



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ

ESCOLA DE SAÚDE E BIOCÊNCIAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM SAÚDE COLETIVA

TAYLA CAVALLARI

**ESTUDO DOS FATORES SOCIOAMBIENTAIS, INDIVIDUAIS E GENÉTICOS
DA DOENÇA CÁRIE**

CURITIBA

2015

TAYLA CAVALLARI

**ESTUDO DOS FATORES SOCIOAMBIENTAIS, INDIVIDUAIS E GENÉTICOS
DA DOENÇA CÁRIE**

**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
em Saúde Coletiva**

**Orientadora: Prof. Dra. Renata Iani
Werneck**

**Co-orientadores: Prof. Dr. Samuel
Jorge Moysés;
Prof. Dra. Simone Tetu Moysés**

CURITIBA

2015

Dados da Catalogação na Publicação
Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/PUCPR
Biblioteca Central

C337e
2015 Cavallari, Tayla
 Estudo dos fatores socioambientais, individuais e genéticos da doença
 cárie / Tayla Cavallari ; orientadora: Renata Iani Werneck ; coorientadores:
 Samuel Jorge Moyses, Simone Tetu Moyses. – 2015.
 57 f. : il. ; 30 cm

 Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná,
 Curitiba, 2015
 Inclui bibliografias

 1. Cáries dentárias – Aspectos sociais. 2. Cáries dentárias - Aspectos
 ambientais. 3. Cáries dentárias – Aspectos genéticos. I. Werneck, Renata Iani.
 II. Moyses, Samuel Jorge. III. Moyses, Simone Tetu. IV. Pontifícia Universidade
 Católica do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. V. Título.

CDD 20. ed. – 617.67

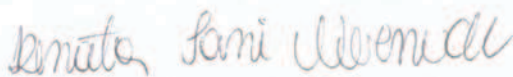
TERMO DE APROVAÇÃO

TAYLA CAVALLARI

ESTUDO DOS FATORES SOCIOAMBIENTAIS, INDIVIDUAIS E GENÉTICOS DA DOENÇA CÁRIE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como parte dos requisitos parciais para a obtenção do Título de **Mestre em Odontologia**, Área de Concentração em **Saúde Coletiva**.

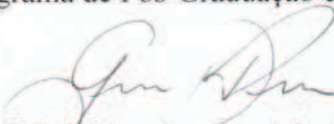
Orientador(a):



Profª Drª Renata Iani Werneck
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, PUCPR



Profª Drª Simone Tetu Moysés
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, PUCPR



Profª Drª Giovana Daniela Pecharki
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, UFPR

Curitiba, 07 de agosto de 2015.

Dedicatória

Aos meus pais, Dionir e lone, por todo amor que eles me transmitem;

Aos meus amigos, Dionir e lone, por todo apoio e compreensão;

Aos meus professores, Dionir e lone, por me ensinarem as mais belas lições da vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus pela minha vida, minha saúde, meus familiares e meus amigos. Por estar sempre presente guiando os meus caminhos, iluminando e fortalecendo os meus pensamentos.

À minha orientadora Renata Iani Werneck, modelo de comprometimento e dedicação. Ela é merecedora de um “*qualis A*”. Agradeço a oportunidade por ter acreditado em mim para conduzir esta pesquisa. Hoje tento ser uma pessoa mais tolerante, mais paciente, mais crítica com os meus objetivos, mais responsável e mais confiante para dar o próximo passo. Devo isso a ela. Agradeço a atenção, persistência e motivação. Mestre é aquele que faz questão de ser um espelho para o aluno e tenta ao máximo estar disposto a ajudá-lo. Renata é assim e se parte disso eu conseguir carregar comigo, ela terá a certeza de que seu exemplo foi levado adiante. Me sinto honrada por ter feito parte da sua primeira turma de mestrado.

Ao professor Samuel Jorge Moysés: Tenho enorme admiração por sua integridade e capacidade intelectual. Suas aulas me hipnotizaram e me fizeram sair desse sistema algemado pelo conhecimento pronto. Conduta impecável, caráter e ética. Não tenho dúvidas que você é o portador da maior “*base de dados*” que eu já conheci.

À professora Simone Tetu Moysés: Agradeço a paciência e o carinho durante esses dois anos. Simone é mil mulheres em uma. Mãe, amiga, professora, coordenadora, esposa. Tenho certeza que suas sábias contribuições aumentaram o “fator de impacto” desta pesquisa.

Ao professor Léo Kriger: É mais que admirável o amor que ele tem pela odontologia. Ele é puro brilho no olhar e uma vontade que não cessa. Gostaria, do fundo do coração, um mundo de “Léos”. De coração de Léo, de bom humor de Léo, de visões de Léo, de intenções de Léo, “*referências*” de Léo. Ídolo - sem mais. Agradeço a oportunidade da experiência na docência.

Aos queridos colegas de turma: Letícia, Alan e Aline: A verdade é que tudo fica mais difícil conforme o tempo passa. As amizades se restringem a uma mão e a vida se torna corrida e de rápida passagem. Desde o primeiro dia, formamos um grupo unido e construímos uma bela amizade. Vocês são os meus “*descritores*” de apoio, fidelidade e companheirismo. Tenho certeza que o esforço e talento de cada um serão reconhecidos.

Aos amigos e colaboradores do laboratório: Naiara, Helóisa, Irenice, Geovana, Rafael, Mônica e Cléber: Muito obrigada! Sempre fui adepta aos desafios. Existem momentos na nossa vida, que nós precisamos mostrar para nós mesmos que somos capazes. Obrigada por me ensinarem a pipetar, diluir soluções, ajustar concentrações e mexer em equipamentos laboratoriais. Obrigada também, por me salvarem em todas as minhas “margens de erro”.

Aos meus pais Dionir e Ione: A linguagem sempre fica escassa para agradecer e definir o que eles representam. Portanto, sem delongas, eu afirmo: Meu amor e gratidão estão “*cientificamente comprovados*” por cada sorriso que vocês me transmitem.

À minha querida irmã Thiala, por todo cuidado e atenção. Pessoa singular. Ela tem o dom de amar e semear o bem. Não vejo “*relevância*” na minha vida sem a sua presença. Obrigada por me ouvir e me aconselhar. Agradeço igualmente ao meu cunhado Guilherme, que não mede esforços para conviver com a nossa família com carinho e respeito.

À minha linda afilhada Luísa, “*amostra*” de amor incondicional. Com toda a inocência de uma criança, ela me mostrou que o melhor da vida a gente sente.

Ao meu noivo Leandro, que dentre “*as razões de chance*” de encontrar um companheiro pra vida, ele confirmou a “*hipótese*” que ainda existe amor de verdade. Admiro seu jeito, suas conquistas e sempre estarei na primeira fila te aplaudindo, torcendo por você e por nós. Meu exemplo de cirurgião-dentista! Estendo o agradecimento à sua família que me acolheu como filha.

Aos amigos que sempre estão ao meu lado, fazendo com que eu me torne uma pessoa melhor, mais amada e confiante.

À Pontifícia Universidade Católica do Paraná pela oportunidade de aprendizado e contribuição na minha formação profissional.

À Fundação Araucária, pelo suporte financeiro para realização deste projeto.

Aos pacientes e seus responsáveis, por acreditarem e confiarem no meu trabalho para realizar esta pesquisa.

“Um homem precisa viajar. Por sua conta, não por meio de histórias, imagens, livros ou TV. Precisa viajar por si, com seus olhos e pés, para entender o que é seu. Para um dia plantar as próprias árvores e dar-lhes valor. Conhecer o frio para desfrutar o calor. E o oposto. Sentir a distância e o desabrigo para estar bem sob o próprio teto. Um homem precisa viajar para lugares que não conhece para quebrar essa arrogância que nos faz ver o mundo como o imaginamos, e não simplesmente como é ou pode ser. Que nos faz professores e doutores do que não vimos, quando deveríamos ser alunos e simplesmente ir ver. É preciso questionar o que se aprendeu. É preciso ir tocá-lo.”

Amyr Klink

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CPOD	Dentes Cariados Perdidos e Obturados
DL	Desiquilíbrio de Ligação
FAM	Frequência Alélica Mínima
GWA	<i>Genoma Wide Association</i>
ICDAS	<i>International Caries Detection and Assessment System</i>
mM	Milimolar
M	Molar
µL	Microlitro
nm	Nanômetro
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PUCPR	Pontifícia Universidade Católica do Paraná
rpm	Rotação por minuto
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
Tris	<i>Tris(hydroxymethyl)aminomethane</i>

RESUMO

Introdução: A cárie dentária consiste em uma doença crônica, pertencente ao grupo das doenças complexas. Fatores ambientais e individuais determinam a sua manifestação. Pesquisas vem sendo conduzidos para melhor compreender o componente genético associado à suscetibilidade e resistência no desenvolvimento da doença cárie. Estudos genéticos bem conduzidos a partir da extração do DNA, amplificam a capacidade da pesquisa neste campo de conhecimento. O progresso na biologia molecular incentivou a busca de diferentes protocolos para a extração de DNA a fim de criar uma maneira eficaz, não-invasiva e com baixo custo. **Objetivos:** Investigar a associação de polimorfismos nos genes *KLK4* e *MUC5B* com a doença cárie e avaliar a quantidade e pureza do DNA obtido por diferentes meios de armazenagem de saliva. **Métodos:** Por meio de um estudo caso-controle, pacientes com 12 anos ou mais, foram recrutados em uma clínica de ensino odontológica, de acordo com sua experiência de cárie. Para o diagnóstico da doença foram utilizados os critérios estabelecidos no *ICDAS (International Caries Detection and Assessment System)*. O grupo controle foi composto por pacientes que possuíam todos os elementos dentários com score zero. Fatores socioeconômicos, hábitos de higiene e dietéticos foram investigados. As células foram obtidas por meio de bochechos com solução de glicose. Efetuou-se a extração do DNA e genotipagem. Análises uni, bi e multivariadas foram conduzidas. Para o segundo artigo, foram coletadas 3 amostras (A,B,C) de saliva (com 5 ml de glicose) de trinta estudantes do curso de odontologia, entre 18 a 23 anos. Para amostra A foi realizada a primeira fase da extração de DNA no dia da coleta. A amostra B permaneceu durante um mês na geladeira e a amostra C permaneceu por um mês no congelador antes de efetuar a primeira fase da extração. A extração do DNA foi realizada com acetato de amônio 10M e EDTA 1mM. Avaliou-se a pureza das amostras por espectrofotometria. As análises estatísticas foram implementadas utilizando o software SPSS versão 21.0. **Resultados:** Dos 200 indivíduos recrutados, 100 eram do grupo caso e 100 do grupo controle. Na análise bivariada, foram encontrados resultados estatisticamente significativos para as variáveis etnia ($p = 0.008$), biofilme ($p < 0.001$) e gengivite ($p < 0.001$). Para o gene *KLK4* foi encontrado suscetibilidade à doença cárie para o alelo A do marcador rs2242670 ($p = 0.009$). O gene *MUC5B* conferiu resistência para o alelo C nos marcadores rs2735733 ($p = 0.004$), rs2249073 ($p < 0.001$) e rs2857476 ($p < 0.001$). Ao

conduzir a análise multivariada, permaneceram significativas as variáveis biofilme ($p=0.026$) e os marcadores do gene *MUC5B* rs2735733 ($p=0.004$), rs2249073 ($p<0.001$) e rs2857476 ($p<0.001$). No segundo artigo, não houve diferença estatística entre as amostras A, B e C em relação a quantidade ($p=0.36$) e pureza ($p=0.17$).

Conclusão: Variações genéticas nos genes estudados podem contribuir na suscetibilidade (gene *KLK4*) e na resistência (gene *MUC5B*) à doença cárie. Todos os métodos de armazenagem de células bucais apresentaram resultado satisfatório em relação à quantidade e pureza de DNA

SUMÁRIO

1. Introdução	01
1.1 Epidemiologia da Doença Cárie	01
1.2 Epidemiologia Genética	02
1.3 Genes candidatos	06
1.3.1 Gene <i>KLK4</i>	05
1.3.2 Gene <i>MUC5B</i>	06
1.4 Extração de DNA	06
1.4.1 Protocolo de extração do DNA para células bucais	06
2. OBJETIVO	09
2.1 Objetivos Específicos	09
3. ARTIGO 1	10
4. ARTIGO 2	21
4.1 Artigo 2 – versão em inglês	28
5. CONCLUSÃO	35
6. REFERÊNCIAS	36
7. ANEXOS	40
7.1 Termo de consentimento livre e esclarecido	40
7.2 Questionário	44
7.3 Tabela score ICDAS	49
7.4 Aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa –PUCPR	50
7.5 Normas para publicação do artigo 1	52
7.6 Normas para publicação do artigo 2	55

1. INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia da Doença Cárie

A cárie dentária consiste em uma doença crônica, de etiologia multifatorial, pertencente ao grupo das doenças complexas (1,2). O acometimento da doença pode provocar limitações no cotidiano, ao desencadear dores e perdas dentárias, interferindo na qualidade de vida dos indivíduos (3).

Alguns modelos que tentam explicar os fatores causais e o desenvolvimento da doença vem sendo discutidos ao longo dos anos. Keyes, em 1969, elaborou a tríade etiológica da doença cárie, na qual define que a interação de três fatores primários são fundamentais na iniciação e progressão da mesma, sendo estes: microrganismos cariogênicos, carboidratos fermentáveis e hospedeiro suscetível (4). Newbrum, na sequência, acrescentou o fator tempo a essa tríade (5), uma vez que a existência desses três fatores exclusivamente, não resultaria na perda de mineral instantaneamente. De acordo com Ferjeskov e Manji em 1990, o desenvolvimento da doença é influenciado por variáveis socioeconômicas, comportamentais e biológicas (6).

Atualmente, sabe-se que os determinantes sociais de saúde estão interligados com desenvolvimento da cárie dentária (7,8), uma vez que estes envolvem aspectos sociais, culturais, econômicos e comportamentais de uma determinada população (9). De acordo com Dahlgren e Whitehead, determinantes sociais de saúde, dispõe-se em diferentes camadas, de acordo com seu nível de abrangência, sendo uma camada proximal, associada a determinantes individuais, e uma camada distal, na qual se encontram os macro determinantes (10). Dentre os fatores proximais no desenvolvimento da doença cárie podem ser citados: o hospedeiro, os microrganismos, a composição da saliva e a dieta. Os determinantes distais incluem, dentre outros, a classe social, a renda, escolaridade, o comportamento, o acesso aos serviços de saúde (2). Apesar do declínio no índice CPOD (média de dentes permanentes cariados, perdidos e obturados) (11), a doença cárie continua sendo um dos principais agravos da saúde bucal (3). No Brasil, no ano de 2003, crianças com 12 anos possuíam CPOD 2,8 e em 2010 esse índice reduziu para 2,1 (12).

Estudos demonstram que o declínio global na prevalência da doença cárie não é uniforme em todos os países (13), sendo notados níveis crescentes de desigualdade. Embora estratégias preventivas tenham sido adotadas, como à expansão da fluoretação das águas de abastecimento público, alterações nos critérios de diagnóstico, aplicações de selantes e controle da dieta, a efetividade no controle da doença ainda não é evidente (14).

Embora já pesquisados diversos fatores relacionados com a instalação e desenvolvimento da doença cárie, a combinação de todos estes ainda não explica completamente a dinâmica da doença, uma vez que entre indivíduos expostos de maneira similar aos mesmos fatores de risco da doença cárie, apenas alguns a desenvolvem. Desse modo, a literatura sugere a hipótese que variações na herança genética podem influenciar na etiopatogenia da doença cárie.

1.2 Epidemiologia Genética

As doenças genéticas podem ser classificadas como mendelianas, causadas pela alterações em um único gene, e doenças complexas (15), que podem resultar da interação entre fatores genéticos e não genéticos, como a hanseníase, vitiligo e obesidade. Em saúde bucal pode se hipotetizar a doença periodontal e a doença cárie.

Estudos vem sendo conduzidos para melhor compreender a natureza do provável componente genético associado com a suscetibilidade ou a resistência no desenvolvimento da doença cárie (16). A discussão da possível influencia genética da herança genética iniciou em 1930 (17). A primeira abordagem envolveu estudos experimentais em animais (18,19), os quais relataram que camundongos sob as mesmas condições ambientais diferiam na experiência de cárie supostamente por serem geneticamente heterogêneos. Posteriormente, pesquisas foram realizadas por meio de estudos observacionais, incluindo populações humanas, como a análise de agregação familiar, estudos com gêmeos e análise de segregação complexa.

As análises de agregação familiar avaliam associações significativas de um determinado fenótipo entre membros de uma família (pedigree), resultando no excesso de compartilhamento de variações genéticas e comportamentais, visto que membros de uma mesma família compartilham informações genéticas e estão

1 expostos aos mesmos fatores ambientais. Esses estudos estimam a razão dos
2 riscos de recorrência (λ_r). No caso da doença cárie, há evidências sobre a
3 agregação dos casos, considerando que a existência de fatores genéticos podem
4 controlar o desenvolvimento da doença (20).

5 Os estudos de gêmeos consistem na comparação da taxa de concordância
6 entre os gêmeos monozigóticos e dizigóticos. Pesquisas mostraram que gêmeos
7 monozigóticos (geneticamente idênticos) possuíam maior concordância na doença
8 cárie quando comparados aos gêmeos dizigóticos (21,22).

9 Estudos de segregação complexa descrevem o modo de herança genética
10 que melhor explica as observações em um conjunto de pedigrees, por meio de:
11 parâmetros, frequências alélicas e penetrâncias. No caso da doença cárie, apenas
12 um estudo foi conduzido até o momento (23). Neste estudo, realizado em uma
13 colônia isolada do Amazonas – Pará (Brasil), dois fenótipos foram investigados,
14 sendo índice CPOD e número de dentes cariados. Um efeito genético conferindo
15 resistência à doença para ambos os fenótipos foi detectado.

16 Com a consolidação da epidemiologia genética, estudos moleculares que
17 utilizam técnicas de análise do DNA e mapeamento de genes envolvidos no
18 desenvolvimento da doença foram iniciados (24,25), sendo estes: estudos de
19 ligação e de associação. Os estudos de ligação tem como objetivo localizar regiões
20 cromossômicas que podem conter genes relacionados ao fenótipo. O primeiro *scan*
21 genômico de ligação para doença cárie foi realizado por Vieira e colaboradores
22 (26), utilizando 392 marcadores. A população estudada foi composta por 46
23 famílias e cinco prováveis loci foram identificados. Três destes estavam
24 relacionados com a baixa suscetibilidade para doença cárie (5q31.1, 14q11.2 e
25 Xq27.1) e dois para alta suscetibilidade à doença (13q31.1, 14q24.3).

26 Os estudos de associação podem ser do tipo caso-controle ou baseada em
27 famílias. Os estudos do tipo caso-controle comparam indivíduos afetados e não
28 afetados em uma população e testam se um determinado alelo ocorre em uma
29 frequência significativamente diferente nos dois grupos, ou seja, indivíduos com a
30 doença (casos) são comparados com controles (que não possuem a doença).
31 Dessa forma, a exposição aos fatores de risco é mensurada em cada grupo, e com
32 isso, o risco associado a cada fator pode ser estimado. Os estudos baseados em
33 família comparam a transmissão do alelo dentro da família (trio – pai, mãe e filho)

(27).Tais estudos permitem avaliar a magnitude da relação entre um determinado gene e a ocorrência do fenótipo, objetivando a identificação precisa de variações genéticas no desenvolvimento da doença. As análises de associação podem ser conduzidas em pequena escala, por meio de genes candidatos, ou em larga escala denominados *Genome Wide Association* (GWA), no qual há uma tentativa de investigar grande parte dos genes e seu envolvimento com a doença (28).

No fluxograma abaixo verificamos todas as estratégias que podem ser conduzidas em estudos na área de epidemiologia genética.

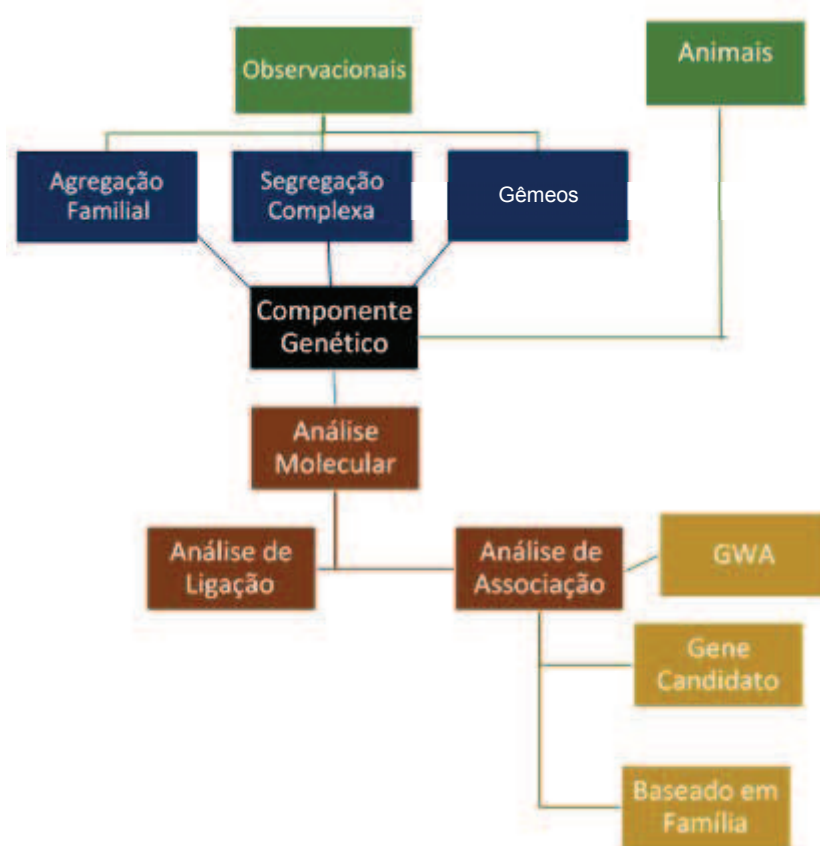


Figura 1- Estratégias de Investigação na Genética Epidemiológica adaptado de Werneck et al (29)

Desde a década de 1980 estudos tentam associar genes candidatos com a doença cárie, sendo que alguns já apresentaram associação. Grande parte das pesquisas foram desenvolvidas analisando os genes relacionados com a formação, desenvolvimento e mineralização do esmalte. Estes genes são: Amelogenina (*AMELX*) (30,31), Tuftelina (*TUFT1*) (32), Ameloblastina (*AMBN*) (33), Enamelina (*ENAN*) (34), Aquaporina (*AQP5*), Calicreína (*KLK4*) (35), Metaloproteinases (*MMP13* e *MMP20*) (36,37). Outro estudo investigou um gene envolvido com a formação, desenvolvimento e mineralização da dentina: *Dentin Sialoprotein* (*DSPP*) (35). Outra linha de pesquisa analisou genes que possuíam relação com a resposta imune do hospedeiro. Estes genes são: *Mannose-binding lectin* (*MBL*)(38), *HLA-DRB1*, *HLA-DQB1* (39), *DEFB1* (40). Os genes *TAS1R2*, (receptor do sabor) e *GLUT2* (transporte de glucose), foram pesquisados e observado associação com a doença cárie (41). Finalmente, genes relacionados com os aspectos composicionais da saliva também estão sendo investigados. Estes genes são: *saliva carbonic anhydrase VI* (*CA6*), *proline-rich protein gene* (*PRPs*) (42), Lactotransferrina (*LTF*) (43).

1.3 Genes candidatos

Para esta pesquisa dois genes candidatos foram selecionados.

1.3.1 Gene *KLK4*

O gene *KLK4* está localizado no braço longo do cromossomo 19 (19q13.41). A proteína que é codificada por esse gene é a calcicreína-4, que possui 230 aminoácidos e se expressa durante todo o estágio de maturação e no final do estágio de transição do esmalte (44). O desenvolvimento para formação do esmalte ocorre por meio de 3 estágios subsequentes: secretório, de transição e de maturação, até que toda matriz orgânica seja degradada e substituída quase que na totalidade por componente mineral. Para que esta degradação aconteça, existe a participação de enzimas, dentre as quais se encontra a calcitreína-4. Ela atua clivando a amelogenina e outras proteínas da matriz de esmalte, para que os cristais de hidroxiapatita sejam depositados de maneira ordenada no local e haja a maturação do esmalte. Ou seja, essa enzima tem um papel fundamental na mineralização do esmalte (45). Um estudo conduzido anteriormente com o gene

KLK4, encontrou uma associação significativa para a doença cárie (35), com o marcador rs2235091 na população caucasiana

1.3.2 Gene *MUC5B*

O gene *MUC5B* está localizado no braço curto do cromossomo 11 (11p15.5). A proteína *MUC5B* pertence a família das mucinas, que são componentes macromoleculares e possuem elevada massa molecular (46). As mucinas recobrem, protegem a mucosa e a superfície do dente. A característica principal da *MUC5B* consiste na capacidade de formar géis, propiciando viscosidade à saliva, favorecendo a lubrificação para manter a boca úmida (47). Este gene foi relacionado com algumas doenças humanas, incluindo sinusite, doença pulmonar obstrutiva crônica e *H. Pylori* associado com doença gástrica (48). Entretanto nenhum estudo na literatura foi descrito com o gene *MUC5B* associado à doença cárie. Este gene foi selecionado para esta pesquisa tendo em vista a associação positiva do gene *MUC7*, também pertencente à família das mucinas (49) com a doença cárie.

1.4 Extração de DNA

Os estudos na área de Genética Humana vem acompanhados pela busca de métodos de coleta de material biológico que forneçam DNA com rendimento e pureza adequada.

Amostras de sangue são preferencialmente escolhidas para coleta, por fornecerem um grande número de células e, conseqüentemente, um bom proveito. No entanto, por se tratar de um método invasivo, percebe-se resistência por parte dos pacientes, além de necessitar de um profissional especializado para realização do procedimento. Desse modo, a utilização de células bucais tem sido um recurso promissor e eficaz na coleta do material genético.

1.4.1 Protocolo de extração do DNA para células bucais

O protocolo de extração de DNA com células bucais é realizado em 3 etapas. Após a coleta de saliva com 5 ml de glicose 3%, a amostra é centrifugada

1 a 2000 RPM durante 10 minutos. Caso haja células suspensas, um novo ciclo de
2 centrifugação deve ser realizado.

3 Após a centrifugação, as células e demais estruturas formam um *pellet*
4 depositado no fundo do frasco. O sobrenadante (saliva e glicose 3%) é vertido fora.
5 Acrescenta-se 1300 µL de tampão de extração (TRIS 10mM, EDTA 4mM, SDS
6 0,5% pH 7,76) em cada frasco. Por fim, congela-se as amostras (-20°C).

7 Numa segunda etapa, todas as amostras devem ser descongeladas e
8 acrescentadas 10µL de proteinase K (em uma concentração de 20mg/mL),
9 homegenizando a solução. Os frascos devem ser mantidos em banho-maria
10 *overnight* a uma temperatura de 50°C, para otimização da enzima.

11 A terceira etapa ocorre no dia seguinte da etapa anterior. O conteúdo de
12 cada tubo é vertido em tubos *ependorf* de 2mL e é acrescentado 500µL de acetato
13 de amônio (8M em 1mM EDTA), deixado previamente em temperatura ambiente.

14 Homogeniza-se a solução com auxílio do vórtex durante 5 minutos e
15 centrifuga-se por 16 minutos a uma velocidade de 13000 RPM.

16 Após tal processo, o conteúdo líquido é dividido igualmente em 2 *ependorfs*
17 de 1,5mL (cerca de 900µL em cada *ependorf*) e o pellet é desprezado.

18 Acrescenta-se 540µl de isopropanol em cada *ependorf* e realiza-se mais
19 um ciclo de centrifugação por 7 minutos com 13000 RPM e descarta-se o conteúdo
20 líquido.

21 Pipeta-se 1mL etanol 70% e centrifuga-se por 7 minutos com 13000 RPM
22 e descarta-se o conteúdo líquido.

23 Os tubos devem ser deixados para secar abertos em temperatura ambiente
24 por 4 horas e, depois de totalmente secos adiciona-se 50µl de solução de extração
25 (TRIS 10mM; EDTA 1 mM; pH 7,76) em cada tubo, agitando delicadamente para
26 homogeneizar o DNA. Posteriormente à extração, as amostras devem ser
27 acondicionadas em geladeira durante dois dias e, após esse tempo, congeladas
28 em -20°C (50).

29 A importância de fatores socioambientais e biológicos no desenvolvimento
30 da doença cárie é bem documentada. Estratégias visando o controle e a prevenção
31 da doença estão sendo aplicadas, entretanto a doença continua sendo um
32 problema relevante na saúde pública. Dessa forma, a investigação genética à

- 1 predisposição a doença cárie, torna-se mais um complemento na detecção de
- 2 grupos suscetíveis e ou resistentes.
- 3

2. OBJETIVO

O objetivo geral deste estudo foi aplicar uma estratégia de análise de associação caso-controle para investigar, em uma população sul-brasileira, a participação de polimorfismos na suscetibilidade e resistência à doença cárie e compreender a influência das variáveis socioambientais no desenvolvimento da doença cárie.

2.1 Objetivos Específicos:

1. Analisar as variáveis sociais e biológicas que predisõem o desenvolvimento da doença cárie;
2. Testar polimorfismos dos genes *KLK4* e *MUC5B*;
3. Avaliar diferentes métodos de armazenamento de saliva para verificar a qualidade (pureza) e quantidade de DNA após a extração de DNA.

3. ARTIGO 1

Influência dos genes *KLK4* e *MUC5B* na experiência de cárie

Resumo

Objetivo: O objetivo desta pesquisa foi identificar a participação de polimorfismos dos genes *KLK4* e *MUC5B* na suscetibilidade à doença cárie. **Métodos:** Um estudo caso-controle foi conduzido com pacientes atendidos na clínica odontológica da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, com 12 anos ou mais. O diagnóstico da doença cárie foi baseado nos critérios estabelecidos no *ICDAS (International Caries Detection and Assessment System)*. O grupo controle foi composto por pacientes que possuíam todos os elementos dentários com escore zero. Fatores socioeconômicos, hábitos de higiene e dietéticos foram investigados. As células bucais foram obtidas por meio de bochechos com solução de glicose 3%. Efetuou-se a extração do DNA com acetato de amônio 10M e EDTA 1mM. A amplificação do material genético foi conduzida por meio da técnica de PCR em tempo real. Análises uni, bi e multivariadas foram realizadas. **Resultados:** Dos 200 indivíduos recrutados, 100 eram do grupo caso e 100 do grupo controle. Na análise bivariada, foram encontrados resultados estatisticamente significativos para as variáveis etnia ($p = 0.008$), biofilme ($p < 0.001$) e gengivite ($p < 0.001$). Para o gene *KLK4* foi encontrada suscetibilidade à doença cárie do marcador rs2242670 ($p = 0.009$). O gene *MUC5B* conferiu resistência à cárie por meio dos marcadores rs2735733 ($p=0.004$), rs2249073 ($p<0.001$) e rs2857476 ($p<0.001$). Ao conduzir a análise multivariada, permaneceram significantes no modelo as variáveis biofilme ($p=0.026$) e os marcadores do gene *MUC5B* rs2735733 ($p=0.004$), rs2249073 ($p<0.001$) e rs2857476 ($p<0.001$). **Conclusão:** Variações genéticas nos genes *KLK4* e *MUC5B* podem contribuir na suscetibilidade e resistência à doença cárie.

Palavras-chave: cárie dentária; genética; análise de associação genética.

INTRODUÇÃO

A cárie dentária consiste em uma doença crônica, complexa, de etiologia multifatorial (Fejerskov, 2004), com alta prevalência em países industrializados e em desenvolvimento (Petersen, 2003). Apesar do declínio no índice CPO-D (média de dentes permanentes Cariados, Perdidos e Obturados), apresentado no último levantamento epidemiológico, a doença cárie continua sendo um dos principais agravos da saúde bucal (Petersen, 2005). É amplamente aceito que a ocorrência da doença dependa de fatores ambientais e fatores ligados ao hospedeiro. Dentre os fatores proximais de risco para o desenvolvimento da doença cárie, encontram-se a presença de microrganismos, o biofilme e a composição da saliva, (Fejerskov and Manji F, 1990).

A saliva é composta por mucinas salivares (*MUC7*, *MUC1* e *MUC5B*), as quais desempenham o papel de recobrir e proteger a mucosa e a superfície do dente. As *MUC5B* tem como função direta a capacidade de formar géis, propiciando viscosidade à saliva (Frenkel and Ribbeck, 2014).

Embora diversos fatores de risco relacionados à predisposição da doença cárie já tenham sido pesquisados, existem variações individuais que talvez possam explicar os motivos pelos quais alguns indivíduos expostos de maneira similar desenvolvem a doença e outros não. Os avanços no conhecimento da biologia molecular e do genoma humano permitem que novas abordagens acerca desta e de outras doenças bucais fossem evidenciadas por alterações em estruturas genéticas (Opal et al., 2015; Vieira, 2012).

Estudos anteriores sugerem uma natureza complexa do controle genético para a suscetibilidade a doença cárie. Portanto, é sempre oportuno que genes já identificados com provável influência em uma doença sejam replicados em diferentes populações. Sendo assim, a hipótese desta pesquisa é que polimorfismos do gene da calcicreína (*KLK4*), estudado previamente (Wang et al., 2013), e os polimorfismos do gene *MUC5B*, ainda não descritos na literatura, concomitantemente associados aos fatores de risco socioambientais, estejam envolvidos no desenvolvimento da doença cárie.

MATERIAL E MÉTODOS

Recrutamento da Amostra

O delineamento desta pesquisa caracterizou-se como um estudo de associação genético caso-controle. A amostra populacional estudada foi constituída por indivíduos afetados e não afetados pela doença cárie, recrutados na clínica de Odontologia da PUCPR (Pontifícia Universidade Católica do Paraná) com idade igual ou superior a 12 anos. A amostra foi dividida entre dois grupos (caso e controle), com 100 indivíduos cada, pareados por gênero e idade. O critério de inclusão para o grupo caso foi o diagnóstico confirmado da doença cárie; já no grupo controle participaram os pacientes sem histórico da doença. Por sua vez, foram excluídos, pacientes com dentição mista, em tratamento ortodôntico ou portadores de doenças sistêmicas. O recrutamento dos pacientes ocorreu por meio de uma amostragem probabilística aleatória temporal de agosto de 2013 até agosto de 2014.

Diagnóstico da doença cárie

O exame clínico foi realizado por um profissional treinado, mediante a profilaxia dos dentes, iluminação adequada, sonda *ball point* e isolamento relativo. Para o diagnóstico da doença, utilizaram-se os critérios estabelecidos no *ICDAS (International Caries Detection and Assessment System)* (Ismail et al., 2007). Os pacientes do grupo controle foram àqueles que apresentaram todos os elementos dentários com o escore zero. Para utilização do ICDAS, o examinador foi calibrado previamente utilizando banco de dentes extraídos. A concordância intra-examinador foi calculada pelo teste Kappa, por meio de reexame com 5% da amostra, um mês após a primeira análise, obtendo uma concordância perfeita de 1. Após o exame clínico, em que o profissional avaliou também a presença de biofilme, os sujeitos da pesquisa responderam um questionário via *tablet*, com questões relacionadas às variáveis clínicas, ambientais, dados sociodemográficos, acesso aos serviços odontológicos, hábitos dietéticos e de higiene bucal. (Werneck et al., 2011).

Obtenção do DNA

O DNA foi obtido a partir de células epiteliais da mucosa jugal, coletadas por meio de um bochecho com solução de glicose 3%, durante 1 minuto, na sequência foi realizada uma leve raspagem da mucosa jugal com espátula de madeira. As células foram decantadas por centrifugação a 2000 rpm durante 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* de células foi ressuspenso em 650 µL de tampão de extração [10 mM Tris-HCl (pH 7.8), 5 mM EDTA, 0.5% SDS]. As amostras foram congeladas a -20°C até o momento da extração de DNA. Após serem descongeladas, as amostras foram incubadas *overnight* com 10 µL de proteinase K a 37°C com agitação. No dia seguinte, o DNA foi extraído com acetato de amônio 10M e EDTA 1mM, de acordo com o protocolo estipulado (Trevilatto PC and Line SR, 200AD) A concentração e pureza do DNA foram determinadas por densidade óptica em espectrofotômetro (NanoDrop®2000c) utilizando-se 2 µL do material extraído.

Seleção dos marcadores

Foram selecionados marcadores do tipo Tag SNPs, os quais representam todos os SNPs de uma região genômica com elevado desequilíbrio da ligação. Esses marcadores foram selecionados no ano de 2014 com base no *International HapMap Project, release 27*, seguindo os critérios de desequilíbrio de ligação (DL) calculados por r^2 menor que 0.80, *multimarker*, e frequência alélica mínima (FAM) de 0.05 na população africana (YRI). Sendo estes: rs2735733, rs2249073, rs2672812, rs2672785, rs285747, rs2075860 do gene *MUC5B* e rs2242670, rs2235091, rs2978642, rs2978643, rs1654551 e 16454553 do gene *KLK4*. Os genótipos foram obtidos por meio de discriminação alélica baseada em fluorescência TaqMan. As reações de amplificação foram executadas pela técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) em tempo real, como implementado na *Applied Biosystems®* plataforma 7500 *Real-Time PCR System®*.

Análise estatística

Todas as variáveis foram exploradas, descritas, e analisadas inicialmente com testes uni e bivariados. Para investigar a associação entre a doença cárie, foi utilizado o teste qui-quadrado e teste exato de Fisher. Para a análise multivariada foi usado o modelo de regressão logística, em que as variáveis com significância

nas análises bivariadas com p menor ou igual a 0.05 foram incluídas na multivariada. Em todos as análises foi considerando um p significativo menor ou igual de 0.05. As análises foram realizadas conforme implementadas no software estatístico SPSS versão 20.0. Foi empregado o *Haploview* 4.2 para estimar o equilíbrio de *Hardy-Weinberg* e desequilíbrio de ligação.

Este estudo teve aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (CEP - PUCPR).

RESULTADOS

Dos 200 pacientes recrutados, 122 (61%) eram mulheres e 78 (39%) eram homens. A média de idade dos pacientes do grupo caso foi 18.43 anos e do grupo controle foi 18.52 anos, sendo a idade mínima de 12 anos e a máxima de 34 anos, em ambos os grupos. Não houve resultados estatisticamente significantes para as variáveis gênero ($p=0.885$) e idade ($p=0.897$). Com relação a etnia dos pacientes, 181 (90.5%) eram brancos e 19 (9.5%) eram negros. Na análise bivariada foram encontrados resultados estatisticamente significantes para as variáveis: etnia ($p=0.014$, OR=0.036), biofilme ($p<0.001$, OR= 10.887) e gengivite ($p<0.001$, OR 5.444) e um resultado *borderline* para escolaridade ($p=0.065$) (tabela 1).

Na análise genética do gene *KLK4*, foram encontrados resultados estatisticamente significativos para o marcador rs2242670 no modelo aditivo ($p=0.009$), quando ajustado para dominância do alelo A, os pacientes que possuíam este alelo apresentaram-se suscetíveis para o desenvolvimento da doença cárie, ($p=0.023$, OR= 2.366) (tabela 2). Para o gene *MUC5B* foram encontrados resultados estatisticamente significativos no modelo aditivo para os marcadores rs2735733 ($p=0.004$), rs2249073 ($p<0.001$) e rs2857476 ($p<0.001$), sendo que o alelo C conferiu resistência no desenvolvimento da doença cárie para os pacientes portadores do genótipo CC (tabela 3).

Com a análise multivariada, em que foram considerados todos os marcadores que estimaram significância prévia simultaneamente analisados com os fatores ambientais para a doença, a variável biofilme, bem como os marcadores do gene *MUC5B* (rs2735733, rs2249073 e rs2857476), permaneceram significativamente associados a doença cárie no modelo aditivo.

1
2
3

Variável	Casos (n=100)	Controle (n=100)	Valor de p	OR (IC)	Multivariada Valor de p
Etnia					
Branco	85 (47%)	96 (53%)	0.0014	0.236 (0.075 - 0.739)	0.109
Negro	15 (78.9 %)	4 (21.1%)			
Gênero					
Masculino	40 (51.3 %)	38 (48.7%)	0.885	0.919 (0.521- 1.623)	
Feminino	60 (49.2%)	62 (50.8 %)			
Biofilme					
Ausência	59 (38.6%)	94 (61.4%)	0.000	10.887 (4.354 - 27.222)	0.026
Presença	41 (87.2%)	6 (12.8%)			
Gengivite					
Sim	29 (80.6)	7 (19.4)	0.000	5.427 (2.245 - 13.100)	0.096
Não	71 (43.3)	97 (56.7)			
Escolaridade					
Até ensino médio	76 (54.7%)	63 (45.3%)	0.065	0.065 (1.008 - 3.432)	0.794
Ensino superior	24 (39.3%)	37 (60.7%)			
Renda Mensal					
Até R\$1000.00	32 (60.4%)	21 (39.6%)	0.109	1.770 (0.935 - 3.353)	
Mais de R\$1000.00	68 (46.3%)	79 (57.7%)			
Escovação					
Até 2 Vezes	61 (55%)	50 (45%)	0.155	1.544 (0.892 - 2.742)	
Mais de 2 vezes	39 (43.8%)	50 (56.2%)			
Ingestão de açúcar					
Até 3 vezes	50 (46.3%)	58 (53.7%)	0.321	0.724 (0.414 - 1.265)	
3 ou mais	50 (54.3%)	42 (45.7%)			

Valor de p estatisticamente significativo < 0.05

OR - Razão de chance

IC - Intervalo de confiança 95%

4 Tabela 1: Análise dos fatores clínicos e ambientais relacionados à doença cárie

5
6

Tabela 2: Análise genética para o gene *KLK4* na doença cárie

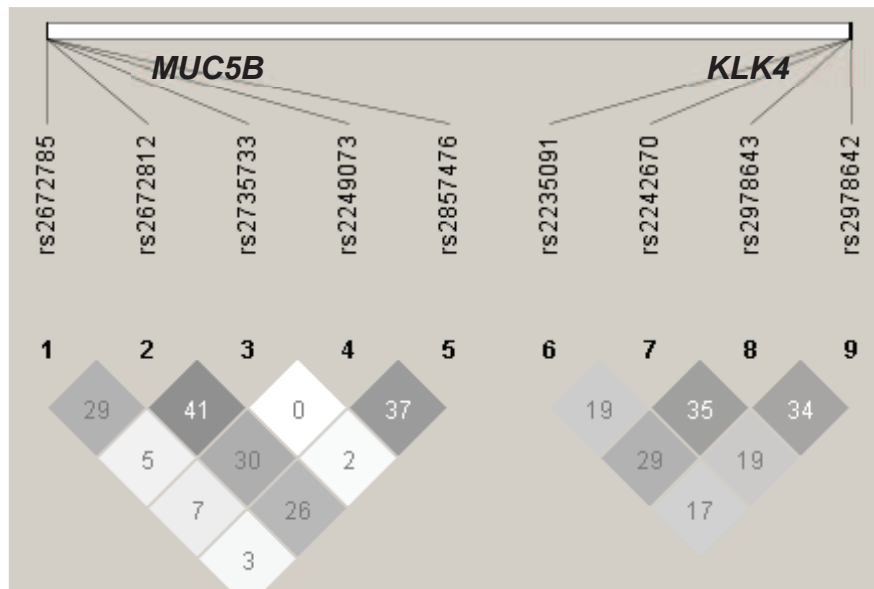
Variável	Modelo	Caso	Controle	valor de p	OR (IC)	Multivariada
KLK4 (rs 2242670)						
AA - GG - AG	Genótipo	15 - 14 - 69	22 - 28 - 49	0.009		0.523
AA + AG vs GG	Dominância A	84 vs 14	71 vs 28	0.023	2.366 (1.157 - 4.838)	
GG + AG vs AA	Dominância G	83 vs 14	77 vs 22	0.274	1.581 (0.765 - 3. 265)	
KLK4(rs2235091)						
AA - GG - AG	Genótipo	34 - 7 - 56	39 - 8 - 52	0.765		
AA + AG vs GG	Dominância A	90 vs 7	91 vs 8	0.821	1.130 (0.393 - 3.247)	
GG + AG vs AA	Dominância G	63 vs 34	60 vs 39	0.532	1.204 (0.674 - 2.191)	
KLK4 (rs2978642)						
AA - TT - AT	Genótipo	50 - 3 - 43	48 - 10 - 41	0.149		
AA + AT vs TT	Dominância A	93 vs 3	89 vs 10	0.051	3.483 ((0.928 - 13.072)	
TT + AT vs AA	Dominância T	46 vs 50	51vs 48	0.615	0.866 (0.494 - 1.519)	
KLK4 (rs2978643)						
CC - GG - CG	Genótipo	51 - 6 - 40	54 - 8 - 38	0.828		
CC + CG vs GG	Dominância C	91 vs 6	92 vs 8	0.621	1.319 (0.440 - 3.952)	
GG + CG vs GG	Dominância G	46 vs 51	46 vs 54	0.841	1.659 (0.605 - 1.853)	
Valor de p estatisticamente significativo < 0.05						

Tabela 3: Análise genética para o gene *MUC5B* na doença cárie

Variável	Modelo	Caso	Controle	valor de p	OR (IC)	Multivariada
MUC5B (2735733)						
CC - TT - CT	Genótipo	22 - 32 - 45	46 - 10 - 44	0.000		0.004
CC + CT vs TT	Dominância C	67 vs 32	90 vs 10	0.000	0.233 (0.107 - 0.506)	
TT + CT vs CC	Dominância T	77 vs 22	54 vs 46	0.002	2.981 (1.611 - 5. 519)	
MUC5B (2249073)						
CC - TT - CT	Genótipo	14 - 37 - 47	47 - 5 - 47	0.000		0.000
CC + CT vs TT	Dominância C	61 vs 37	94 vs 5	0.000	0.088 (0.33 - 0.236)	
TT + CT vs CC	Dominância T	84 vs 14	52 vs 47	0.000	5.423 (2.721 - 10. 908)	
MUC5B (2672812)						
AA - GG - AG	Genótipo	27 - 23 - 47	24 - 20 - 51	0.528		
AA + AG vs GG	Dominância A	74 vs 23	75 vs 20	0.195	0.885 (0.435 - 1. 693)	
GG + AG vs AA	Dominância G	70 vs 27	71 vs 24	0.163	0.876 (0.461 - 1.664)	
MUC5B (2672785)						
AA - GG - AG	Genótipo	54 - 4 - 38	55 - 10 - 34	0.252		
AA + AG vs GG	Dominância A	92 vs 4	89 vs 10	0.109	2.584 (0.782 - 8.542)	
GG + AG vs AA	Dominância G	42 vs 54	44 vs 55	0.922	0.972 (0.552 - 1.711)	
MUC5B (2857476)						
CC - TT - CT	Genótipo	17 - 31 - 46	47 - 4 - 46	0.000		0.000
CC + CT vs TT	Dominância C	63 vs 31	93 vs 4	0.0001	0.087 (0.029 - 0.260)	
TT + CT vs CC	Dominância T	77 vs 50	17 vs 47	0.0001	4.258 (2.203 - 8.230)	

Tanto os marcadores do gene *KLK4* quanto do gene *MUC5B* eram TagSNPS de acordo com o Hapmap. A análise realizada no Haploview confirmou haver equilíbrio de ligação entre os marcadores (figura 1).

Figura 1: Desequilíbrio de ligação para os genes *KLK4* e *MUC5B*



DISCUSSÃO

A importância na identificação de fatores etiopatológicos, sejam estes ambientais ou biológicos, no desenvolvimento da doença cárie é inquestionável. Tem-se observado um interesse crescente pela investigação de componentes genéticos na ocorrência da doença. Os achados deste estudo reforçam que a suscetibilidade à doença cárie pode resultar tanto de fatores ambientais, quanto genéticos, sendo observada a influência dos genes *KLK4* e *MUC5B* juntamente com biofilme neste estudo.

A presença de biofilme associada com o desenvolvimento da doença cárie ocorre, uma vez que microrganismos cariogênicos e carboidratos fermentáveis estão presentes em um hospedeiro suscetível. O processo da doença se inicia no local onde biofilme dental recobre a superfície dentária. Os microrganismos do biofilme gradualmente se adaptam a um pH reduzido provocando a desmineralização do esmalte dentário (Marsh, 2010). Em Natal-RN (Ferreira MA,

2005), estudantes de escolas públicas, apresentaram uma taxa de 85% de biofilme na superfície dos dentes com lesões cáries. Estudo recente realizado com crianças de 3 até 8 anos, apontou uma correlação direta entre a presença de biofilme e contagens de *Streptococcus Mutans* relacionada à atividade de doença cárie (Nanda et al., 2015).

Com relação a análise genética para o gene *KLK4*, o alelo A, do marcador rs2242670, foi observado em maior frequência nos indivíduos com histórico da doença cárie. Outro estudo realizado com este gene, também apresentou os pacientes com suscetibilidade à doença, no entanto o marcador associado foi o rs2235091 (Wang et al., 2013). O gene para a proteína calcitreína-4 tem demonstrado um papel fundamental na mineralização do esmalte (Lu et al., 2008). Alguns estudos também evidenciaram que gene envolvidos na formação do esmalte estão associados com a suscetibilidade a doença cárie (Tannure et al., 2012; Kang et al., 2011; Slayton, RL; Cooper, ME; Marazita, 2005). Os polimorfismos genéticos contribuem na alteração estrutural do esmalte, uma vez que aumentam sua porosidade e promovem o decréscimo do conteúdo mineral contribuindo na formação de hipoplasias dentárias e facilitando a aderência do biofilme (Lu et al., 2008) .

Os resultados da presente pesquisa apresentaram uma diferença significativa na distribuição dos genótipos entre os grupos caso e controle, para o gene *MUC5B*, para os marcadores rs2735733, rs2249073, rs2857476, em que o genótipo CC apresentou-se como um fator protetor para o desenvolvimento da doença. Uma pesquisa realizada anteriormente (Gabryel-Porowska et al., 2014) teve como objetivo comparar os níveis de mucinas (*MUC5B*, *MUC7* e *MUC1*) na saliva de indivíduos jovens. Os resultados indicaram que adolescentes com índice elevado da doença cárie, possuíam níveis aumentados de *MUC1* e *MUC5B* (Gabryel-Porowska et al., 2014). Outro estudo realizado com o gene *MUC7* revelou que polimorfismos neste gene aumentam a probabilidade de desenvolver doença cárie (Pol, 2011). Este é o primeiro estudo de genética realizado para o gene *MUC5B*, ainda há necessidade de mais investigações em relação à via metabólica deste gene, assim como sua replicação em diferentes populações.

Os marcadores rs2075860, rs1654551 e rs16454553 não foram amplificados pela técnica da PCR, provavelmente por conta de um desenho inadequado dos primers.

Ainda hoje o foco da genética epidemiológica em relação às doenças complexas é a caracterização dos fenótipos. Para a doença cárie, o diagnóstico correto da lesão também pode ser impreciso. Sendo assim, neste estudo trabalhamos com o ICDAS para método de diagnóstico. Esta metodologia auxilia na caracterização da lesão cárie mesmo na fase inicial, ainda na lesão de mancha branca.

Avanços para melhor compreensão das bases genéticas da doença cárie podem contribuir no entendimento da etiopatogenia desta doença para a identificação dos grupos de risco, auxiliando tanto em um rastreio efetivo como na prevenção da doença. Um dos nossos resultados replica a participação do gene KLK4, em outra população, no desenvolvimento da doença cárie. Além disso, nossos resultados sugerem que polimorfismos genéticos do gene MUC5B podem contribuir no desenvolvimento da doença cárie.

REFERÊNCIAS

- Fábián TK, Hermann P, Beck A, Fejérdy P, Fábián G (2012). Salivary Defense Proteins: Their Network and Role in Innate and Acquired Oral Immunity. :4295–4320.
- Fejerskov O (2004). Changing paradigms in concepts on dental caries: consequences for oral health care. *Caries Res.* 38:182–91.
- Fejerskov O, Manji F (1990). Risk assessment in dental caries. *Dental Eco*:214–217.
- Ferreira MA MN (2005). Factors associated with active white enamel lesions. *Int J Paediatr Dent*:327–334.
- Frenkel ES, Ribbeck K (2014). Salivary Mucins Protect Surfaces from Colonization by Cariogenic Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol* 8:332–338.
- Gabryel-Porowska H, Gornowicz A, Bielawska A, Wójcicka A, Maciorkowska E, Grabowska SZ, et al. (2014). Mucin levels in saliva of adolescents with dental caries. *Med. Sci. Monit.* 20:72–7.
- Ismail A, Sohn W, Tellez M, Amaya A, Sen A, Hasson H, et al. (2007). The International Caries Detection and Assessment System (ICDAS): an integrated system for measuring dental caries. *"Communit Dentistry Oral Epidemiol.*:170–178.

- 1 Kang S, Yoon I, Lee H, Cho J (2011). Association between AMELX polymorphisms
2 and dental caries in Koreans. *Oral Dis* 4:399–406.
- 3 Lu Y, Papagerakis P, Yamakoshi Y, Hu JC-, Bartlett JD, Simmer JP (2008).
4 Functions of KLK4 and MMP-20 in dental enamel formation. *Biol Chem* 389:695–
5 700.
- 6 Marsh P (2010). Microbiology of dental plaque biofilms and their role in oral health
7 and caries. *Dent Clin North Am* 3:441–54.
- 8 Nanda J, Sachdev V, Sandhu M, Deep-Singh-Nanda K (2015). Correlation between
9 dental caries experience and mutans streptococci counts using saliva and plaque
10 as microbial risk indicators in 3-8 year old children. A cross Sectional study. *J. Clin.*
11 *Exp. Dent.* 7:114–118.
- 12 Opal S, Garg S, Jain J, Walia I (2015). Genetic factors affecting dental caries risk.
13 *Aust. Dent. J.* 60:2–11.
- 14 Petersen, Pe (2005). Sociobehavioural risk factors in dental caries – international
15 perspectives. *Community Dent. Oral Epidemiol.* 4:274–279.
- 16 Petersen PE (2003). The World Oral Health Report 2003 WHO Global Oral Health
17 Programme.
- 18 Pol J (2011). Association of the polymorphism of MUC7 gene encoding the low-
19 molecular-weight mucin MG2 with susceptibility to caries. *Ann Acad Med Stetin*:85–
20 91.
- 21 Slayton, RL; Cooper, ME; Marazita M (2005). Tuftelin, Mutans Streptococci, and
22 Dental Caries Susceptibility. *J Dent Res*:711–714.
- 23 Tannure PN, Küchler EC, Falagan-Lotsch P, Amorim LMF, Raggio Luiz R, Costa
24 MC, et al. (2012). MMP13 Polymorphism Decreases Risk for Dental Caries. *Caries*
25 *Res.* 46:401–407.
- 26 Trevilatto PC, Line SR (200)AD. Use of buccal epithelial cells for PCR amplification
27 of large DNA fragments. *Forensic Odontostomatol*:6–9.
- 28 Vieira AR (2012). Genetics and Caries – Perspectives. *Braz Oral Re* 26:7–9.
- 29 Wang X, Willing MC, Marazita ML, Wendell S, Warren JJ, Broffitt B, et al. (2013).
30 Genetic and environmental factors associated with dental caries in children: The
31 Iowa Fluoride Study. *Caries Res* 46:177–184.
- 32 Werneck RI, Lázaro FP, Cobat a, Grant a V, Xavier MB, Abel L, et al. (2011). A
33 major gene effect controls resistance to caries. *J. Dent. Res.* 90:735–9.
- 34

4. ARTIGO 2

AVALIAÇÃO DE PROTOCOLOS DE ARMAZENAGEM DE SALIVA PARA EXTRAÇÃO DO DNA

RESUMO

O progresso na biologia molecular incentivou a busca de diferentes protocolos de extração de DNA a fim de criar uma maneira eficaz, não-invasiva e com baixo custo. O objetivo desta pesquisa foi avaliar a quantidade e pureza do DNA obtido por células bucais utilizando diferentes meios de armazenagem. Trinta estudantes do curso de Odontologia entre 18 e 23 anos participaram desta pesquisa. O material genético foi coletado 3 vezes de cada indivíduo (amostras A, B e C) por meio de bochechos com 5 ml de glicose 3%. Para a amostra denominada A, foi realizada a primeira fase da extração do DNA no dia da coleta, já as amostras B e C, ficaram estocadas em geladeira e freezer, respectivamente, por um mês antes da primeira de extração. A extração do DNA foi realizada com acetato de amônio 10M e EDTA 1mM. Avaliou-se a pureza das amostras por espectrofotometria. As análises estatísticas foram implementadas utilizando o software SPSS versão 21.0. As amostras A, B e C apresentaram resultado satisfatório em relação a quantidade e pureza de DNA.

Palavras - chave: DNA, saliva, genética

INTRODUÇÃO

O estudo da genética humana com as demais áreas da saúde tem aumentado recentemente. Com isso, novos métodos de coleta e extração de DNA vem sendo explorados. O sangue é uma excelente fonte de DNA, no entanto, sua coleta e obtenção são dispendiosos, invasivos e requerem um alto custo de laboratório (1). Assim, vários kits e protocolos químicos utilizando células bucais tem sido propostos para a extração de DNA (2). As células epiteliais bucais são uma grande fonte de material genético e geralmente os protocolos tendem a ser

1 mais rápidos, simples, econômicos, permitindo diversas amostras processadas ao
2 mesmo tempo (3), além de indolores e não-invasivos, podendo atingir a mesma
3 eficácia de amostras de sangue (1).

4 A obtenção do DNA por meio da coleta de saliva pode variar desde os
5 materiais utilizados até seus passos sequenciais e meios de armazenamento (4-
6 6). Alguns estudos em larga escala utilizaram diferentes tipos de coleta para avaliar
7 o rendimento de DNA, para otimizar a aplicação em grandes projetos (1, 7). As
8 diversidades entre as coletas podem gerar alguma diferença entre os grupos
9 comparados, contudo, muitos estudos ainda obtêm aceitabilidade de pureza e
10 quantidade de DNA no final de sua análise a partir da saliva (6, 8-11). Mesmo
11 alterando algum passo específico do protocolo para aumentar o rendimento de
12 DNA (12), ou mesmo a partir de materiais auxiliares bastante simples, como uma
13 escova de dentes para coleta das células bucais (13).

14 A necessidade de avaliar métodos para melhor obtenção de DNA para os
15 estudos genéticos inclui também a facilidade que se pode alcançar a partir de
16 coletas e armazenamentos mais simples. Desta forma, esta praticidade pode
17 possibilitar que pesquisadores acadêmicos ou até clínicos realizem seus estudos,
18 eventualmente em áreas mais limitadas de estocagem do material genético ou a
19 partir de materiais com um custo menor. Sendo assim, este trabalho teve como
20 objetivo avaliar a quantidade e a qualidade (pureza) do DNA obtido por diferentes
21 meios de armazenagem de saliva humana, a fim de verificar a viabilidade de
22 amplificação por PCR.

23 24 **MÉTODO**

25 As amostras de saliva foram coletadas de estudantes do curso de
26 Odontologia da PUCPR, sendo mulheres e homens, com idades entre 18 e 23
27 anos. Não foram incluídos usuários de tabaco, álcool, medicamentos e portadores
28 de doenças sistêmicas que poderiam afetar a morfologia e função das células da
29 mucosa bucal. As coletas foram conduzidas durante o período de setembro à
30 dezembro de 2014.

31 Os materiais auxiliares utilizados foram: 5ml de solução de glicose 3%,
32 espátula de madeira, tubos de vidro tipo falcon de 15ml e canudos descartáveis
33 previamente esterilizados

Cada paciente foi orientado a colocar a solução de glicose na boca e bochechá-la vigorosamente por 1 minuto. Após o bochecho os estudantes depositavam a solução de glicose com auxílio de um canudo plástico dentro do tubo falcon e em seguida realizava-se a raspagem da mucosa jugal com uma espátula de madeira, movimentando-a na solução. Três amostras foram coletadas de cada estudante (A, B e C) no mesmo dia. Para as amostras A, a primeira fase da extração do DNA foi realizada no dia da coleta, estas foram levadas ao laboratório de genética da PUC-PR e centrifugadas a 2000 rpm durante 10 minutos. Caso houvessem células suspensas, fazia-se um novo ciclo de centrifugação. As células e demais estruturas formavam um pellet no fundo do frasco. Após a centrifugação, o sobrenadante (saliva e glicose) era vertido fora. Foi acrescentado 1300 µL de tampão de extração (TRIS 10mM, EDTA 4mM, SDS 0,5% ph 7,76) em cada frasco. Por fim, as amostras foram congeladas a -20°C (14).

Para as amostras B e C a sequência de coleta foi a mesma, entretanto a após o bochecho, a saliva permaneceu armazenada por um mês em geladeira para as amostras B e um mês em freezer para as amostras C. Após esse período, as amostras foram descongeladas e realizou-se o mesmo preparo prévio à extração de DNA realizado para as amostra A.

EXTRAÇÃO DO DNA

Procedeu-se a extração de DNA de todos os grupos de amostras de acordo com o protocolo proposto por Trevillato e Line (2000) (14). As amostras foram descongeladas e incubadas *overnight* com 10µL de proteinase K. No dia seguinte o DNA foi extraído com acetato de amônio 10M e EDTA 1mM.

QUANTIFICAÇÃO DO DNA E VERIFICAÇÃO DA PUREZA

O DNA foi submetido à leitura por espectrofotometria para verificação de sua concentração e pureza. O método espectrofotométrico empregado tem como princípio a absorção seletiva de luz ultravioleta de 260 nm de comprimento de onda pelo DNA, enquanto que proteínas absorvem seletivamente luz em 280 nm. Portanto, a leitura da solução nestes dois comprimentos de onda permitiu a quantificação tanto de DNA quanto de proteínas presentes na amostra extraída. A

razão de 260/280mM/μL indicou o grau de pureza de cada amostra. As amostras foram quantificadas 1 mês após a extração.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Após a coleta de informações necessárias e realizada a análise do DNA, os dados foram tabulados no *software* para análise estatística *Statistical Package for the Social Sciences versão 21.0* (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA). Para gerar o perfil da amostra, procedeu-se a análise descritiva dos dados por meio da distribuição de frequências.

Para melhor elucidação dos dados, objetivando avaliar se havia diferença na concentração e pureza de DNA entre as amostras, procedeu-se o teste ANOVA e comparações múltiplas de Games Howell.

RESULTADOS

Não houve diferença estatisticamente significativa entre quantidade ($p = 0.37$) e qualidade ($p = 0.16$) de DNA entre as amostras

Tabela 1: Avaliação da quantidade e qualidade do DNA

Amostras	Concentração de DNA (ng/μl)(média e desvio padrão)	Razão 260nm /280nm (média e desvio padrão)
A	373,47 (±434,04)	1,957 (±0,147)
B	200,26 (±243,90)	2,035 (±0,113)
C	185,9 (±338,26)	2,049 (±0,264)

DISCUSSÃO

Todos os métodos foram eficazes quanto a quantidade e pureza de DNA, independentemente do meio de armazenagem realizado, sendo que o método A possuiu a maior quantidade de DNA.

Na literatura, o resultado obtido a partir do DNA de células sanguíneas é compatível com as das células bucais, as quais tem sido apontadas como uma fonte alternativa e promissora de DNA genômico para estudos moleculares principalmente por ser um método indolor, não invasivo, sem risco de transmissão

1 de doenças (15). Embora a evidente praticidade da obtenção de DNA a partir da
2 saliva já tenha se tornado realidade na comunidade científica, diferentes
3 procedimentos tem sido propostos para coleta, armazenamento e processamento
4 da saliva para extração do DNA (3, 11). Ademais, outra vantagem que as amostras
5 de epitélio bucal possuem sobre as amostras sanguíneas é que as últimas, por
6 possuírem inibidores da reação em cadeia da polimerase em sua composição, por
7 vezes, fornecem DNA após a extração que apresenta problemas na amplificação
8 (16). Desse modo, estudos comparativos entre diferentes protocolos são
9 necessários visando, principalmente, avaliar o rendimento, a integridade e os
10 custos dispendidos para a coleta e processamento laboratorial.

11 O protocolo utilizado para as amostras A seguiu os critérios de extração
12 estipulados por Trevilatto e Line (14), o qual preconiza que as amostras, assim que
13 coletadas, sejam levadas ao laboratório para a primeira fase de extração e em
14 seguida congeladas à -20°C. Entretanto, alguns estudos demonstraram que se as
15 amostras forem congeladas antes mesmo da primeira fase de extração, a
16 quantidade de DNA obtida pode ser até maior, pois algumas enzimas presentes na
17 saliva que degradam o DNA são inativadas ao congelamento direto (17). Neste
18 estudo, as amostras denominadas C foram congeladas diretamente após a
19 extração e todas apresentaram concentração e pureza adequadas para utilização
20 em estudos moleculares. Um estudo ainda relatou a armazenagem da saliva em
21 temperatura ambiente por até 30 dias antes da extração, possibilitando a coleta em
22 campo e aumento de amostragem (18).

23 Todas as amostras foram coletadas do paciente no mesmo dia, sendo esta
24 uma limitação do estudo e o motivo da amostra A possuir maior quantidade de
25 DNA. Entretanto, não houve diferença estatisticamente significativa entre as 3
26 amostras e as quantidade de DNA.

27 28 **CONCLUSÃO**

29 Todos meios apresentaram resultado satisfatório em relação a quantidade
30 e pureza de DNA para este estudo. Este achado suporta a afirmação de que é
31 possível fazer a coleta de saliva em consultório e congela-la para posterior análise
32 de DNA, sem alteração de pureza.

REFERÊNCIAS

- 1.Juarez-Cedillo T, Sanchez-Garcia S, Mould-Quevedo JF, Garcia-Pena C, Gallo JJ, Wagner FA, et al. Cost-effective analysis of genotyping using oral cells in the geriatric population. *Genet Mol Res*. 2010;9(3):1886-95.
- 2.Saab YB, Kabbara W, Chbib C, Gard PR. Buccal cell DNA extraction: yield, purity, and cost: a comparison of two methods. *Genet Test*. 2007;11(4):413-6.
- 3.Aidar M, Line SR. A simple and cost-effective protocol for DNA isolation from buccal epithelial cells. *Braz Dent J*. 2007;18(2):148-52.
- 4.Kuchler EC, Tannure PN, Falagan-Lotsch P, Lopes TS, Granjeiro JM, Amorim LM. Buccal cells DNA extraction to obtain high quality human genomic DNA suitable for polymorphism genotyping by PCR-RFLP and Real-Time PCR. *J Appl Oral Sci*. 2012;20(4):467-71.
- 5.Hearn RP, Arblaster KE. DNA extraction techniques for use in education. *Biochem Mol Biol Educ*. 2010;38(3):161-6.
- 6.Nedel F, Andre Dde A, de Oliveira IO, Tarquinio SB, Demarco FF. Buccal cells submitted to three different storage conditions before DNA extraction. *J Appl Oral Sci*. 2009;17(2):113-5.
- 7.Koni AC, Scott RA, Wang G, Bailey ME, Peplies J, Bammann K, et al. DNA yield and quality of saliva samples and suitability for large-scale epidemiological studies in children. *Int J Obes* 2011. 35(1):113-8.
- 8.Lum A, Le Marchand L. A simple mouthwash method for obtaining genomic DNA in molecular epidemiological studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1998;7(8):719-24.
- 9.Ng DP, Koh D, Choo SG, Ng V, Fu Q. Effect of storage conditions on the extraction of PCR-quality genomic DNA from saliva. *Clin Chim Acta*. 2004;343(1-2):191-4.
- 10.Rogers NL, Cole SA, Lan HC, Crossa A, Demerath EW. New saliva DNA collection method compared to buccal cell collection techniques for epidemiological studies. *Am J Hum Biol*. 2007;19(3):319-26.
- 11.Waltrick-Zambuzzi MR, Vieira TCdS, Romanos HF, Macedo EE, Granjeiro JM, Kuchler EC. Avaliação do rendimento, pureza e integridade

do DNA genômico em diferentes protocolos de coleta de células bucais. Int J Dent. 2012;11(1):12-8

12.Adamowicz MS, Stasulli DM, Sobestanovich EM, Bille TW. Evaluation of methods to improve the extraction and recovery of DNA from cotton swabs for forensic analysis. PLoS One. 2014;9(12):e116351.

13.Imamura Y, Usui S, Oomori Y, Fujigaki Y, Ota N, Wang PL. Recovery of genomic DNA from lingual mucosal cells in sufficient quantity and quality. Am J Dent. 2007;20(4):241-4.

14.Trevilatto PC, Line SR. Use of buccal epithelial cells for PCR amplification of large DNA fragments. J Forensic Odontostomatol. 2000;18(1):6-9.

15.de Vries HG, Collee JM, van Veldhuizen MH, Achterhof L, Smit Sibinga CT, Scheffer H, et al. Validation of the determination of deltaF508 mutations of the cystic fibrosis gene in over 11 000 mouthwashes. Hum Genet. 1996;97(3):334-6.

16.Barea J, Pardini M, Gushiken T. Extração de DNA de Materiais de Arquivo e Fontes Escassas: Revisão e Apontamentos Sobre as Possíveis Aplicações. NewsLab. 2004;63:96-114.

17.Scorsato A, Telles J. Factors that affect the quality of DNA extracted from biological samples stored in paraffin blocks. J Bras Patol Med Lab. 2011;47(5):541-548.

18.Line SRP, Edmilson Ricardo, Coletta RD. Extração do DNA genômico a partir de células epiteliais bucais utilizando acetato de amônio. 2006. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. Piracicaba, SP. 2006.

4.2 Versão em inglês

ASSESSMENT OF SALIVA STORAGE PROTOCOLS FOR DNA EXTRACTION

Tayla Cavallari, Naiara Niesciur Beckert, Letícia Yumi Arima, Simone Tetu Moyses, Samuel Jorge Moyses, Paula Cristina Trevilatto, Renata Iani Werneck

ABSTRACT

Advances in molecular biology have driven the search for more effective, noninvasive, and cost-effective DNA extraction protocols. The aim of this study was to assess the quantity and purity of DNA obtained from buccal cells under different storage conditions. Thirty dentistry students aged 18–23 years participated in the study. Three samples of genetic material were collected from each individual (samples A, B, and C) through the use of a mouth rinse with 5 mL of 3% glucose. The first phase of DNA extraction from sample A was performed on the day of sample collection, whereas samples B and C were stored in the refrigerator and freezer, respectively, for 1 month before the first extraction. DNA extraction was performed with 10 M ammonium acetate and 1 mM EDTA. Sample purity was assessed by spectrophotometry. Statistical analyses were performed using SPSS software version 21.0. The samples showed no significant differences with regard to the DNA quantity ($p = 0.37$) and quality ($p = 0.16$). The quantity and purity of DNA extracted from all three samples was found to be satisfactory.

Key Words: DNA, saliva, genetic

INTRODUCTION

The study of human genetics combined with other health disciplines has been growing considerably and has led to the development of new methods of DNA collection and extraction. Blood is an excellent source of DNA; however, collecting and obtaining blood is an invasive process that entails high laboratory costs (1). Therefore, various DNA extraction kits and chemical protocols that use buccal cells have been developed (2). Buccal epithelial cells are a good source of genetic material, and protocols that use them tend to be faster, simpler, and more cost-effective. Furthermore, these procedures allow several samples to be processed at

the same time (3), in addition to being painless and noninvasive. The efficacy of buccal sampling is found to be the same as that of blood sampling (1).

The procedure for obtaining DNA via the collection of saliva may vary according to the materials, protocol sequence, and storage conditions used (4-6). Large-scale studies have used different types of collection methods to assess DNA yield, with the aim of optimizing procedures in large research projects (1, 7). The diversity of collection methods may result in differences between the compared groups; however, in many studies using saliva, the DNA purity and quantity were found to be acceptable (6, 8-11). This is true even when a specific step of the protocol to increase the DNA yield is altered (12) or when simple ancillary materials such as a tooth brush are used to collect buccal cells (13).

The assessment of methods to improve DNA extraction for genetic studies also aims to find simpler collection and storage procedures that simplify the process. Increasing practicability allows researchers and clinicians to conduct their studies even under limited conditions of genetic material storage or cheap materials. The aim of this study was to assess the quantity and quality (purity) of DNA obtained under different human saliva storage conditions and to confirm their feasibility for use in PCR amplification.

METHODS

Saliva samples were collected from PUCPR dentistry students aged 18–23 years. Students who consumed tobacco, alcohol, and/or certain medications and those with systemic illnesses that could affect the morphology and function of the buccal mucosa cells were excluded. Samples were collected between September and December 2014.

The following auxiliary materials were used for collection: 5 mL of 3% glucose solution, a wooden spatula, 15-mL Falcon tubes, and sterilized disposable straws.

The students were instructed to vigorously rinse their oral cavities with the glucose solution for 1 min. Subsequently, they were asked to transfer the glucose solution into a Falcon tube using a plastic straw. The malar mucosa was then scraped with a wooden spatula, which was stirred into the solution. Three samples were collected from each student (A, B, and C) at the same day. The first phase of

1 DNA extraction from sample A was performed on the day of sample collection. The
2 samples were sent to the genetics laboratory at PUCPR and centrifuged at 2000
3 rpm for 10 min. Centrifugation was performed again if there were cells in the
4 suspension. Cells and debris formed a pellet at the bottom of the tube. The
5 supernatant (saliva and glucose) was separated and 1300 μ L of extraction buffer
6 (10 mM TRIS, 4 mM EDTA, 0.5% SDS; pH, 7.76) was added to each tube. Finally,
7 the samples were stored at -20°C (14).

8 The collection sequence was the same for samples B and C. However, after
9 the mouth rinse, sample B was stored for 1 month in the refrigerator and sample C
10 was stored for 1 month in the freezer. After this period, the samples were thawed
11 and prepared for DNA extraction in the same manner described for sample A.

12 **DNA EXTRACTION**

13 DNA extraction was performed for all samples according to the protocol
14 described by Trevillato and Line (2000) (14). The samples were thawed and
15 incubated overnight with 10 μ L of proteinase K. DNA was extracted the following
16 day with 10M ammonium acetate and 1 mM EDTA.

17 **DNA QUANTIFICATION AND PURITY ANALYSIS**

18 DNA concentration and purity were determined by spectrophotometry. In the
19 spectrophotometric method used, DNA and proteins selectively absorb ultraviolet
20 light at wavelengths of 260 nm and 280 nm, respectively. Therefore, analysis of the
21 solution at these two wavelengths allowed the quantification of both DNA and
22 proteins present in the sample. The ratio of 260/280 mM/ μ L indicated the degree of
23 purity in each sample. The samples were quantified 1 month after extraction.

24 **STATISTICAL ANALYSIS**

25 After collecting the necessary information and DNA analysis, data were
26 tabulated using the Statistical Package for the Social Sciences software, version
27 21.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Descriptive analyses of data with frequency
28 distribution were used to gauge the sample profile.

29 One-way analysis of variance (ANOVA) with the Games–Howell multiple
30 comparisons test was used for further data analysis, namely the identification of
31 differences in DNA concentration and purity among samples.

RESULTS

The samples showed no significant differences with regard to the DNA quantity ($p = 0.37$) and quality ($p = 0.16$).

Table 1: Assessment of DNA quantity and quality

Samples	DNA concentration (ng/ μ L) (mean and standard deviation)	Ratio 260 nm/280 nm (mean and standard deviation)
A	373.47 ($\pm$ 434.04)	1.957 ($\pm$ 0.147)
B	200.26 ($\pm$ 243.90)	2.035 ($\pm$ 0.113)
C	185.9 ($\pm$ 338.26)	2.049 ($\pm$ 0.264)

DISCUSSION

All methods were effective with regard to the quantity and purity of DNA, regardless of the storage method used. Method A resulted in a higher quantity of DNA.

In the literature, the results obtained for DNA extraction from blood cells are similar to those for DNA extraction from buccal cells. The latter have been proposed as a promising alternative source of genomic DNA for molecular studies, primarily because their collection requires a painless and noninvasive method with no risk of disease transmission (15). Although the scientific community has embraced the practicality of obtaining DNA from saliva, different procedures have been proposed for saliva collection, storage, and processing for DNA extraction (3, 11). Moreover, buccal epithelium samples have an advantage over blood samples in that the latter contain PCR inhibitors and can consequently be affected by the presence of DNA after extraction, which leads to problems in amplification (16). It is therefore necessary to compare different protocols to determine the DNA yield and integrity and the costs of sample collection and laboratory processing.

The protocol used to prepare sample A was in accordance with the extraction procedures proposed by Trevilatto and Line (14), who recommended that samples be sent to the laboratory immediately after collection for the first phase of extraction, followed by storage at -20°C . However, some studies have demonstrated that when samples are frozen before the first phase of extraction, a higher quantity of

DNA can be obtained because some salivary enzymes that degrade DNA are inactivated by immediate freezing (17). In the present study, sample C was immediately frozen after extraction. Nevertheless, all conditions yielded a DNA concentration and purity that was suitable for molecular studies. One study also reported that the storage of saliva at room temperature for up to 30 days before extraction allows the collection of field specimens and an increase in the sample amount (18).

All samples from one individual were collected on the same day in this study. This was a limitation and the reason why sample A produced a higher quantity of DNA. However, there were no significant differences among the three samples with regard to DNA quantity.

CONCLUSIONS

All methods tested in this study yielded a satisfactory quantity and purity of DNA, indicating that the collection of saliva in a medical office and freezing the sample for subsequent DNA analysis is feasible and does not alter the purity of extracted DNA.

REFERENCES

1. Juarez-Cedillo T, Sanchez-Garcia S, Mould-Quevedo JF, Garcia-Pena C, Gallo JJ, Wagner FA, et al. Cost-effective analysis of genotyping using oral cells in the geriatric population. *Genet Mol Res*. 2010;9(3):1886-95.
2. Saab YB, Kabbara W, Chbib C, Gard PR. Buccal cell DNA extraction: yield, purity, and cost: a comparison of two methods. *Genet Test*. 2007;11(4):413-6.
3. Aidar M, Line SR. A simple and cost-effective protocol for DNA isolation from buccal epithelial cells. *Braz Dent J*. 2007;18(2):148-52.
4. Kuchler EC, Tannure PN, Falagan-Lotsch P, Lopes TS, Granjeiro JM, Amorim LM. Buccal cells DNA extraction to obtain high quality human genomic DNA suitable for polymorphism genotyping by PCR-RFLP and real-time PCR. *J Appl Oral Sci*. 2012;20(4):467-71.

5. Hearn RP, Arblaster KE. DNA extraction techniques for use in education. *Biochem Mol Biol Educ*. 2010;38(3):161-6.
6. Nedel F, Andre Dde A, de Oliveira IO, Tarquinio SB, Demarco FF. Buccal cells submitted to three different storage conditions before DNA extraction. *J Appl Oral Sci*. 2009;17(2):113-5.
7. Koni AC, Scott RA, Wang G, Bailey ME, Peplies J, Bammann K, et al. DNA yield and quality of saliva samples and suitability for large-scale epidemiological studies in children. *Int J Obes*. 2011;35(1):113-8.
8. Lum A, Le Marchand L. A simple mouthwash method for obtaining genomic DNA in molecular epidemiological studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1998;7(8):719-24.
9. Ng DP, Koh D, Choo SG, Ng V, Fu Q. Effect of storage conditions on the extraction of PCR-quality genomic DNA from saliva. *Clin Chim Acta*. 2004;343(1-2):191-4.
10. Rogers NL, Cole SA, Lan HC, Crossa A, Demerath EW. New saliva DNA collection method compared to buccal cell collection techniques for epidemiological studies. *Am J Hum Biol*. 2007;19(3):319-26.
11. Waltrick-Zambuzzi MR, Vieira TCdS, Romanos HF, Macedo EE, Granjeiro JM, Kuchler EC. Avaliação do rendimento, pureza e integridade do DNA genômico em diferentes protocolos de coleta de células bucais. *Int J Dent*. 2012;11(1):12-8.
12. Adamowicz MS, Stasulli DM, Sobestanovich EM, Bille TW. Evaluation of methods to improve the extraction and recovery of DNA from cotton swabs for forensic analysis. *PLoS One*. 2014;9(12):e116351.
13. Imamura Y, Usui S, Oomori Y, Fujigaki Y, Ota N, Wang PL. Recovery of genomic DNA from lingual mucosal cells in sufficient quantity and quality. *Am J Dent*. 2007;20(4):241-4.
14. Trevilatto PC, Line SR. Use of buccal epithelial cells for PCR amplification of large DNA fragments. *J Forensic Odontostomatol*. 2000;18(1):6-9.
15. de Vries HG, Collee JM, van Veldhuizen MH, Achterhof L, Smit Sibinga CT, Scheffer H, et al. Validation of the determination of deltaF508 mutations

1 of the cystic fibrosis gene in over 11000 mouthwashes. Hum Genet.
2 1996;97(3):334-6.

3 16. Barea J, Pardini M, Gushiken T. Extração de DNA de Materiais de
4 Arquivo e Fontes Escassas: Revisão e Apontamentos Sobre as Possíveis
5 Aplicações. NewsLab. 2004;63:96-114.

6 17. Scorsato A, Telles J. Factors that affect the quality of DNA extracted from
7 biological samples stored in paraffin blocks. J Bras Patol Med
8 Lab. 2011;47(5):541-8.

9 18. Line SRP, Edmilson Ricardo, Coletta RD. Extração do DNA genômico a
10 partir de células epiteliais bucais utilizando acetato de amônio. 2006.
11 Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas. Faculdade
12 de Odontologia de Piracicaba. Piracicaba, SP. 2006.

5. CONCLUSÃO

Nesta pesquisa, os resultados sugerem que polimorfismos genéticos dos genes *MUC5B* e *KLK4* podem estar associados com a doença cárie. A quantidade e pureza de DNA obtida pelas diferentes formas de armazenagem se apresentaram satisfatórias em todos os métodos testados.

Avanços na compreensão das bases genéticas podem contribuir com a identificação de grupos de risco no desenvolvimento da doença. Dessa forma, estratégias individualizadas podem ser elaboradas visando a prevenção da cárie dentária.

Ainda que esta tecnologia seja pouco acessível, é importante que epidemiologistas e cirurgiões-dentistas estejam atualizados quanto as alternativas existentes para estabelecer critérios que favoreçam o diagnóstico.

A obtenção do DNA por meio de células bucais consiste em um método não-invasivo e indolor, podendo atingir a mesma eficácia de amostras de sangue. A praticidade da coleta e a armazenagem em geladeira ou freezer sem a necessidade imediata da primeira fase da extração, pode possibilitar que pesquisadores, acadêmicos e clínicos realizem seus estudos, eventualmente em áreas mais limitadas de estocagem do material genético e dessa forma ampliem a amostra da pesquisa.

6. REFERÊNCIAS

1. Featherstone JDB. The Continuum of Dental Caries--Evidence for a Dynamic Disease Process. *J. Dent. Res.* [Internet]. 2004 Jul 1 [cited 2013 May 26];83(suppl 1):C39–C42.
2. Fejerskov O. Changing paradigms in concepts on dental caries: consequences for oral health care. *Caries Res.* [Internet]. 2004 [cited 2013 May 26];38(3):182–91.
3. Petersen PE. The World Oral Health Report 2003 WHO Global Oral Health Programme. 2003;
4. Keyes PH. The Infectious and Transmissible Nature of Experimental Dental Caries. *Arch. oral Biol.* 1960;1(1):304–20.
5. Newbrun E. *Cariology*. 2nd ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1983.
6. Fejerskov O, Manji F. Risk assessment in dental caries. *University of North Carolina Dental Ecology*; 1990;Dental Eco:214–7.
7. Bonadia D, Paula M, Rando M, Rosário L, Sousa D. Cárie dentária e determinantes sociais de saúde em escolares do município de Piracicaba - SP. *Rev Odontol UNESP*. 2010;39(6):344–50.
8. Petersen, PE. Sociobehavioural risk factors in dental caries – international perspectives. *Community Dent. Oral Epidemiol.* 2005;4:274–9.
9. Boing AF, Bastos JL, Peres KG, Antunes JLF, Peres MA. Social determinants of health and dental caries in Brazil: a systematic review of the literature between 1999 and 2010. *Rev. Bras. Epidemiol.* [Internet]. 2014 [cited 2015 Mar 27];17:102–15.
10. Dahlgren G, Whitehead M. Policies and strategies to promote social equity in health [Internet]. Copenhagen: WHO Regional Office for Europe; 1992.
11. Roncalli AG. National Oral Health Survey in 2010 shows a major decrease in dental caries in Brazil. 2011;27(March 2010):2011.
12. Brasil. Projeto SB Brasil 2010 – Pesquisa Nacional de Saúde Bucal revela importante redução da cárie dentária no país. 2010;27(1).
13. BAGRAMIAN RA, GARCIA-GODOY F, VOLPEA NR. The global increase in dental caries . A pending public health crisis. *Am. J. Dent.* 2009;21.
14. Narvai PC, Frazão P, Roncalli AG, Antunes LF. Cárie dentária no Brasil : declínio , polarização , iniquidade e exclusão social. *Rev Panam Salud Publica.* 2006;19(6):385–93.

- 1 15. Schork NJ. Genetics of complex disease: approaches, problems, and
2 solutions. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* [Internet]. 1997 Oct;156(4 Pt 2):S103–9.
- 3 16. Shuler CF. Inherited Risks for Susceptibility to Dental Caries. *J. Dent. Educ.*
4 2008, 65(10):1038–45.
- 5 17. Bachrach F, Young M. Genetic and Environmental Influences. *Brit Dent J.*
6 1927;1293–304.
- 7 18. Hunt H, Hopper C, Erwin W. Inheritance of susceptibility to caries in albino
8 rats (*Mus norvegicus*). *J Dent Res.* 1944;23(5):385.
- 9 19. Kanamoto T, Nonaka K, Nakata M. Genetic Variation in Experimental
10 Dental Caries in Four Inbred Strains of Rats. *Caries Res.* 1994;28:156–60.
- 11 20. Garn SM, Rowe NH, Cole PE. Sibling similarities in dental caries. *J. Dent.*
12 *Res.* [Internet]. 1976;55(5):914.
- 13 21. Hughes T, Bockmann M, Mihailidis S, Bennett C, Harris A, Seow WK, et al.
14 Genetic, epigenetic, and environmental influences on dentofacial structures and oral
15 health: ongoing studies of Australian twins and their families. *Twin Res. Hum. Genet.*
16 [Internet]. 2013 Feb [cited 2013 Jun 2];16(1):43–51.
- 17 22. Horowitz SL, Osborne RH, Degeorge F V. Caries Experience in Twins.
18 *Science* (80-.). 1958;128:300–1.
- 19 23. Werneck RI, Lázaro FP, Cobat a, Grant a V, Xavier MB, Abel L, et al. A
20 major gene effect controls resistance to caries. *J. Dent. Res.* [Internet]. 2011 Jun [cited
21 2013 Jun 4];90(6):735–9.
- 22 24. Valarini N, Doi RK, Maciel SM, Poli-frederico RC. Biologia molecular na
23 odontologia: métodos comumente utilizados na cariologia. *Odontol. Clín.-Cient.*
24 2011;10(1):19–23.
- 25 25. Maria N, Scheid J. A Proposição do Modelo de DNA: Um Exemplo de com
26 a História da Ciência Pode Contribuir Para o Ensino da Genética. *ENCONTRO Nac.*
27 *Pesqui. EM Educ. EM CIÊNCIAS.* 2000. p. 1–11.
- 28 26. Vieira A, Marazita M, Goldstein-McHenry T. Genome-wide Scan Finds
29 Suggestive Caries Loci. *J. Dent. Res.* [Internet]. 2008 May 1 [cited 2013 Jun
30 4];87(5):435–9.
- 31 27. Kuchler EC, Deeley K, HO B, Meyer C, Antunes L, Marazita M, et al.
32 Genetic mapping of high caries experience on human chromosome 13. *BMC Med.*
33 *Genet.* 2013;14(1):114–6.
- 34 28. Wang X, Shaffer JR, Zeng Z, Begum F, Vieira AR, Noel J, et al. Genome-
35 wide association Scan of dental caries in the permanent dentition Genome-wide
36 association Scan of dental caries in the permanent dentition. *BMC Oral Health.* 2012.

29. Werneck RI, Mira MT TP. A critical review: an overview of genetic influence on dental caries. *Oral Dis.* 2010;16:613–23.
30. Kang SW, Yoon I, Lee HW CJ. Association between AMELX polymorphisms and dental caries in Koreans. *Oral Disiase.* 2010;
31. Deeley K, Letra A, Rose EK, Brandon CA, Resick JM, Marazita ML VA. Possible association of amelogenin to high caries experience in a Guatemalan-Mayan population. *Caries Res.* 2008;8–13.
32. Slayton RL CM, ML M. Tuftelin, Mutans Streptococci, and Dental Caries Susceptibility. *J Dent Res.* 2005;711–4.
33. Ergöz N, Seymen F, Gencay K, Tamay Z, Deeley K, Vinski S, et al. Genetic variation in Ameloblastin is associated with caries in asthmatic children. *Eur. Arch. Paediatr. Dent.* [Internet]. 2013 Nov 8 [cited 2015 Mar 27];15(3):211–6.
34. Patir A, Seymen F, Yildirim M, Deeley K, Cooper ME, Marazita ML, et al. Enamel formation genes are associated with high caries experience in Turkish children. *Caries Res.* [Internet]. 2008 Jan [cited 2013 Jun 4];42(5):394–400.
35. Wang X, Willing MC, Marazita ML, Wendell S, Warren JJ, Broffitt B, et al. Genetic and environmental factors associated with dental caries in children: The Iowa Fluoride Study. *Caries Res* [Internet]. 2013;46(4):177–84.
36. Tannure PN, Kuchler EC, Falagan-Lotsch P, Amorim LMF, Raggio Luiz R, Costa MC, et al. MMP13 Polymorphism Decreases Risk for Dental Caries. *Caries Res.* [Internet]. 2012 [cited 2015 Mar 27];46(4):401–7.
37. Tannure PN, Kuchler EC, Lips A, Castro M De, Luiz RR, Granjeiro JM, et al. Genetic Variation in MMP20 Contributes to Higher Caries Experienc. 2012;40(5):381–6.
38. Yang Y, Wang W, Qin M. Mannose-binding lectin gene polymorphisms are not associated with susceptibility to severe early childhood caries. *Hum. Immunol.* [Internet]. American Society for Histocompatibility and Immunogenetics; 2013 Jan [cited 2015 Mar 27];74(1):110–3.
39. Valarini N, Maciel SM, Moura SK, Poli-Frederico RC. Association of dental caries with HLA Class II allele in Brazilian adolescents. *Caries Res.* [Internet]. 2012 Jan [cited 2015 Mar 27];46(6):530–5.
40. Ozturk a, Famili P, Vieira a R. The antimicrobial peptide DEFB1 is associated with caries. *J. Dent. Res.* [Internet]. 2010 Jun [cited 2015 Mar 27];89(6):631–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20371866>
41. Kulkarni G V, Chng T, Eny KM, Nielsen D, Wessman C, El-Sohemy a. Association of GLUT2 and TAS1R2 genotypes with risk for dental caries. *Caries Res.* [Internet]. 2013 Jan [cited 2015 May 11];47(3):219–25.

42. Anderson LC, Lamberts BL BW. Salivary Protein Polymorphisms in Caries-free and Caries-active Adults. 1982;
43. Azevedo LF, Pecharki GD, Brancher JA, Cordeiro CA, Gabriella K, Antunes AA, et al. Analysis of the association between lactotransferrin (LTF) gene polymorphism and dental caries. 2010;18(2):166–70.
44. Available from: <http://omim.org/entry/603767>
45. Lu Y, Papagerakis P, Yamakoshi Y, Hu JC-, Bartlett JD, Simmer JP. Functions of KLK4 and MMP-20 in dental enamel formation. Biol Chem. 2008;389(6):695–700.
46. Available from: <http://omim.org/entry/600770>
47. Frenkel ES, Ribbeck K. Salivary Mucins Protect Surfaces from Colonization by Cariogenic Bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 2014;8:332–8.
48. Available from: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MUC5B>
49. Pol J. Association of the polymorphism of MUC7 gene encoding the low-molecular-weight mucin MG2 with susceptibility to caries. Ann Acad Med Stetin. 2011;85–91.
50. Trevilatto PC, Line SR. Use of buccal epithelial cells for PCR amplification of large DNA fragments. J Forensic Odontostomatol. 2000;18(1):6-9

7. ANEXOS

7.2 Termo de Consentimento livre e esclarecido

A Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR) estará realizando um estudo que irá investigar o papel da genética na susceptibilidade à cárie e a gravidade da doença. Se bem sucedido, o projeto poderá facilitar o tratamento da cárie e melhorar a qualidade de vida dos pacientes. Este estudo será coordenado pela Dra Renata Iani Werneck, professora e pesquisador do programa de Pós-Graduação em Odontologia da PUCPR e pela aluna Tayla Cavallari, do programa de pós graduação da PUCPR na área de concentração de Saúde Coletiva e pela aluna Amanda Dias de Castro da graduação em Odontologia da PUCPR.

1) Métodos

Se você concordar em participar neste estudo, você será submetido a um exame clínico odontológico e a um questionário. O exame será constituído de uma observação dos seus dentes e gengiva. A dentista irá usar luvas, um palito de madeira para afastar a bochecha e gaze para absorver saliva. Os dados observados serão anotados em um folha (odontograma) e serão analisados e guardados pelos pesquisadores na PUCPR. Estes dados irão permitir aos cientistas estudar as características genéticas que tornam mais fácil para alguns indivíduos e seus familiares desenvolver a cárie. Sob sua autorização, informações de prontuários clínicos também poderão ser lidas pelos cientistas e utilizadas no estudo.

Sua autorização só valerá sob a condição de se manter o desenho, objetivos e metodologia do projeto original, além da avaliação e aprovação de eventuais alterações pelo Comitê de Ética da PUCPR.

2) Riscos Físicos para Saúde/Desconfortos

Os riscos físicos para saúde de participação neste estudo são muito pequenos e limitados ao procedimento de exame clínico. Durante o exame, você poderá sentir um desconforto temporário devido ao uso do palito de madeira.

3) Alternativas

Se você tiver cárie, uma visita ao dentista será indicada, mesmo que você não queira participar do estudo. Portanto, se você decidir não participar, ou cessar sua participação no estudo a qualquer momento, você receberá informações sobre a saúde da sua boca, assim como explicações sobre prevenção de doenças da boca.

Se você não tiver cárie, você está sendo convidado a participar do estudo como familiar do afetado. Neste caso, sua decisão de participar ou não, ou de cessar sua participação a qualquer momento, não irá interferir de nenhuma forma nos procedimentos odontológicos para diagnóstico ou tratamento da cárie que você possa necessitar no futuro. Da mesma forma, sua decisão não irá refletir no acesso a procedimentos odontológicos necessários a algum familiar.

4) Custos para os participantes

No caso de você decidir participar do estudo, você não terá nenhum custo. Todos os custos serão cobertos pelo estudo.

5) Benefícios

Em longo prazo, os resultados deste estudo poderão facilitar a detecção de causas da cárie ocorrer, tornando possível evitar o desenvolvimento da doença. Além disso, espera-se que conhecimentos científicos adicionais sejam alcançados, com consequente melhoria do tratamento de pessoas afetadas pela cárie.

6) Reembolso

Você não será reembolsado por participar deste estudo.

7) Confidencialidade dos dados

A participação em projetos de pesquisa pode resultar em perda de privacidade. Além disso, a descoberta de fatores de risco genéticos para cárie

1 podem expor susceptibilidades de certos grupos de pessoas, possivelmente
2 levando a outros ou certas empresas a considerar estes grupos diferentes de uma
3 forma negativa. Entretanto, procedimentos serão adotados pelos responsáveis por
4 este estudo no intuito de proteger a confidencialidade das informações que você
5 fornecer e as informações produzidas pelo projeto. Nenhuma informação genética
6 e odontológica individual será tornada pública. As informações serão codificadas e
7 mantidas num local reservado o tempo todo. Somente os pesquisadores
8 envolvidos neste estudo terão acesso às informações. Após o término deste
9 estudo, as informações serão transcritas dos questionários para arquivos de
10 computador, mantidos em local restrito com acesso permitido apenas aos mesmos
11 pesquisadores. Os dados deste estudo poderão ser discutidos com pesquisadores
12 de outras instituições, mas nenhuma identificação será fornecida.

13 14 **Consentimento**

15 Estudo Genético Epidemiológico de Susceptibilidade à Cárie Dentária

16 Você receberá uma cópia deste Termo de Consentimento para mantê-lo
17 consigo. A PARTICIPAÇÃO EM PESQUISA É VOLUNTÁRIA

18 Você tem o direito de não concordar em participar ou mesmo de se retirar
19 do estudo em qualquer momento que queira, sem riscos para o seu tratamento
20 odontológico. Se você desejar e concordar em participar, deve assinar ou fornecer
21 sua impressão digital na linha apropriada abaixo.

22 Se você desejar participar do estudo, permitirá que seu endereço e telefone
23 sejam anotados em uma folha separada, para facilitar contato quando necessário.
24 Como já foi esclarecida anteriormente, toda informação, pessoal será mantida em
25 sigilo.

26
27 _____
28 Nome completo e Assinatura ou impressão nº do prontuário
29 digital do voluntário

30
31
32 Assinatura do entrevistador

Nome do entrevistador

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12

Assinatura testemunha 1

Assinatura testemunha 2

____/____/____

Data

7.2 Questionário

(Aplicado eletronicamente via tablete, desta forma, apresenta-se neste formato)

Nome *

Número *

Local de nascimento *

Bairro *

Idade *

Grupo *

- ☐ Caso
☐ Controle

Escolaridade *

- ☐ Fundamental Incompleto
☐ Fundamental Completo
☐ Médio incompleto
☐ Médio completo
☐ Superior incompleto
☐ Superior completo

Etnia *

- ☐ Branco
☐ Negro
☐ Asiático
☐ Mulato
☐ Indígena

Sexo *

- ☐ Feminino

- 1 ☐ Masculino
- 2
- 3 **Renda mensal ***
- 4 ☐ Nenhuma renda
- 5 ☐ até 400 reais
- 6 ☐ de 400 à 1000 reais
- 7 ☐ de 1000 até 2000
- 8 ☐ Acima de 2000
- 9
- 10
- 11 **Biofilme ***
- 12 ☐ Ausência de placa
- 13 ☐ Placa visível
- 14 ☐ Placa abundante
- 15
- 16 **Gengivite ***
- 17 ☐ Sim
- 18 ☐ Não
- 19
- 20 **Peiodontite ***
- 21 ☐ Sim
- 22 ☐ Não
- 23
- 24 **Você escovou seus dentes hoje? ***
- 25 ☐ Sim
- 26 ☐ Não
- 27
- 28 **Quantas vezes você escova os dentes por dia? ***
- 29 ☐ Nenhuma vez
- 30 ☐ Uma vez
- 31 ☐ Duas vezes
- 32 ☐ Três vezes
- 33
- 34 **Você usa fio dental? ***
- 35 ☐ Sim
- 36 ☐ Não
- 37
- 38 **Quando você usa fio dental?**
- 39 ☐ As vezes

- 1 ☐ Todos os dias
- 2
- 3 **Quantas vezes você ingere açúcar por dia fora das refeições? ***
- 4 ☐ Nenhuma
- 5 ☐ Até 3 vezes
- 6 ☐ Mais de 3 vezes
- 7 **Toma remédio? ***
- 8 ☐ Sim
- 9 ☐ Não
- 10
- 11 **Tomou remédio nos últimos 3 meses? ***
- 12 ☐ Sim
- 13 ☐ Não
- 14
- 15 **Quantas vezes ao ano vai ao dentista? ***
- 16 ☐ Nenhuma vez
- 17 ☐ Uma vez
- 18 ☐ Duas ou mais
- 19
- 20 **Quem de sua família já foi ao dentista? ***
- 21 ☐ Ninguém
- 22 ☐ Pai
- 23 ☐ Mãe
- 24 ☐ Marido - Esposa
- 25 ☐ Filhos
- 26 ☐ Outros
- 27
- 28 **Alguma vez já recebeu informações sobre a prevenção de cáries e**
- 29 **doenças bucais? ***
- 30 ☐ Sim
- 31 ☐ Não
- 32 ☐ Não sei
- 33
- 34 **Usa outras formas de Flúor? ***
- 35 ☐ Bochecho com flúor todos os dias
- 36 ☐ Bochecho com flúor de vez em quando
- 37 ☐ Só no dentista
- 38 ☐ Não uso

1
2 **Como classifica sua saúde bucal? ***

- 3 ☐ Não sabe
4 ☐ Péssima
5 ☐ Ruim
6 ☐ Regular
7 ☐ Boa
8 ☐ Ótima

9
10 **Como classificaria a aparência de seus dentes? ***

- 11 ☐ Não sabe
12 ☐ Péssima
13 ☐ Ruim
14 ☐ Regular
15 ☐ Boa
16 ☐ Ótima

17
18 **Tem a sensação de boca seca? ***

- 19 ☐ Sim
20 ☐ Não

21
22 **Como classificaria sua mastigação? ***

- 23 ☐ Não sabe
24 ☐ Péssima
25 ☐ Ruim
26 ☐ Regular
27 ☐ Boa
28 ☐ Ótima

29
30 **Como classificaria a sua fala devido aos seus dentes e gengivas? ***

- 31 ☐ Não sabe
32 ☐ Péssima
33 ☐ Ruim
34 ☐ Regular
35 ☐ Boa
36 ☐ Ótima

37
38 **O quanto de dor seus dentes e gengivas causaram nos últimos 6 meses?**

39 *

- | | |
|----|------------------------------------|
| 1 | ☐ Não sabe |
| 2 | ☐ Nenhuma dor |
| 3 | ☐ Pouca dor |
| 4 | ☐ Dor moderada |
| 5 | ☐ Muita dor |
| 6 | |
| 7 | |
| 8 | |
| 9 | |
| 10 | |
| 11 | |
| 12 | |
| 13 | |
| 14 | |
| 15 | |

1 **7.3 Tabela Score ICDAS**

2

Dente	Score 1	Score 2	Score 3	Score 4	Score 5	Score 6	Restaurado	Ausente
11								
12								
13								
14								
15								
16								
17								
21								
22								
23								
24								
25								
26								
27								
31								
32								
33								
34								
35								
36								
37								
41								
42								
43								
44								
45								
46								
47								

3

4

5

6

7

8

9

10

11

7.4 Aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa – PUCPR

Plataforma Brasil - Ministério da Saúde

Número do Parecer:69491

PROJETO DE PESQUISA

Apresentação do Projeto:

Estudo caso-controle que visa à compreensão dos aspectos genéticos envolvidos na patogênese da cárie. A população de estudo será composta por 100 casos e 100 controles recrutados na Clínica de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná. A genotipagem dos marcadores dos genes ocorrerá através do sistema de discriminação alélica TaqMan. As análises estatísticas iniciarão com uma descrição de todos os dados coletados, regressão logística com variáveis ambientais e marcadores e análise multinível.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo geral deste estudo é aplicar uma estratégia de análise de associação caso-controle para investigar, em uma população sul - brasileira, a participação de polimorfismos de genes candidatos ao controle da susceptibilidade/resistência à doença cárie e suas variáveis clínicas, assim como compreender a influência das variáveis ambientais juntamente com as variáveis genéticas.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: limitado ao procedimento de exame clínico e o desconforto temporário pelo uso de palito de madeira. Benefícios: o resultado do estudo poderá facilitar a detecção das causas da ocorrência da cárie e a possibilidade de evitar o desenvolvimento da doença.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Projeto de pesquisa com relevância acadêmico-científica.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

TCLE atende as recomendações deste Comitê.

Recomendações:

Nenhuma.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto atende às recomendações deste Comitê.

- 1 **Situação do Parecer:**
- 2 Aprovado.
- 3 **Necessita Apreciação da CONEP:**
- 4 Não
- 5 **Considerações Finais a critério do CEP:**
- 6 Aprovado.
- 7
- 8
- 9

7.5 Normas para publicação do artigo 1

Journal of Dental Research

TITLES

Titles can consist of a maximum of 75 characters (including spaces). Titles do not normally include numbers, acronyms, abbreviations or punctuation. The title should include sufficient detail for indexing purposes but be general enough for readers outside the field to appreciate what the paper is about.

ACKNOWLEDGEMENTS

Authors are required to report all sources of support for their project or study, including but not limited to: grant funds, commercial sources, funds from a contributors' institution. Do not refer to a study being "partially funded by the cited sources." Consultancies and funds paid directly to investigators must also be listed. Authors are required to specify during the submission process if their paper received funding from NIH, NIDCR, or any other NIH Institute or Center and provide the grant number. To comply with the NIH Public Access Mandate, for qualifying NIH-funded papers, the *Journal of Dental Research* will deposit the final, copyedited paper to PubMed Central on behalf of the authors.

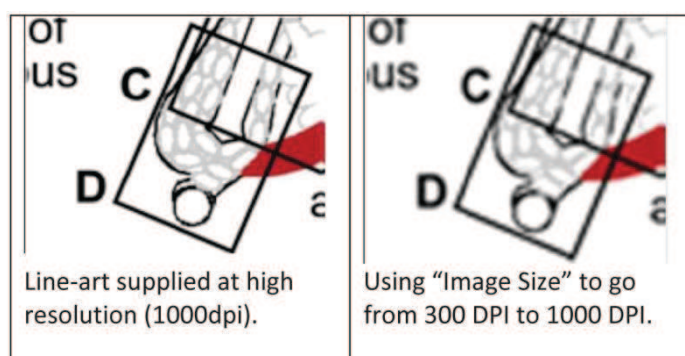
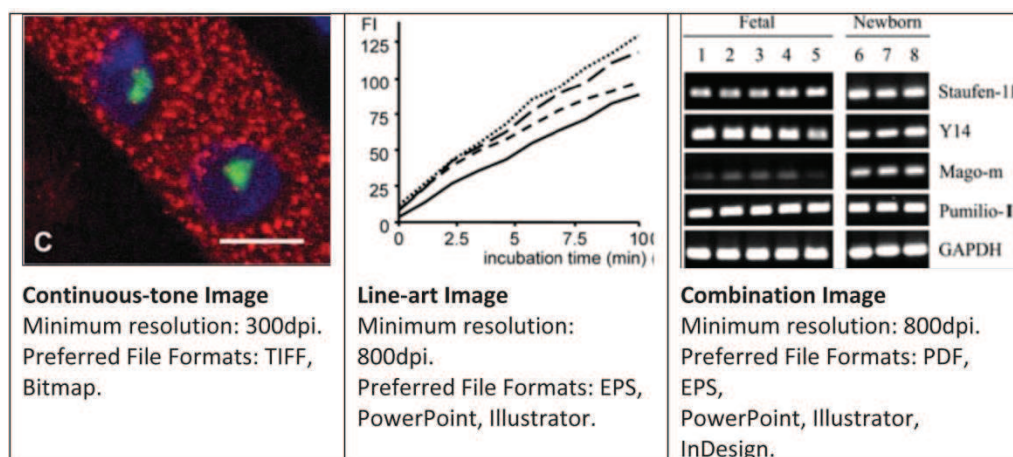
Any perceived or actual conflicts of interest need to be identified in the acknowledgments section. The *JDR* abides by the International Committee of Medical Journal Editors guidelines for the Ethical Considerations in the Conduct and Report of Research (www.icmje.org). Authors are requested to include this information in the acknowledgments section and the corresponding author must confirm that all co-authors have reported any potential conflicts.

FIGURE AND TABLE REQUIREMENTS

These guidelines are intended to aid authors in providing figures that will reproduce well in both print and online media. Submitting digital image files that conform to these guidelines will prevent delays in the review and publication processes, and maximize the published quality of your figures.

Figure Types

JDR figures can fall into one of three categories: **Continuous-tone images**, **Line-art images**, and **Combination images**. Each image type has specific requirements in terms of the resolution needed for publication and the file types best suited for the figure. See the following panels for examples and requirements.



Resolution

In order for a figure to be used in publication, its Digital Image File must have the required resolution when it is created. The resolution cannot be raised after the original image is made. Attempting to do so (for example, with Adobe Photoshop's® "Image Size" command) results in the addition of artificial pixels that distort the image and lower its sharpness. The figures on the right show an example of this reduced sharpness.

Limit fonts used in any figure to Times, Times New Roman, Arial, Frutiger, and Sabon. Other fonts cannot be guaranteed to reproduce properly.

Files containing figures and tables should be clearly labeled to indicate their placement in the text or appendix. Tables should be viewable in a portrait view. Tables that are created in a landscape view are more suitable for an appendix.

If the online version is in color and the printed version in black and white, please submit separate files for each version. Figures should be identical except in color or grayscale. The cost of color figures in the print version will be borne by the authors. Rates for color reproduction are \$300 per initial page of color and \$150 for each additional page of color. However, there are no charges for figures and diagrams printed in black and white. Color figures may be included in the online version of *JDR* with no extra charges.

REFERENCES

The *Journal of Dental Research* (JDR) adheres to the CSE (8th Edition) editorial style. All submitted manuscripts should be formatted in this style. Additional guidelines on formatting your references in CSE style may be found [here](#).

SUPPLEMENTAL FILES

Additional supporting data may be referenced as a supplemental appendix for publication online only. All supplemental appendix files must be submitted with the manuscript for review. Supplemental files may include additional figures or tables that exceed the *Journal's* limit. Material intended for the supplemental appendix must have “supplemental” or “appendix” in the file name upon upload.

Language Editing: Manuscripts submitted for publication consideration should be written in English. Prior to submission, if a manuscript would benefit from professional editing, authors may consider using a language-editing service. Suggestions for this type of service can be found at www.iadr.org/EditingServices. The *Journal of Dental Research* does not take responsibility for, or endorse these services, and their use has no bearing on acceptance of a manuscript for publication.

7.6. Normas para publicação do artigo 2

International Journal of Dentistry

Title and Authorship Information

The following information should be included

- Paper title
- Full author names
- Full institutional mailing addresses
- Email addresses

Abstract

The manuscript should contain an abstract. The abstract should be self-contained and citation-free and should not exceed 200 words.

Introduction

This section should be succinct, with no subheadings.

Materials and Methods

This part should contain sufficient detail so that all procedures can be repeated. It can be divided into subsections if several methods are described.

Results and Discussion

This section may each be divided by subheadings or may be combined.

Conclusions

This should clearly explain the main conclusions of the work highlighting its importance and relevance.

Acknowledgments

All acknowledgments (if any) should be included at the very end of the paper before the references and may include supporting grants, presentations, and so forth.

References

Authors are responsible for ensuring that the information in each reference is complete and accurate. All references must be numbered consecutively and citations of references in text should be identified using numbers in square brackets (e.g., “as discussed by Smith [9]”; “as discussed elsewhere [9, 10]”). All references should be cited within the text; otherwise, these references will be automatically removed.

Preparation of Figures

1 Upon submission of an article, authors are supposed to include all figures
2 and tables in the PDF file of the manuscript. Figures and tables should not be
3 submitted in separate files. If the article is accepted, authors will be asked to provide
4 the source files of the figures. Each figure should be supplied in a separate
5 electronic file. All figures should be cited in the paper in a consecutive order. Figures
6 should be supplied in either vector art formats (Illustrator, EPS, WMF, FreeHand,
7 CorelDraw, PowerPoint, Excel, etc.) or bitmap formats (Photoshop, TIFF, GIF,
8 JPEG, etc.). Bitmap images should be of 300 dpi resolution at least unless the
9 resolution is intentionally set to a lower level for scientific reasons. If a bitmap image
10 has labels, the image and labels should be embedded in separate layers.

11 Preparation of Tables

12 Tables should be cited consecutively in the text. Every table must have a
13 descriptive title and if numerical measurements are given, the units should be
14 included in the column heading. Vertical rules should not be used.

15 Proofs

16 Corrected proofs must be returned to the publisher within 2-3 days of receipt.
17 The publisher will do everything possible to ensure prompt publication. It will
18 therefore be appreciated if the manuscripts and figures conform from the outset to
19 the style of the journal.
20
21