectives. *Biometals*, v.17, n.3, p189-96, 2004.

PANELLA, TJ; LIU, Y; HUANG, AT; TENG, CT. Polymorphism and altered methylation of the lactoferrin gene in normal leukocytes, leukemic cells, and breast cancer. *Cancer Res*, v.51, p3037-43, 1991.

PENCO, S; CALIGO, MA; CIPOLLINI, G; BEVILACQUA, G; GARRE, C. Lactoferrin expression in human breast cancer. *Cancer Biochem Biophys*, v.17, n.1-2, p163-78, 1999.

PERES, KGA; BASTOS, JRM; LATORRE, MRDO. Severidade da cárie em crianças e relação com aspectos sociais e comportamentais. *Rev de Saúde Pública*, v.34, n.4, p402-8, 2000.

PETERSSON, HG; BRATTHALL, D. The caries decline: a review of reviews. *Eur J Oral Sci*, v.104, p436-43, 1996.

POCIOT, F; MOLVIG, J; WOGENSEN, L; WORSAAE, H; NERUP, J. A. TaqI polymorphism in the human interleukin-1 beta (IL-1 beta) gene correlates with IL-1 beta secretion in vitro. *Eur J Clin Invest*, v.22, n.6, p396-402, 1992.

REISINE, S; PSOTER, W. Socioeconomic status and selected behavioral determinants as risk factors for dental caries. *J Dent Educ*, v.65, n.10, p1009-15, 2001.

SIKORSKA, MH; MIELNIK-BLASCZAK, M; KAPEC, E. The relationship between the levels of SigA, lactoferrin and alpha (1) proteinase inhibitor in saliva and permanent dentition caries in 15-year-olds. *Oral Microbiol Immunol*, v.17, n.5, p272-6, 2002.

SINGH, PK. Iron sequestration by human lactoferrin stimulates *P. aeruginosa* surface motility and blocks biofilm formation. *Biometals*, v.17, p267-70, 2004.

SINGH, PK; PARSEK, MR; GREENBERG, EP; WELSH, MJ. A component of innate immunity prevents bacterial biofilm development. *Nature*, v.417, n.6888, p552-5, 2002.

SON, KN; PARK, J; CHUNG, DK; YU, DY; LEE, KK; KIM, J. Human lactoferrin activates transcription of IL-1beta gene in mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun*, v.290, n.1, p236-41, 2002.

SOUZA, SMD de. CPO-D brasileiro aos 12 anos tem redução de 53,22%. *Jornal da ABO Nacional*, Rio de Janeiro, p8, 1996

TENG, CT. Lactoferrin gene expression and regulation: an overview. *Biochem Cell Biol*, v.80, n.1, p7-16, 2002.

TENOVUO, J. Clinical applications of antimicrobial host proteins lactoperoxidase, lysozyme and lactoferrin in xerostomia: efficacy and safety. *Oral disease*, v.8, n.1, p23-9, 2002.

VAN NIEUW AMERONGEN, A; BOLSCHER, JG; VEERMAN, EC. Salivary proteins: protective and diagnostic value in cariology? *Caries Res*, v.38, n.3, p247-53, 2004.

VAN NIEUW AMERONGEN, A; VEERMAN, EC. Saliva -The defender of oral cavity. *Oral Disease*, v.8, n.1, p12-22, 2002.

VAN VEEN, HA; GEERTS, MEJ; VAN BERKEL, PHC; NUIJENS, JH. Analytical cation-exchange chromatography to assess the identity, purity, and N-terminal integrity of human lactoferrin. *Anal biochem*, v.309, p60-6, 2002.

VELLIYAGOUNDER, K; KAPLAN, JB; FURGANG, D; LEGARDA, D; DIAMOND, G; PARKIN, RE, FINE, DH. One of two human lactoferrin variants exhibits increased antibacterial and transcriptional activation activities and is associated with localized juvenile periodontitis. *Infect Immun*, v.71, n.11, p6141-7, 2003.

WARD, PP; CONNEELY, OM. Lactoferrin: role in iron homeostasis and host defense against microbial infection. *Biometals*, v.17, n.3, p203-8, 2004.

\* Normas ABNT

# Anexos

---

## 7. ANEXOS

### 7.1 Material e Método detalhado

#### Seleção da amostra

O presente estudo é do tipo quantitativo, de caráter transversal exploratório, em uma amostra intencional.

A amostra foi constituída de 113 escolares de 12 anos de idade, caucasóides, não-aparentados, de ambos os sexos, estudantes de uma escola particular do bairro do Portão, na cidade de Curitiba-PR. Os responsáveis pelos escolares assinaram um termo de consentimento informado, de acordo com as normas do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS) da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUC-PR), conforme a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, aprovado sob registro nº 104.

Escolares foram excluídos quando fumantes, usuários de aparelhos ortodônticos, doentes crônicos, usuários crônicos de antiinflamatórios e de antibióticos nos últimos seis meses.

Os escolares foram diagnosticados de acordo com o índice de dentes cariados perdidos e obturados (CPO-D). Foram considerados cariados os dentes que apresentavam tanto cavitação quanto lesão de mancha branca. Os indivíduos foram divididos em dois grupos:

Grupo 1: Cinquenta e um (51) escolares de baixo risco à cárie dentária (CPO-D = 0)

Grupo 2: Sessenta e dois (62) escolares de alto risco à cárie dentária (CPO-D  $\geq$  1).

Os grupos foram assim categorizados devido o valor do índice CPO-D médio do bairro de 1,31, conforme último levantamento epidemiológico do Ministério da Saúde. Além disso, o bairro apresenta população de classe média e é abastecido com água fluoretada.

Os examinadores foram previamente calibrados. Para esse treinamento, empregou-se a técnica do consenso (OMS, 1991). Segundo essa técnica, havendo discordância, os examinadores discutem até chegar em um consenso quanto à interpretação do critério relativo a uma dada condição.

Os exames clínicos foram realizados na própria escola, com o auxílio de iluminação natural, espátula de madeira, gaze e luvas. Não foram realizados exames radiográficos.

Foram respondidos questionários acerca de hábitos dietéticos e de higiene bucal (frequência de escovação e uso de fio dental), uso de flúor, frequência de visita ao dentista e condição socioeconômica, e os dados foram comparados entre os grupos de alto e baixo risco/atividade de cárie dentária.

### Avaliação da presença de placa

A presença de biofilme foi evidenciada pelo Índice de Placa Visível (IPV, modificado), após a secagem dos incisivos centrais e laterais superiores.

### Avaliação dos parâmetros salivares

#### *Sialometria (Fluxo Salivar)*

Para a coleta de saliva estimulada, os escolares mastigavam durante 6 minutos uma tira de látex de 1 cm<sup>2</sup>, sendo que no primeiro minuto a saliva era desprezada. Toda a saliva coletada foi depositada em frascos coletores que haviam sido previamente pesados. Após a coleta, os frascos foram fechados hermeticamente e novamente pesados. A diferença de peso antes e após a coleta proporcionava o volume em mililitros de saliva expelida. Cada 1,0 g de massa de saliva correspondia a 1,0 mL de saliva.

Hipossalivação: < 0,7 mL/min

Baixo: entre 0,7 e 1,0 mL/min

Normal: entre 1,0 e 3,0 mL/min

#### *Medição de pH*

O pH salivar foi mensurado pelo método comparativo da fita de pH (*Merck*). A fita foi mantida no frasco contendo saliva por 5 min. Após este período a fita era retirada do frasco e colocada ao lado da tabela de cores, cada qual correspondente a um valor de pH.

#### *Capacidade de Tamponamento Salivar (CTS)*

A determinação da CTS se fez por titulometria, medindo-se o volume de ácido láctico 0,1 N necessário para baixar o pH salivar até o valor de 3,9. Dependendo do volume de ácido láctico utilizado, pôde-se classificar os indivíduos em três grupos:

1. Volume de ácido láctico utilizado > 1 mL = indivíduos resistentes à cárie.
2. Volume de ácido láctico utilizado = 1 mL = indivíduos suscetíveis à cárie.
3. Volume de ácido láctico utilizado < 1 mL = indivíduos muito suscetíveis à cárie

#### Obtenção de DNA

O DNA foi obtido a partir de células epiteliais da mucosa bucal, por um bochecho com solução de glicose a 3 %, por 1 min, e leve raspagem da mucosa jugal com espátula de madeira esterilizada (Trevilatto & Line, 2000). O DNA foi colhido em duplicata. Após a coleta, as amostras eram processadas da seguinte forma:

1. As amostras eram centrifugadas a uma velocidade de 2000 rpm por 10 min;

2. Descartado o sobrenadante, as células eram homogeneizadas com 1.300  $\mu\text{L}$  de solução de extração (TE 10 mM, EDTA 1 mM, SDS 0,5%);
3. Dez (10)  $\mu\text{L}$  de proteinase K (20  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ) eram adicionados em cada frasco para que houvesse hidrólise das proteínas contidas nas amostras;
4. Os frascos foram mantidos em banho-maria a uma temperatura de 50°C *overnight* (ON);
5. As amostras eram transferidas para tubos do tipo *ependorf* com volume de 2 mL;
6. Eram adicionados 500  $\mu\text{L}$  de acetato de amônio;
7. As amostras eram levadas ao vórtex por 5 min para a agitação da solução. Em seguida, eram centrifugadas por 10 min a uma velocidade de 17.000 g;
8. Após a centrifugação a solução era dividida em dois *ependorfs* de 1,5 mL, contendo cada um a quantidade de 900  $\mu\text{L}$  de solução;
9. A estes frascos foram acrescentados 540  $\mu\text{L}$  de isopropanol para a precipitação do DNA. Após os frascos serem invertidos por vinte vezes, foram centrifugados por 5 min a 17.000 g. Após este período, o isopropanol era descartado (o *pellet* continha o DNA);
10. Acrescentava-se etanol a 70 %, com posterior centrifugação por 5 min a 17.000 g;
11. O etanol era descartado e o *pellet* mantido. Os frascos eram mantidos abertos para evaporação do etanol. Após secos em temperatura ambiente, eram adicionados 50  $\mu\text{L}$  de TE (Tris 10mM, EDTA 1 mM, pH 7,8) para a ressuspensão do DNA.

#### Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)/Análise de Polimorfismo de Conformação de Fita Simples (SSCP)

##### *Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)*

A PCR se baseia na amplificação seletiva *in vitro* de regiões específicas de DNA e consiste em sucessivos ciclos de desnaturação da dupla fita, hibridação (anelamento) com oligonucleotídeos e extensão da cadeia de DNA, mediante a ação da *Taq* polimerase. Esta técnica apresenta vantagens consideráveis frente a outros métodos de análise molecular, pois é sensível e específica. A PCR permite a amplificação de fragmentos desde aproximadamente 50 pb até mais de 3.000 pb e, para cada fragmento de DNA que se quer amplificar, deve-se ter em conta suas características próprias, principalmente as quantidades das diferentes bases que a molécula contém, características estas que incidem sobre as distintas variáveis do processo. É necessário, portanto, otimizar as condições para cada fragmento a ser amplificado em particular.

Para as reações de PCR-SSCP eram confeccionados volumes finais de reação de 10,8  $\mu\text{L}$ . Um (1)  $\mu\text{L}$  de DNA era adicionado a 9,4  $\mu\text{L}$  de *PCR Supermix*® e 0,2  $\mu\text{L}$  (5 *pmol*) de cada primer. Os primers utilizados foram 5' CTTACTCCTTGGCCCCTCTC 3' (*forward*) e 5'

TCTCCCTTCCATTCAGCTTG 3' (*reverse*) e amplificavam uma seqüência de 238 pares de base, localizada no segundo (2º) éxon do gene da lactoferrina (Fig.1).

cagtcagtggtgaatccttactccttggcccctctctcccagGACTGTGTCTGGCTGGCCGTAGGAGGAGTGTTCA  
 GTGGTGCGCCGTATCCCAACCCGAGGCCACAAAATGCTTCCAATGGCAAAGGAATATGAGAA  
RAGTGCGTGGCCCTCCTGTCAGCTGCATAAAGAGAGACTCCCCATCCAGTGTATCCAGGCC  
 ATTGCGgtgagtcagtccgggtgttggtgggaccaagctgaatggaagggagagagaaatggaaaaagatagaacacgagct  
 ctcttactcctctgcttcacctgttgggcaacgaagtggggagccgtcctctc

Fig.1 – Seqüência do gene da LF contendo o polimorfismo A/G indicado pela letra **R**. As letras em caixa alta referem-se ao 2º éxon e as letras em caixa baixa, ao 2º e 3º íntrons. Os *primers*, que delimitam a seqüência a ser amplificada, encontram-se sublinhados.

As amplificações foram realizadas em um termociclador (*Eppendorf Master Cycle Gradiente*) e as condições de reação foram: desnaturação inicial a 96°C por 30 s, seguida de 40 ciclos com desnaturação a 94°C por 30 s, anelamento a 60°C por 30 s e extensão a 72°C por 30 s, com uma extensão final de 10 min a 72°C.

Ao fim da reação, procedeu-se a detecção do produto de PCR amplificado, por meio da técnica de SSCP.

#### *Polimorfismo Conformacional de Fita Simples (SSCP)*

A técnica SSCP é uma técnica de rastreamento de mutações/polimorfismos, geralmente subsequente á técnica PCR, que permite uma detecção rápida e sensível da maior parte das mutações de uma seqüência gênica. Ela é baseada na amplificação de regiões específicas, seguida por desnaturação dos produtos, e eletroforese em gel de poliacrilamida. Consiste em desnaturação do DNA por calor a 94°C por 5 min, o que permite a abertura da dupla fita, seguida de rápida permanência no gelo, evitando, assim, a renaturação da dupla fita. Este produto de PCR é posteriormente corrido em gel não-desnaturante, por um tempo que varia de acordo com o tamanho do fragmento amplificado (entre 4 e 36 h), e corado com prata (SAMMONS *et al.* 1981). A grande vantagem desta técnica é que quase todas as alterações na seqüência de bases do fragmento amplificado, entre 50 e 400 pb podem ser detectadas por desvios de mobilidade no gel, com uma confiabilidade de 98%. As desvantagens são: 1) algumas vezes, a dificuldade de interpretação das bandas, pois uma mesma banda (seqüência gênica/ fita simples de DNA) pode migrar de duas ou mais formas diferentes no gel; 2) polimorfismos/mutações contidos nas

extremidades do fragmento amplificado podem não ser detectados. No caso do presente estudo, o polimorfismo encontrava-se no meio da seqüência amplificada.

As condições utilizadas foram:

Desnaturação a 94°C por 5 min, seguida de rápida permanência em gelo. Aplicação em um gel de poliacrilamida a 7%, ao qual foi adicionado glicerol em concentração final de 5%.

Para a confecção do gel foram realizados os seguintes passos:

1. Lavaram-se os vidros com água e sabão. As placas foram desengorduradas com álcool absoluto e montadas com espaçadores;
2. Gel de poliacrilamida: 13,25 mL de água destilada, 5 mL de TBE 5% , 6,25 mL de acrilamida/bisacrilamida (39:1) com glicerol a 5 %, 250 µL de persulfato de amônio a 10 % (APS) e 9 µL de TEMED;
3. Os géis correram a 4°C, com uma pré-corrída de 10 min para equilíbrio da placa antes da aplicação das amostras;
4. Foram aplicadas as amostras com corantes para seu acompanhamento de migração. As amostras corriam a 200 V por um período de 5 h.

A coloração dos géis com nitrato de prata foi baseada na técnica descrita por SAMMONS et al. (1981), de acordo com o seguinte protocolo:

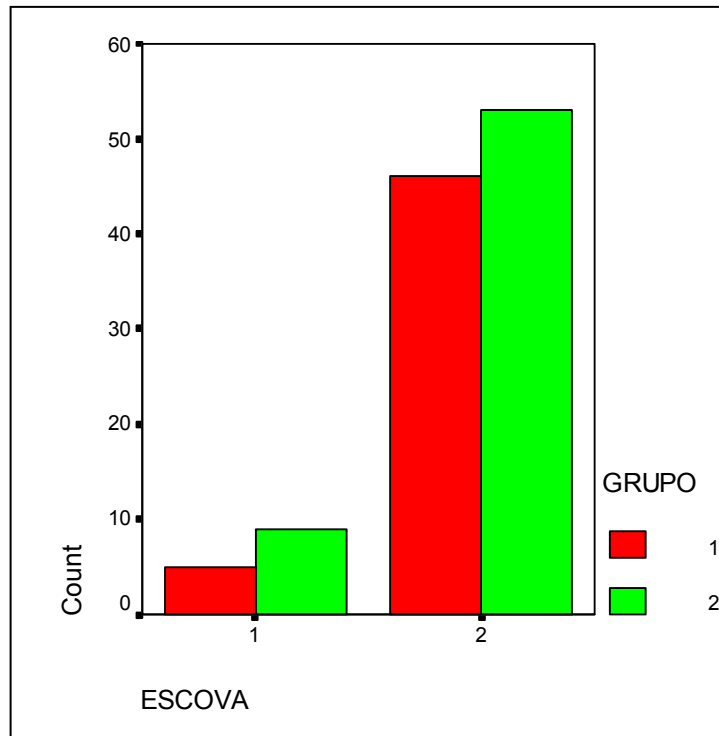
1. O gel era colocado em um recipiente e lavado rapidamente com água destilada (dH<sub>2</sub>O);
2. Solução de ácido nítrico a 1% (HNO<sub>3</sub>) foi adicionada por 3 min em agitação, seguida de duas lavagens de 15 s com dH<sub>2</sub>O;
3. Solução de nitrato de prata (AgNO<sub>3</sub>) a 0,2 % foi acrescentada por 20 min em agitação, seguida de duas lavagens de 5 s com dH<sub>2</sub>O;
4. Foi adicionada solução a 2,96 % de carbonato de sódio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) e 0,054 % de formaldeído, agitada até que a solução escurecesse (aproximadamente 1 min), seguida de lavagem por 15 s com dH<sub>2</sub>O;
5. Após descarte da dH<sub>2</sub>O, era adicionada solução de ácido acético a 10% por aproximadamente 5 min, seguida de duas lavagens de 15 s com dH<sub>2</sub>O;
6. Removida a dH<sub>2</sub>O, era adicionada solução de metanol e glicerol a 5% por 10 min, em agitação;
7. O gel era retirado do recipiente (sem ser lavado) e colocado entre placas de vidro, forradas com papel celofane e mantido sob pressão até que secasse totalmente para ser armazenado.

## 7.2 Análise Estatística detalhada

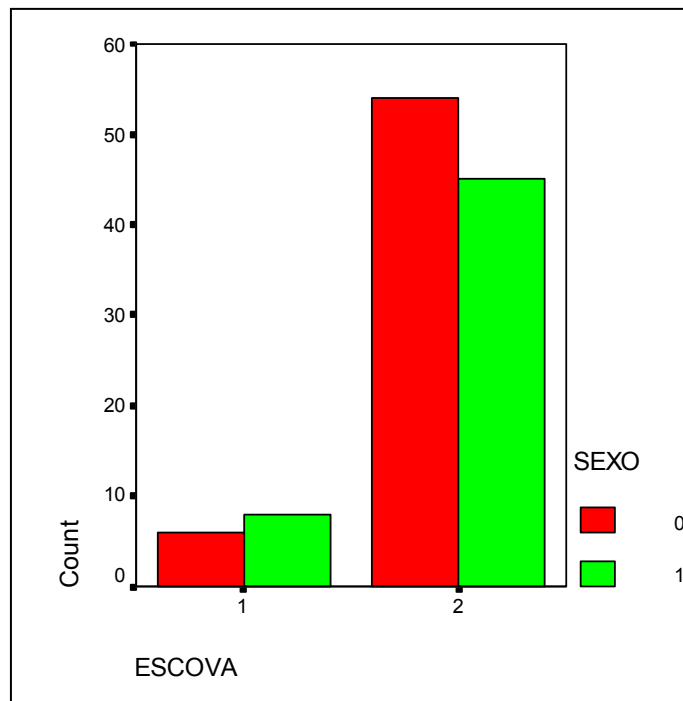
As variáveis comparadas entre os grupos com baixo e alto risco/atividade de cárie dentária foram:

1. Hábitos de higiene bucal: frequência de escovação (Figs. 1, 2, 3, 4) e uso do fio dental (questionário) (Figs. 5, 6);
2. Uso de flúor (questionário) (fig. 7);
3. Aspectos socioeconômicos/ classe socioeconômica (questionário; Critério de Classificação Econômica Brasil) (Fig. 8);
4. Frequência de ingestão de açúcar entre as refeições - dieta (questionário) (Fig. 9);
5. Frequência de visita ao dentista (questionário) (Fig. 10);
6. Presença de placa/ biofilme (análise clínica; Índice de Placa Visível - IPV) (Fig. 11);
7. Parâmetros salivares: pH, capacidade tampão e fluxo salivar (análise laboratorial) (Figs. 12, 13, 14);
8. Frequências genotípicas e alélicas (análise de campo - *coleta de DNA* -, e laboratorial - *PCR-SSCP*) (Figs. 15, 16).

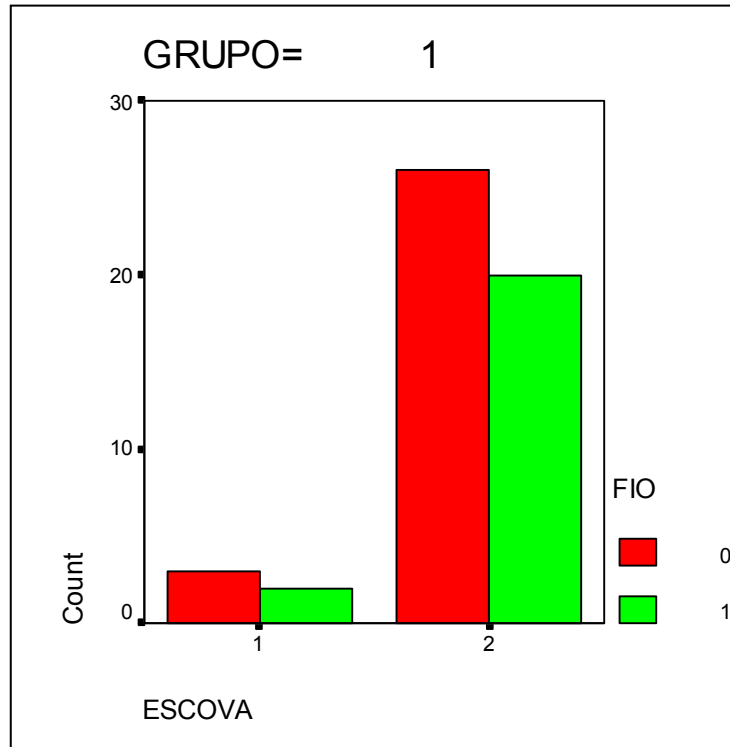
Todas as variáveis foram testadas a fim de verificar se houve diferenças significativas entre variáveis dependentes e independentes. Estas diferenças foram acessadas por meio do teste qui-quadrado ( $\chi^2$ ) ao nível de probabilidade  $p < 0,05$ . Nos casos em que ocorreram frequências esperadas menores que 5, em tabelas 2x2, utilizou-se, juntamente com o  $\chi^2$ , o teste exato de Fisher. Visando testar se havia diferenças entre os valores médios das variáveis: pH, capacidade tampão e fluxo salivar, em função dos grupos, utilizou-se o teste não-paramétrico U de Mann-Whitney, uma vez que as variáveis não apresentaram distribuição normal em relação aos dois grupos.



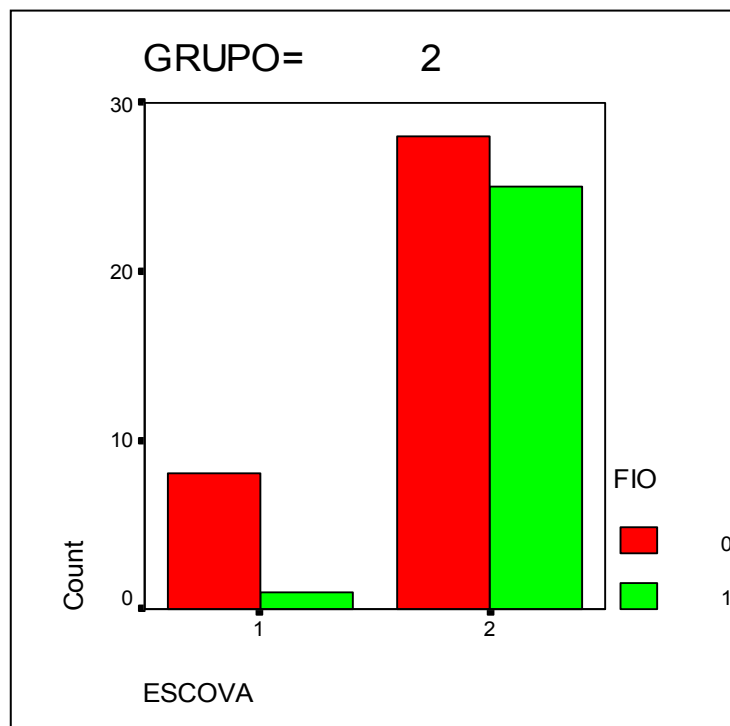
**Fig. 1.** Frequência de escovação nos grupos 1 e 2,  $n = 113$  ( $p = 0,45$ ). 1: escova uma vez; 2: escova mais de uma vez/dia.



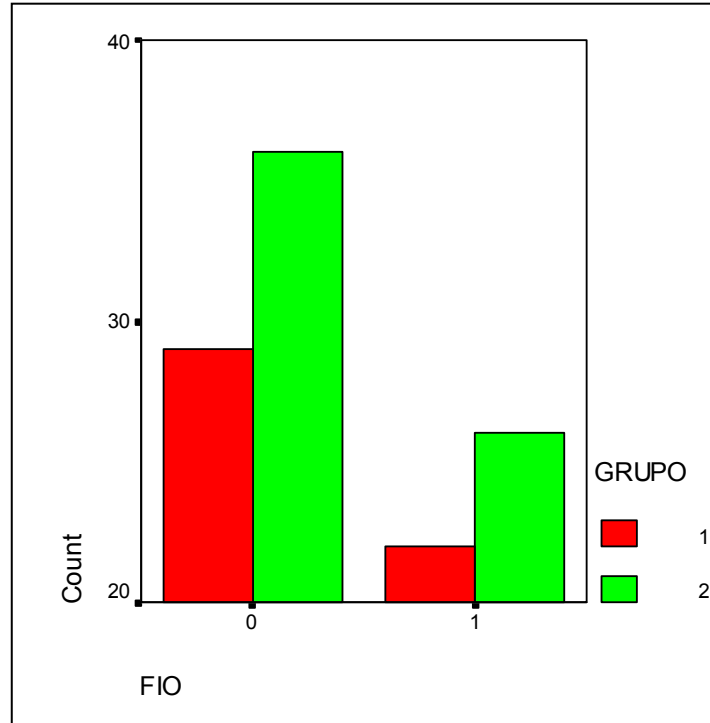
**Fig. 2.** Frequência de escovação de acordo com os sexos: masculino (0) e feminino (1),  $n = 113$  ( $p = 0,41$ ). 1: escova uma vez; 2: escova mais de uma vez/dia.



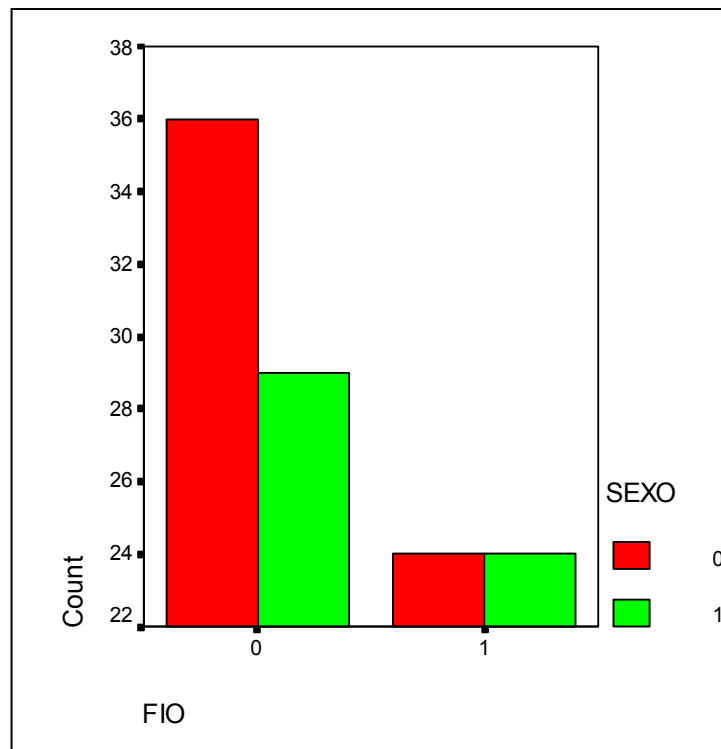
**Fig. 3.** Relação entre frequência de escovação e uso de fio dental no grupo 1 ( $p = 0,88$ ). 1: escova uma vez/dia; 2: escova mais de uma vez/dia. 0: não usa fio dental; 1: usa fio.



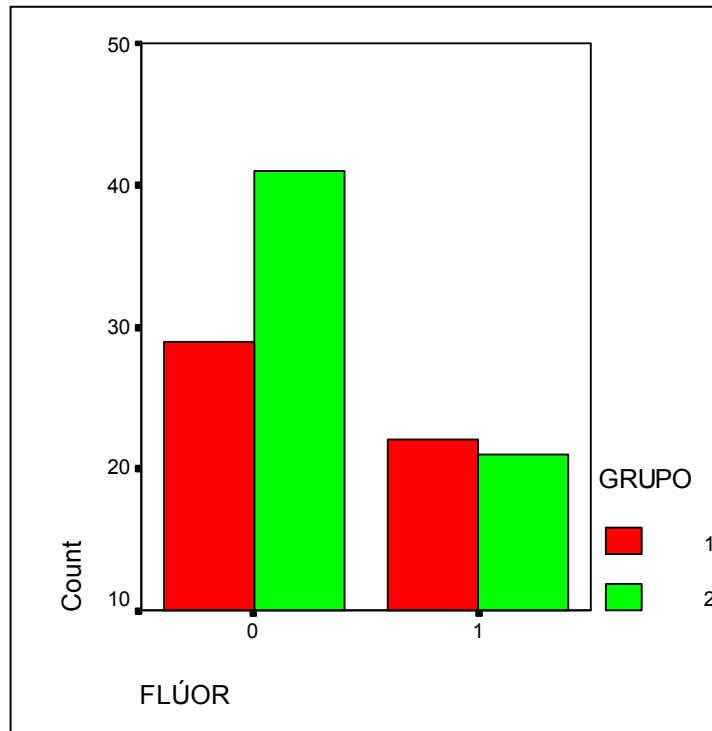
**Fig. 4.** Relação entre frequência de escovação e uso de fio dental no grupo 2 ( $p = 0,04$ ). 1: escova uma vez/dia; 2: escova mais de uma vez/dia. 0: não usa fio dental; 1: usa fio.



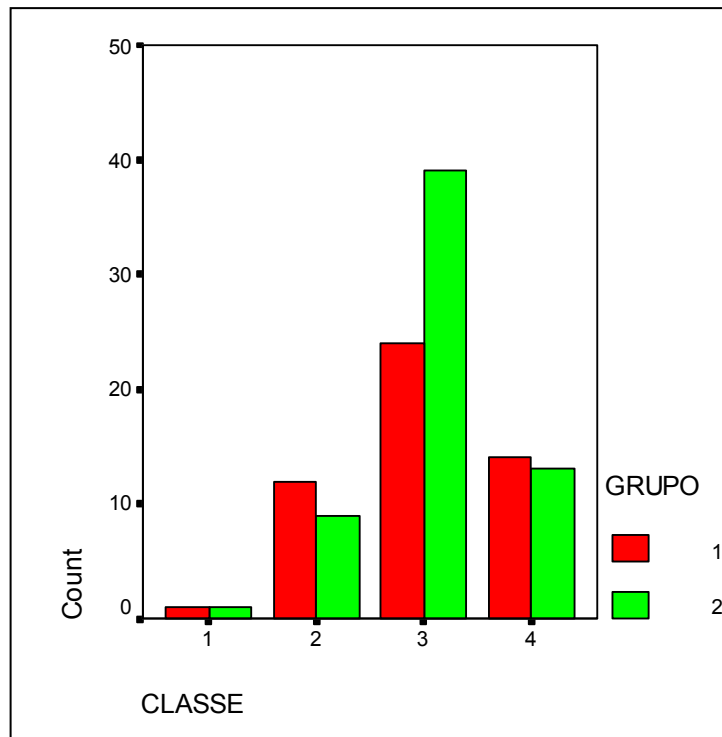
**Fig. 5.** Uso do fio dental nos grupos 1 e 2,  $n = 113$  ( $p = 0,89$ ) 0: não usa; 1: usa fio.



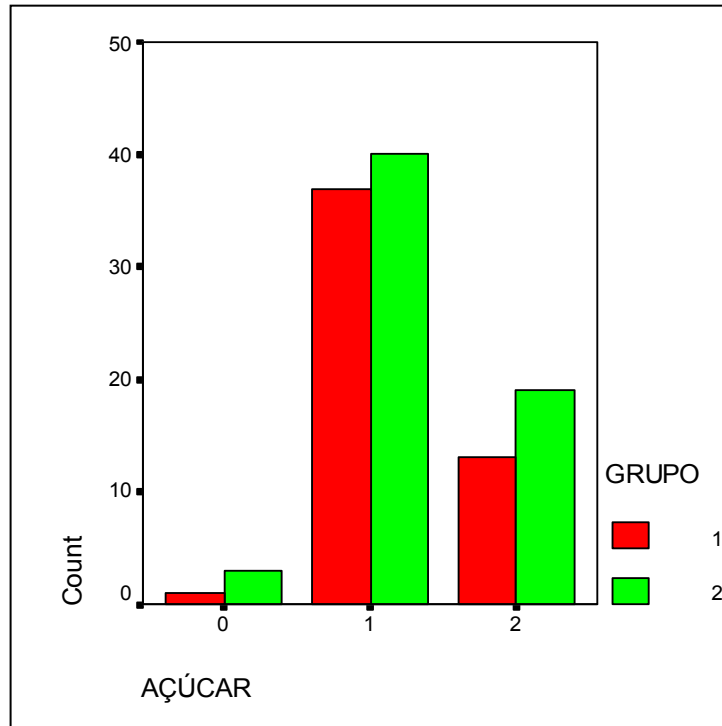
**Fig. 6.** Uso do fio dental nos grupos 1 e 2, considerando o sexo masculino (0) e feminino (1),  $n = 113$  ( $p = 0,57$ ). 0: não usa; 1: usa fio.



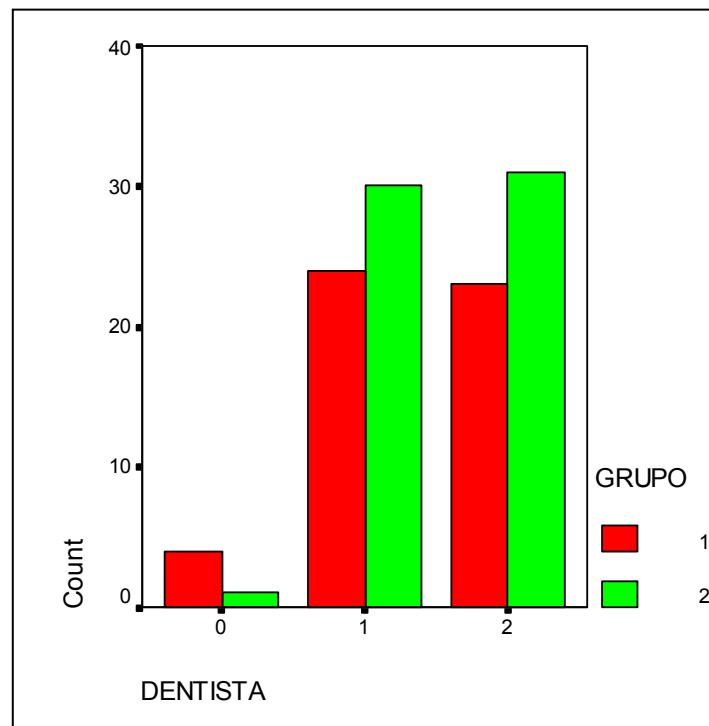
**Fig. 7.** Uso de flúor nos grupos 1 e 2, n = 113 ( $p = 0,31$ ). 0: não usa; 1: usa.



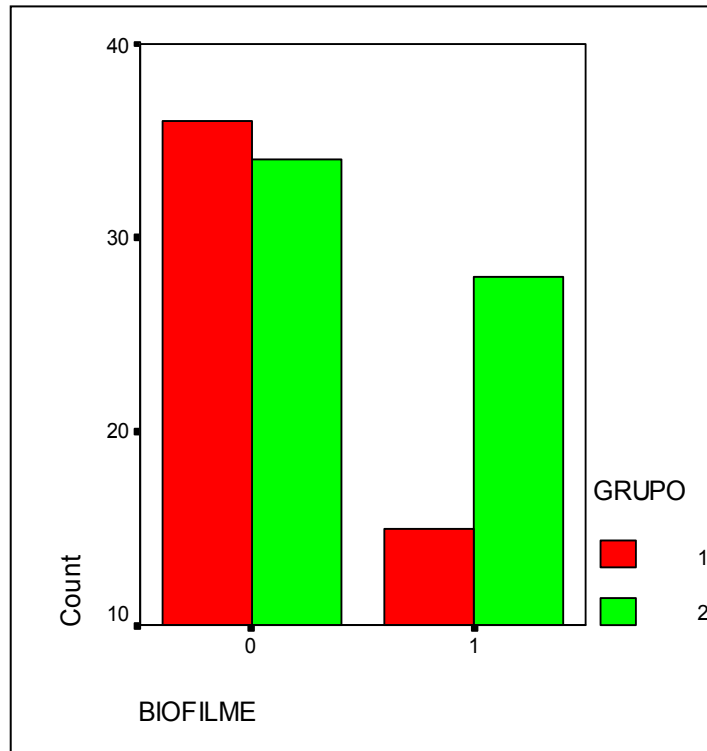
**Fig. 8.** Nível socioeconômico nos grupos 1 e 2, n = 113 ( $p = 0,85$ ). 1: classe pobre; 2: média-baixa; 3: média-média, e 4: alta.



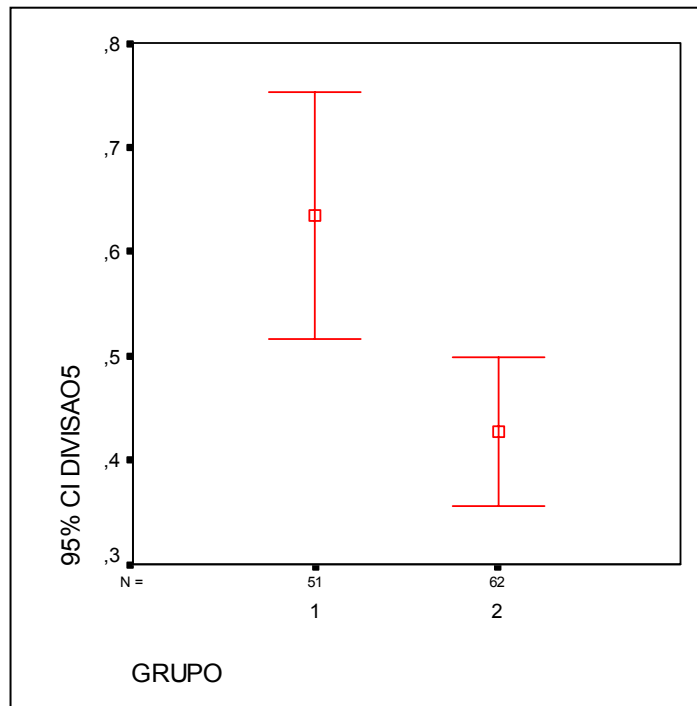
**Fig. 9.** Frequência de ingestão de açúcar entre as refeições nos grupos 1 e 2,  $n = 113$  ( $p = 0,74$ ).  
0: não consome; 1: consome até três vezes/dia; 2: consome mais de três vez/dia.



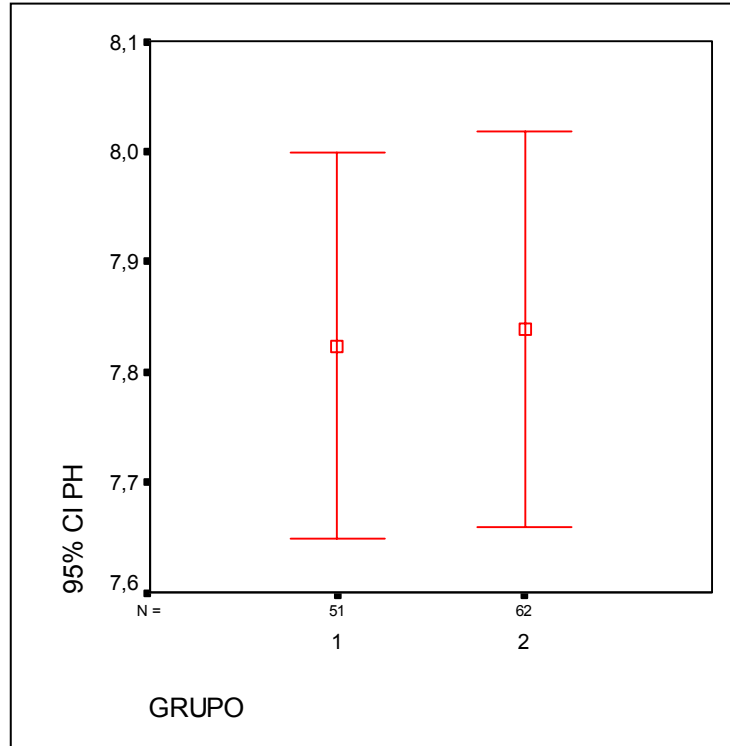
**Fig. 10.** Avaliação de visitas ao dentista nos grupos 1 e 2,  $n=113$  ( $p =0,41$ ). 0: não visita/ano;1: visita uma vez/ano; 2: mais de uma vez/ano.



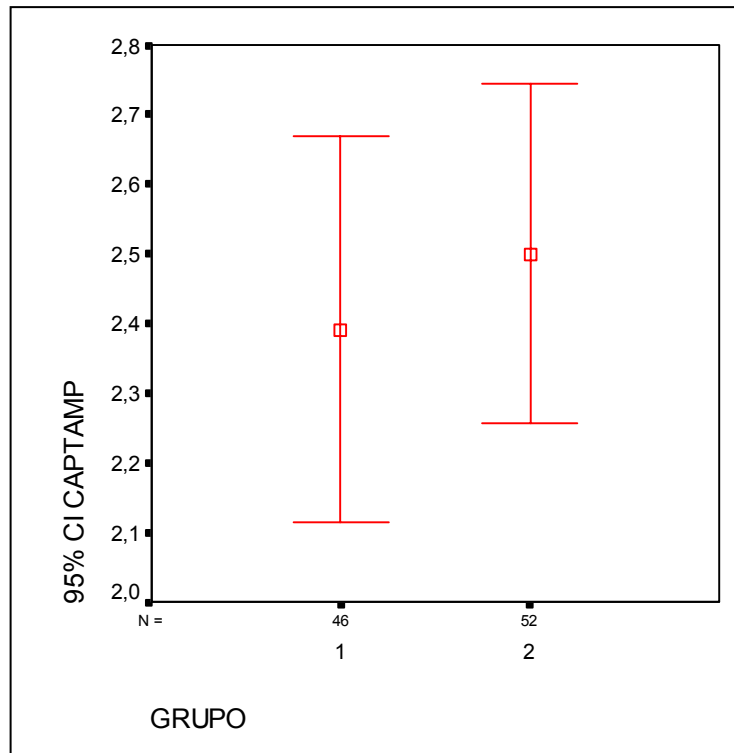
**Fig. 11.** Presença de biofilme nos grupos 1 e 2,  $n = 113$  ( $p = 0,08$ ). 0: ausência de biofilme; 1: presença.



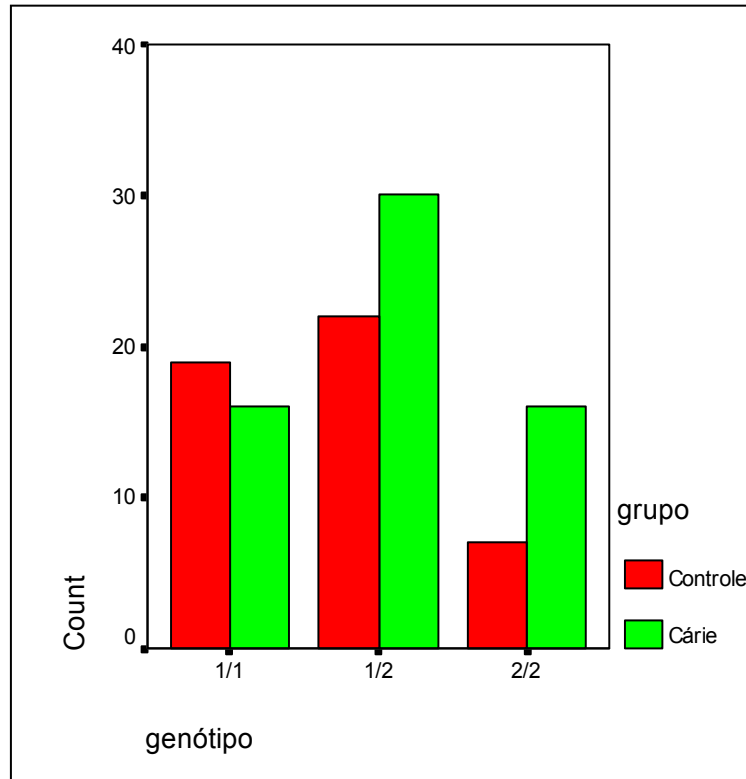
**Fig. 12.** Fluxo salivar nos grupos 1 e 2,  $n = 113$  ( $p = 0,00$ ).



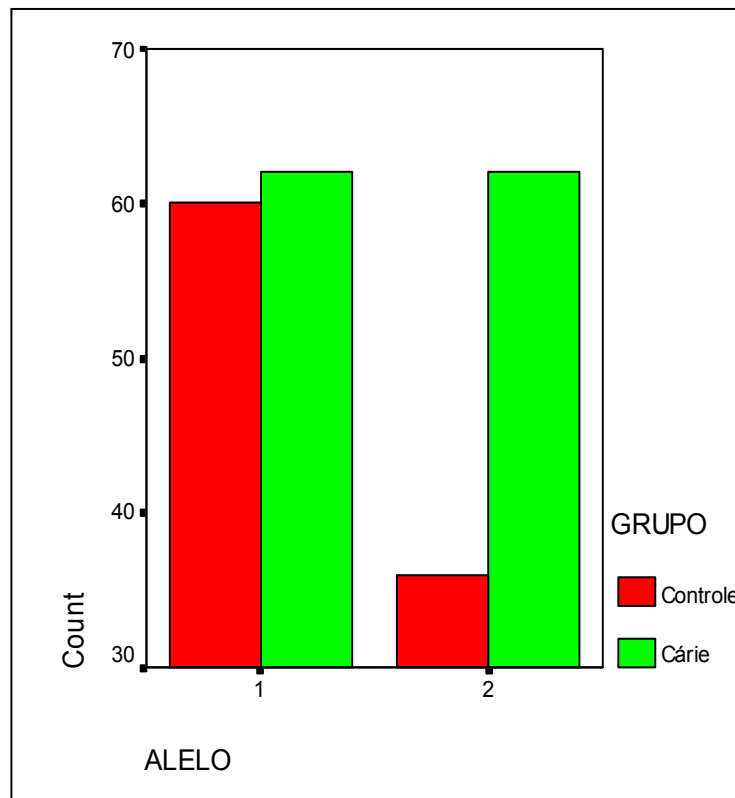
**Fig. 13.** Intervalo de confiança do pH nos grupos 1 e 2, n= 113 ( $p = 0,71$ ).



**Fig. 14:** Capacidade tampão nos grupos 1 e 2, n= 113 ( $p = 0,55$ ).



**Fig. 15.** Frequências genótípicas nos grupos 1 e 2, n= 110 ( $p = 0,19$ ).



**Fig. 16.** Frequências alélicas nos grupos 1 e 2, n=110 ( $p = 0,07$ ).

### 7.3 Termo de Consentimento Livre Esclarecido

Eu, \_\_\_\_\_, com número de registro Civil (RG) \_\_\_\_\_, emitido por (pela) \_\_\_\_\_, autorizo meu(minha) filho(a) a participar da pesquisa intitulada “Susceptibilidade Genética à Cárie Dentária em Escolares de 12 Anos”, sob a responsabilidade da Profa. Dra. PAULA CRISTINA TREVILATTO (CROSP 65.038), do curso de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), e a ser examinado por alunos por ela indicados. Essa pesquisa tem como finalidade a determinação do risco à cárie, através de análises de CPOD (dentes cariados, perdidos e restaurados), índice de placa e evidenciação da presença de cárie ativa, de medidas de pH, fluxo salivar, capacidade tampão da saliva e dosagem de lactoferrina. Adicionalmente, serão colhidas amostras de saliva, de onde se extrairá o DNA para análise de susceptibilidade genética à cárie dental. Escolares com alto índice de cárie (alto risco) receberão esclarecimentos sobre o que é a cárie e como preveni-la e orientações sobre técnica de escovação e utilização do fio dental, além de receberem uma aplicação tópica de flúor. Se desejarem, poderão ser encaminhados para realizar tratamento odontológico na Clínica da PUC, conforme disponibilidade, sendo esta situada na Avenida Imaculada Conceição n. 1155, Prado Velho, nesta cidade. As informações advindas de análises em tais escolares somente poderão ser divulgadas no meio científico se o anonimato de meu(minha) filho(a) for preservado. Sei que se de alguma forma meu(minha) filho(a) for prejudicado(a), ou se eu precisar de esclarecimentos adicionais, posso entrar em contato com os profissionais responsáveis. Este termo foi entendido, o qual eu firmo e conservo uma cópia.

Data: \_\_/\_\_/\_\_

---

Assinatura

## 7.4. Questionários

### 7.4.1. Questionário I

Nome do aluno:

*Atenção:* O objetivo desse questionário é selecionar indivíduos de alto e baixo risco à cárie dentária, na tentativa de elucidar alguns aspectos do risco à mesma. As informações desse questionário serão restritas ao conhecimento dos alunos que apreciarão o risco à cárie dos escolares.

1.) Seu filho apresenta qualquer problema de saúde, como diabetes?

sim                       não

infecção por vírus, como hepatite ou HIV?

sim                       não    Infecção: \_\_\_\_\_

faz quimioterapia ou radioterapia?

sim                       não

2.) Tomou antibiótico nos últimos 6 meses?

sim                       não    Qual foi o problema? \_\_\_\_\_

3.) Toma antiinflamatórios como rotina?

sim                       não    Qual? \_\_\_\_\_

4.) Toma algum medicamento?

sim                       não    Qual? \_\_\_\_\_

## 7.4.2. Questionário II

Nome do aluno: \_\_\_\_\_

1- Quantas vezes você escova os dentes por dia?

nenhuma vez ( )

uma vez ( )

mais de uma vez ( )

2- Você usa fio dental?

Sim ( )

não ( )

3- Quantas vezes você ingere açúcar (salgadinhos, bolachas, lanchinhos), por dia, fora das refeições?

nenhuma vez ( )

até 3 vezes ( )

mais de 3 vezes ( )

4- Quantas vezes ao ano vai ao dentista?

nenhuma vez ( )

1 vez ( )

2 vezes ou mais ( )

5- Usa flúor?

sim ( )

( ) não

## 7.4.3. Questionário III - ficha de avaliação

Idade: 12 anos

Sexo:

Raça: Caucasiano

Anotações:

Ficha de avaliação do risco à cárie dental.

CPOD BIOFILME DENTAL (IPV)  SIM  NÃORISCO ALTO RISCO BAIXO 

Determinação de classe social.

Classe:

Item	Número de itens Possuídos						
	0	1	2	3	4	5	6 e +
Televisor	0	2	4	6	8	10	12
Rádio	0	1	2	3	4	5	6
Banheiro	0	2	4	6	8	10	12
Automóvel	0	4	8	12	16	16	16
Empregada	0	6	12	18	24	24	24
Posse de	Pontos						
Aspirador de pó	5						
Máquina de lavar roupa	2						
Grau de Instrução do Chefe de Família	Pontos						
Analfabeto ou primário incompleto	0						
Primário completo	1						
Ginásio completo	3						
Colegial completo	5						
Superior completo	10						

Fonte: Critério de Classificação Econômica Brasil

## 7.5 Carta de aceite do Comitê de Ética em Pesquisa.



Pontifícia Universidade Católica do Paraná  
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde

Curitiba, 30 de Abril de 2.003.

Of. 066/2003

**Ref. “Suscetibilidade genética à cárie dentária em escolares de 12 anos”.**

Prezado (a) Pesquisador (es),

Venho por meio desta informar a Vossa Senhoria que o Comitê de Ética em pesquisa do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde – PUCPR, que no dia 30 de abril do corrente ano aprovou o Projeto Intitulado “Suscetibilidade genética à cárie dentária em escolares de 12 anos”, pertencente ao Grupo III, sob o registro no CEP nº 104 e será encaminhado ao CONEP para o devido cadastro. Lembro ao senhor (a) pesquisador (a) que é obrigatório encaminhar relatório anual parcial e relatório final a este CEP.

Atenciosamente,

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Emílio José Scheer Neto', is written over a circular stamp or seal.

Prof. Dr. Emílio José Scheer Neto  
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa

Ilma. Sr<sup>a</sup>.  
Paula Cristina Tevilatto  
Curso de Odontologia

## 7.6 Normas das revistas para onde os artigos serão enviados

### 7.6.1 *Revista de Clínica e Pesquisa Odontológica*

A Revista de Clínica e Pesquisa Odontológica é uma publicação oficial da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Curso de Odontologia, **Programa de Pós Graduação em Clínica Odontológica - Mestrado Acadêmico.**

#### **Instruções para os autores**

##### **Instruções gerais**

Os artigos deverão ser enviados para:

Prof. Dr. Wilson Denis Martins, Editor em Chefe, RCPO  
Faculdade de Odontologia, CCBS, PUCPR  
Rua Imaculada Conceição. 1155 - Prado Velho - CEP 80215-901  
Curitiba, PR, Brasil  
Fones 41 362 1177 41 9977 1299 Fax 41 263 2371  
e-mail wilson@rla01.pucpr.br

As seguintes **contribuições** serão consideradas para publicação: trabalhos científicos originais, relatos de casos de interesse especial, notas clínicas ou técnicas (comunicações breves), revisões, editoriais (mediante convite dos editores), revisões de livros e cartas ao editor.

Os artigos serão submetidos à revisão pelo Conselho Editorial e pelo Conselho Consultivo (**revisão por pares**). A decisão final de aceitação ou rejeição de artigos é tomada pelo Conselho Editorial. Artigos serão considerados para publicação no entendimento que **não foram publicados** previamente ou estejam sendo submetidos simultaneamente para publicação em outra Revista, em qualquer idioma.

Quaisquer afirmativas, opiniões e políticas expressadas nesta Revista são de exclusiva **responsabilidade do(s) autor(es)**, sendo que nem o Editor nem a Editora Champagnat garantem, endossam ou se responsabilizam por quaisquer produtos ou serviços anunciados.

O Editor reserva-se o direito de fazer correções editoriais e literárias no material aceito para publicação, ouvido (s) o(s) autor(es).

A submissão de um artigo significa que o(s) autor(es) automaticamente concordam em firmar cessão de **direitos autorais** à Editora Champagnat, em caso de aceite para publicação.

Por ocasião do aceite do artigo, o autor correspondente (responsável) receberá um formulário de cessão de direitos autorais, que deverá retornar firmado por todos os autores.

Trabalhos que contenham resultados de estudos humanos e/ou animais somente serão aceitos para publicação se estiver claro que todos os **princípios de ética** foram utilizados na investigação. Estes trabalhos devem obrigatoriamente incluir uma afirmação de que o protocolo de pesquisa foi aprovado por um comitê de ética institucional.

Os pacientes têm o **direito à privacidade**, o qual não pode ser infringido sem um consentimento esclarecido. Em caso de utilização de fotografias de pessoas/pacientes, estas não podem ser identificáveis ou as fotografias devem estar acompanhadas de permissão específica escrita para uso e divulgação das imagens. O uso de máscaras oculares não é considerado proteção adequada para a anonimidade.

Os editores não podem aceitar responsabilidade pelo extravio, dano ou perda de material relacionado com os artigos.

Os artigos deverão ser submetidos em estilo de publicação em revistas científicas. A não observação desta solicitação levará a uma demora importante na publicação, podendo até mesmo causar a rejeição sumária do artigo.

Os trabalhos podem ser escritos em **Português** ou **Inglês**. Seja qual for o idioma escolhido, o(s) autor(es) que não forem fluentes em Inglês ou Português devem assessorar-se na preparação de seus artigos. A assistência de pessoa fluente no idioma escolhido facilitará o processo de revisão e reduzirá o tempo de publicação, no caso de aceitação do artigo.

Deverá ser obtida permissão do autor original ou da Editora para uso direto de material (texto, fotos, desenhos, etc) previamente publicado, cujos **direitos autorais** não pertençam ao(s) autor(es) do artigo submetido. O(s) autor(es) são responsáveis pela obtenção de permissões para publicação de todo material emprestado e são igualmente responsáveis por quaisquer taxas ou pagamentos relacionados com estas permissões.

A maioria dos artigos aceitos serão publicados na RCPO sem custos para o(s) autor(es). Porém, acordos especiais poderão ser necessários para publicação de **ilustrações coloridas**, caso em que o autor será solicitado a arcar com os custos das mesmas

Quaisquer associações **comerciais** que possam criar conflitos de interesse relacionados com trabalhos submetidos devem ser divulgadas. Todas as **fontes de financiamento externo** que possam ter dado suporte aos trabalhos devem ser indicadas em notas de rodapé, bem como quaisquer filiações corporativas do(s) autor(es).

Estas instruções estão de acordo com o **Comitê Internacional de Editores de Revistas Médicas** - Uniformização das Exigências para Manuscritos Submetidos às Revistas Biomédicas.

### **Submissão de trabalhos**

Favor apresentar três cópias de **texto**, em papel formato A4, fonte Arial ou Times New Roman, espaço duplo e margens de 3 cm. Recomenda-se aos autores reter uma cópia do trabalho, na forma apresentada.

Apresentar as **ilustrações** em forma de três cópias de cada fotografia, bem como três cópias de cada tabela, figura ou desenho. Em virtude de serem essenciais para a qualidade da impressão, somente serão aceitas fotografias em papel brilhante, em tamanho mínimo de 8 x 10 cm e máximo de 13 x 18 cm. As radiografias devem ser apresentadas como impressões (fotografias), mostrando as imagens ósseas/dentárias brancas/claras.

As ilustrações serão devolvidas ao(s) autor(es) mediante solicitação.

**Legendas:** cada ilustração deve ser acompanhada por uma legenda, datilografadas em espaço duplo em folha separada do corpo do trabalho.

**Tabelas:** devem ser datilografadas em espaço duplo, incluindo cabeçalhos de colunas, dados e notas de rodapé da tabela. As tabelas serão apresentadas em folhas separadas do corpo do trabalho. As tabelas deverão ser auto-explicáveis e deverão complementar, não duplicar, o texto. Um título conciso deverá ser apresentado para cada tabela. As colunas deverão ter cabeçalhos descritores dos dados inseridos. Notas de rodapé das tabelas deverão ser datilografadas imediatamente abaixo da tabela e conter definições das abreviaturas.

Os artigos podem ser submetidos **eletronicamente**, seja em *floppy disc*, *CD Rom* ou por e-mail. Discos e CD Roms devem ser novos e formatados, compatíveis com PC IBM (MAC compatíveis não são aceitos). Os discos devem ser rotulados claramente com o nome da Revista, o nome do(s) autor(es), o título do artigo e o programa de texto usado (ex. Word). Os arquivos não devem ser convertidos para o formato ASCII. Todo material deve ser embalado adequadamente, de maneira a protegê-lo contra possíveis danos de transporte.

Quando apresentando ilustrações em discos ou e-mail, os diferentes arquivos devem ser separados e não incorporados ao documento de texto. As tabelas também devem ser apresentadas como arquivos separados.

**Imagens** devem ser apresentadas em formatos JPEG ou TIFF. Imagens coloridas devem ser CMYK, com pelo menos 300 DPI. Imagens cinzas igualmente devem apresentar pelo menos 300 DPI. Combinações de escala de cinza e desenhos artísticos devem conter pelo menos 1200

DPI e ser acompanhadas por um desenho de prova. Desenhos artísticos devem conter pelo menos 1200 DPI e ser acompanhados por provas. Incluir informações sobre hardware e software com o(s) disco(s).

### **Página de título**

Deve conter o título do artigo, o nome completo do(s) autor(es), qualificações acadêmicas, cargos e filiações institucionais. Não há limitações quanto ao **número de autores**, porém todos os relacionados devem ter contribuído substancialmente para o trabalho. Contribuições apenas de suporte não devem ser incluídas como co-autoria, porém agradecidas ao final do artigo.

O **autor correspondente** deve ser indicado nesta página e fornecidos seus dados para contato (endereço, telefone, fax, e-mail).

Apresentar também nesta página as palavras-chave do artigo.

### **Resumo**

Em página separada, apresentar o resumo do trabalho com máximo de 150 palavras (relatos de casos e revisões).

### **Resumo estruturado**

Requere-se um resumo estruturado com máximo de 200 palavras para os trabalhos de pesquisa científica (artigos científicos originais). O resumo estruturado deve conter os seguintes cabeçalhos:

*Objetivos, Planejamento do Estudo; Resultados e Conclusões.*

Os *Objetivos* refletem a finalidade do estudo (a hipótese que está sendo testada);

O *Planejamento do Estudo* deve incluir a montagem do trabalho, o material ou casuística (número e tipo), o tratamento ou intervenção e a análise estatística. Deve haver uma descrição do tipo de estudo ("duplo cego", "estudo prospectivo aleatório e controlado", "análise retrospectiva", etc.

Os *Resultados* incluem os resultados do estudo e sua significância estatística, se apropriada.

*Conclusões*: somente as conclusões confirmadas pelos dados devem ser apresentadas. Deve ser possível estabelecer a conexão entre as conclusões e os *Objetivos*. As limitações do trabalho devem ser indicadas e as implicações para a prática clínica devem ser ressaltadas.

### **Referências**

([www.icmje.org](http://www.icmje.org))

As referências devem ser numeradas consecutivamente na ordem em que são primeiramente **mencionadas no texto**. Identificar as referências no texto, tabelas e legendas por números arábicos entre parênteses.

Evitar o uso de resumos como referências. Referências a **artigos aceitos** para publicação, mas ainda não publicados, devem ser designados como *in press*. Os autores devem obter permissão escrita para citar tais artigos, bem como documento que comprove a aceitação. Artigos submetidos, mas ainda não publicados, devem citados no texto como *documento não publicado*, também com permissão por escrito da fonte.

Evitar citar *comunicação pessoal*, a não ser em caso de informação considerada essencial não disponível em fonte pública. Neste caso, o nome da pessoa e data de comunicação deve ser citada no texto em nota de rodapé.

### **Artigos em Revistas**

Revistas (*Journals*) convencionais

Até seis autores:

- Naylor CD, Williams JI, Guyatt G. Structured abstracts of proposal for clinical and epidemiological studies. *J Clin Epidemiol* 1991; 44:731-737.

Mais de seis autores:

Listar os seis primeiros autores seguidos de et al.

- Parkin DM, Clayton D, Black RJ, Masuyer E, Friedl HP, Ivanov E, et al  
Childhood leukaemia in Europe after Chernobyl: 5 year follow-up. *Br J Cancer* 1996; 73:1006-12.

Sem indicação do autor:

- Cancer in South Africa [editorial]. *S Afr Med J* 1994;84:15

Organização como autora:

- The Cardiac Society of Australia and New Zealand. Clinical exercise stress testing. Safety and performance guidelines. *Med J Aust* 1996;164:282-4.

Suplemento de volume:

- Shen HM, Zhang QF. Risk assessment of nickel carcinogenicity and occupational lung cancer. *Environ Health Perspect* 1994;102 Suppl 1:275-82.

Suplemento de número:

- Payne DK, Sullivan MD, Massie MJ. Women's psychological reactions to

breast cancer. *Semin Oncol* 1996;23(1 Suppl 2):89-97.

### **Livros e outras monografias**

Autor(es) do livro:

- Berkovitz BKB, Holland GR, Moxham BJ. Color atlas & textbook of oral anatomy. Chicago:Year Book Medical Publishers; 1978.
- Ringsven MK, Bond D. Gerontology and leadership skills for nurses. 2nd ed. Albany:Delmar Publishers; 1996.

Capítulo do livro:

- Israel HA. Synovial fluid analysis. In: Merrill RG, editor. Disorders of the temporomandibular joint I: diagnosis and arthroscopy. Philadelphia: Saunders; 1989. p. 85-92.

Anais de congressos, conferências e congêneres

- Damante JH, Lara VS, Ferreira Jr O, Giglio FPM. Valor das informações clínicas e radiográficas no diagnóstico final. Anais X Congresso Brasileiro de Estomatologia; 1-5 de julho 2002; Curitiba, Brasil. Curitiba, SOBE; 2002.
- Bengtsson S, Solheim BG. Enforcement of data protection, privacy and security in medical informatics. In: Lun KC, Degoulet P, Piemme TE, Rienhoff O, editors. MEDINFO 92. Proceedings of the 7th World Congress of Medical Informatics; 1992 Spt 6-10; Geneva, Switzerland. Amsterdam:North-Holland; 1992. p. 1561-5.

Trabalhos acadêmicos (teses e dissertações):

- Kaplan SJ. Post-hospital home health care: the elderly's access and utilization [dissertation]. St. Louis: Washington Univ.; 1995.
- Pereira FJ. Macroscopic and microscopic findings in the temporomandibular joint. A clinical and autopsy study with reference to age, sex and signs and symptoms [thesis]. Malmö: Lund Univ.; 1995.

Dicionários e similares:

- Stedman's medical dictionary. 26th ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1995. Apraxia; p. 119-20.

Artigos científicos em formato eletrônico:

- Al-Balkhi K. Orthodontic treatment planning: do orthodontists treat to cephalometric norms ?J Contemp Dent Pract 2003 Nov. 4 (4) Fall issue. Available from: URL: [www.thejcdp.com](http://www.thejcdp.com)

### 7.6.2 *Acta Odontologica Scandinavica*

**\*\*\*Note to Authors:** please make sure your contact address information is clearly visible on the **outside** of all packages you are sending to Editors.\*\*\*

**Manuscripts** Manuscripts should be sent in triplicate together with an electronic file (see below) to: *Acta Odontologica Scandinavica*, Folke Lagerlöf, Institute of Odontology, Karolinska Institutet, 4064, SE-14104, Huddinge, Sweden. Original research papers, review articles, letters, and short communications will be considered for publication.

Manuscripts must be submitted in final, fully corrected form on the express condition, stated in the covering letter, that it has not been published, simultaneously submitted, or already accepted for publication elsewhere. All authors must sign the covering letter. The manuscript shall be clearly printed on a high-quality printer, in American English, on one side of the paper only. Use double spacing throughout and margins of at least 3 cm. Begin each of the following sections on separate pages: title page, abstract and key words, text, acknowledgements, references, individual tables, and figure legends. Number the pages consecutively beginning with the title page. The text should normally be divided into: Introduction, Materials and methods, Results, and Discussion. Use a clear system of headings to divide up and clarify the text, with not more than three grades.

The author must warrant that whenever appropriate, any patient or participant mentioned in the text or shown in a photograph has given informed consent to publication of such material. When informed consent has been obtained, it should be indicated in the published article.

Please use these simple guidelines when preparing your electronic manuscript:

1. Please be consistent.
2. The same elements should be keyed in exactly the same way throughout the manuscript.
3. Do not break words at the end of lines.
4. Use a hyphen only to hyphenate compound words.
5. Enter only one space after the full stop at the end of a sentence.
6. When emphasizing words, please use the italic feature of your word processor software.

7. Do not justify your text; use a ragged right-hand margin.
8. Use a double hyphen (--) to indicate a dash in text.
9. Do not use the lowercase l for 1 (one) or the uppercase O for 0 (zero).
10. The space bar should only be used as a word separator.
11. Use TAB when indenting paragraphs or separating columns in tables.

*Title page:* The title page shall contain: 1) The title of the article, which should be concise but informative. Subtitles may be used if necessary, but must be short. 2) A short title not exceeding 40 letters and spaces for use as a running headline. 3) The full name of each author. 4) The departments and institutions to which the work should be attributed, including the city and country.

*Abstract and key words:* A short abstract should be presented on the second page. Since most databases truncate abstracts longer than 250 words, this is the absolute limit in length. The abstract should state briefly the object of the investigation, basic procedures, main findings, and principal conclusions. Only standard abbreviations should be used. Not more than five key words should be inserted in alphabetical order after the abstract. Use terms from the Medical Subject Headings list from Index Medicus whenever possible and do not repeat words in the article title. The name and current address of the author(s) to whom correspondence, proofs, and offprints are to be addressed must be typed below the key words. Include phone and fax numbers and, if available, e-mail address.

*Tables:* Type each table, double-spaced, on a separate sheet. Do not submit tables as photographs. Number tables consecutively with arabic numerals and give each a short descriptive heading. Give each column a short or abbreviated heading. Place explanatory matter in footnotes to the table, not in the heading. Explain in the footnotes all non-standard abbreviations used in the table. For footnotes, use the following symbols in this sequence: \*, †, ‡, §, ||, ¶, \*\*, ††, etc. Omit internal vertical rules (lines). If data from another published or unpublished source are used, obtain permission and acknowledge fully. A table shall as far as possible be self-explanatory and understandable without reference to the text of the article.

*Figures:* All illustrations are to be considered figures. Figures should be submitted in triplicate and numbered consecutively with Arabic numerals. Letters, numbers, and symbols must be clear, in proportion to each other, and large enough to be legible when reduced for publication.

The author should refer to the journal and decide whether a figure is to cover, one, one-and-a-half, or two columns of the journal when printed and then plan the figure accordingly. Photographs should be submitted as near to their printed size as possible. If magnification is significant, indicate it by a bar on the print, not by a magnification factor in the figure legend. Line drawings should be drawn in India ink or printed on a high-quality printer on appropriate paper. They should be drawn in proportion to each other, so that letters, numbers, and symbols in different figures will be the same size after reduction. Use sans-serif fonts for lettering the axes, and only capitalize the first letter. Do not attempt to hand-letter line drawings and photographs.

All figures should have a label pasted on the back indicating the number of the figure, the name(s) of the author(s), and the top. Do not write directly on the backs of photographs or damage them by using paper clips. Pack them so that they will not be bent or damaged in the post. If photographs of persons are used, either the subjects must not be identifiable, or written permission to use the photographs must accompany the manuscript.

Each figure should have a legend containing sufficient information to make the figure intelligible without reference to the text. All the legends must be typed together, double-spaced, on a separate sheet(s). If a figure has been published previously, acknowledge the original source and submit written permission from the copyright holder to reproduce it.

Color figures must be submitted as color negatives or positive transparencies and, when necessary, accompanied by drawings marked to indicate the region to be reproduced. The authors will be charged for the extra cost of color illustrations. Grants to cover part of this cost may be given by the Foundation on application to the Editor.

*Acknowledgements:* Acknowledge only persons who have made substantive contributions to the study. Authors are responsible for obtaining written permission from everyone acknowledged by name because readers may infer their endorsement of the data and conclusions. The source of financial support should be acknowledged here.

*References:* The list of references shall be typed, double-spaced, on a separate sheet(s), and the references shall be numbered consecutively in the order in which they are first mentioned in the text. The reference list will therefore not be in alphabetical order. The reference list must include all authors referred to in the text, and in the tables or legends. The accuracy of the reference list must

be verified before the manuscript is submitted for publication. Identify references in the text, tables, and legends by Arabic numerals in parentheses. In the text, references shall be made by giving the name of the author followed by the appropriate number in parentheses, e.g. 'Hansen (1) has reported...', 'Hansen & Olsen (2) have reported...', or by simply giving the appropriate number in parentheses, e.g. 'As has recently been reported (1, 2) ..'. When there are three or more authors, in the text only the name of the first author shall be given, followed by 'et al.'. The reference list should follow the style set forth in *Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals*. The names of journals should be abbreviated in accordance with the style used in *Index Medicus*. Some examples follow:

1. Troedson M, Derand T. Photoelastic experiments on facings laminated to teeth. *Acta Odontol Scand* 1995;53:270-4.
2. Lund JP, Sessle BJ. Neurophysiological mechanisms. In: Zarb GA, Carlsson GE, Sessle BJ, Mohl ND, editors. *Temporomandibular joint and masticatory muscle disorders*. 2nd ed. Copenhagen: Munksgaard; 1994. p. 188-203.

**Abbreviations:** Use standard abbreviations. The following source may be consulted: *Scientific style and format. The CBE manual for authors, editors, and publishers*. 6th ed. Cambridge: Cambridge University Press; 1994. Any non-standard abbreviations (to be avoided if possible) should be explained in the text the first time they are used. Avoid abbreviations in the title. Quantities and units should be expressed in accordance with the recommendations of the *Système International d'Unités (SI)*. Tooth designations should be in accordance with the two-digit system (ISO 3950-1977).

**Electronic manuscripts** When a new or revised manuscript is submitted to the Editor, it must be accompanied by a diskette containing an electronic file *identical* to the manuscript. The diskette should be labeled with the author's name and the name of the computer platform and version of the word processing system used. Styled Microsoft Word files in PC format are preferred. For the final version Taylor & Francis can receive files from any word processing system. Graphic elements should be kept as separate files in EPS or TIFF format. Halftones and color photos should be included separately. For further information and support, please contact us by e-mail at [post@tandf.no](mailto:post@tandf.no).