



**Universidade Norte do Paraná**

---

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
MESTRADO EM ODONTOLOGIA

NATALIA VALARINI

**ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO ENTRE AS VARIANTES  
GENÉTICAS HLA-DR E HLA-DQ EM ADOLESCENTES  
PORTADORES DE CÁRIE DENTÁRIA**

---

Londrina  
2011

NATALIA VALARINI

**ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO ENTRE AS VARIANTES  
GENÉTICAS HLA-DR E HLA-DQ EM ADOLESCENTES  
PORTADORES DE CÁRIE DENTÁRIA**

Dissertação apresentada à Universidade Norte do Paraná - UNOPAR, como parte integrante dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientadora: Profª Drª Regina Célia Poli-Frederico  
Co-orientadora: Profª Drª Sandra Mara Maciel

Londrina  
2011

**AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.**

**Dados Internacionais de catalogação-na-publicação**  
**Universidade Norte do Paraná**  
**Biblioteca Central**  
**Setor de Tratamento da Informação**

V234e Valarini, Natalia.  
Estudo de associação entre as variantes genéticas HLA-DR e HLA-DQ em adolescentes portadores de cárie dentária / Natalia Valarini. Londrina : [s.n], 2011.  
58 fls.

Dissertação (Mestrado) - Odontologia. Dentística Preventiva e Restauradora. Universidade Norte do Paraná.  
Orientador: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Regina Célia Poli-Fredrico.

1- Odontologia - dissertação de mestrado - UNOPAR 2- Cárie dentária  
3- Suscetibilidade genética 4- Antígeno HLA 5- Adolescente I- Poli-Frederico, Regina Célia, orient. II- Universidade Norte do Paraná.

CDU 616.314-089.27/.28

## NATALIA VALARINI

Filiação	Marcos Augusto Valarini Edilene Daniel Guedes
Naturalidade	Londrina -PR
Nascimento	08 de fevereiro de 1985
2005 – 2008	Graduação em Odontologia - UNOPAR: Universidade Norte do Paraná
2009 – 2010	Curso de Pós-Graduação na área de Dentística Preventiva e Restauradora, nível Mestrado, na Universidade Norte do Paraná – UNOPAR
Associações	IADR – International Association for Dental Research



# Universidade Norte do Paraná

## Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação

### Programa do Mestrado em Odontologia – Dentística Preventiva e Restauradora

#### ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Aos vinte e três dias do mês de fevereiro do ano de dois mil e onze, no Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, desta Universidade, às quatorze horas e trinta minutos, reuniu-se a Banca Examinadora indicada pelo Programa de Pós-Graduação e homologada pelo Colegiado dos Programas Pós-Graduação *Stricto Sensu*, conforme Protocolo nº. 172 de \_\_/\_\_/2011, composta por 1. Profª. Drª. Regina Célia Poli-Frederico, presidente da banca. 2. Profª. Drª. Roberta Losi Guembarovski. 3. Profª. Drª. Flaviana Bombarda de Andrade. A reunião tem por objetivo julgar o trabalho da estudante *Natalia Valarini*, sob o título “*Estudo de associação entre as variantes genéticas HLA-DR e HLA-DQ em adolescentes portadores de cárie dentária*”. Os trabalhos foram abertos pelo (a) presidente da banca Profª. Drª. Regina Célia Poli-Frederico que agradeceu aos membros da banca pela presença e passou a palavra à candidata que fez a apresentação do trabalho em 30 minutos. Em seguida, a Profª. Drª. Roberta Losi Guembarovski fez a arguição da candidata em 60 minutos e o Profª. Drª. Flaviana Bombarda de Andrade em 30 minutos. Finalmente a Profª. Drª. Regina Célia Poli-Frederico arguiu a candidata em 15 minutos. Terminadas as arguições, procedeu-se o julgamento do trabalho, concluindo a Banca Examinadora por sua **APROVAÇÃO** e com a recomendação de envio dos exemplares no prazo de 60 dias, para homologação pelo Colegiado de Pós-Graduação. Nada mais havendo a tratar, foi lavrada a presente ata, assinada pelos membros da Banca Examinadora.

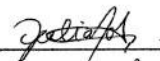
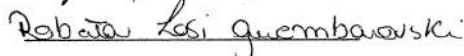

Londrina, 23 de fevereiro de 2011.

#### Examinadores:

Profª. Drª. Regina Célia Poli-Frederico

Profª. Drª. Roberta Losi Guembarovski

Profª. Drª. Flaviana Bombarda de Andrade

  
\_\_\_\_\_  
  
\_\_\_\_\_  
  
\_\_\_\_\_

## **ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO ENTRE AS VARIANTES GENÉTICAS HLA-DR E HLA-DQ EM ADOLESCENTES PORTADORES DE CÁRIE DENTÁRIA.**

Dissertação apresentada à Universidade Norte do Paraná - UNOPAR, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, como parte integrante dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Odontologia, área de concentração em Dentística, com nota final igual a \_\_\_\_\_, conferida pela Banca Examinadora formada pelos professores:

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Regina Célia Poli-Frederico  
Universidade Norte do Paraná

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Flaviana Bombarda Andrade Ferreira  
Universidade de São Paulo

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Roberta Losi Guembarovski  
Universidade Estadual do Paraná

Londrina, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2011.

Dedico este trabalho inteiramente aos meus pais, **Marcos** e **Edilene**, que são os alicerces de minha vida e as pessoas que mais amo. Obrigada por todo amor, compreensão, carinho e por sempre acreditarem em mim.

## **Agradecimento Especial**

À minha orientadora, **Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Regina Célia Poli-Frederico**, pela confiança, amizade, dedicação e atenção durante todos estes anos e por ter despertado em mim o amor e o prazer pela ciência.



## Agradecimentos

A **Deus**, por ter me dado vida e tê-la preenchido com tantas pessoas maravilhosas, oportunidades e alegria.

À **Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sandra Mara Maciel** pela essencial co-orientação deste trabalho, sempre disposta a ajudar nos momentos em que precisei.

À **Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Flaviana Bombarda de Andrade Ferreira**, por ter acompanhado meus primeiros passos de vida acadêmica, sempre com palavras de incentivo e valiosas sugestões.

A todos os **professores do curso de Mestrado em Odontologia**, pelos ensinamentos, constante apoio e exemplo como profissionais.

Aos queridos colegas de turma, **Renata Kirita Doi** e **Carlos Ribeiro**, pela convivência e amizade.

Ao **Guilherme Amaral Bouças de Campos**, pela amizade, conselhos e por sempre estar presente em todos os momentos que precisei.

Ao **Heliton Gustavo de Lima**, pela parceria ao longo dos anos de graduação e pelo exemplo de determinação e garra na vida. Saudades.

Ao laboratório, que foi o local de realização deste estudo e à **técnica Elaine Luvisotto**, pela cooperação durante os procedimentos laboratoriais.

Aos **alunos de Iniciação Científica** de Odontologia da Universidade Norte do Paraná (UNOPAR), **Daiana Mitiko** e **Raissa Rositto Shimizu** pela importante ajuda nos procedimentos laboratoriais e nas coletas.

Aos **pais e respectivos filhos(as) integrantes da pesquisa**, pela confiança e fundamental participação.

Ao **Núcleo Regional de Ensino** e aos **diretores de cada escola** por permitirem o acesso às escolas para que esta pesquisa fosse realizada.

À **banca examinadora** pelo intercâmbio de idéias e sugestões construtivas durante a qualificação e defesa desta dissertação.

À **Universidade Norte do Paraná** representada pela Chanceler, **Prof<sup>a</sup> Elisabeth Bueno Laffranchi** e pela Reitora **Prof<sup>a</sup> Wilma Jandre Melo**.

À **Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação**, representada pelo **Prof. Dr. Hélio Hiroshi Sugimoto**.

Ao **Centro de Ciências Biológicas e da Saúde**, representada pelo **Prof. Ruy Moreira da Costa Filho**.

**À Coordenação do Curso de Mestrado em Odontologia, representada pelo Prof. Dr. Alcides Gonini Junior.**

**A todos os funcionários da secretaria e da clínica de Odontologia da UNOPAR.**

Meus sinceros agradecimentos!

i carry your heart with me

i carry your heart with me (i carry it in  
my heart) i am never without it (anywhere  
i go you go, my dear; and whatever is done  
by only me is your doing, my darling)

i fear

no fate (for you are my fate, my sweet) i want no  
world (for beautiful you are my world, my true)  
and it's you are whatever a moon has always  
meant and whatever a sun will always sing is you

here is the deepest secret nobody knows  
(here is the root of the root and the bud of the  
bud and the sky of the sky of a tree called life;  
which grows higher than the soul can hope or  
mind can hide) and this is the wonder that's  
keeping the stars apart

i carry your heart (i carry it in my heart)

e. e. cummings

VALARINI, Natalia. **Estudo de associação entre as variantes genéticas HLA-DR e HLA-DQ em adolescentes portadores de cárie dentária**. 2011. 58 fls. Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Universidade Norte do Paraná, Londrina, 2011.

## RESUMO

Nas últimas décadas foi observado um declínio geral no índice de cárie dentária, entretanto, esta ainda é uma das doenças bucais mais comuns, afetando principalmente crianças e adolescentes. Estudos sugerem que diferenças nas moléculas do HLA (antígeno leucocitário humano) podem causar variações na resposta imune contra microrganismos, influenciando na suscetibilidade do indivíduo à cárie dentária. O presente estudo avaliou a relação entre as frequências alélicas do HLA-DR4, -DQ2, -DQ4, -DQ5 e -DQ6 e a prevalência de cárie dentária em adolescentes brasileiros. Participaram do estudo 164 adolescentes com idades entre 15 e 19 anos. Para a avaliação da prevalência de cárie nos adolescentes foi utilizado o índice CPO-D (dentes cariados, perdidos e obturados), segundo os critérios definidos pela Organização Mundial da Saúde (WHO, 1997). As amostras de DNA foram extraídas a partir de células da mucosa bucal. Após a obtenção do DNA foi feita a amplificação dos alelos HLA-DR e HLA-DQ por meio da reação em cadeia da polimerase de seqüência de *primers* específicos (PCR-SSP). O produto amplificado foi analisado por eletroforese em gel de agarose. A prevalência de cárie dentária foi de 60.4%. Entre os que possuíam histórico da doença, os valores de CPO-D médio foram  $2.41 \pm 2.53$ . Foi encontrada maior presença do alelo DQ6 (45,1%) nos adolescentes. A presença do alelo DQ2 no grupo com CPO-D  $\geq 1$  foi estatisticamente significativa quando comparada com o grupo com CPO-D = 0 (43.1%,  $p=0,02$ ). Os resultados também indicaram que a presença do alelo DQ2 diminui o risco para a cárie dentária em 65% (OR=0,35; IC= 0,18 – 0,70). Os resultados obtidos neste estudo fornecem evidência que os genes do complexo de histocompatibilidade humano (MHC), especialmente do grupo DQ2, podem influenciar a suscetibilidade à cárie dentária em adolescentes brasileiros.

**Palavras-chave:** Cárie dentária. Suscetibilidade genética. Antígenos HLA. Adolescente.



VALARINI, Natalia. **Study of association between genetic variants HLA-DR and HLA-DQ in caries active adolescents.** 2011. 58 p. Dissertation (Master of Dentistry) – University of North of Parana, Londrina, 2011.

## ABSTRACT

In the past decades, a general decline in the dental caries index was observed, however, it is still one of the most common oral diseases, specially affecting children and adolescents. Previous studies have suggested that differences in the HLA (human leukocyte antigen) molecules can cause variations in the immune response against microorganisms and may influence on the individual's susceptibility to dental caries. The present study evaluated the association between allelic frequencies for HLA-DR4, -DQ2, -DQ4, -DQ5 and -DQ6 and prevalence of dental caries in Brazilian adolescents. The study sample consisted of 164 adolescents aged between 15 to 19 years. For the assessment of the adolescents caries experience the DMFT (decayed, missing, filled teeth) index was used, according to criteria defined by the World Health Organization. DNA samples of the adolescents were extracted from the oral mucosa cells. After obtaining the DNA the amplification of the alleles HLA-DR and HLA-DQ was carried out by polymerase chain reaction with sequence specific primers (PCR-SSP). The products of PCR-SSP were electrophoresed and analyzed in agarose gel. The prevalence of dental caries was 60.4%. Among those with a history of dental caries, the average DMFT value was  $2.41 \pm 2.53$ . A higher presence of the DQ6 allele was found in the adolescents (45.1%). HLA-DQ2 allele frequency in DMFT  $\geq 1$  group was statically significant as compared to DMFT = 0 scored group (43.1%,  $p = 0.002$ ). There was a negative correlation between the DQ2 allele and dental caries ( $r = -0.237$ ,  $p < 0.001$ ). The results also indicate that being positive for the DQ2 allele decreased the risk for dental caries by 65% (OR=0.35; IC= 0.18-0.70). Our data provide evidence that genes within MHC, especially the DQ2 group, may influence susceptibility to dental caries in Brazilian adolescents.

**Keywords:** Dental caries. Genetic susceptibility. HLA antigens. Adolescents.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>12</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>13</b>
<b>2.1 EPIDEMIOLOGIA DA CÁRIE DENTÁRIA.....</b>	<b>13</b>
<b>2.2 SUSCETIBILIDADE GENÉTICA À CÁRIE DENTÁRIA.....</b>	<b>14</b>
<b>2.3 COMPLEXO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE.....</b>	<b>16</b>
<b>2.3.1 Estrutura Genética .....</b>	<b>17</b>
<b>2.3.2 Estrutura das Moléculas do MHC.....</b>	<b>19</b>
<b>2.3.3 Funções das Moléculas do MHC.....</b>	<b>19</b>
<b>2.3.4 Nomenclatura dos Antígenos e Genes do MHC.....</b>	<b>20</b>
<b>2.3.5 Associação do HLA com Doenças.....</b>	<b>21</b>
<b>2.4 MODIFICAÇÃO GENÉTICA DA RESPOSTA IMUNE E A CÁRIE DENTÁRIA.....</b>	<b>21</b>
<b>3 ARTIGO: The association of dental caries with HLA class II allele in Brazilian adolescents.....</b>	<b>24</b>
<b>4 CONCLUSÃO.....</b>	<b>43</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>44</b>
<b>APÊNDICE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....</b>	<b>50</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>51</b>
<b>ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da UNOPAR.....</b>	<b>51</b>
<b>ANEXO B – Autorização da Diretoria do Núcleo Regional de Educação.....</b>	<b>52</b>
<b>ANEXO C – Participantes do Estudo.....</b>	<b>53</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A cárie dentária é considerada uma doença de prevalência e incidência mundial, constituindo assim um desafio para a saúde pública de vários países<sup>1</sup>. Se não tratada, esta doença pode causar dor e desconfortos consideráveis, além de altos custos de tratamento<sup>2</sup>. A saúde bucal pode ser considerada como parte do complexo craniofacial agindo em funções vitais como alimentação e comunicação<sup>3</sup>. Sendo assim, está diretamente ligada ao bem-estar e qualidade de vida do ponto de vista social, psicológico e econômico.

O tratamento da cárie dentária nos países em desenvolvimento, pelo método restaurador tradicional, está além das capacidades financeiras da maioria das populações de baixa renda. Apesar de inúmeros programas de prevenção serem realizados e reduções nos níveis de cárie terem sido observadas, o Brasil ainda se encontra entre os países com os maiores índices desta doença<sup>4</sup>.

Estudos realizados com gêmeos<sup>5-11</sup>, mostraram evidências que a cárie tem um componente genético. Estabelecer a base genética envolvida no desenvolvimento desta doença fornecerá subsídios para o incremento de novas estratégias de prevenção, tratamento, avaliação de riscos e compreensão da patogênese.



## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 EPIDEMIOLOGIA DA CÁRIE DENTÁRIA

Apesar de muitos esforços a cárie ainda é uma das doenças bucais mais comuns e afeta principalmente jovens e crianças<sup>12</sup>. Nos últimos anos têm sido observado um declínio no número de casos, mas ainda é necessário criar medidas individuais e coletivas, assim como estratégias de prevenção para controlá-la e tornar suas sequelas menos graves<sup>13</sup>.

O Brasil ainda se encontra entre os países com os maiores índices de cárie dentária do mundo. Tal fato pode ser evidenciado pela comparação da prevalência de cárie dentária em escolares do Brasil com escolares de outras nações com base no banco de dados da Organização Mundial da Saúde. Enquanto no Brasil o índice CPO-D (dentes cariados, perdidos ou obturados) foi de 3,1 em 1996, outros países como Inglaterra, Dinamarca, Finlândia e Austrália possuíam CPO-D por volta de 1,1.

O planejamento de políticas públicas deve estar relacionado com o conhecimento das necessidades e problemas de uma população, a fim de que os recursos sejam direcionados da melhor forma possível<sup>14</sup>. A Organização Mundial da Saúde recomenda que estudos epidemiológicos sejam realizados a cada cinco anos, com a finalidade de acompanhar e monitorar distribuição, tendências e severidade da doença. A idade de doze anos é preconizada para possibilitar comparações internacionais.

Em 1986, no Brasil, foi realizado o primeiro levantamento epidemiológico em saúde bucal. Cinco regiões urbanas foram avaliadas, totalizando 16 capitais de estados. Os exames foram realizados em aproximadamente 21.960 indivíduos entre 6 e 59 anos de idade. Destes, 15.009 tinham idades entre 6 e 12 anos. Quanto à cárie dentária, o estudo mostrou que a população brasileira apresentava alta prevalência em todas as idades e que, aos 12 anos, as crianças apresentavam 6,7 dentes cariados<sup>15</sup>.

Após 10 anos, o Ministério da Saúde realizou um novo levantamento epidemiológico em 27 capitais brasileiras. Neste estudo foi apontada uma queda de 52% no índice CPO-D para escolares aos 12 anos<sup>16</sup>. No ano de 2002 o Ministério da

Saúde realizou um amplo projeto denominado Projeto SB 2000 – condições de Saúde Bucal da população Brasileira, renomeado de SB Brasil, que avaliou os principais agravos em diferentes grupos etários, incluindo zonas rurais e urbanas. Foi observada uma diferença muito significativa na proporção de dentes cariados nas regiões Norte e Nordeste, enquanto os menores índices foram encontrados nas regiões Sul e Sudeste. As médias mais elevadas foram encontradas nas regiões Nordeste e Centro-Oeste. Tais dados evidenciam que o declínio da cárie dentária está ocorrendo de forma desigual entre a população brasileira<sup>17</sup>.

Os resultados deste último levantamento demonstraram que, aos 12 anos de idade, as crianças brasileiras apresentam em média três dentes com história de cárie e que quase 70% destas possuem pelo menos um dente permanente afetado. A situação se agrava entre adolescentes de 15 a 19 anos, que possuem em média 6,2 dentes com experiência de cárie, estando somente 11% destes livres da doença.

## **2.2 SUSCETIBILIDADE GENÉTICA À CÁRIE DENTÁRIA**

É aceito e estabelecido que a cárie dentária é uma doença multifatorial, infecciosa, transmissível e dieta dependente, resultando na desmineralização das estruturas dentárias. Devido ao caráter multifatorial da doença a possibilidade de ligar padrões de herança em sua suscetibilidade é limitada<sup>18</sup>.

A suscetibilidade do indivíduo pode estar ligada a fatores extrínsecos e intrínsecos. Os fatores extrínsecos – como exposição ao flúor, qualidade de higiene bucal, microbiota bucal e dieta – podem superar a suscetibilidade genética do indivíduo. Fatores intrínsecos – como fluxo, composição e capacidade tampão da saliva, aspectos hereditários e imunológicos, muitas vezes são difíceis de serem controlados e acabam não sendo incluídos em estratégias de prevenção<sup>19</sup>. Consequentemente, aspectos hereditários relacionados à esta doença são menos investigados e, assim, pouco entendidos<sup>20</sup>.

Desde o início do século XX pesquisadores já avaliavam a suscetibilidade genética à cárie dentária por meio de estudos com gêmeos monozigóticos e dizigóticos. Em 1927, Bachrach e Young<sup>21</sup> fizeram um estudo com 301 pares de gêmeos, sendo que destes 130 eram monozigóticos e 171 dizigóticos. Os resultados

indicaram que gêmeos monozigóticos apresentavam incidência de cárie similar e que os dizigóticos de gêneros diferentes tinham variação maior.

Dez anos depois outro estudo foi realizado e mostrou que gêmeos idênticos tinham cárie em dentes correspondentes. Tais estudos indicavam que a herança genética tinha participação na cárie dentária, mas as conclusões eram de que esta era apenas um fator contribuinte<sup>18</sup>.

Com o passar do tempo pesquisas com gêmeos monozigóticos e dizigóticos evoluíram, assim como as técnicas de avaliação. Quatro estudos detectaram influência genética na suscetibilidade à cárie dentária e demonstraram que a cárie em gêmeos monozigóticos tinha uma concordância maior do que nos dizigóticos<sup>22-25</sup>.

Conclusões similares foram verificadas em trabalhos que avaliaram a influência genética na suscetibilidade à cárie nas dentições decídua e permanente<sup>26</sup>. O maior avanço no entendimento do papel da hereditariedade e a incidência da cárie dentária foi conseguido com o estudo intitulado “*Minnesota Study of Twins Reared Apart*”. Foi achada significativa semelhança na porcentagem de superfícies de dentes restaurados e cariados nos monozigóticos, estimando que a contribuição genética à cárie dentária seria de 40%. Também foi sugerido que alguns fatores genéticos poderiam estar envolvidos no processo da cárie dentária e na maior similaridade desta em gêmeos monozigóticos. Tais fatores eram: salivares e da microbiota bucal; tempo e seqüência de erupção dentária; morfologia dentária; forma do arco dentário; espaço dentário e propensão à dieta<sup>5</sup>.

Apesar dos estudos com gêmeos terem demonstrado evidências da contribuição genética no risco à cárie dentária, nenhum apontou ligação com genes específicos<sup>18</sup>.

Pesquisas investigando a suscetibilidade genética à cárie dentária também foram realizados em modelos animais. Em 1944, Hunt et al.<sup>27</sup> desenvolveram linhagens de ratos albinos resistentes e suscetíveis à cárie dentária e verificaram que a hereditariedade era um fator importante no desenvolvimento desta doença. Outro estudo de cruzamentos de linhagens de ratos machos resistentes e ratos fêmeas suscetíveis à cárie mostrou que a resistência contra a doença em seus descendentes é devido, em grande parte, a fatores genéticos<sup>28</sup>.

Em 1998, Suzuki et al.<sup>29</sup> investigaram o efeito do complexo principal de histocompatibilidade na suscetibilidade à cárie dentária em camundongos. Uma linhagem de camundongos suscetíveis à cárie (BALB.K/Ola) foi gerada pela introdução da região do MHC - derivada de uma linhagem resistente (C3H/HeJ) - em camundongos propensos a desenvolver a doença. Dessa forma, foi observada a ligação entre suscetibilidade e o haplótipo H-2. Os resultados mostraram que um dos fatores de suscetibilidade genética em camundongos está localizado na região H-2 do cromossomo 17. Outro estudo sugeriu que o maior efeito na suscetibilidade à cárie em camundongos está localizado nos cromossomos 1, 2, 7 e 8<sup>30</sup>.

Bretz *et al.*<sup>8</sup>, com a finalidade de quantificar contribuições de fatores genéticos e ambientais no início e na progressão da cárie dentária na infância, realizaram um estudo longitudinal em um coorte com 314 pares de gêmeos com idades entre 1,5 e 8 anos. Neste estudo, a hipótese testada foi a de que a cárie dentária tem um componente hereditário e que fatores ambientais são mais ativos na instalação da lesão e desenvolvimento com o aumento da idade. Dois exames detalhados, para avaliação da cárie dentária, foram realizados com um intervalo de 12 meses utilizando-se os índices CPO-S (número total de superfícies cariadas/número total de superfícies presentes) e ILS (índice de severidade da lesão de cárie dentária). Foi estimado que a hereditariedade era maior nos grupos de crianças maiores e menores.

Inúmeras pesquisas são realizadas, investigando principalmente a contribuição genética à cárie dentária por alterações no tecido dentário mineralizado<sup>31-34</sup>, alterações no metabolismo do açúcar<sup>35-37</sup>, predileção por alimentos doces<sup>9,38</sup>, nas funções das glândulas salivares<sup>39-40</sup> e resposta imune<sup>29, 41-48</sup>.

## **2.3 COMPLEXO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE**

### **2.3.1 Estruturas das Moléculas do MHC**

As moléculas de histocompatibilidade são glicoproteínas de superfície que apresentam em comum três porções: uma citosólica, voltada para o interior da célula e responsável pela transdução de sinais intracelulares; uma transmembrana, que

mantém a molécula ligada à camada bilipídica e a porção extracelular, que é responsável pela apresentação de peptídeos citosólicos/endógenos às células T<sup>55</sup>.

Existem dois tipos de proteínas do MHC estruturalmente distintas. A molécula do MHC de classe I é um heterodímero consistindo de uma cadeia pesada  $\alpha$ , de peso molecular equivalente a 45 KDa, altamente polimórfica, associada à cadeia  $\beta$  ( $\beta_2$  – microglobulina). A  $\beta_2$  – microglobulina é uma proteína não polimórfica, com peso molecular igual a 12 KDa e é codificada por um gene localizado no cromossomo 15. A cadeia  $\alpha$  contém 3 domínios:  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  e  $\alpha_3$ , sendo que o grande polimorfismo dessas moléculas ocorre nos domínios  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$ . Os peptídeos que irão se ligar às moléculas de classe I são gerados no citosol, pela ação de algumas proteínas chamadas proteossomas. A estabilidade e sustentação da molécula são obtidas por meio de uma interação não-covalente de ambas as cadeias. A molécula de classe II também é um heterodímero e consiste de duas cadeias peptídicas, uma cadeia  $\alpha$  com peso molecular de 33 KDa, uma cadeia  $\beta$  com peso molecular de 28 KDa e um peptídeo antigênico com 10 a 30 aminoácidos. Esta ligação é possível pois, estruturalmente, a região de ligação do peptídeo da molécula classe II é maior<sup>51</sup>.

As moléculas de classe I são expressas em todas as células nucleadas e plaquetas, enquanto as moléculas de classe II apresentam uma distribuição mais restrita, sendo encontradas em linfócitos B, macrófagos, monócitos, células de Langerhans, células dendríticas, células endoteliais e linfócitos T quando ativados<sup>55</sup>.

### **2.3.2 Estrutura genética**

O complexo principal de histocompatibilidade ou MHC (*Major Histocompatibility Complex*) é o conjunto de genes responsável por codificar as moléculas de histocompatibilidade em uma espécie, sendo denominado nos seres humanos de sistema HLA (antígenos leucocitários humanos)<sup>49</sup>.

O MHC é o conjunto de genes mais polimórficos entre os mamíferos e codifica proteínas expressas nas superfícies de vários tipos celulares. Encontra-se localizado no braço curto do cromossomo 6 e se estende ao longo de 2 a 4 centimorgans (cM) de DNA, ou seja, cerca de  $4 \times 10^6$  pares de bases. Atualmente,

mais de 40 *loci* do MHC humano são reconhecidos. Estes codificam moléculas, muitas delas envolvidas diretamente na resposta imune<sup>50</sup>. O sistema HLA é constituído por 224 genes, sendo 128 genes funcionais e 96 pseudogenes.

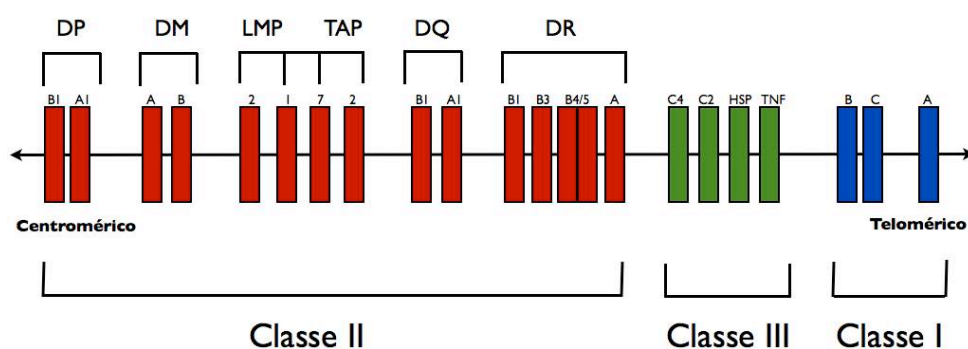
Didaticamente, estes genes podem ser organizados em três grupos, denominados de classe I, II e III. A região de classe I (porção mais telomérica) tem genes que codificam as moléculas clássicas HLA-A, HLA-B e HLA-C, genes não clássicos HLA-E, HLA-F e HLA-G, cujas funções não foram definidas e um grupo de pseudogenes, os quais os produtos não são expressos na membrana celular.

A região de classe II apresenta cinco *loci*, denominados de DP, DN, DO, DQ e DR e encontram-se localizados próximo ao centrômero. O *locus* DR é composto por 10 genes, 1 gene A e até 9 genes B, que codificam as cadeias  $\alpha$  e  $\beta$ , respectivamente, que posteriormente irão formar as moléculas de classe I e II. A região DR possui os segmentos éxon 1, 2 e 3 separados por longos íntrons. O éxon 2 é o responsável por codificar o domínio  $\alpha 1$  e  $\beta 1$ , e, conseqüentemente, pela porção variável da molécula. Adicionalmente, na região de classe II é possível encontrar dois genes: TAP (TAP1 e TAP2), que codificam proteínas responsáveis pelo transporte, até o retículo endoplasmático rugoso, dos peptídeos gerados no citosol e LMP (LMP2 e LMP7), que codificam componentes do proteossomas que funcionam como endopeptidases, responsáveis pela degradação de proteínas citosólicas endógenas ou virais. A região de classe III é telomérica à região classe II e contém genes que codificam moléculas do sistema complemento (C2, C4 e fator B), dois genes que codificam a enzima 21-hidroxilase (CYP 21A e CYP 21B), proteína do choque térmico (Hsp 70) e os fatores de necrose tumoral TNF  $\alpha$  e  $\beta$ <sup>50-51</sup>.

O MHC possui duas características marcantes: ele é poligênico e altamente polimórfico. Ainda que a estrutura das moléculas de classe I ou II seja semelhante, os genes que as codificam possuem, em determinadas regiões, seqüências de nucleotídeos que variam entre indivíduos. O polimorfismo das moléculas de histocompatibilidade está restrito aos domínios terminais da molécula, no sulco de ligação com o peptídeo. Assim, diferentes versões de uma certa seqüência de DNA em um determinado local cromossômico (*locus*) são chamados de alelos. Polimorfismos são a ocorrência em uma população - ou entre populações - de várias formas fenotípicas associadas a alelos de um gene ou homólogos de cromossomo. O polimorfismo das moléculas do MHC é importante, pois pode afetar a seleção de

peptídeos a serem apresentados via moléculas de HLA classe I e II. Também pode influenciar no reconhecimento dos antígenos pelas células T e o desenvolvimento das mesmas. Além disso, está relacionado com rejeição de enxertos e proteção ou suscetibilidade a doenças infecciosas<sup>50,52-53</sup>.

Uma representação esquemática do conjunto de genes do MHC humano pode ser observada na Figura 1.



**Figura 1 – Representação esquemática, resumida, da estrutura gênica do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) humano.**

### 2.3.3 Funções das Moléculas do MHC

As moléculas de classe I têm como função apresentar peptídeos endógenos/virais às células T CD8 positivas. Pela ação de proteossomas, como LPM 2 e 7, peptídeos são gerados no citosol e transportados ao retículo endoplasmático rugoso (RER) pelas proteínas TAP 1 e 2. Também no RER, ocorre a síntese da cadeia pesada  $\alpha$  e da  $\beta$ 2-microglobulina, com auxílio da calnexina. O sítio de ligação do peptídeo é uma fenda profunda, lateralmente formada pelas  $\alpha$  hélices dos domínios  $\alpha$ 1 e  $\alpha$ 2, e o assoalho é formado por oito fitas  $\beta$  pregueadas,

desses mesmos domínios que acomodam peptídeos de 9 a 14 resíduos de aminoácidos. Com a formação do heterodímero, acontece a acomodação do peptídeo na fenda e estabilização da molécula de classe I. Esta, por sua vez, poderá, via complexo de Golgi, ser exteriorizada e expressa na superfície celular<sup>56-57</sup>.

As moléculas de classe II têm como função a apresentação de peptídeos às células CD4 positivas. Nas moléculas de classe II a fenda de ligação ao peptídeo é semelhante à da molécula de classe I podendo, entretanto, acomodar peptídeos de 15 a 24 resíduos de aminoácidos. Estes peptídeos são processados por proteases como as catepsinas B e D, encontradas no endossoma e lisossoma de células apresentadoras de antígeno. Paralelamente, no RER acontece a associação das cadeias  $\alpha$  e  $\beta$ . No complexo de Golgi, moléculas de classe II se ligam a compartimentos endo/lisossomais, para que proteases ácidas e moléculas de HLA-DMA e DMB removam a cadeia não variante, para que a molécula se ligue ao peptídeo e seja expressa na superfície celular<sup>58-59</sup>.

O polimorfismo das moléculas HLA está localizado, principalmente, nos seus sítios de ligação ao peptídeo, sendo que os peptídeos apresentados por uma mesma molécula, apresentam resíduos de ancoragem semelhantes. Entretanto, moléculas diferentes apresentam peptídeos com sequências e resíduos de ancoragem distintos. Dessa forma, o polimorfismo é capaz de determinar quais peptídeos podem ser ligados a elas, definindo, assim, o repertório de peptídeos que serão apresentados às células T<sup>60</sup>.

#### **2.3.4 Nomenclatura dos Antígenos e Genes de Histocompatibilidade**

A nomenclatura aceita para os genes MHC e suas proteínas codificadas é normatizada pelo Comitê de Nomenclatura do sistema HLA da Organização Mundial da Saúde (WHO - *Nomenclature Committee*, 1968), com a finalidade de padronizar e facilitar a compreensão do complexo gênico. Este comitê se reúne regularmente a fim de atribuir novos nomes aos genes descobertos recentemente, ou mudar estruturas da nomenclatura vigente.



Os genes do MHC são indicados pelas letras que correspondem ao *loci* ou grupo de *loci*, como HLA-A, HLA-B, HLA-DR, HLA-DQ. Quando mais de um alelo é codificado por genes do MHC, é colocada uma letra equivalente à cadeia após a denominação do *loci*, exemplo: HLA-DRA, HLA-DRB1, HLA-DQB1. Especificidades definidas por sorologia equivalem aos dois primeiros números, exemplo HLA-DRB1\*04 e HLA-DQB1\*02. Os alelos são identificados pelos dois dígitos seguintes, como HLA-DRB1\*0513. Um quinto dígito é colocado para designar a substituição silenciosa de uma base nitrogenada no código genético, sem alterar os resíduos de aminoácidos na molécula, exemplo HLA-DQA1\*05011, HLA-DQA1\*05013. Há casos em que o gene, embora presente no DNA, não codifica a respectiva proteína. Nestes casos, introduz-se a letra N (referente a nulo) no final da denominação do alelo, exemplo HLA-A\*0215N<sup>54,61</sup>.

### **2.3.5 Associação do HLA com Doenças**

Atualmente, inúmeros estudos investigam a associação dos alelos HLA com doença celíaca<sup>62-63</sup>, diabetes *mellitus* tipo 1<sup>64-67</sup>, lúpus eritematoso sistêmico<sup>68-70</sup>, artrite reumatóide<sup>71-73</sup>, linfoma de Hodgkin<sup>74</sup>, leucemia<sup>75-76</sup>, pênfigo foliáceo ou fogo selvagem<sup>77</sup>, doença de Chagas<sup>78</sup>, miastenia gravis<sup>79-82</sup>, doença de Graves<sup>83-84</sup>, hepatites B e C<sup>85-87</sup>, asma<sup>88</sup>, narcolepsia<sup>89</sup>, mal de Alzheimer<sup>90</sup>, hanseníase<sup>91-92</sup>, esclerose múltipla<sup>93</sup>, carcinoma gástrico<sup>94</sup>, quelóide<sup>95</sup> e cárie dentária<sup>48,96-98</sup>.

## **2.4 MODIFICAÇÃO GENÉTICA DA RESPOSTA IMUNE E A CÁRIE DENTÁRIA**

Indivíduos com imunodeficiências adquiridas ou herdadas estão sujeitos a um aumento de risco e incidência de cárie dentária<sup>45</sup>. Estas observações levaram a uma análise específica de moléculas do complexo imune para associação com o aumento de risco à cárie. Duas diferentes linhas de investigação têm fornecido evidências de que os genes do sistema HLA estão associados com alterações de desenvolvimento do esmalte e com a suscetibilidade aumentada à cárie dentária.

O primeiro estudo que relacionou moléculas do MHC com a cárie foi conduzido por Lehner et al.<sup>40</sup> (1981). Os autores analisaram antígenos de HLA-DR

em um grupo de 24 indivíduos com índices CPO-D alto e baixo. O estudo verificou que o HLA-DRw6-1,2,3 tinha relação com o índice CPO-D e com a baixa resposta de antígenos aos *Streptococcus mutans* (*S. mutans*). Um estudo parecido foi realizado por de Vries et al.<sup>41</sup> (1985), em recrutas militares com e sem presença da cárie dentária. Não foi observada associação entre a presença de HLA-DRw6 e a incidência desta doença.

A relação entre tipagem de HLA e a presença de defeitos do esmalte dentário em indivíduos portadores de doença celíaca foi analisada por Mariani et al.<sup>43</sup> (1994). O estudo mostrou que a presença do antígeno para HLA-DR3 aumentou significativamente o risco à cárie dentária. Em contrapartida, os genótipos DR5 e 7 pareceram proteger os dentes contra possíveis defeitos no esmalte dentário. Resultados similares puderam ser observados por Aine et al.<sup>42</sup> (1996), em que a presença de defeitos no esmalte dentário em crianças e adultos portadores de doença celíaca puderam ser relacionados com o HLA-DR3. Aguirre et al.<sup>46</sup> (1997) observaram que os antígenos HLA-DR3, DR7 e DQ2 eram mais presentes em pacientes com doença celíaca e estavam relacionados com defeitos no esmalte dentário.

Em 1998, Sepuku et al.,<sup>47</sup> analisaram o antígeno de superfície do *S. mutans* como alvo para o desenvolvimento de uma vacina contra a cárie dentária. Foi verificado que o peptídeo PAc (316-334) mostrou ligações mais fortes com o HLA-DR, em especial HLA-DR8 (DRB1\*0802), DR5 (DRB1\*1101) e DR6 (DRB1\*1402 e 1405), sugerindo que esse peptídeo pode ser utilizado em uma possível vacina contra cárie dentária em humanos.

Acton et al.<sup>48</sup> (1999) verificaram a relação da presença dos alelos HLA-DRB1 e DQB1, níveis de bactérias cariogênicas e CPO-D em mulheres afro-americanas. Altos níveis de *S. mutans* foram associados com a presença de DRB1\*3 e DRB1\*4, entretanto não foi observada relação com o índice CPO-D.

Ozawa et al.<sup>96</sup> (2001) investigaram a suscetibilidade genética ao número de *S. mutans* e lactobacilos salivares pelos alelos de HLA de Classe II, focando especialmente nos genes DQA1, DQB1 e DRB1. O estudo verificou associação entre o alelo HLA-DQB1\*0601 e o número de *S. mutans*, sugerindo que estes alelos possam estar associados com o aumento de alguns microrganismos bucais.

Wallengren et al.<sup>99</sup> (2001) descreveram e compararam reações de anticorpos IgA salivares contra *S. mutans* de indivíduos positivos e negativos para HLA-DR4. Foi verificado que os indivíduos positivos para HLA-DR4 demonstraram um baixo grau de atividade de IgA contra antígenos bacterianos. Estes indivíduos também pareceram possuir mais os subgrupos DRB1\*0404 e 0401. O estudo também indicou que o número de resposta de anticorpos salivares difere entre indivíduos geneticamente distintos.

Em 2008, Bagherian et al.<sup>98</sup> estudaram a associação entre os genes HLA-DRB1 e HLA-DQB1 e cárie dentária precoce em crianças que tinham entre 12 e 71 meses. Os autores sugeriram que o alelo HLA-DRB1\*04 está associado com a suscetibilidade à esta doença.

O papel destes genes do HLA na resposta imune fornece a oportunidade de, no futuro, estudar suas variações alélicas específicas como potenciais marcadores para o aumento de risco à cárie dentária<sup>18</sup>.

### **3 ARTIGO**

Esta dissertação é composta de um estudo em formato de artigo, ainda em fase de submissão, cujo título está descrito abaixo:

“The association of dental caries with HLA class II allele in Brazilian adolescents”.

Este artigo será submetido à publicação no periódico *The Journal of Immunology*. Impact factor: 5.646.

# **The association of dental caries with HLA class II allele in Brazilian adolescents**

N. Valarini<sup>a</sup>, S. M. Maciel<sup>b</sup>, R.C. Poli-Frederico<sup>c,\*</sup>

<sup>a</sup>DDS, Department of Restorative Dentistry, Faculty of Dentistry, University of North of Parana, Londrina, PR, Brazil

<sup>b</sup>DDS, MS, PhD, Department of Restorative Dentistry, Faculty of Dentistry, University of North of Parana, Londrina, PR, Brazil

<sup>c</sup>MS, PhD, Department of Genetics and Molecular Biology, Faculty of Dentistry, University of North of Parana, Londrina, PR, Brazil

## **\*Corresponding author**

Regina Célia Poli-Frederico

Universidade Norte do Paraná, Faculdade de Odontologia

Rua Marselha 183, Jardim Piza, Londrina, PR, Brasil. CEP 86041-120

Phone: +55-43-3371-7820 Fax: +55-43-3371-7741

E-mail: reginafrederico@yahoo.com.br

## Abstract

The present study evaluated the association between allelic frequencies for HLA-DR4, -DQ2, -DQ4, -DQ5 and -DQ6 and prevalence of dental caries in Brazilian adolescents. The study sample consisted of 164 adolescents aged between 15 to 19 years. For the assessment of the adolescents caries experience the DMFT (decayed, missing, filled teeth) index was used, according to criteria defined by the World Health Organization. DNA samples of the adolescents were extracted from the oral mucosa cells. After obtaining the DNA the amplification of the alleles HLA-DR and HLA-DQ was carried out by polymerase chain reaction with sequence specific primers (PCR-SSP). The products of PCR-SSP were electrophoresed and analyzed in agarose gel. The prevalence of dental caries was 60.4%. Among those with a history of dental caries, the average DMFT value was  $2.41 \pm 2.53$ . A higher presence of the DQ6 allele was found in the adolescents (45.1%). HLA-DQ2 allele frequency in DMFT  $\geq 1$  group was statically significant as compared to DMFT = 0 scored group (43.1%,  $p = 0.002$ ). There was a negative correlation between the DQ2 allele and dental caries ( $r = -0.237$ ,  $p < 0.001$ ). The results also indicate that being positive for the DQ2 allele decreased the risk for dental caries by 65% (OR=0.35; IC= 0.18-0.70). Our data provide evidence that genes within MHC, especially the DQ2 group, may influence susceptibility to dental caries in Brazilian adolescents.

**Keywords:** dental caries, genetic susceptibility, HLA antigens, adolescents

## Introduction

Despite the general decline in the past decades, dental caries is still a significant problem in many countries, specially affecting children and adolescents<sup>1</sup>. It is an infectious microbiologic disease of the teeth that results in localized dissolution and destruction of the calcified tissue<sup>2</sup>. It also has a considerable impact on individuals and communities, since it causes pain, suffering, impairment of function and reduced quality of life<sup>3</sup>.

Dental caries is a chronic, complex and multifactorial disease<sup>4</sup>. It results from the interaction between the host, the host's diet, and the microflora on the tooth surface bounded by the time factor. The factors related to the host may be influenced by genetic components, but the external ones may overcome the individual's genetic susceptibility to the disease. As a result, hereditary aspects of this particular disease are not often studied and scantily comprehended.

The term HLA refers to the human leukocyte antigen system and its a collection of genes arranged within a long, continuous stretch of DNA on chromosome 6p21.3<sup>5</sup>. The HLA loci are part of the genetic region known as the major histocompatibility complex (MHC), wich encodes polymorphic class I, II and III molecules that play a major role in antigen processing and presentation to the T-cell receptor, beying crucial for the cell interactions in cell-mediated immunity<sup>6-7</sup>. Therefore, differences in the HLA molecules can cause variations in immune response against microorganisms, such as *Streptococcus mutans* (*S. mutans*), and may influence on the individual's susceptibility to dental caries.

Associations between dental caries and genetic susceptibility are provided by several studies conducted throughtout the years. The first study was made by Lehner et al.,<sup>8</sup> in wich the distribution of HLA-DR antigens were linked with either high or low DMFS indexes and response to *S. mutans* antigens, finding a significant relationship. However, De Vries et al.<sup>9</sup> did not replicate these findings on a similar study, in wich there was no association between HLA-DR and caries experience on the studied population. Recent studies have shown relationship between HLA and increased risk for dental caries and higher levels of cariogenic bacterias in individuals<sup>10-11</sup>.

In order to detect allelic polymorphisms, polymerase chain-reaction with sequence-specific primers (PCR-SSP) can be used as an effective method. The methodology for typing HLA-DR alleles by PCR-SSP was described by Olerup and Zetterquist<sup>12</sup>, in 1992. In light of these observations, the aim of this study was to evaluate the association between allelic frequencies for HLA-DR4, -DQ2, -DQ4, -DQ5 and -DQ6 and prevalence of dental caries in

Brazilian adolescents.



## **Materials and methods**

### ***Study Subjects***

The study sample consisted of 164 adolescents aged between 15 to 19 years, which studied on public schools in the city of Londrina, Parana, Brazil. The aim and details of the experiments were explained, and the informed consent forms were obtained from parents or legal guardians of the adolescents prior to the beginning of the experimental procedures. The research was approved by the Ethics Committee of the University of North of Parana and by the local Health and Education Authorities.

Clinical examination of dental caries was carried out using a mirror and explorer, in accordance with World Health Organization criteria and methods (WHO, 2010). The total number of decayed, missing and filled permanent teeth (DMFT) were recorded in each subject. The caries prevalence (DMFT>0) was dichotomized into two groups: (1) low caries severity (DMFT = 1) and (2) high caries severity (DMFT  $\geq$ 2)<sup>13</sup>. The clinical examination was performed by the same examiner. The intra-examiner agreement was high ( $\kappa$ = 0.92).

### ***DNA extraction***

Genomic DNA was obtained from epithelial cells from buccal mucosa according to the method described by Aidar and Line (2007)<sup>14</sup>. The subjects were asked to vigorously rinse their mouths with a 5ml solution of sucrose (3%) for 60s, and each individual mouthwash was collected in a 15ml centrifuge tube. In each tube, 3ml of TNE solution [17 mM Tris-HCL (pH 8,0), 50 mM NaCl, 7 mM EDTA] diluted in 66% ethanol was added. The epithelial buccal cells were centrifuged for 10 min at 3000 rpm and re-suspended in 1ml of a solution containing 10 mM Tris (pH 8.0), 0.5% SDS, 5 mM EDTA and proteinase K (20 mg/mL), followed by an overnight incubation at 55°C. After incubation, proteins and other contaminants were removed by adding a solution containing 8M ammonium acetate and 1mM EDTA, followed by vortexing at high speed for 5s and centrifuging at 17000 g for 10 min. DNA pellet was washed with ethanol and re-suspended in a TE solution (10mM Tris pH 7,8; 1mM EDTA). DNA then was conditioned at -4°C, prior to the PCR analysis.

### ***Genetic polymorphisms analysis by PCR-SSP***

The presence of HLA-DR4, -DQ2, -DQ4, -DQ5 and -DQ6 alleles was determined by PCR amplification of genomic DNA with sequence-specific primers (PCR-SSP). For DNA amplification, the primer sequences, PCR reaction profiles and expected product sizes for the

DR and DQ alleles have been previously reported by Olerup and Zetterquist<sup>12</sup> and Cannava and Olerup<sup>15</sup>, respectively (Table 1). To check the PCR conditions, the internal positive control primer pairs that amplify the human growth hormone gene segments was used, and as an internal negative control, ultra-pure water was used.

The PCR master mix for DR4 alleles contained buffer 1x, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 200mM dNTP, 1μM HLA-DRB1\*04, 0.2μM HGHg and 1U Taq DNA polymerase (Invitrogen Life Technologies®, São Paulo, Brazil). PCR amplifications were carried out in a thermal cycler (Endurance TC-512 Techne™, Burlington, New Jersey, United States). After an initial denaturation at 94 °C for 5 min, a total of 30 PCR cycles were performed; each cycle consisted of denaturation at 94 °C for 20s, annealing at 50 °C for 50s, extension at 72 °C for 20s and a final extension for 5 min at 72 °C.

For the DQ2, DQ4, DQ5 and DQ6 alleles, the PCR master mix contained buffer 1x, 1.5μM MgCl<sub>2</sub>, 200μM dNTP, 0.4μM HLA-DRB1\*02, 04, 05 and 06-F, 0.1μM HGHg, 1U and Taq DNA polymerase (Invitrogen Life Technologies®, São Paulo, Brazil). PCR amplifications were carried out in thermal cycler (Endurance TC-512 Techne™, Burlington, New Jersey, United States). After an initial denaturation at 94 °C for 2 min the DNAs were amplified by 30 amplification cycles. The first 10 cycles consisted of denaturation at 94 °C for 10s and a combined annealing-extension step at 65°C for 60s. The 20 following cycles consisted of denaturation at 94°C for 10s, annealing at 61°C for 50s and extension at 72°C for 30s.

### ***Visualization of amplifications by agarose gel electrophoresis***

Following amplification, the products of PCR-SSP were electrophoresed on 0.8% agarose gel. A 100 bp DNA ladder was included in each gel. The agarose gel was stained with 3μl of Sybr Safe (Invitrogen Life Technologies®, São Paulo, Brazil) and visualized under UV illumination. The reading and interpretation of the agarose gels was made with the LabImage L-PIX (H.E) 1D-L340 program (Loccus Biotecnologia, Brazil).

### ***Statistical analysis***

The Statistical Package for Social Science -SPSS (v. 15, SPSS Inc, Chicago, Ill) was used for statistical analysis of the data. Frequencies, means and standard deviation were computed for descriptive purposes. Fisher's exact test and the chi-square test were used to test associations of significance between HLA allelic frequency and the groups of adolescents

caries-free and caries-active. Odds ratio to report the strength of association. The significance level for all analyses was  $p < 0.05$ .

## Results

There was a predominance of females (69.5%) and participants with 15 years of age (45.7%). The prevalence of dental caries was 60.4% (Table 2). Among those with a history of dental caries (Table 3), the average DMFT value was  $2.41 \pm 2.53$ .

A higher presence of the DQ6 allele was found in the adolescents (45.1%), followed by DQ5 (34.8%), DQ2 (31.1%), DR4 (20.1%) and DQ4 (12.8%) alleles. (Table 4).

The frequency of HLA-DR and HLA-DQ alleles and caries are presented in Table 5. Frequencies of HLA-DR4, -DQ4, -DQ5 and -DQ6 alleles in  $DMFT \geq 1$  appeared to be increased as compared to  $DMFT = 0$  (63.6%, 61.9%, 61.4% and 60.8%, respectively). These alleles were, however, not statistically significant. HLA-DQ2 allele frequency in  $DMFT \geq 1$  group was statistically significant as compared to  $DMFT = 0$  scored group (43.1%,  $p = 0.002$ ). DQ2 allele was negatively associated with dental caries ( $r = -0.237$ ,  $p < 0.001$ ).

The results also indicated that being positive for the DQ2 allele decreased the risk for dental caries by 65% (OR=0.35; CI=0.18-0.70) (Table 6).

## Discussion

Dental caries is considered a disease of worldwide prevalence and incidence, constituting an important public health challenge in many countries<sup>16</sup>. Studies have identified associations between various factors and dental caries, supporting agreement that it is a multi-factorial disease modulated by behavior, environment and genetic<sup>17</sup>. One aspect of the genetic effects is the genetic modification in the host's immune response, in which individuals may have inherited or acquired immune deficiency, leading to an increased risk for dental caries.

To our knowledge, there has not been many studies that showed association between dental caries and HLA alleles. In this study, we evaluated the association between allelic frequencies of DR and DQ HLA class II alleles and dental caries in Brazilian adolescents.

We did not observe an association between HLA-DQ4, -DQ5, -DQ6 and -DR4 alleles with the DMFT index. This finding is in line with previous studies that failed to observe an association between dental caries and HLA-DRB1 alleles<sup>11,17-18</sup>.

These studies diverge in some respects with previous findings, where a serologically determined DR4 positive group was related to high DMFT scores and a negative group was not<sup>8</sup>. Although this previous study suggested a DR4 caries connection, it did not provide high resolution genotyping as the antigens tested were determined by immunological reactions and not direct DNA sequencing.

The first set of researchers to use an updated nomenclature in testing various HLA-II alleles against levels of *S. mutans* and caries indicated that African-American women demonstrated similar trends (up to this point only Caucasian populations had been studied), but the association to caries did not reach statistical significance<sup>19</sup>.

Wallengren et al.<sup>10</sup> showed that high levels of oral cariogenic microorganisms are present in saliva among DR4 positive dental students and staff in Sweden.

In another non-Caucasian Asian cohort, a variety of alleles from three loci, including HLA-DQA1, DQB1 and DRB1, as well as a variety of haplotypes, were examined<sup>20</sup>. The authors found that the DR4 association with *S. mutans* was not significant. Whereas Bagherian et al.<sup>1</sup> reported that the DR4 positive subjects younger than 5 years of age were 10 times more likely to develop early childhood caries than their negative counterparts.

In the present study we found an association between dental caries and a different allele, specifically HLA-DQ2. Ozawa et al.<sup>20</sup> have also shown that *S. mutans* levels were weakly associated with a distinct allele, the HLA-DQ6. We hypothesized that the difference might be explained by population or ethnic differences. One set of authors recently observed

that identical diseases, may be associated with different HLA-II alleles in different ethnic or racial populations<sup>21</sup>.

Our data provide evidence that genes within the MHC, specially the DQ2 group, may influence susceptibility to dental caries in Brazilian adolescents.

## References

1. Bagherian A, Nematollahi H, Afshari JT, Moheghi N. Comparison of allele frequency for HLA-DR and HLA-DQ between patients with ECC and caries-free children. *J Indian Soc Pedod Prev Dent.* 2008; 26(1):18-21.
2. Shivakumar KM, Vidya SK, Chandu GM. Dental caries vaccine. *Indian J Dent Res.* 2009; 20(1):99-106.
3. Vieira AR, Marazita ML, Goldstein-McHenry T. Genome-wide scan finds suggestive caries loci. *J Dent Res.* 2008; 87(5):435-9.
4. Bretz WA, Corby PM, Schork NJ, Robinson MT, Coelho M, Costa S, et al. Longitudinal analysis of heritability for dental caries traits. *J Dent Res.* 2005; 84(11):1047-51.
5. Gustke CJ, Stein SH, Hart TC, Hoffman WH, Hanes PJ, Russell CM, et al. HLA-DR alleles are associated with IDDM, but not with impaired neutrophil chemotaxis in IDDM. *J Dent Res.* 1998; 77(7): 1497-503.
6. da Silva SA, Mazini PS, Reis PG, Sell AM, Tsuneto LT, Peixoto PR, et al. HLA-DR and HLA-DQ alleles in patients from the south of Brazil: markers for leprosy susceptibility and resistance. *BMC Infect Dis.* 2009; 9:134.
7. Pacheco PR, Branco CC, Gomes CT, Cabral R, Mota-Vieira L. HLA class I and II profile in São Miguel Island (Azores): genetic diversity and linkage disequilibrium. *BMC Res Notes.* 2010; 3: 134.
8. Lehner T, Lamb JR, Welsh KL, Batchelor RJ. Association between HLA-DR antigens and helper cell activity in the control of dental caries. *Nature.* 1981; 292(5825): 770-2.
9. de Vries RR, Zeylemaker P, van Palenstein Helder WH, Huis in 't Veid JH. Lack of association between HLA-DR antigens and dental caries. *Tissue Antigens.* 1985; 25(3):173-4.
10. Wallengren ML, Ericson D, Hamberg K, Johnson U. HLA-DR4 and salivary immunoglobulin A reactions to oral streptococci. *Oral Microbiol Immunol.* 2001;16(1):45-53.
11. Altun C, Guven G, Orkonoglu F, Cehreli ZC, Karaasian A, Basak F, et al. Human leukocyte antigen class II alleles and dental caries in a child population. *Pediatr Dent.* 2008;30(2):154-9.
12. Olerup O, Zetterquist H. HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: an alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. *Tissue Antigens.* 1992; 39(5):225-35.
13. Petersen PE, Bourgeois D, Ogawa H, Estupinan-Day S, Ndayaie C. The global burden of oral diseases and risks to oral health. *Bull World Health Organ.* 2005; 83(9):661-9.
14. 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.
15. Aldener-Cannavá A, Olerup O. HLA-DQB1 low resolution typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP). *Eur J Immunogenet.* 1994; 21(6): 447-55.

16. Rebelo MA, Lopes MC, Veira MC, Parente RC. Dental caries and gingivitis among 15 to 19 year-old students in Manaus, AM, Brazil. *Braz Oral Res.* 2009; 23(3):248-54.
17. Ditmyer M, Dounis G, Mobley C, Schwarz E. A case-control study of determinantes for high and low dental caries prevalence in Nevada youth. *BMC Oral Health.* 2010; 10:1-8.
18. Acton RT, Dasanayake AP, Harrison RA, Li Y, Roseman JM, Go RC, et al. Associations of MHC genes with levels of caries-inducing organisms and caries severity in African-American women. *Hum Immunol.* 1999; 60(10): 984-9.
19. de Vries RR, Zeylemaker P, van Palenstein Helderma WH, Huis in 't Veid JH. Lack of association between HLA-DR antigens and dental caries. *Tissue Antigens.* 1985; 25(3):173-4.
20. Ozawa Y, Chiba J, Sakamoto S. HLA class II alleles and salivary numbers of mutans streptococci and lactobacilli among young adults in Japan. *Oral Microbiol Immunol.* 2001;16(6):353-7.
21. Bondinas GP, Moustakas AK, Papadopoulos GK. The spectrum of HLA-DQ and HLA-DR alleles, 2006: a listing correlating sequence and structure with function. *Immunogenetics.* 2007; 59(7):539-553.



Table 1. Oligonucleotide primers used in the PCR-SSP for HLA-DR and HLA-DQ allelic typing (Olerup and Zetterquist<sup>13</sup> and Cannava and Olerup<sup>16</sup>)

<i>ALLELE</i>	<i>GENOTYPE</i>	<i>SEQUENCE (5' to 3')</i>	<i>AMPLICON SIZE (BP*)</i>
HLA-DQ2	0201	GTG-CGT-CTT-GTG-AGC-AGA-AG TGC-AAG-GTC-GTG-CGG-AGC-T	206
HLA-DQ4	0401,0402	GTG-CTA-CTT-CAC-CAA-CGG-GAC-C CTG-GTA-GTT-GTG-TCT-GCA-TAC-G	211
HLA-DQ5	0501,0504	GAC-GGA-GCG-CGT-CCG-GGG TGC-AGG-ATC-CCG-CGG-TAC-G GGG-ACG-GAG-CGC-GTG-CGT-TA	216
HLA-DQ6	0601,0609	GGG-ACG-GAG-CGC-GTG-CGT-CT CTG-CAA-GAT-CCC-GCG-GAA-CG TGC-AGG-ATC-CCG-CGG-TAC-C	218,219
HLA-DR4	DR4	CGT-TTC-TTG-GAG-CAG-GTT-AAA-CA CTC-GCC-GCT-GCA-CTG-TG	213
HGHg	HGHg	GCC-TTC-CCA-ACC-ATT-CCC-TTA TCA-CGG-ATT-TCT-GTT-GTG-TTT-C	360

\*bp: base pair

Table 2. Characterization of the adolescents according to gender, age and caries experience.

<b>Characteristics</b>	<b><i>n</i></b>	<b>%</b>
<i>Adolescent gender</i>		
<i>Male</i>	50	30.5
<i>Female</i>	114	69.5
<i>Adolescent age</i>		
15	75	45.7
16	48	29.3
17	32	19.5
18	7	4.3
19	2	1.2
<i>Dental Caries Experience</i>		
<i>Caries active</i>	99	60.4
<i>Caries free</i>	65	39.6

Table 3. Dental caries severity among adolescents from the city Londrina, Paraná, Brazil (n = 164).

	Dental caries severity			
	<i>D</i>	<i>M</i>	<i>F</i>	<i>DMFT</i>
<i>Mean</i>	1.16	0.06	1.2	2.41
<i>Standard deviation</i>	1.74	0.26	1.78	2.53
<i>Minimum</i>	0	0	0	0
<i>Maximum</i>	8	2	10	10

Table 4. Frequency of the HLA-DR4 and HLA-DQ2, DQ4, DQ5 and DQ6 alleles in the adolescents.

<b>Allele</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
<b><i>DR4</i></b>		
<i>Positive</i>	33	20.1
<i>Negative</i>	131	79.9
<b><i>DQ2</i></b>		
<i>Positive</i>	51	31.1
<i>Negative</i>	113	68.9
<b><i>DQ4</i></b>		
<i>Positive</i>	21	12.8
<i>Negative</i>	143	87.2
<b><i>DQ5</i></b>		
<i>Positive</i>	57	34.8
<i>Negative</i>	107	65.2
<b><i>DQ6</i></b>		
<i>Positive</i>	74	45.1
<i>Negative</i>	90	54.9

Table 5. Relationship between caries experience and frequencies of HLA alleles in the adolescents.

	CARIES EXPERIENCE		$\chi^2$	p value
	DMFT $\geq$ 1 n (%)	DMFT=0 n (%)		
<b>R4</b>				
<i>Positive</i>	21 (63.6)	12 (36.4)	0.185	0.696
<i>Negative</i>	78 (59.5)	53 (40.5)		
<b>Q2</b>				
<i>Positive</i>	22 (43.1)	29 (56.9)	9.183	0.002
<i>Negative</i>	77 (68.1)	36 (31.9)		
<b>Q4</b>				
<i>Positive</i>	13 (61.9)	8 (38.1)	0.024	0.877
<i>Negative</i>	86 (60.1)	57 (39.9)		
<b>Q5</b>				
<i>Positive</i>	35 (61.4)	22 (38.6)	0.392	0.868
<i>Negative</i>	64 (59.8)	43 (40.2)		
<b>Q6</b>				
<i>Positive</i>	45 (60.8)	29 (39.2)	0.011	0.916
<i>Negative</i>	54 (60.0)	36 (40.0)		

Table 6. A logistic regression analysis of the variables: dental caries and DQ2 allele.

	Dental caries	
	<i>OR (95% CI)</i>	<i>p value</i>
HLA-DQ2 allele	0.35 (0.18 – 0.70)	0.0043

## 4 CONCLUSÃO

Com base na metodologia utilizada e a partir dos resultados obtidos, pode-se concluir que:

- Não foi observada associação entre os alelos DR4, DQ4, DQ5 e DQ6 e o índice CPO-D dos adolescentes estudados.

- Houve associação estatisticamente significativa entre o alelo DQ2 e a cárie dentária, sugerindo que este possa influenciar na suscetibilidade à doença nos adolescentes estudados.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Rebelo MA, Lopes MC, Veira MC, Parente RC. Dental caries and gingivitis among 15 to 19 year-old students in Manaus, AM, Brazil. *Braz Oral Res.* 2009; 23(3):248-54.
2. Shivakumar KM, Vidya SK, Chandu GM. Dental caries vaccine. *Indian J Dent Res.* 2009; 20(1):99-106.
3. Fuente-Hernández J, González de Cossío M, Ortega-Maldonado M, Sifuentes-Valenzuela MC. Caries y pérdida dental en estudiantes preuniversitarios mexicanos. *Salud Publica Mex.* 2008; 50:235-40.
4. Peres SHCS, Carvalho FS, Carvalho CP, Bastos JRM, Lauris JRP. Polarização da cárie dentária em adolescentes, na região sudoeste do Estado de São Paulo Brasil. *Ciênc. saúde coletiva.* 2008; 13(2): 2155-62.
5. Boraas JC, Messer LB, Till MJ. A genetic contribution to dental caries, occlusion and morphology as demonstrated by twins reared apart. *J Dent Res.* 1988; 67(9): 1150-5.
6. Conry JP, Messer LB, Boraas JC, Aeppli DP, Bouchard TJ Jr. Dental caries and treatment characteristics in human twins reared apart. *Arch Oral Biol.* 1993; 38(11): 937-43.
7. Kabban M, Fearn J, Jovanovski V, Zou L. Tooth size and morphology in twins. *Int J Pediatr Dent.* 2001; 11(5): 333-9.
8. Bretz WA, Corby PM, Schork NJ, Robinson MT, Coelho M, Costa S, et al. Longitudinal analysis of heritability for dental caries traits. *J Dent Res.* 2005; 84(11):1047-51.
9. Bretz WA, Corby PM, Melo MR, Coelho MQ, Costa SM, Robinson M, et al. Heritability estimates for dental caries and sucrose sweetness preference. *Arch Oral Biol.* 2006; 51(12):1156-60.
10. Race JP, Townsend GC, Hughes TE. Chorion type, birthweight discordance and tooth-size variability in Australian monozygotic twins. *Twin Res Hum Genet.* 2006; 9(2): 285-91.
11. Townsend G, Richards L, Messer LB, Hughes T, Pinkerton S, Seow K, et al. Genetic and environmental influences on dentofacial structures and oral health: studies of Australian twins and their families. *Twin Res Hum Genet.* 2006; 9(6):727-32.
12. Marshall T. Dental caries and beverage consumption in young children. *Pediatrics.* 2003; 112(3):184-91.
13. Bezerra ACB. Promoção de saúde bucal. São Paulo: Artes Médicas. 2002.
14. Furquim T. Relação entre o limiar gustativo ao doce e ao amargo e a cárie dentária em escolares da zona rural e urbana de Londrina-PR. [Dissertação]. Londrina: Universidade Norte do Paraná, 2006.
15. Brasil. Levantamento epidemiológico em saúde bucal: Brasil - zona urbana - 1986. M. D. Saúde. Brasília, 1988.
16. Brasil. Levantamento epidemiológico em saúde bucal - cárie dental. M. D. Saúde. Brasília, 1996.
17. Brasil. Coordenação Nacional de Saúde Bucal. Projeto SB Brasil: condições de saúde bucal da população brasileira 2002-2003: resultados principais. M. D. Saúde. Brasília, 2004.



18. Shuler CF. Inherited risks for susceptibility to dental caries. *J Dent Educ.* 2001; 65(10):1038-45.
19. Lima JEO. Cárie dentária: um novo conceito. *R Dental Press Ortodont Ortop Facial.* 2007; 12(6):119-30.
20. Vieira AR, Marazita ML, Goldstein-McHenry T. Genome-wide scan finds suggestive caries loci. *J Dent Res.* 2008; 87(5):435-9.
21. Bachrach F, Young M. A comparison of the degree of resemblance in dental characters shown in pairs of twins identical and fraternal types. *Br Dent J.* 1927; 48:1293-304.
22. Goldberg S. The dental arches of identical twins. *Dental Cosmos.* 1930; 72:869-81.
23. Horowitz SL, Osborne RH, Degeorge FV. Caries experience in twins. *Science.* 1958; 128(3319):300-1.
24. Mansbridge JN. Heredity and dental caries. *J Dent Res.* 1959; 38:337.
25. Finn SB, Caldwell RC. Dental caries in twins - I. A comparison of the caries experience of monozygotic twins, dizygotic twins and unrelated children. *Arch Oral Biol.* 1963:571-85.
26. Fairpo CG. Total caries experience in monozygotic and like-sexed dizygotic twins of caucasoid origin aged 5 to 15 years. *Arch Oral Biol.* 1979; 24(7):491-4.
27. Hunt HR, Hoppert CA. Inheritance of susceptibility and resistance to caries in albino rats (*Mus norvegicus*). *J Am Col Dentists.* 1944; 11:33.
28. Rosen S, Coleman GT, Sawant AC, Hunt HR, Hoppert CA. Effect on caries of cross-breeding caries-resistant and caries-susceptible rats. *J Dent Res.* 1962; 41:1033-6.
29. Suzuki N, Kurihara Y, Kurihara Y. Dental caries susceptibility in mice is closely linked to the H-2 region on chromosome 17. *Caries Res.* 1998; 32(4):262-5.
30. Nariyama M, Shimizu K, Uematsu T, Maeda T. Identification of chromosomes associated with dental caries susceptibility using quantitative trait locus analysis in mice. *Caries Res.* 2004; 38(2):79-84.
31. Wright JT, Fine JD, Johnson LB, Steinmetz TT. Oral involvement of recessive dystrophic epidermolysis bullosa inversa. *Am J Med Genet.* 1993; 47(8):1184-8.
32. Wright JT, Fine JD, Johnson L. Dental caries risk in hereditary epidermolysis bullosa. *Pediatr Dent.* 1994;16(6):427-32.
33. Kirkham J, Robinson C, Strafford SM, Shore RC, Bonass WA, Brookes SJ, et al. The chemical composition of tooth enamel in recessive dystrophic epidermolysis bullosa: significance with respect to dental caries. *J Dent Res.* 1996; 75(9):1672-8.
34. Kirkham J, Robinson C, Strafford SM, Shore RC, Bonass WA, Brookes SJ, et al. The chemical composition of tooth enamel in junctional epidermolysis bullosa. *Arch Oral Biol.* 2000; 45(5):377-86.
35. Zengo AN, Mandel ID. Sucrose tasting and dental caries in man. *Arch Oral Biol.* 1972;17(3): 605-7.
36. Newbrun E, Hoover C, Mettraux G, Graf H. Comparison of dietary habits and dental health of subjects with hereditary fructose intolerance and control subjects. *J Am Dent Assoc.* 1980; 101(4):619-26.

37. Saxén L, Jousimies-Somer H, Kaisla A, Kanervo A, Summanen P, Sipilla I. Subgingival microflora, dental and periodontal conditions in patients with hereditary fructose intolerance. *Scand J Dent Res.* 1989; 97(2):150-8.
38. Keskitalo K, Knaapila A, Kallela M, Palotie A, Wessman M, Sammalisto S, et al. Sweet taste preferences are partly genetically determined: identification of a trait locus on chromosome 16. *Am J Clin Nutr.* 2007; 86(1):55-63.
39. Leone CW, Oppenheim FG. Physical and chemical aspects of saliva as indicators of risk for dental caries in humans. *J Dent Educ.* 2001; 65(10): 1054-62.
40. Lehner T, Lamb JR, Welsh KL, Batchelor RJ. Association between HLA-DR antigens and helper cell activity in the control of dental caries. *Nature.* 1981; 292(5825): 770-2.
41. de Vries RR, Zeylemaker P, van Palenstein Helderma WH, Huis in 't Veid JH. Lack of association between HLA-DR antigens and dental caries. *Tissue Antigens.* 1985; 25(3):173-4.
42. Aine L, Maki M, Collin P, Keyrilainen O. Dental enamel defects in celiac disease. *J Oral Pathol Med.* 1990;19(6): 241-5.
43. Mariani P, Mazzilli MC, Margutti G, Lionetti P, Triglione P, Petronzelli F, et al. Coeliac disease, enamel defects and HLA typing. *Acta Paediatr.* 1994; 83(12):1272-5.
44. Aine L. Coeliac-type permanent-tooth enamel defects. *Ann Med.* 1996;28(1):9-12.
45. Madigan A, Murray PA, Houpt M, Catalanotto F, Feuerman M. Caries experience and cariogenic markers in HIV-positive children and their siblings. *Pediatr Dent.* 1996; 18(2):129-36.
46. Aguirre JM, Rodríguez R, Oribe D, Vitoria JC. Dental enamel defects in celiac patients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1997; 84(6):646-50.
47. Senpuku H, Yanagi K, Nisizawa T. Identification of *Streptococcus mutans* PAC peptide motif binding with human MHC class II molecules (DRB1\*0802, \*1101, \*1401 and \*1405). *Immunology.* 1998; 95(3):322-30.
48. Acton RT, Dasanayake AP, Harrison RA, Li Y, Roseman JM, Go RC, et al. Associations of MHC genes with levels of caries-inducing organisms and caries severity in African-American women. *Hum Immunol.* 1999; 60(10): 984-9.
49. Ellis SA, Ballingall KT. Cattle MHC: evolution in action?. *Immunol Rev.* 1999; 167:159-68.
50. Fernandes APM, Maciel LMZ, Foss MC, Donadi EA. Como entender a associação entre o sistema HLA e as doenças auto-imunes endócrinas. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2003; 47(5):601-11.
51. Oliveira EA, Sell AM. Os antígenos HLA e a hemoterapia. *Acta Scientiarum.* 2002; 24(3):731-6.
52. Riley E, Olerup O. HLA polymorphisms and evolution. *Immunol Today.* 1992;13(9):333-5.
53. Kronenberg M, Brines R, Kaufman J. MHC evolution: a long term investment in defense. *Immunol Today.* 1994;15(1):4-6.
54. Donadi EA. Como entender a nomenclatura e os mecanismos de associação entre os antígenos e os alelos de histocompatibilidade com as doenças. *Medicina.* 2000; 7(18):7-18.

55. Phelan DL. The HLA system. In: Harmening DM. Modern blood banking and transfusion practices. Philadelphia: F. A. Davis Company; 1999. p.489-506.
56. Anderson KS, Alexander J, Wei M, Cresswell P. Intracellular transport of class I MHC molecules in antigen processing mutant cell lines. *J Immunol.* 1993;151(7):3407-19.
57. Brodsky FM, Lem L, Bresnahan PA. Antigen processing and presentation. *Tissue Antigens.* 1996; 47(6):464-71.
58. Driscoll J, Brown MG, Finley D, Monaco JJ. MHC-linked LMP gene products specifically alter peptidase activities of the proteasome. *Nature.* 1993; 365(6443): 262-4.
59. Morris P, Shaman J, Attaya M, Amaya M, Goodman S, Bergman C, et al. An essential role for HLA-DM in antigen presentation by class II major histocompatibility molecules. *Nature.* 1994; 368(6471):551-4.
60. Fernandes APM. Expressão das moléculas de histocompatibilidade de classe I e II em células linfomonocitárias de pacientes com diabetes mellitus do tipo 1 recentemente diagnosticados [Dissertação]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo; 1999.
61. Bodmer WF. HLA: What's in a name? A commentary on HLA nomenclature development over the years. *Tissue Antigens.* 1997; 49(3 Pt 2):293-6.
62. Alarida K, Harown J, Di Pierro MR, Drago S, Catassi C. HLA-DQ2 and -DQ8 genotypes in celiac and healthy Libyan children. *Dig Liver Dis.* 2010; 42(6): 425-7.
63. Lavant EH, Carlson JA. A new automated human leukocyte antigen genotyping strategy to identify DR-DQ risk alleles for celiac disease and type 1 diabetes mellitus. *Clin Chem Lab Med.* 2009; 47(12): 1489-95.
64. Alves C, Toralles MB, Carvalho GC. HLA class II polymorphism in patients with type 1 diabetes mellitus from a Brazilian racially admixed population. *Ethn Dis.* 2009; 19(4):420-4.
65. Israni N, Goswami R, Kumar A, Rani R. Interaction of vitamin D receptor with HLA DRB1 0301 in type 1 diabetes patients from North India. *PLoS One.* 2009;4(12):e8023.
66. Jung MH, Yu J, Shin CH, Suh BK, Yang SW, Lee BC. Association of cytotoxic T lymphocyte antigen-4 gene polymorphisms and HLA class II alleles with the development of type 1 diabetes in Korean children and adolescents. *J Korean Med Sci.* 2009; 24(6):1004-9.
67. Pan CF, Wu CJ, Chen HH, Dang CW, Chang FM, Liu HF, et al. Molecular analysis of HLA-DRB1 allelic associations with systemic lupus erythematosus and lupus nephritis in Taiwan. *Lupus.* 2009; 18(8):698-704.
68. Rezaieyazdi Z, Tavakkol-Afshari J, Esmaili E, Orouji E, Pezeshkpour F, Khodadoost M, et al. Association of HLA-DQB1 allelic sequence variation with susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Iran J Allergy Asthma Immunol.* 2008; 7(2):91-5.
69. Martens HA, Noite IM, van der Steege G, Schipper M, Kallenberg CG, Te Meerman GJ, et al. An extensive screen of the HLA region reveals an independent association of HLA class I and class II with susceptibility for systemic lupus erythematosus. *Scand J Rheumatol.* 2009;38(4):256-62.
70. Veit TD, Cordero EA, Mucenic T, Monticelo OA, Brenol JC, Xavier RM, et al. Association of the HLA-G 14 bp polymorphism with systemic lupus erythematosus. *Lupus.* 2009; 18(5):424-30.

71. Lemire M. On the association between rheumatoid arthritis and classical HLA class I and class II alleles predicted from single-nucleotide polymorphism data. *BMC Proc.* 2009; 3 Suppl 7: S33.
72. Okada Y, Yamada R, Suzuki A, Kochi Y, Shimane K, Myouzen K, et al. Contribution of a haplotype in the HLA region to anti-cyclic citrullinated peptide antibody positivity in rheumatoid arthritis, independently of HLA-DRB1. *Arthritis Rheumatol.* 2009;60(12): 3582-90.
73. Qiao B, Huang CH, Cong L, Xie J, Lo SH, Zheng T. Genome-wide gene-based analysis of rheumatoid arthritis-associated interaction with PTPN22 and HLA-DRB1. *BMC Proc.* 2009; 3 Suppl 7: S132.
74. Abdou AM, Gao X, Cozen W, Cerhan JR, Rothman N, Martin MP, et al. Human leukocyte antigen (HLA) A1-B8-DR3 (8.1) haplotype, tumor necrosis factor (TNF) G-308A, and risk of non-Hodgkin lymphoma. *Leukemia.* 2010; 24: 1055-58.
75. Nie XM, Fang YH, Zhang Y, He WD, Zhu CF. A novel HLA-DRB1 allele, DRB1\*1219, was identified by sequence-based typing in a Chinese leukaemia family. *Tissue Antigens.* 2009; 74(4): 352-4.
76. Skrablin PS, Brixner V, Richter R, Boehme E, Seifried E, Seidi C. Confirmation of allele HLA-A\*3116 found in a family of a leukaemia patient with Caucasian and Caribbean origin. *Int J Immunogenet.* 2009; 36(6):383-4.
77. Pavoni DP, Cerqueira LB, Roxo VM, Pretzl-Erler ML. Polymorphism of the promoter region and exon 1 of the CTLA4 gene in endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). *Braz J Med Biol Res.* 2006; 39(9):1227-32.
78. García Borrás S, Racca L, Cotorruelo C, Biondi C, Beloscar J, Racca A. Distribution of HLA-DRB1 alleles in Argentinean patients with Chagas' disease cardiomyopathy. *Immunol Invest.* 2009; 38(3-4):268-75.
79. Bartoccioni E, Scuderi F, Augugliaro A, Chiatamone Ranieri S, Sauchelli D, Alboino P, et al. HLA class II allele analysis in MuSK-positive myasthenia gravis suggests a role for DQ5. *Neurology.* 2009; 72(2):195-7.
80. Hajeer AH, Sawidan FA, Bohlega S, Saleh S, Sutton P, Shubaili A, et al. HLA class I and class II polymorphisms in Saudi patients with myasthenia gravis. *Int J Immunogenet.* 2009;36(3):169-72.
81. Vandiedonck C, Raffoux C, Eymard B, Tranchant C, Dulmet E, Krumeich S, et al. *J Neuroimmunol.* 2009; 210(1-2):120-3.
82. Yousefipour GA, Salami Z, Farjadian S. Association of HLA-DQA1\*0101/2 and DQB1\*0502 with myasthenia gravis in southern Iranian patients. *Iran J Immunol.* 2009; 6(2):99-102.
83. Zeitlin AA, Heward JM, Newby PR, Carr-Smith JD, Franklyn JA, Gough SC, et al. Analysis of HLA class II genes in Hashimoto's thyroiditis reveals differences compared to Graves' disease. *Genes Immun.* 2008; 9(4):358-63.
84. Kuang M, Wang S, Wu M, Ning G, Yao Z, Li L. Expression of IFN $\alpha$ -inducible genes and modulation of HLA-DR and thyroid stimulating hormone receptors in Graves' disease. *Mol Cell Endocrinol.* 2009; 319(1-2): 23-9.

85. Kuniholm MH, Kovacs A, Gao X, Xue X, Marti D, Thio CI, et al. Specific human leukocyte antigen class I and II alleles associated with hepatitis C virus viremia. *Hepatology*. 2010; 51(5): 1514-22
86. Liang HX, Yu ZJ, Jiang HQ. Study on the association between chronic hepatitis B cirrhosis and HLA-DRB1\*1301,1302 allele. *Chinese Journal of Experimental and Clinical Virology*. 2009; 23(4):302-3.
87. Tripathy AS, Shankarkumar U, Chadha MS, Ghosh K, Arankalle VA. Association of HLA alleles with hepatitis C infection in Maharashtra, western India. *Indian J Med Res*. 2009;130(5):550-5.
88. Li X, Howard TD, Zheng SL, Haselkom T, Peters SP, Meyers DA, et al. Genome-wide association study of asthma identifies RAD50-IL13 and HLA-DR/DQ regions. *J Allergy Clin Immunol*. 2010; 125(2):328-35.
89. Watson NF, Ton TG, Koepsell TD, Gersuk VH, Longstreth WT Jr. Does narcolepsy symptom severity vary according to HLA-DQB1\*0602 allele status? *Sleep*. 2010;33(1):29-35.
90. Guerini FR, Tinelli C, Calabrese E, Agliardi C, Zanzotrera M, De Silvestri A, et al. HLA-A\*01 is associated with late onset of Alzheimer's disease in Italian patients. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2009; 22(4):991-9.
91. da Silva SA, Mazini PS, Reis PG, Sell AM, Tsuneto LT, Peixoto PR, et al. HLA-DR and HLA-DQ alleles in patients from the south of Brazil: markers for leprosy susceptibility and resistance. *BMC Infect Dis*. 2009; 9:134.
92. Zhang F, Liu H, Chen S, Wang C, Zhu C, Zhang L, et al. Evidence for an association of HLA-DRB1\*15 and DRB1\*09 with leprosy and the impact of DRB1\*09 on disease onset in a Chinese Han population. *BMC Med Gen*. 2009; 10:133.
93. Wu XM, Wang C, Zhang KN, Lin AY, Kira J, Hu GZ, et al. Association of susceptibility to multiple sclerosis in Southern Han Chinese with HLA-DRB1, -DPB1 alleles and DRB1-DPB1 haplotypes: distinct from other populations. *Mult Scler*. 2009; 15(12):1422-30.
94. Lee HW, Hahm KB, Lee JS, Ju YS, Lee KM, Lee KW. Association of the human leukocyte antigen class II alleles with chronic atrophic gastritis and gastric carcinoma in Koreans. *J Dig Dis*. 2009; 10(4):265-71.
95. Brown JJ, Ollier WE, Arcsott G, Bayat A. Association of HLA-DRB1\* and keloid disease in an Afro-Caribbean population. *Clin Exp Dermatol*. 2010; 35(3):305-10.
96. Ozawa Y, Chiba J, Sakamoto S. HLA class II alleles and salivary numbers of mutans streptococci and lactobacilli among young adults in Japan. *Oral Microbiol Immunol*. 2001;16(6):353-7.
97. Altun C, Guven G, Orkonoglu F, Cehreli ZC, Karaasian A, Basak F, et al. Human leukocyte antigen class II alleles and dental caries in a child population. *Pediatr Dent*. 2008;30(2):154-9.
98. Bagherian A, Nematollahi H, Afshari JT, Moheghi N. Comparison of allele frequency for HLA-DR and HLA-DQ between patients with ECC and caries-free children. *J Indian Soc Pedod Prev Dent*. 2008; 26(1):18-21.
99. Wallengren ML, Ericson D, Hamberg K, Johnson U. HLA-DR4 and salivary immunoglobulin A reactions to oral streptococci. *Oral Microbiol Immunol*. 2001;16(1):45-53.

## APÊNDICE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



Universidade Norte do Paraná

### PESQUISA SOBRE AS CONDIÇÕES BUCAIS E O ESTADO NUTRICIONAL DE ADOLESCENTES DAS ESCOLAS ESTADUAIS DE LONDRINA-PR. CARTA DE INFORMAÇÃO AO RESPONSÁVEL

Prezados pais/ responsáveis:

A Unopar, através de seu Curso de Mestrado em Odontologia , pretende desenvolver algumas pesquisas junto aos adolescentes matriculados nas Escolas Estaduais de Ensino Médio de Londrina-Pr. Estas pesquisas serão úteis para que, em uma etapa posterior, ações de controle da cárie dentária nos adolescentes sejam planejadas e desenvolvidas. Os estudos terão os seguintes objetivos:

- reavaliar a condição da boca
- avaliar a quantidade de bactérias presentes na boca

Para tanto, serão adotados procedimentos que já foram amplamente utilizados em pesquisas/estudos anteriores e que se mostraram totalmente seguros.

Será garantido ao participante: que receba respostas a qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida acerca dos procedimentos e outros assuntos relacionados com a pesquisa; a liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo; a segurança de que não será identificado e que se manterá o caráter confidencial da informação relacionada com sua privacidade.

Caso o adolescente tenha interesse em receber os resultados da sua avaliação, deve procurar a secretaria da escola a partir do segundo semestre de 2008.

Informações: UNOPAR- Mestrado em Odontologia, Profas. Sandra Maciel, Regina Frederico , Rua Marselha, 183, Jardim Piza, Londrina, telefone (43) 3371-7820

.....  
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Pelo presente instrumento que atende às exigências legais, o (a) Sr.(a). \_\_\_\_\_, portadora da cédula de identidade no. \_\_\_\_\_, após leitura minuciosa da **CARTA DE INFORMAÇÃO AO RESPONSÁVEL**, devidamente explicada pelos profissionais em seus mínimos detalhes, ciente dos procedimentos aos quais seu(sua) filho(a) será submetido(a), não restando quaisquer dúvidas a respeito do lido e explicado, firma seu **CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**, concordando em participar da pesquisa proposta.

Por estarem de acordo, assinam o presente termo.

\_\_\_\_\_  
Assinatura: pai/mãe/responsável legal

\_\_\_\_\_  
Assinatura do(a) adolescente

\_\_\_\_\_  
Assinatura do(a) Pesquisador(a)

Londrina-PR, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

## ANEXOS

### ANEXO A - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da UNOPAR



## Universidade Norte do Paraná Comitê de Ética em Pesquisa

### PARECER CONSUBSTANCIADO

PROTOCOLO: PP 0012/08

RESPONSÁVEL: *Sandra Mara Maciel*

O Comitê de Ética em Pesquisa da Unopar analisou e APROVOU quanto ao aspecto ético o projeto "*Estudo sobre fatores genéticos e comportamentais de risco comum à cárie dentária e à obesidade em adolescentes*".

O CEP/UNOPAR estabelece:

- a) O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).
- b) O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP/UNOPAR (Res. CNS Item III.3.z), aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa (Item V.3) que requeiram ação imediata.
- c) O CEP/UNOPAR deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alteram o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP/UNOPAR junto com seu posicionamento.
- d) Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP/UNOPAR de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.
- e) Semestralmente devem ser encaminhados relatórios parciais e ao término do projeto o relatório final.

Londrina, 09 de maio de 2008

  
Prof. Dr. Hélio Hirashi Sugimoto  
Presidente do C.E.P. UNOPAR

## ANEXO B – Autorização da Diretoria do Núcleo Regional de Educação



Of. CHEFIA/NRE n.º 055/08



SECRETARIA DE ESTADO DA EDUCAÇÃO

Londrina, 31 de janeiro de 2008.

Prezada Senhora

Acusamos o recebimento da solicitação de Vossa Senhoria, de autorização da coleta de dados para realização das pesquisas "Comparação entre necessidades normativas de tratamento ortodôntico e auto-percebidas em relação à má-oclusão por adolescentes de Londrina-PR" e "Estudos sobre fatores genéticos e comportamentais de risco comum à cárie dentária e à obesidade em adolescentes".

Encaminhamos, em anexo, cópia da relação das Escolas Estaduais, por região, para facilitar o acesso e a obtenção de autorização das Direções dos Colégios que vierem a ser selecionados para a coleta de dados.

Atenciosamente

  
Márcia Maria Lopes de Souza  
Chefe do NRE/LONDRINA  
Decreto nº 743/97

Ilma Sra  
Prof<sup>ª</sup>. Dr.<sup>ª</sup> Sandra Mara Maciel  
UNOPAR  
Londrina - PR



### ANEXO C – Participantes do Estudo

Região da escola	Nome da escola	Porte da escola	Código	Gênero	Data de Nascimento
central	José Aloísio Aragão-Aplicação	grande	S9	masculino	20.02.1991
central	José Aloísio Aragão-Aplicação	grande	S10	feminino	21.12.1993
central	José Aloísio Aragão-Aplicação	grande	S12	feminino	11.03.1991
central	José Aloísio Aragão-Aplicação	grande	S19	feminino	04.03.1991
central	José Aloísio Aragão-Aplicação	grande	S20	feminino	19.03.1991
central	José Aloísio Aragão-Aplicação	grande	S21	feminino	10.01.1991
central	José Aloísio Aragão-Aplicação	grande	S4	feminino	08.11.1993
central	José Aloísio Aragão-Aplicação	grande	S13	masculino	13.07.1993
norte	José Carlos Pinotti	pequeno	S3	masculino	23.12.1992
Sul	Maria José B. Aguilera	grande	S8	feminino	19.11.1990
norte	Ubedulha Correia de Oliveira	grande	S3	feminino	20.09.1991
norte	Ubedulha Correia de Oliveira	grande	S13	masculino	26.11.1991
central	Vicente Rijo	grande	S7	feminino	29.07.1993
leste	Benedita Rosa Resende	grande	C4	feminino	31.07.1992
norte	José Carlos Pinotti	pequeno	C8	masculino	09.10.1992
Sul	Maria José B. Aguilera	grande	C23	feminino	10.08.1990
Sul	Paulo Freire	pequeno	C10	feminino	03.02.1992
Sul	Paulo Freire	pequeno	C28	feminino	31.03.1990
leste	Benedita Rosa Resende	grande	C6	feminino	17.11.1992
Sul	Paulo Freire	pequeno	C6	feminino	18.10.1992
central	Vicente Rijo	grande	C8	feminino	02.07.1993
central	Vicente Rijo	grande	C10	masculino	01.09.1993
leste	Benedita Rosa Resende	grande	C3	feminino	01.02.1992
oeste	Polivalente	grande	C15	feminino	27.06.1992
oeste	Polivalente	grande	C4	feminino	19.02.1992
norte	Ubedulha Correia de Oliveira	grande	C8	feminino	27.03.1991
central	Vicente Rijo	grande	C1	masculino	17.05.1991
central	Vicente Rijo	grande	C4	masculino	11.03.1991
central	Vicente Rijo	grande	C5	masculino	22.11.1991
central	Vicente Rijo	grande	C11	feminino	12.03.1993
leste	Carlos de Almeida	grande	S4	feminino	02.05.1992
leste	Carlos de Almeida	grande	S3	feminino	26.12.1992

central	José Aloísio Aragão- Aplicação	grande	S11	feminino	23.11.1993
central	José Aloísio Aragão- Aplicação	grande	S6	masculino	06.01.1993
central	José Aloísio Aragão- Aplicação	grande	S1	feminino	08.03.1993
central	José Aloísio Aragão- Aplicação	grande	S7	masculino	21.07.1992
central	José Aloísio Aragão- Aplicação	grande	S16	masculino	19.12.1991
norte	José Carlos Pinotti	pequeno	S5	masculino	27.07.1992
Sul	Maria José B. Aguilera	grande	S3	masculino	06.07.1990
Sul	Maria José B. Aguilera	grande	S7	feminino	17.03.1991
Sul	Paulo Freire	pequeno	S20	feminino	08.10.1992
Sul	Paulo Freire	pequeno	S27	masculino	10.12.1992
Sul	Paulo Freire	pequeno	S17	feminino	27.01.1992
Sul	Paulo Freire	pequeno	S12	feminino	27.07.1992
norte	Ubedulha Correia de Oliveira	grande	S1	feminino	22.11.1991
norte	Ubedulha Correia de Oliveira	grande	S9	masculino	15.04.1990
norte	Ubedulha Correia de Oliveira	grande	S2	feminino	23.12.1991
central	Vicente Rijo	grande	S9	feminino	16.04.1992
central	Vicente Rijo	grande	S5	feminino	03.10.1991
central	José de Anchieta	grande	C1	feminino	26.10.1992
Sul	Maria José B. Aguilera	grande	C10	feminino	11.02.1993
Sul	Maria José B. Aguilera	grande	C1	feminino	21.11.1991
Sul	Paulo Freire	pequeno	C14	feminino	12.08.1992
Sul	Paulo Freire	pequeno	C19	feminino	21.04.1990
norte	Ubedulha Correia de Oliveira	grande	C3	masculino	07.06.1991
norte	Ubedulha Correia de Oliveira	grande	C4	feminino	29.10.1991
norte	José Carlos Pinotti	pequeno	C7	masculino	18.04.1991
norte	José Carlos Pinotti	pequeno	C6	feminino	13.07.1992
central	José de Anchieta	grande	C3	feminino	10.11.1992
central	José de Anchieta	grande	C2	feminino	29.04.1991
Sul	Maria José B. Aguilera	grande	C24	feminino	05.11.1991
Sul	Maria José B. Aguilera	grande	C27	masculino	04.03.1989
Sul	Maria José B. Aguilera	grande	C8	masculino	03.01.1993
Sul	Paulo Freire	pequeno	C24	feminino	02.03.1990
Sul	Paulo Freire	pequeno	C29	feminino	06.05.1989
oeste	Polivalente	grande	S3	feminino	07.11.1989
oeste	Polivalente	grande	C11	feminino	28.08.1992

norte	Ubedulha Correia de Oliveira	grande	C5	feminino	11.09.1991
norte	Ubedulha Correia de Oliveira	grande	C2	feminino	07.03.1992
norte	José Carlos Pinotti	pequeno	C10	masculino	09.08.1991
Sul	Maria José B. Aguilera	grande	C13	feminino	26.05.1992
Sul	Maria José B. Aguilera	grande	C3	masculino	04.05.1991
Sul	Maria José B. Aguilera	grande	C15	feminino	12.07.1991
Sul	Maria José B. Aguilera	grande	C26	masculino	10.01.1990
Sul	Paulo Freire	pequeno	C11	feminino	31.03.1992
Sul	Paulo Freire	pequeno	C13	feminino	08.05.1992
Sul	Paulo Freire	pequeno	C22	masculino	04.07.1992
Sul	Paulo Freire	pequeno	C15	feminino	22.12.1992
Sul	Paulo Freire	pequeno	C16	feminino	09.04.1992
Sul	Paulo Freire	pequeno	C21	feminino	16.09.1992
oeste	Polivalente	grande	C8	feminino	12.08.1992
oeste	Polivalente	grande	C12	masculino	22.11.1990
oeste	Polivalente	grande	C10	feminino	03.03.1992
oeste	Polivalente	grande	C9	feminino	04.04.1992
oeste	Polivalente	grande	C5	feminino	28.06.1992
norte	Ubedulha Correia de Oliveira	grande	C6	feminino	18.02.1990
central	Vicente Rijo	grande	C2	feminino	11.09.1991
central	Vicente Rijo	grande	C9	masculino	07.01.1992
leste	Carlos de Almeida	grande	S1	feminino	28.06.1991
leste	Carlos de Almeida	grande	S6	feminino	25.08.1992
leste	Carlos de Almeida	grande	S5	feminino	28.09.1992
central	José Aloísio Aragão-Aplicação	grande	S8	feminino	14.06.1993
central	José Aloísio Aragão-Aplicação	grande	S14	masculino	01.02.1992
central	José Aloísio Aragão-Aplicação	grande	S15	feminino	15.01.1992
central	José Aloísio Aragão-Aplicação	grande	S2	feminino	20.10.1993
norte	José Carlos Pinotti	pequeno	S1	feminino	14.03.1992
central	José de Anchieta	grande	S2	feminino	14.04.1992
central	José de Anchieta	grande	S1	feminino	20.07.1992
central	José de Anchieta	grande	S3	masculino	21.07.1991
Sul	Maria José B. Aguilera	grande	S2	masculino	06.09.1990
Sul	Maria José B. Aguilera	grande	S5	feminino	13.02.1991
Sul	Maria José B. Aguilera	grande	S11	masculino	12.02.1993
Sul	Maria José B. Aguilera	grande	S9	feminino	30.11.1992
Sul	Maria José B. Aguilera	grande	S10	feminino	14.07.1991

Sul	Maria José B. Aguilera	grande	S4	feminino	19.12.1991
Sul	Maria José B. Aguilera	grande	S1	feminino	05.10.1993
Sul	Paulo Freire	pequeno	S4	masculino	02.06.1992
Sul	Paulo Freire	pequeno	S26	feminino	07.09.1992
oeste	Polivalente	grande	S8	feminino	13.10.1992
norte	Ubedulha Correia de Oliveira	grande	S11	feminino	03.04.1991
norte	Ubedulha Correia de Oliveira	grande	S10	feminino	21.04.1993
central	Vicente Rijo	grande	S16	feminino	06.09.1992
central	Vicente Rijo	grande	S18	masculino	09.01.1991
central	Vicente Rijo	grande	S19	masculino	18.09.1991
central	Vicente Rijo	grande	S21	feminino	20.07.1993
central	Vicente Rijo	grande	S22	feminino	12.11.1992
norte	José Carlos Pinotti	pequeno	C3	masculino	05.12.1990
norte	José Carlos Pinotti	pequeno	C2	masculino	08.09.1992
norte	José Carlos Pinotti	pequeno	C4	feminino	12.08.1992
Sul	Maria José B. Aguilera	grande	C14	feminino	25.04.1993
Sul	Maria José B. Aguilera	grande	C20	masculino	22.05.1992
Sul	Maria José B. Aguilera	grande	C11	masculino	06.05.1992
oeste	Polivalente	grande	C13	masculino	01.12.1992
norte	Ubedulha Correia de Oliveira	grande	C9	feminino	05.06.1991
norte	José Carlos Pinotti	pequeno	C1	feminino	11.07.1992
Sul	Maria José B. Aguilera	grande	C25	masculino	15.02.1991
Sul	Maria José B. Aguilera	grande	C17	masculino	23.04.1992
Sul	Maria José B. Aguilera	grande	C21	feminino	02.02.1991
Sul	Paulo Freire	pequeno	C3	masculino	15.06.1992
Sul	Paulo Freire	pequeno	C1	feminino	18.10.1992
Sul	Paulo Freire	pequeno	C25	feminino	22.09.1992
oeste	Polivalente	grande	S4	feminino	22.07.1988
oeste	Polivalente	grande	S5	feminino	14.12.1987
oeste	Polivalente	grande	S7	feminino	07.09.1988
leste	Benedita Rosa Resende	grande	C2	masculino	19.07.1992
leste	Benedita Rosa Resende	grande	C1	feminino	17.07.1992
norte	José Carlos Pinotti	pequeno	C15	feminino	16.12.1991
norte	José Carlos Pinotti	pequeno	C13	feminino	15.07.1992
norte	José Carlos Pinotti	pequeno	C11	feminino	24.04.1991
norte	José Carlos Pinotti	pequeno	C5	masculino	12.05.1992
norte	José Carlos Pinotti	pequeno	C9	masculino	25.03.1991
norte	José Carlos Pinotti	pequeno	C14	feminino	16.03.1991
Sul	Maria José B. Aguilera	grande	C9	masculino	28.02.1993

Sul	Maria José B. Aguilera	grande	C18	masculino	08.01.1992
Sul	Maria José B. Aguilera	grande	C5	feminino	29.06.1993
Sul	Maria José B. Aguilera	grande	C4	feminino	07.08.1989
Sul	Maria José B. Aguilera	grande	C6	feminino	10.08.1992
Sul	Maria José B. Aguilera	grande	C19	masculino	30.04.1993
Sul	Maria José B. Aguilera	grande	C22	feminino	24.07.1992
Sul	Paulo Freire	pequeno	C9	masculino	01.02.1992
Sul	Paulo Freire	pequeno	C2	masculino	18.07.1992
Sul	Paulo Freire	pequeno	C8	feminino	07.01.1992
Sul	Paulo Freire	pequeno	C23	feminino	07.11.1992
oeste	Polivalente	grande	C1	feminino	21.07.1992
oeste	Polivalente	grande	C14	feminino	19.01.1992
oeste	Polivalente	grande	C7	feminino	11.06.1992
oeste	Polivalente	grande	C6	feminino	30.01.1991
oeste	Polivalente	grande	S6	feminino	09.07.1992
oeste	Polivalente	grande	C2	masculino	29.08.1991
oeste	Polivalente	grande	C7	feminino	17.05.1991
oeste	Polivalente	grande	C3	feminino	18.03.1992
norte	Ubedulha Correia de Oliveira	grande	C7	feminino	10.08.1991
central	Vicente Rijo	grande	C12	feminino	26.03.1993
central	Vicente Rijo	grande	C6	feminino	02.04.1991