



unopar

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU
MESTRADO EM ODONTOLOGIA**

PAULA MARINO COSTA

**POLIMORFISMO NOS GENES ENAMELINA E
AMELOGENINA E SUA RELAÇÃO COM A CÁRIE
DENTÁRIA**

Londrina
2016

PAULA MARINO COSTA

**POLIMORFISMO DOS GENES ENAMELINA E
AMELOGENINA E SUA RELAÇÃO COM A CÁRIE
DENTÁRIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Norte do Paraná - UNOPAR, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Área de Concentração: Dentística Preventiva e Restauradora.

Orientador: Prof^a. Dr^a Regina Célia Poli-Frederico.

Londrina
2016

PAULA MARINO COSTA

**POLIMORFISMO NOS GENES ENAMELINA E AMELOGENINA E SUA
RELAÇÃO COM A CÁRIE DENTÁRIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Norte do Paraná - UNOPAR, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Área de Concentração: Dentística Preventiva e Restauradora.

BANCA EXAMINADORA

Profª. Drª Regina Célia Poli-Frederico.
Universidade Norte do Paraná

Profª. Drª Sandra Mara Maciel
Universidade Norte do Paraná

Profª. Drª Maria Paula Jacobucci Botelho
UniCesumar

Londrina, ____ de _____ de ____.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais Luiz Fernando e Sara, que não medem esforços para me ajudar a realizar meus sonhos.

AGRADECIMENTO

Minha gratidão primeiramente a Deus, porque dEle e por Ele, e para Ele são todas as coisas.

Agradeço aos meus pais, Luiz Fernando e Sara, que são minha base para tudo na vida. Não existem palavras que consigam expressar o amor, o respeito e admiração que tenho por eles. Minha gratidão ao meu namorado, Thiago Cantanti, que me dá suporte, amor e me sustenta em oração. Sou grata a minhas irmãs Fernanda e Natália e meus cunhados Michael e Israel, que sempre estão ao meu lado.

Meus sinceros agradecimentos à minha orientadora Prof. Regina Frederico, que além de me ajudar a realizar esta dissertação, compartilhou muito dos seus conhecimentos comigo e é sempre uma honra aprender mais com uma pessoa tão doce e inteligente. Obrigada professora Regina, por tanta paciência e dedicação por mim.

Sou grata a minha amiga, professora e orientadora Prof. Maria Paula Botelho, que desde que entrei na faculdade de Odontologia, esteve ao meu lado nas pesquisas, estudos e projetos. E agora que estou finalizando o mestrado, ainda está comigo e me ajuda em cada mínimo detalhe. Obrigada por ser minha maior incentivadora. Meu amor por pesquisa, saúde pública e desejo de solucionar os problemas e sofrimento das pessoas, são graças ao seu exemplo. Muito obrigada!

Minha gratidão à Prof. Sandra Maciel, que tanto somou com esta pesquisa. Sua experiência e amor pelo ensino me incentivam a ser melhor. Obrigada por ser tão solícita e por me ajudar.

COSTA. Paula Marino. **Polimorfismo nos genes amelina e amelogenina e sua relação com a cárie dentária**. 52 pag. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Odontologia – Universidade Norte do Paraná, Londrina, 2016.

RESUMO

A cárie é uma doença multifatorial e complexa, não estando todos os fatores envolvidos em sua etiologia ainda definidos. Já está bem documentado o papel dos micro-organismos e da dieta para o seu estabelecimento e progressão, no entanto também parece haver um componente genético que influencia o desenvolvimento da cárie dentária. Dados da literatura relatam que o polimorfismo nos genes amelogenina (*AMELX*) e amelina (*ENAM*), genes responsáveis pela formação do esmalte, pode estar envolvido nesta doença. O objetivo do presente estudo foi avaliar se a ocorrência de cárie dentária em adolescentes está relacionada com o polimorfismo nos genes *AMELX* e *ENAM*. Para a avaliação da prevalência de cárie, foi utilizado o índice de dentes permanentes cariados, perdidos e obturados (CPO-D), segundo critérios da Organização Mundial da Saúde. As amostras de DNA, extraídas de células da mucosa bucal, foram quantificadas em um Espectrofotômetro ND-1000 (Nanodrop) e posteriormente diluídas em uma concentração final de 30 ng/ μ L. Para a análise dos polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs) dos genes *AMELX* (rs17878486) e *ENAM* (rs7671281) foi realizada a técnica de amplificação dos fragmentos de DNA por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real pelo sistema TaqMan (Applied Biosystems, Foster City, USA). A análise estatística dos dados foi realizada utilizando os testes Exato de Fisher e Qui-Quadrado, fixando o nível de significância em 5%. De acordo com os procedimentos estatísticos deste estudo, somente os fatores socioeconômicos tiveram influência na experiência de cárie. Conclui-se que, o componente genético, representado pelo polimorfismo nos genes *AMELX* e *ENAM*, nesta população de estudo, não exerceu influência no desenvolvimento da cárie.

Palavras-chave: Cárie Dentária. Polimorfismo genético. Adolescentes. Esmalte. Suscetibilidade à Cárie Dentária.

COSTA, Paula Marino. **Polymorphism in enamelin and amelogenin gene and their relationship with dental caries**. 52 p. Master's Thesis. Dentistry Post-Graduate Program – Universidade Norte do Paraná, Londrina, 2016.

ABSTRACT

Although awareness of disease determinants is, usually, enough to get control over it, about tooth decay that is not possible yet, because it is a multifactorial and complex disease, and neither all involved factors have been already defined. The roles of microorganisms and diet are widely understood, as well their setting up and progression. However, there seems to be a genetic component, which influences the development of dental caries. Scientific literature and dental research data have reported that a kind of polymorphism in amelogenin gene (AMELX) and enamelin (ENAM) genes, which are responsible for enamel formation, they also have been seen as potentially involved in this specific disease. The aim of this study was to evaluate if the occurrence of dental caries in adolescents is related to the polymorphism in AMELX and ENAM genes. For an assessment of caries prevalence it was used the Index of Decayed, Missing and Filled (DMF-T), according to criteria of the World Health Organization. The DNA samples, extracted from the oral mucosa cells, were quantified by a spectrophotometer ND-1000 (NanoDrop), and then diluted into a final concentration of 30 ng/μL. For the analysis of single nucleotide polymorphisms (SNPs) of AMELX genes (rs17878486) and ENAM (rs7671281) amplification technique of DNA fragments by polymerase chain reaction was performed (PCR) in real time by TaqMan system (Applied Biosystems, Foster City, USA). For the statistical data analysis, it was performed using Fisher exact test and chi-square with significance level of 5%. According to the statistical data of this study, only socioeconomic factors had an influence on caries experience. It was concluded that the genetic component in this study population, did not influence the development of caries.

Keywords: Dental caries. Genetic polymorphism. Adolescents. Enamel. Dental Caries Susceptibility.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Localização do gene <i>AMELX</i> no cromossomo X	20
Figura 2 – Localização do gene <i>ENAM</i> no cromossomo 4.....	22
Figura 3 – Amostras de DNA.....	28
Figura 4 – Condições da PCR.....	31
Figura 5 - Representação gráfica de indivíduos portadores dos genótipos.....	32
Figura 6 – Gráfico 1 – Frequência genotípica Enamelina	35
Figura 7 – Gráfico – Frequência genotípica Amelogenina	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Distribuição das variáveis sócio demográficas e econômicas, comportamentais, de saúde bucal e genéticas na população de escolares de 12 a 19 anos de idade de escolas públicas do município de Londrina/PR.....	36
Tabela 2 – Relação entre as variáveis deste estudo e a experiência de cárie dentária em escolares da rede pública de Londrina/PR.....	37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>AMELX</i>	Amelogenina
CPO-D	Dentes permanentes cariados perdidos e obturados
C	Citosina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
<i>ENAM</i>	Enamelina
<i>KLK4</i>	Calicreína - 4
MMP	Metaloprotease de matriz
ND	Nanodrop
ng	Nanograma
PCR	Reação em cadeia da polimerase
SNPs	Polimorfismos de nucleotídeos únicos
SPSS	Statistical Package for Social Science
T	Timina

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Por cento
°C	Graus Celsius
μL	Microlitro
X	Cromossomo feminino
Y	Cromossomo masculino

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DE LITERATURA – CONTEXTUALIZAÇÃO	14
2.1 EPIDEMIOLOGIA DA CÁRIE DENTÁRIA	14
2.2 ETIOLOGIA DA CÁRIE DENTÁRIA	15
2.3 GENÉTICA E A CÁRIE DENTÁRIA	17
2.3.1 AMELOGENINA	19
2.3.2 ENAMELINA	21
3 PROPOSIÇÃO	23
4 ARTIGO.....	26
4.1 INTRODUÇÃO	26
4.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	28
4.2.1 ÉTICA.....	29
4.2.2 EXAME CLÍNICO.....	29
4.2.3 QUESTIONÁRIO.....	29
4.2.4 ANÁLISE DOS POLIMORFISMOS DOS GENES <i>AMELX</i> E <i>ENAM</i>	30
4.2.4.1 EXTRAÇÃO DO DNA	
4.2.4.2 GENOTIPAGEM PARA OS GENES <i>AMELX</i> E <i>ENAM</i>	
4.2.5 REAÇÃO DE CADEIA DA POLIMERASE (PCR).....	32
4.2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	33
4.4 RESULTADOS.....	34
4.5 DISCUSSÃO.....	38
4.6 CONCLUSÕES.....	41
4.7 REFERÊNCIAS DO ARTIGO.....	42
5 CONCLUSÕES	44
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	45
7 REFERÊNCIAS.....	46

ANEXOS: ANEXO A

1 INTRODUÇÃO

Graças à implementação de medidas de saúde pública, como distribuição de escovas de dente e dentifrício com flúor, acesso à água fluoretada, ampliação do acesso aos serviços odontológicos, houve uma significativa melhora na saúde bucal da população brasileira. De acordo com o projeto SBBrasil 2010, o Brasil passou de uma condição de média prevalência de cárie para baixa prevalência de cárie. No entanto, na população de 15 a 19 anos, apesar de ter ocorrido uma redução significativa na prevalência de cárie em relação a 2003, a média dos dentes afetados por cárie foi de 4,25, o que representa mais do que o dobro do número médio encontrado aos 12 anos (BRASIL, 2011).

Para que o controle e a prevenção da doença cárie sejam efetivos, torna-se inquestionável a necessidade de pesquisar o maior número de fatores predisponentes desta doença, antes que ela se instale ou se agrave. Atualmente, estudos tem sido realizados para provar que há um componente genético que influencia na suscetibilidade à cárie e pesquisas realizadas em seres humanos apontaram que alterações em genes formadores do esmalte e sua interação com *Streptococcus mutans* podem contribuir para o desenvolvimento da doença (PATIR et al., 2008). Os genes que codificam proteínas que formam o esmalte dentário, quando mutados, foram propostos como potencialmente envolvidos com a cárie, e foram relatadas associações positivas entre variação genética no genes amelogenina, tuftelina e enamelina e a cárie dentária (SHIMIZU et al., 2012).

Estudos feitos anteriormente comprovam a relação genética entre o gene amelogenina (*AMELX*), gene responsável por contribuir na formação do esmalte dentário, e a doença em questão. Defeitos no gene *AMELX* estão associadas com amelogenese imperfeita (SIMMER e HU, 2002).

Estudo realizado em crianças da Turquia demonstrou a possível interação entre a alteração genética do gene enamelina (*ENAM*) e o *Streptococcus mutans* (uma das bactérias precursoras da cárie dentária), por tornar o hospedeiro suscetível ao desenvolvimento à cárie dentária (PATIR et al., 2008). É sugerido que a enamelina controla a formação de cristais juntamente com amelogenina, a mais abundante das proteínas da matriz do esmalte, e subsequentemente, construir uma estrutura de cristais de hidroxiapatita altamente organizada (BARLETT, 2013). Desta forma, alguns autores sugerem que variações genéticas nesses genes devem

contribuir para alterações estruturais no esmalte dentário que podem causar altos níveis de perdas minerais, maior suscetibilidade ao ataque bacteriano e deposição do biofilme (PATIR et al., 2008). Assim a hipótese do nosso estudo foi que polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs) nos genes *AMELX* e *ENAM* teriam relação com a cárie dentária. O objetivo deste trabalho foi investigar a influência que polimorfismos nestes genes podem causar no desenvolvimento da cárie em escolares de 12 a 19 anos de idade.

2 REVISÃO DE LITERATURA – CONTEXTUALIZAÇÃO

2.1 EPIDEMIOLOGIA DA CÁRIE DENTÁRIA

A saúde bucal tem relação direta com a qualidade de vida, principalmente quando se trata de relações sociais, devido à preocupação com a halitose e com a aparência. Além disso com a cárie não tratada, o indivíduo apresentará dor, desconforto e sofrimento, causando impacto em seu bem-estar geral (KRIDAPONG et al. 2012). A cárie dentária e a doença periodontal são os agravos de saúde bucal que causam mais dor e constrangimento entre os adolescentes (LEÃO et al., 2015).

No início do século 21, grande porcentagem de crianças em idade escolar e expressiva proporção de adultos no mundo todo foram afetadas pela cárie dentária, uma doença predominante quando se diz respeito às doenças bucais. Apesar da distribuição da cárie divergir entre os continentes, a doença é predominante nas Américas. Há discrepância entre regiões também, sendo que regiões economicamente menos favorecidas apresentam-se ainda com alta prevalência da doença, diferindo das mais favorecidas economicamente (BOING et al., 2014).

É hoje amplamente reconhecido que uma compreensão mais abrangente e detalhada de desigualdades em saúde bucal é necessária para permitir que agências de saúde pública tomem medidas eficazes contra este problema fundamental da saúde. Por isso, é importante conhecer o padrão de distribuição da cárie dentária em diferentes grupos populacionais (PIOVESAN et al., 2011).

Encontra-se alta desigualdade entre a distribuição da cárie dentária, a experiência varia entre países e até mesmo dentro de pequenas regiões. Existem diversos fatores que contribuem para esta variação, como idade, sexo, dieta, etnia e fatores dentro da cavidade oral (SARAVANAN; ANUDRADHA; BHASKAR, 2003). Apesar do declínio na experiência de cárie na maioria dos países, a alta prevalência da doença é observada em algumas minorias (BONECKER; MARCENES; SHEIHAM, 2002).

A prevenção da cárie dentária tem sido considerada como uma tarefa importante para os profissionais de saúde. Os cientistas continuam suas pesquisas para identificar as melhores práticas para a prevenção, diagnóstico e tratamento da cárie. Há a tendência de substituição dos métodos utilizados para o tratamento das lesões cariosas e estratégias têm sido enfatizadas para a prevenção e conservação da estrutura dentária (MOSES; RAMGEEH; GURUNATHAN, 2011).

Os resultados de um levantamento realizado no Brasil em 2003 demonstraram que adolescentes de 15 a 19 anos, possuíam em média 6 dentes com experiência de cárie, estando somente 11% destes livres da doença (BRASIL, 2004). Segundo dados do levantamento realizado no ano de 2010, houve melhora no índice CPO-D, sendo que este reduziu para 4,25 (BRASIL, 2011).

2.2 ETIOLOGIA DA CÁRIE DENTÁRIA

A cárie dentária é uma doença multifatorial reconhecida por ser causada por uma combinação de fatores ambientais e comportamentais e predisposições genéticas. Os fatores de risco ambientais para a cárie dentária têm sido estudados há décadas e incluem comportamentos alimentares, microbiota bucal, transmissão de bactérias, higiene bucal, composição e quantidade de fluxo salivar, características morfológicas dos dentes, exposição ao flúor, *status* socioeconômico e acesso à saúde bucal (HUNTER, 1988; ANDERSON, 2002).

A saliva contém componentes que podem agir diretamente nas bactérias cariogênicas. Também é rica em cálcio e fosfatos que estão ativamente envolvidos no processo de re-mineralização do esmalte do dente. O fluxo salivar ajuda a desalojar agentes patogênicos (vírus, bactérias e leveduras) dos dentes e superfícies das mucosas (STOOKEY, 2008).

A morfologia do dente se refere ao número e forma das cúspides, sulcos, e até mesmo ao tamanho do dente como um todo. Mau posicionamento dos dentes, ranhuras e anatomia profunda e áreas de retenção devido à morfologia natural da estrutura do dente podem causar dificuldades na escovação dos dentes e, assim, serem considerado como fatores de risco à cárie (GUZMAN-ARMSTRONG, 2005).

Na cavidade bucal humana, existe um biofilme altamente diversificado, sendo que do grupo estreptococos, existem cerca de 25 espécies. Cada espécie coloniza um diferente local e tem propriedades específicas que conseguem resistir às agressões externas. Algumas destas espécies são etiologicamente responsáveis pelo processo carioso. As espécies *mutans* e *sobrinus*, são as espécies mais fortemente ligadas às lesões cariosas, devido a sua patogenicidade. A simples presença de estreptococos do grupo *mutans* não indica maior risco a cárie, já que este grupo faz parte da microbiota residente da boca, porém a interação das espécies *mutans*, *sobrinus* (NICOLAS; LAVOIE, 2010) e *sanguinis* (GE et al, 2008) pode levar à manifestação da cárie dentária. Outro grupo importante de bactérias residentes na boca, mas que apresenta espécies fortemente correlacionadas à cárie é representado pelos lactobacilos. Eles se instalam na cavidade bucal logo nos primeiros anos de vida e estão fortemente ligados com o consumo de açúcares. A característica primordial que torna o gênero *Lactobacillus* um excelente promotor do processo carioso é a capacidade de produzir ácidos e também sobreviver em meio ácido. No entanto, nem todas as espécies são cariogênicas, como é o caso da espécie *casei*, algumas chegam a diminuir a contagem de *S. mutans* (BADET; THEBAUD, 2008).

Uma alimentação balanceada é capaz de proporcionar um adequado estado nutricional, além de contribuir para uma desejável condição bucal do indivíduo. A alimentação e a nutrição são importantes no desenvolvimento dentário: a nutrição implica na ingestão e absorção dos nutrientes, bem como nos seus efeitos sobre os processos metabólicos e está relacionada ao equilíbrio entre o consumo fisiológico de energia e nutrientes, ambas participando do processo de determinação do estado nutricional dos indivíduos (BATISTA; MOREIRA; CORSO, 2007). A dieta pode influenciar na quantidade e tipo de formação de biofilme e os detritos e a presença de microrganismos cariogênicos nas superfícies dos dentes. As interações do potencial cariogênico de alimentos (por exemplo, sacarose), a frequência de ingestão de alimentos e do estado físico (ou tipo) de toda a dieta pode afetar individualmente ou em conjunto o processo de cárie (WENDELL et al., 2010).

Embora o conhecimento sobre o papel que a dieta desempenha na instalação e progressão da doença cárie seja conhecido há várias décadas (NEWBRUN, 1988), vários trabalhos têm sido realizados buscando esclarecer melhor este ponto. Isto talvez ocorra pela dificuldade encontrada na prática clínica

diária em fazer pacientes e seus responsáveis seguirem as recomendações a este respeito (KRASSE, 1988; SHEIHAM, 2015).

O paciente quando é motivado a fazer uma higiene bucal com qualidade, consegue remover o biofilme satisfatoriamente, prevenindo contra lesão cariosa, doença periodontal, retração gengival e abrasão. O paciente precisa se adaptar à melhor técnica de escovação, para fazer uma higiene bucal com qualidade, sendo mais importante a qualidade do que a frequência de escovação (GUEDES-PINTO, 2010; SANTOS et al., 2007).

2.3 GENÉTICA E CÁRIE DENTÁRIA

A cárie dentária em si é um processo destrutivo causando demineralização do esmalte do dente e levando à destruição continuada de esmalte e dentina, e, eventualmente, à cavitação do dente. Desmineralização do esmalte conduz à cárie e por outro lado, a remineralização pode ajudar a prevenir esta doença. Assim, os genes que regulam a formação do esmalte / dentina devem fazer contribuições significativas, quando alterados, para a experiência de cárie. Há duas teorias plausíveis que explicam como os genes relacionados à formação do esmalte podem associar-se com o desenvolvimento de lesões de cárie: eles interagem com bactérias orais (tais como *Streptococcus mutans*) para afetar a suscetibilidade à cárie e / ou alterar a espessura do esmalte, causando maiores níveis de perdas de minerais, ou facilitando a fixação bacteriana e o acúmulo de biofilme (PATIR et al., 2008).

Numerosos esforços no mapeamento de genes têm sido feitos para identificar um *locus* gênico específico que deva contribuir para a susceptibilidade à cárie (WERNECK; LÁZARO; COBAT, 2010). Genes responsáveis pela formação do esmalte têm sido propostos como potencialmente envolvidos na suscetibilidade à cárie, e associações positivas entre a variação genética nos genes amelogenina, tuftelina e enamelina e a maior experiência de cárie foram relatadas (SLAYTON; COOPER; MARAZITA, 2005). Com estes resultados pode-se propor que a variação na superfície do esmalte pode ser um fator predisponente em indivíduos para o desenvolvimento de lesões de cárie. A identificação de indivíduos com "esmalte predisponente para a cárie" permitiria pensar em estratégias preventivas para o controle da doença (SHIMIZU et al., 2012).

Dada a evidência de um componente genético para a cárie dentária, a descoberta de genes e vias adicionais podem melhorar significativamente a identificação de indivíduos de risco e reforçar a implementação de estratégias de prevenção orientadas para a fase crítica antes do início da cárie. Alguns estudos evidenciaram a associação de genes específicos e a cárie em humanos. Tuftelina e diferentes níveis de *Streptococcus mutans* foram estudados e relacionados com a cárie (SLAYTON; COOPER; MARAZITA, 2005).

Doenças genéticas humanas são classificadas em duas categorias: 1) doenças mendelianas e 2) doenças complexas. Doenças mendelianas são raras e geralmente causadas pela variação em um único gene (monogenética). Apresentam uma perfeita correlação entre o genótipo e fenótipo. Doenças complexas são resultados da interação entre fatores genéticos e não genéticos (SORENSEN et al., 1988).

Desde o início do século XX pesquisadores já haviam começado a avaliar a suscetibilidade genética à cárie dentária por meio de estudo de gêmeos monozigóticos e dizigóticos. Em 1927, Bachrach e Young fizeram um estudo com 301 pares de gêmeos, destes 130 eram monozigóticos e 171 dizigóticos. Resultados indicaram que gêmeos monozigóticos apresentavam incidência de cárie similar e os dizigóticos de gêneros diferentes tinham uma variação maior (BACHRACH; YOUNG, 1927).

Klein e Palmer (1938) estudaram famílias e indicaram que a cárie tem um componente genético. Shuler (2001), em sua revisão sistemática de literatura, apontou que gêmeos idênticos tinham cárie em dentes correspondentes, indicando que a herança genética é um fator contribuinte no risco à cárie dentária.

Estudos sobre pares de gêmeos monozigóticos criados separadamente sugerem uma contribuição genética para o estabelecimento da cárie de 40% (CONRY et al., 1993). Estudos de gêmeos criados juntos estimam a herança desta doença, ajustado para idade e sexo, em 45-64% (BRETZ et al., 2005). No entanto, hábitos compartilhados dentro de famílias podem contribuir para a covariância entre parentes e imitar a correlação genética. Deve-se, portanto, levar em consideração todos os fatores para realizar o delineamento experimental (POTTER, 1990).

Com o passar do tempo, as pesquisas com gêmeos monozigóticos e dizigóticos evoluíram sistematicamente, assim como suas técnicas de avaliação (SHULER, 2001). Goldberg (1930), Horowitz (1958), Mansbridge (1959) e Finn (1963), detectaram um componente genético na suscetibilidade à cárie dentária e demonstraram que ocorrência de cárie em gêmeos monozigóticos obteve concordância maior que nos dizigóticos.

Durante o desenvolvimento dos dentes, a amelogenina e outros componentes da matriz dentinária (enamelinina, ameloblastina) são depositadas por ameloblastos secretores de esmalte de uma maneira altamente estruturada de modo a formar prismas que são completamente mineralizados durante a maturação, com a degradação de componentes proteicos e deposição de minerais de hidroxiapatita. O esmalte é composto por aproximadamente 96% de minerais, 3% de água, e 1% de material orgânico. A maior parte do material orgânico está localizado no interior do esmalte, onde forma estruturas muito características chamadas tufo de esmalte devido à sua aparência na junção amelo-dentinária (DUVERGER et al., 2014).

A literatura relata que existem alguns genes envolvidos na formação do esmalte dentário, ou seja: amelogenina (*AMELX*), enamelinina (*ENAM*), calicreína - 4 (*KLK4*), metaloprotease de matriz-20 (*MMP 20*), ameloblastina (WRIGHT et al., 2009) e além dos que foram descobertos recentemente, *DLX3* (STEPHANOPOULOS et al., 2005), *FAM83H* (WRIGHT et al., 2009, HAUBEK et al., 2011) *WDR725* (WRIGHT et al. 2011) e *SLC4A4* (URZÚA et al., 2009). Tuftelina também é associada à cárie dentária (SLAYTON et al. 2005).

2.3.1 AMELOGENINA

O gene Amelogenina (*AMELX*) codifica um membro da família da proteína amelogenina da matriz extracelular e tem um papel importante no desenvolvimento do esmalte dentário, na sua biomineralização. O gene amelogenina ligado ao X está localizado no cromossomo Xp22.31 - p22.1 (KANG; YOON; CHOO, 2011) (Figura 1).

Mutações conhecidas do gene amelogenina (*AMELX*) aparentam ser críticas na mineralização do esmalte dentário. Defeitos no gene *AMELX* estão associados com amelogênese imperfeita, uma variedade de doenças caracterizadas por hipoplasia do esmalte (SIMMER; HU, 2002). Além disso, de acordo com Deeley et al. (2008), que examinaram a associação entre o gene amelogenina e experiência

de cárie na população da Guatemala, alterações no gene amelogenina foram associadas com aumento à cárie ajustadas por idade.

Kang, Yon, Choo (2010) realizaram a genotipagem de três polimorfismos de nucleotídeo único (rs17878486, rs5933871, rs5934997) no gene *AMELX*. A intenção deste estudo era avaliar se a variação no gene *AMELX* poderia contribuir para a suscetibilidade à cárie em crianças coreanas. Os autores comprovaram a existência da relação entre polimorfismos de nucleotídeo único em *AMELX* (rs5933871 e rs5934997) e a suscetibilidade a cárie dentária.

Hu et al. (1997) afirmam que o gene amelogenina tem expressão diferencial em homens e mulheres. As mutações e polimorfismos no gene amelogenina causam uma das formas de amelogênese imperfeita. No entanto, amelogênese imperfeita pode ser expressa de forma diferente dependendo do gênero do indivíduo afetado (ALVELSALO, 1997).

Ambos os cromossomos X e Y têm uma versão do gene amelogenina. No entanto, as sequências de aminoácidos de ambas as proteínas parecem diferir, e os produtos de transcrição dos cromossomos X e Y são tanto quantitativa como qualitativamente diferentes (ALVELSALO, 1997). O *locus* do cromossomo Y codifica uma proteína funcional, embora o seu nível de expressão seja de apenas 10% em relação ao *locus* no cromossomo X (SALIDO et al., 1992). Pode-se especular que a variação de amelogenina X altera a estrutura do esmalte e aumenta a suscetibilidade à cárie e que a expressão amelogenina adicional de 10% no sexo masculino, em parte, explica por que as mulheres tendem a mostrar suscetibilidade mais elevada de experiência de cárie (PATIR et al., 2008).

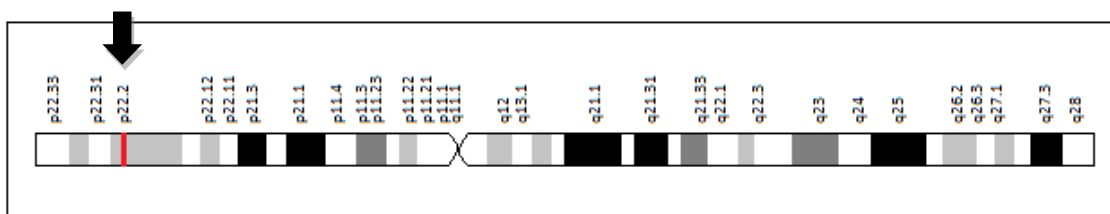


Fig1: Localização do gene *AMELX* no cromossomo X.

2.3.2 ENAMELINA

A proteína da matriz extracelular do esmalte dentário, enamelina, foi identificada por Fukae et al. (1993). Esta proteína é produzida por ameloblastos, durante a fase secretora do esmalte. Na polpa dentária, há a expressão de pequenos níveis de enamelina, presumivelmente secretada por odontoblastos. Western, utilizando a imuno-histoquímica, mostra que a enamelina intacta (186kDa) e os produtos de clivagem da enamelina (155 kDa, 142 kDa, 89 kDa) estão presentes apenas na superfície do esmalte e não se acumulam na matriz (HU et al., 1997).

Estudo realizado em crianças da Turquia mostrou que existe a possível interação entre a alteração genética do gene enamelina e o *Streptococcus mutans* (uma das bactérias precursoras da cárie dentária), e o agravamento da saúde bucal do indivíduo (PATIR et al., 2008).

Enamelina é específica do esmalte dentário, não sendo detectada em outros tecidos do corpo humano. Um papel que é sugerido para enamelina é controlar a formação de cristais juntamente com amelogenina, a mais abundante das proteínas da matriz do esmalte, e subsequentemente, construir uma estrutura de cristais de hidroxiapatita altamente organizada (BARLETT, 2012).

O gene *ENAM* (4q13.3) foi mapeado no cromossomo 4 (Figura 2), assim como, o gene da ameloblastina (genes separados apenas por 15 kb), sugerindo que esta região pode conter um grupo de genes que codificam proteínas do esmalte. Recentemente, mutações do gene enamelina foram identificadas em formas autossômicas dominantes de amelogenese imperfeita hipoplásica. Os primeiros relatos de mutação no gene enamelina em humanos foram no íntron 7 por uma única substituição de base, o que resultou em uma forma grave de amelogenese imperfeita hipoplásica (SANTOS; LINE, 2005).

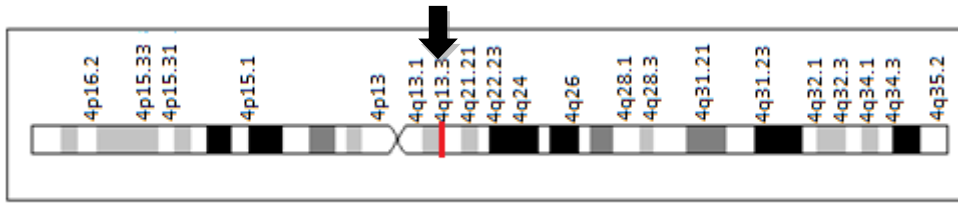


Fig 2: Localização do gene *ENAM* no cromossomo 4.

3 PROPOSIÇÃO

Geral:

- Avaliar a possível relação entre o polimorfismo de genes que codificam proteínas formadoras do esmalte dentário e a suscetibilidade à cárie dentária em escolares com idade entre 15 e 19 anos pertencentes a escolas públicas do município de Londrina-PR.

Específica:

- Verificar a prevalência de cárie dentária em alunos de escolas públicas do município de Londrina – PR;
- Identificar o perfil sociodemográfico dos alunos e suas famílias.
- Conhecer os comportamentos em saúde bucal dos alunos.
- Determinar as frequências genotípicas dos genes amelogenina e enamelinina na população de estudo;

4 ARTIGO

Polimorfismo nos genes enamelina e amelogenina e sua relação com a cárie dentária

Será submetido ao periódico Brazilian Oral Reserch

Paula Marino Costa¹, Sandra Mara Maciel², Maria Paula Jacobucci Botelho³, Regina Célia Poli-Frederico⁴

¹. Mestre em Dentística pela Universidade Norte do Paraná, Londrina, PR, Brasil. E-mail: paula.maarino@hotmail.com

². Professora associada do departamento de odontologia da UEM. E-mail: sandramaciel53@gmail.com

³. Professora do Departamento de Odontologia da UniCesumar, Maringá, PR/Brasil.

⁴. Professora Adjunta do Departamento de Odontologia da Universidade Norte do Paraná, Londrina, PR/Brasil. E-mail: reginafrederico@yahoo.com.br

Endereço para correspondência

Profa. Dra. Regina Célia Poli-Frederico
Universidade Norte do Paraná, Faculdade de Odontologia
Rua Marselha, 183 - Jardim Piza
Londrina – PR/Brasil CEP: 86041-120
Telefone: (43) 3371-7820 Fax: (43) 3371-7741
E-mail: reginafrederico@yahoo.com.br

Abstract

The roles of microorganisms and diet are widely understood, as well their setting up and progression. However, there seems to be a genetic component, which influences the development of dental caries. Scientific literature and dental research data have reported that a kind of polymorphism in amelogenin gene (AMELX) and enamelin (ENAM) genes, which are responsible for enamel formation, they also have been seen as potentially involved in this specific disease. The aim of this study was to evaluate if the occurrence of dental caries in adolescents is related to the polymorphism in AMELX and ENAM genes. For an assessment of caries prevalence it was used the Index of Decayed, Missing and Filled (DMF-T), according to criteria of the World Health Organization. The DNA samples, extracted from the oral mucosa cells, were quantified by a spectrophotometer ND-1000 (NanoDrop), and then diluted into a final concentration of 30 ng/ μ L. For the analysis of single nucleotide polymorphisms (SNPs) of AMELX genes (rs17878486) and ENAM (rs7671281) amplification technique of DNA fragments by polymerase chain reaction was performed (PCR) in real time by TaqMan system (Applied Biosystems, Foster City, USA). For the statistical data analysis, it was performed using Fisher exact test and chi-square with significance level of 5%. According to the statistical data of this study, only socioeconomic factors had an influence on caries experience. It was concluded that the genetic component in this study population, did not influence the development of caries.

Keywords: Dental caries. Genetic polymorphism. Adolescents. Enamel. Dental Caries Susceptibility.

4.1 INTRODUÇÃO

Graças à implementação de medidas de saúde pública, como distribuição de escovas de dente e dentifrício com flúor, acesso à água fluoretada, ampliação do acesso aos serviços odontológicos, houve uma significativa melhora na saúde bucal da população brasileira. De acordo com os dados do projeto SBBrasil 2010, o Brasil passou de uma condição de média prevalência de cárie para baixa prevalência de cárie, tendo como parâmetro o grupo etário de 12 anos. No entanto, na população de 15 a 19 anos, apesar de ter ocorrido uma redução significativa desta doença em relação ao levantamento nacional anterior (Brasil 2004). A média dos dentes afetados por cárie foi de 4,25, representando mais do que o dobro do número médio encontrado aos 12 anos (Brasil 2011).

Para que o controle e a prevenção da doença cárie sejam efetivos, torna-se inquestionável a necessidade de pesquisar o maior número de fatores predisponentes desta doença, antes que ela se instale ou se agrave. Atualmente, estudos tem sido realizados para provar que há um componente genético que influencia na suscetibilidade à cárie e pesquisas realizadas em seres humanos apontaram que alterações em genes formadores do esmalte e sua interação com *Streptococcus mutans* podem contribuir para o desenvolvimento da doença (Patir et al. 2008). Os genes que codificam proteínas que formam o esmalte dentário, quando mutados, foram propostos como potencialmente envolvidos com a cárie, e foram relatadas associações positivas entre a ocorrência desta e a variação genética no genes amelogenina, tuftelina e enamelina (Shimizu et al. 2012).

Estudos feitos anteriormente comprovaram a relação genética entre o gene amelogenina (*AMELX*), gene responsável por contribuir na formação do esmalte dentário, e a doença em questão. Defeitos no gene *AMELX* estão associados com amelogênese imperfeita (Simmer & Hu 2002).

Por outro lado, pesquisa realizada com crianças turcas demonstrou a possível interação entre a alteração genética do gene enamelina (*ENAM*) e o *Streptococcus mutans*, tornando o hospedeiro suscetível ao desenvolvimento da cárie dentária (Patir et al. 2008). É sugerido que a enamelina controla a formação de cristais juntamente com amelogenina, a mais abundante das proteínas da matriz do esmalte, e subsequentemente, constrói uma estrutura de cristais de hidroxiapatita altamente organizada (Barlett 2013). Desta forma, sugere-se que variações

genéticas nesses genes devem contribuir para alterações estruturais no esmalte dentário que podem causar altos níveis de perdas minerais, maior suscetibilidade ao ataque bacteriano e deposição do biofilme (Patir et al. 2008). Assim a hipótese do nosso estudo foi que polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs) nos genes *AMELX* e *ENAM* devem ter relação com a cárie dentária. O objetivo deste trabalho foi investigar a influência que polimorfismos nestes genes podem causar no desenvolvimento da cárie em adolescentes.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

As amostras de DNA utilizadas nesta pesquisa (Fig. 1) foram coletadas no ano de 2008, em um estudo transversal realizado com adolescentes de escolas públicas para a dissertação de mestrado da aluna Denise Morim (Relação entre polimorfismos do gene do paladar amargo **TAS2R38** e a ocorrência da cárie dentária). Estas amostras foram devidamente acondicionadas sob refrigeração (-80°C) para não haver a desnaturação do DNA. Os DNA que não eram válidos foram descartados, totalizando a amostra de 123 alunos (n=123), exceto para a avaliação dos SNPs (rs17878486) no gene amelogenina, onde a amostra foi constituída de 82 indivíduos (n=82), em função de problemas laboratoriais. Os dados utilizados do questionário e índice de cárie dos alunos também foram coletados neste ano de 2008.



Fig. 3: Amostras contendo DNA.

Para a pesquisa realizada no ano de 2008, um estudo transversal foi desenvolvido com uma amostra de 157 adolescentes de ambos os gêneros, com idades entre 15 e 19 anos, matriculadas na rede pública de ensino médio de Londrina, PR. Para a seleção dos alunos, o município foi dividido por estratos em 5 regiões geográficas (norte, sul, leste, oeste e centro). Em cada uma dessas regiões, as escolas foram classificadas como sendo de grande e pequeno porte, segundo o número de estudantes matriculados. Os critérios de elegibilidade foram os adolescentes pertencerem a escolas públicas de Londrina-PR e terem a idade entre 12 e 19 anos.

A partir destas amostras de DNA anteriormente coletadas, foi avaliada a frequência de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) pela reação de cadeia da polimerase (PCR). Nosso foco foi o SNPs no gene que codifica a amelogenina - *AMELX* C__2190967_10 (rs17878486) que pode apresentar a substituição de

Citosina para Timina, e o gene que codifica a enamelinina - *ENAM C__25763290_10* (rs76711281), onde pode ocorrer também uma troca de Citosina por Timina.

4.2.1 ÉTICA

Este estudo prévio foi submetido à avaliação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Norte do Paraná (UNOPAR), recebendo parecer favorável à sua execução (Protocolo PP 0012/08 – anexo A).

Para a coleta de dados, questionário e amostras de saliva, foi requerida a autorização das direções das escolas selecionadas e um termo de consentimento livre e esclarecido foi enviado para os responsáveis dos alunos participantes do projeto.

4.2.2 EXAME CLÍNICO

Como variável dependente, foram considerados níveis de lesões de cárie dentária, conforme aferido pelo índice CPO-D (dentes permanentes perdidos, cariados e obturados), seguindo os critérios de diagnóstico definidos pela Organização Mundial da Saúde.

As avaliações bucais foram realizadas por um único examinador, previamente treinado e calibrado. Os exames clínicos foram conduzidos em uma sala sob luz natural, com auxílio de um espelho clínico plano e sonda. O examinador realizava limpeza com gaze para remover os detritos alimentares, quando necessário. O exame clínico registrou a prevalência da cárie dentária.

4.2.3 QUESTIONÁRIO

As características sociodemográficas dos indivíduos e suas famílias foram obtidas por meio de questionário aplicado aos adolescentes. O instrumento da coleta de dados permitia o registro de informações demográficas e socioeconômicas, e outras relacionadas à saúde bucal (morbidade bucal referida, uso de serviços, autopercepção e impactos). Além de obter registros de alimentação e higiene oral.

Os dados obtidos pelo questionário aplicado aos escolares serão utilizados como meio de avaliação dos impactos que a condição social, alimentação, acesso a saúde e histórico familiar de doença bucal têm em relação a saúde bucal atual deles.

4.2.4 ANÁLISE DOS POLIMORFISMOS DOS GENES *AMELX* E *ENAM*

4.2.4.1 Extração do DNA

As amostras de DNA dos adolescentes foram extraídas de acordo com o método descrito por Aidar & Line (2007) modificado. Foi solicitado que os escolares fizessem um bochecho com 5ml de dextrose (glicose) a 3% durante 1 minuto e que durante este procedimento esfregassem a língua na mucosa bucal e nos dentes. O conteúdo do bochecho foi desprezado em tubos de centrífuga de 15 ml através de um funil.

4.2.4.2 Genotipagem para os genes *AMELX* e *ENAM*

Os DNA extraídos foram quantificados em um Espectrofotômetro ND - 1000 (Nanodrop) e posteriormente diluídos em uma concentração final de 30 ng/ μ L. Polimorfismos de nucleotídeos únicos *AMELX* C__2190967_10 (rs17878486), substituição de C para T, e o gene que codifica a enamina – *ENAM* C__25763290_10 (rs76711281), aqui, também, uma substituição de C para T. Selecionados a partir de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP> e analisados usando ensaios TaqMan validados (*Applied Biosystems*, Foster City, CA). *Primers* para a reação em cadeia da polimerase (PCR) e as sondas TaqMAN foram desenhadas pela *Applied Biosystems*.

4.2.5 REAÇÃO EM CADEIRA DA POLIMERASE (PCR) EM TEMPO REAL E ANÁLISE DOS POLIMORFISMOS DE *AMELX* E *ENAM*

Para a análise dos polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs) dos genes *AMELX* e *ENAM* foi realizada a técnica de amplificação dos fragmentos de

DNA por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real pelo sistema TaqMan (Applied Biosystems, Foster City, USA).

Os ensaios foram conduzidos em placas de 96 poços contendo um volume final de reação em cada poço de 20 uL consistindo de: DNA genômico 30ng, Máster Mix 1x e os *primers* 1x (ensaio desenvolvido pela *Applied Biosystems*: C__2190967_10 para *AMELX* e C__25763290_10 para *ENAM*). A PCR pelo sistema TaqMan foi realizada em um termociclador automático (*Applied Biosystems* 7500 Real Time PCR Systems), sob as seguintes condições: 95 °C por 10 minutos (ativação inicial), seguido por 50 ciclos de 95 °C por 15 segundos (desnaturação do DNA) e 60 °C por 1 minuto e 30 segundos (pareamento dos *primers* e duplicação do DNA) (Figura 4). Após a PCR completa, a placa foi lida e os resultados analisados para a discriminação alélica por meio do software detector de sequência (StepOne Plus Real-time PCR System - Applied Biosystems).

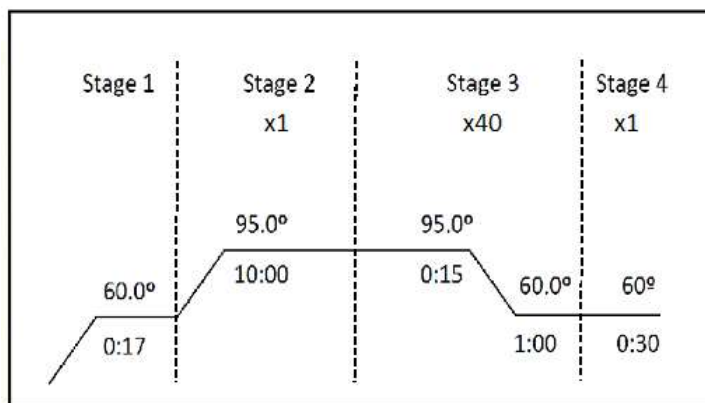
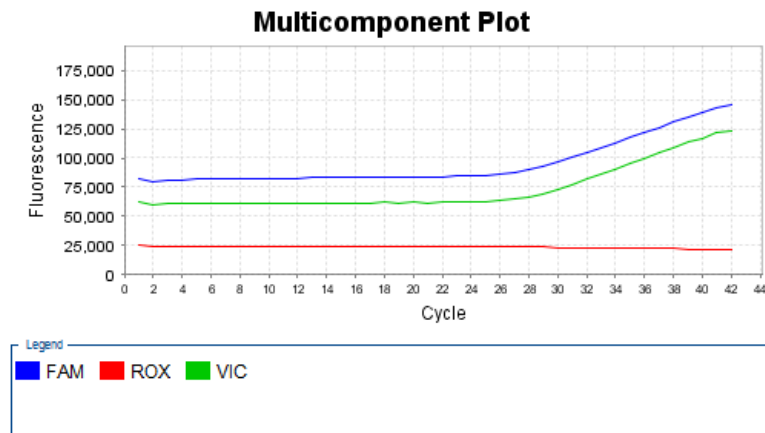
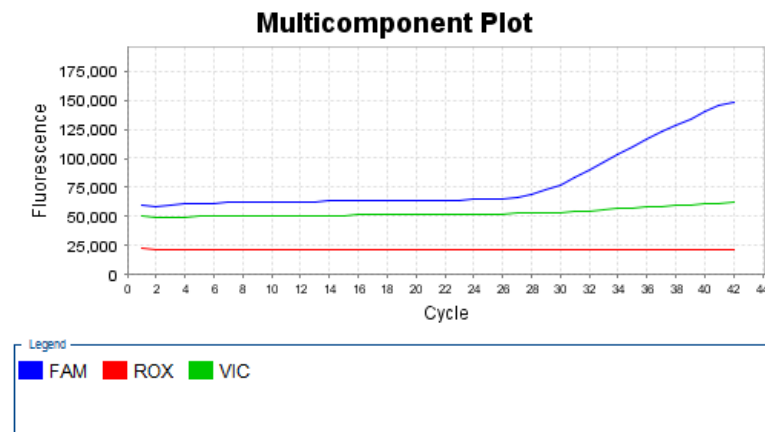


Fig 4: Condições da reação em cadeia da polimerase (PCR).

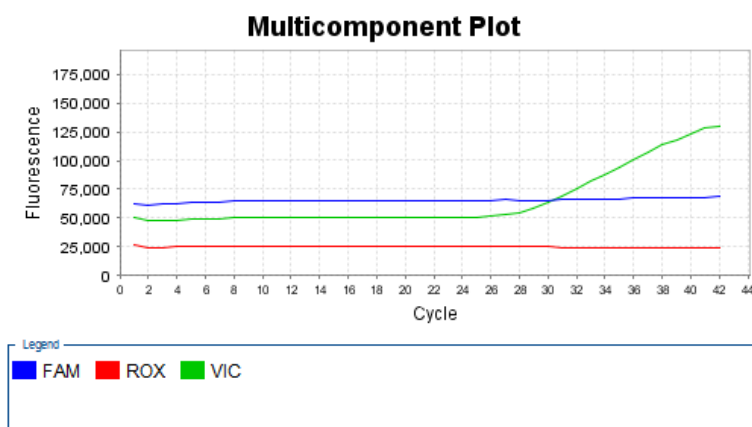
Figura 5: Representação gráfica de indivíduos portadores dos genótipos (a) heterozigoto CT, (b) homozigoto TT, (c) homozigoto CC.



(a) Heterozigoto CT



(b) Homozigoto TT



(c) Homozigoto CC

4.2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi utilizado o pacote estatístico Statistical Package for Social Science – SPSS, versão 17.0, com único digitador, propiciando a pesquisa uma maior fidedignidade e confiabilidade. Após a realização da coleta dos dados, estes foram processados para a confecção de um banco de dados. Foi feita a análise descritiva dos mesmos, e o teste Exato de Fisher e de associação do Qui-quadrado foram empregados, utilizando-se o nível de significância de 5% para identificar prováveis relações significantes entre as variáveis genéticas/comportamentais e a ocorrência de cárie dentária entre os adolescentes estudados.

4.3 RESULTADOS

Os resultados do levantamento epidemiológico realizado nos adolescentes das escolas públicas de Londrina-PR, estão expressos na tabela 1. Dos 123 participantes da pesquisa, 85 (69,1%) foram do gênero feminino e 81 (61,9%) de etnia branca e maior parcela tinha idade entre 14 e 15 anos (43,1%).

A maioria do adolescentes mostraram ter pelo menos um dente cariado (60,2%). O índice CPO-D encontrado para os adolescentes com cárie foi de 3,67 (DP= 2,2). Dos 123 participantes do estudo, 88,6% apresentavam hábito de beliscar. Os que consumiam doces diariamente foram 26% dos estudantes avaliados e 74% relataram ingerir dois ou mais doces por dia.

Com relação à renda familiar, 45,5% dos adolescentes disseram ter o salário familiar entre 350 a 1245 Reais. Metade das mães apresentava escolaridade entre 0 a 8 anos de estudo e 56,1% fizeram visitas ao dentista regularmente.

A frequência genotípica da enamulina foi de CC 0,08, TT 0,75 e CT 0,16. Da amelogenina, CC 0,04, TT 0,75 e CT 0,19 e estão expressos nos gráficos 1 e 2, respectivamente.

A frequência alélica dos participantes da pesquisa na enamulina foi de 0,16 para o alelo C e 0,87 para o alelo T. Na amelogenina, o C foi de 0,14 e o alelo T 0,85.

No presente estudo foi observada uma associação estatisticamente significativa entre as variáveis hábito de beliscar, consumo de doces em geral, escolaridade materna e a experiência de cárie (Tabela 2).

Pode ser verificado que 94,6% dos escolares que apresentavam hábito de beliscar entre as refeições tinham carie dentária, enquanto que 20,4%

daqueles que não tinham o hábito, estavam livres da doença. Dos que apresentavam a doença cárie, 78,4% consumiam mais de dois doces por dia.

A escolaridade materna também teve influência nesta pesquisa, sendo que os filhos de mães com menos anos de estudo tendiam a apresentar a cárie dentária. Ou seja, 60% dos filhos de mães que tinham de 0 a 8 anos de estudo, apresentavam lesões cariosas (Tabela 2).

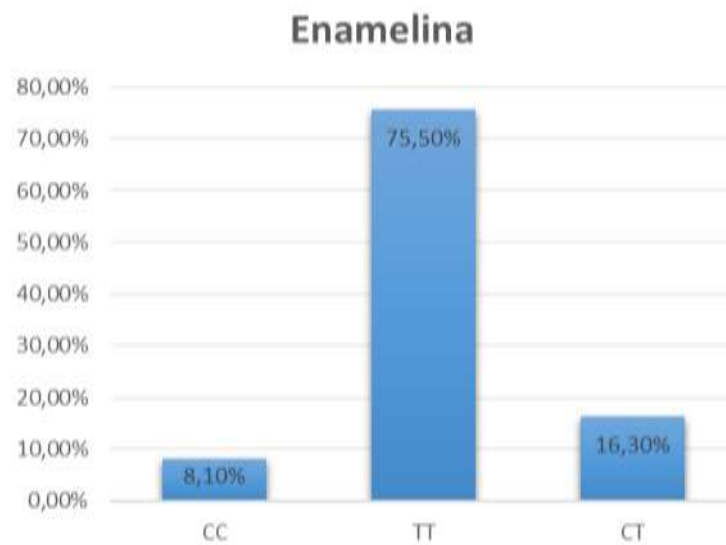


Figura 6 - Gráfico 1: Frequência genotípica para o gene enamelina na população estudada.

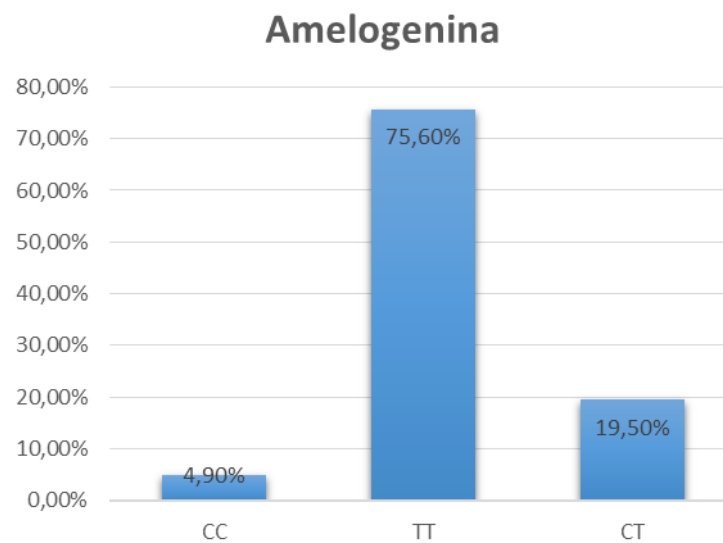


Figura 7- Gráfico 2: Frequência genotípica para o gene Amelogenina na população estudada.

TABELA 1- Distribuição das variáveis sócio demográficas e econômicas, comportamentais, de saúde bucal e genéticas na população de escolares de 12 a 19 anos de idade de escolas públicas do município de Londrina/PR.

Características	N	%
Sociodemográficas		
Gênero		
Feminino	38	30,9
Masculino	85	69,1
Idade		
14 a 15	53	43,1
16	35	28,5
17 ou +	35	28,5
Cor		
Branca	81	65,8
Não branca	42	34,1
Socioeconômicas		
Renda familiar		
350 a 1245	46	45,5
1245 a 2075	30	29,7
Acima de 2075	25	24,8
Escolaridade materna		
0 a 8 anos	67	54,5
9 a 11 anos	40	32,5
Acima de 12	16	13,0
Visitas regulares ao dentista		
Sim	54	43,9
Não	69	56,1
Comportamentais		
Frequência de consumo de doces em geral		
1	32	26,0
2 ou +	91	74,0
Hábito de beliscar		
Sim	109	88,6
Não	14	11,4
Saúde bucal		
Histórico de cárie		
Com cárie	74	60,2
Sem cárie	49	39,8
Genética		
Enamelina		
CC	10	8,1
TT	93	75,6
CT	20	16,3
Amelogenina		
CC	4	4,9
TT	62	75,6
CT	82	19,5

TABELA 2 – Relação entre as variáveis deste estudo e a experiência de cárie dentária em escolares da rede pública de Londrina/PR.

Variáveis	Com cárie		Sem cárie		χ^2	Valor de P
	N	%	N	%		
Gênero						
Feminino	50	(67,6)	35	(71,4)	0,21	0,65
Masculino	24	(32,4)	14	(28,6)		
Idade						
14 a 15	33	(44,6)	20	(40,8)	0,23	0,89
16	20	(27,0)	15	(30,6)		
17 ou +	21	(28,4)	14	(28,6)		
Cor						
Branco	46	(62,1)	35	(71,4)	0,34	0,48
Não branco	28	(37,9)	14	(28,6)		
Renda familiar						
350 a 1245	28	(47,5)	18	(42,9)	1,5	0,46
1245 a 2075	19	(32,2)	11	(26,2)		
Acima de 2075	12	(20,3)	13	(31,0)		
Escolaridade materna						
0 a 8 anos	45	(60,0)	22	(44,0)	6,9	0,031
9 a 11 anos	24	(33,3)	16	(34,0)		
Acima de 12	5	(6,7)	11	(22,0)		
Visitas regulares ao dentista						
Sim	42	(56,8)	27	(55,1)	0,03	0,85
Não	32	(43,2)	22	(44,9)		
Frequência de consumo de doces em geral						
1	16	(21,6)	16	(32,7)	9,5	0,023
2 ou +	58	(78,4)	33	(67,3)		
Hábito de beliscar						
Sim	70	(94,6)	39	(79,6)	6,5	0,02
Não	4	(5,4)	10	(20,4)		
Enamelina						
CC	6	(8,1)	4	(8,2)	0,24	0,89
TT	55	(74,3)	38	(77,6)		
CT	13	(17,6)	7	(14,3)		
Amelogenina						
CC	2	(4,2)	2	(5,9)	0,22	0,89
TT	36	(75,0)	26	(76,5)		
CT	20	(10,8)	6	(17,6)		

4.4 DISCUSSÃO

A saúde bucal é fundamental para que o indivíduo seja saudável como um todo, e na presença da doença cárie dentária, dificulta a capacidade da pessoa de comer, falar e até de socializar (Parker 2007). Como a cárie é uma doença multifatorial, é necessário conhecer os fatores predisponentes para sua formação. Há alguns fatores biológicos que influenciam a doença, como a má higiene bucal, a presença de bactérias cariogênicas, exposição inadequada ao flúor, hábitos alimentares errados (Selwitz, Ismail, Pitts 2007), genética (KANG et al. 2011), além dos fatores socioeconômicos (Peres et al. 2005).

Estudos tem tentando comprovar que há um fator genético que influencia no estabelecimento da cárie (Shuler 2001). A variação nos genes que codificam o esmalte dentário, quando mutados, pode levar a perda de minerais (Deeley et al. 2008). Amelogenina pode ser associada com a suscetibilidade à cárie dentária (Kang et al. 2011). Estudo realizado em crianças da Turquia mostrou a possível interação entre a alteração genética na enamelina e o *Streptococcus mutans*, pode agravar a saúde do indivíduo (Patir et al. 2008).

Nesta pesquisa, foram investigados estes dois genes envolvidos na formação do esmalte, o *AMELX* (rs 17878486) e o *ENAM* (rs76711281). Ambos não mostraram associação significativa com a cárie dentária nesta população do estudo. Assim como um estudo realizado em coreanos por Kang et al., não foi possível provar a associação entre cárie dentária e o polimorfismo do *AMELX* (rs17878486). Porém, nesta mesma pesquisa realizada em coreanos, foram investigados mais dois SNPs do *AMELX* (rs5933871 e rs5934997) e os autores comprovaram a influência genética destes dois SNPs com a cárie na população da Coreia (Kang et al. 2011).

Foram encontradas mutações nos genes *AMELX* e *ENAM*, em um estudo realizado no Brasil e na Turquia, e os autores concluíram que as mutações podem levar à amelogenese imperfeita (Jeremias et al. 2013).

A frequência alélica dos participantes da pesquisa na amelogenina foi de C 0,14 e o para o alelo T 0,85. Comparando com estudo feito em coreanos, que mostrou que o C e o T, representam 0,026 e 0,97, respectivamente (Kang et al 2011). Na população coreana, quase 100% apresenta frequência do alelo T, assim como no Brasil, que a maioria (85%) também apresenta o alelo T.

O principal achado do estudo foi a positiva associação do comportamento, que se refere ao hábito de beliscar e ingestão de doces em geral, com a cárie dentária, que nesta população estudada foi o que teve mais influência. O fator primordial para a prevenção da cárie é o controle do açúcar (Moynihan 2005). Deve-se realizar um aconselhamento sobre educação nutricional para os pais, para que estes ensinem os filhos e reduzam a exposição ao açúcar, diminuindo então a prevalência de cárie dentária (Tinanoff, Palmer 2000). A dieta representa um papel muito importante na instalação e desenvolvimento da doença cárie e embora seja muito difícil conseguir a adesão dos pacientes e/ou seus responsáveis às orientações sobre alterações na dieta (Krasse 1988). A importância do consumo do açúcar na cárie dentária é erroneamente não explorada em estratégias preventivas (Sheiham, James 2015). Além disso, populações de baixa renda ainda são particularmente suscetíveis à essa doença, devendo-se intervir em seus fatores de risco para diminuir sua prevalência. A OMS recomenda que fatores de risco comuns a determinadas doenças sejam identificados e controlados visando à saúde global do indivíduo. A cárie e a obesidade, dois sérios problemas de saúde pública, têm a dieta como fator comum (Watt 2005).

Fatores de risco sociais e biológicos acumulados precocemente na vida, contribuem para o desenvolvimento de altos níveis de cárie dentária na infância (Peres et al. 2005). O nível de escolaridade materna, como fator de risco social, teve associação estatística positiva com a presença da cárie dentária nos adolescentes.

No entanto, o nosso estudo tem algumas limitações. Nós não tínhamos radiografias, lesões de modo interproximal ou cárie secundária debaixo do material restaurador pode não ter sido detectados. Além disso, o número de participantes dos grupos com e sem experiência de cárie não apresentavam o mesmo n amostral. pois Por problemas laboratoriais, não foi possível obter a frequência genotípica da amelogenina em todos os participantes. Considerando o limitado tamanho amostral, estes resultados precisam ser replicados em outras populações maiores.

4.5 CONCLUSÕES

Conclui-se que nesta população de estudo os fatores ambientais, socioeconômicos e comportamentais tiveram maior relevância do que os fatores biológicos, ou seja, os fatores genéticos. Deve-se em pesquisas futuras investigar outros genes envolvidos na cárie dentária, com uma população maior de estudo.

4.6 REFERÊNCIAS DO ARTIGO

- 1- Aidar M, Line SR. A simple and cost-effective protocol for DNA isolation from buccal epithelial cells. *Braz. Dent. J.* v. 18; n. 2, p. 148-152, 2007.
- 2- Brasil. Ministério da Saúde. *Projeto SB Brasil 2010: Pesquisa Nacional de Saúde Bucal*. Brasília, 2011.
- 3- Bartlett J D. Dental Enamel Development: Proteinases and Their Enamel Matrix Substrates. *ISRN Dent.* V. 16, 2013.
- 1- Deeley K, Letra A, Rose EK, Brandon C.A, Resick JM, Marazita ML, Vieira AR. Possible association of amelogenin to high caries experience in a Guatemalan-Mayan population. *Caries Res* 2008; 42:8-13.
- 2- Jeremias F, Koruyucu M, K uchler EC, Bayram M, Tuna EB, Deeley K, Pierri RA, Souza JF, Fragelli CM, Paschoal MA, Gencay K, Seymen F, Caminaga RM, dos Santos-Pinto L, Vieira AR. Genes expressed in dental enamel development are associated with molar-incisor hypomineralization. *Arch Oral Biol* 2013; 58(10): 1434-42.
- 3- Kang SW, Yoon I, Cho J. Association between AMELX polymorphism and dental caries in Koreans. *Oral Dis* 2011; 17: 399-406.
- 4- KRASSE, B. *Risco de c aries*. São Paulo: Quintessence, 1988.
- 5- Moynihan PJ. The role of diet and nutrition in the etiology and prevention of oral diseases. *Bull World Health Organ.* 2005; 83(9): 694-699.
- 6- Parker EJ, Jamieson LM. Oral health comparisons between children attending an Aboriginal health service and a Government school dental service in a regional location. *Rural Remote Health* 2007; 7:625:.
- 7- Patir A, Yildirim M, Poletta FA, Mereb JC, Resick JM, Brandon CA, Orioli IM, Castilla EE, Marazita ML, Seymen F, Costa MC, Granjeiro JM, Trevilatto PC, Vieira AR. Enamel formation genes influence enamel microhardness before and after cariogenic challenge. *Plos One* 2012; 7(9):1-9.
- 8- Peres MA, de Oliveira Latorre Mdo R, Sheiham A, Peres KG, Barros FC, Hernandez PG, Maas AM, Romano AR, Victora CG. Social and biological early life influences on severity of dental caries in children aged 6 years. *Community Dent Oral Epidemiol* 2005; 33(1): 53-63.
- 9- Shuler CF. Inherites risks for susceptibility to dental caries. *J Dent Educ* 2001; 65(10): 1038-45.
- 10- Selwitz RH, Ismail AI, Pitts NB. Dental caries. *Lancet* 2007; 369: 51-9.

- 11- Sheiham A, James WP. Diet and Dental Caries: The Pivotal Role of Free Sugars Reemphasized. *J Dent Res* 2015; 94(10): 1341-7.
- 12-Shimizu T, Ho B, Deeley K, Briseño-Ruiz J, Faraco IM, Schupack BI, Brancher JA, Pecharki GD, Kuchler EC, Tannure PN, Lips A, Vieira TC, Patir A, Yildirim M, Poletta FA, Mereb JC, Resick JM, Brandon CA, Orioli IM, Castilla EE, Marazita ML, Seymen F, Costa MC, Granjeiro JM, Trevilatto PC, Vieira AR. Enamel formation genes influence enamel microhardness before and after cariogenic challenge. *PLoS ONE* 2012; 7(9), p. e45022.
- 13-Simmer JP, Hu JC. Expression, structure, and function of enamel proteinases. *Connect Tissue Res.* 2002; 43: 441-449.
- 14- Tinanoff N, Palmer CA. Dietary determinants of dental caries and dietary recommendations for preschool children. *J Public Health Dent.* 2000; 60(3): 197-206.
- 15- Watt R. Strategies and approaches in oral disease prevention and health promotion. *Bulletin of the world Health Association* 2005; 83(9); 2005.

5 CONCLUSÕES

Nesta população de estudo não foi possível estabelecer a relação entre o polimorfismo dos genes *AMELX* e *ENAM*, ambos formadores do esmalte dentário, com a cárie dentária.

A maioria do adolescentes mostraram ter pelo menos um dente cariado (60,2%). O índice CPO-D encontrado para os adolescentes com cárie foi de 3,67.

Os fatores etiológicos que apresentaram relação com o desenvolvimento da doença foram os comportamentais, que se caracterizam pelo alto consumo de açúcar e o hábito de beliscar entre as refeições.

A frequência genotípica da enamulina foi de CC 0,08, TT 0,75 e CT 0,16. Da amelogenina, CC 0,04, TT 0,75 e CT 0,19.

Por fim, conclui-se que são necessárias novas pesquisas em outras populações e com maior número de amostras, para poder verificar a suscetibilidade genética à cárie dentária.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Pensando em triagem genética, as possibilidades são quase infinitas. Estudos na genética são válidos, mas deve-se considerar a aplicabilidade na prática. Este estudo encontrou consistência entre a prevalência de cárie e hábitos comportamentais e socioeconômicos, que apesar de representarem um desafio para os clínicos, para que consigam modificá-los, é uma estratégia mais acessível do ponto de vista econômico do que a triagem genética.

7 REFERÊNCIAS

1. AIDAR, M.; LINE, S.R. A simple and cost-effective protocol for DNA isolation from buccal epithelial cells. **Braz Dent J**, v.18, n.2, p.148-52, 2007.
2. ALVESALO, L. Sex chromosomes and human growth. A dental approach. **Hum Genet**, v.101, n.10, p.1-5, 1997.
3. ANDERSON, M. Risk assessment and epidemiology of dental caries: review of the literature. **Pediatr Dent**, v.24, n.5, p.377-85, 2002.
4. BACHRACH, F.; YOUNG, M. A comparison of the degree of resemblance in dental characters shown in pairs of twins of identical and fraternal types. **Brit Dent J**, v.48, p.1293-1304, 1927.
5. BADET, C.; THEBAUD, N.B. Ecology of Lactobacilli in the Oral Cavity: A Review of Literature. **Open Microbiol J**, v.2, p.38-48, 2008.
6. BARTLETT, J.D. Dental Enamel Development: Proteinases and Their Enamel Matrix Substrates. **ISRN Dent**, v.16, p. 1-24, 2013.
7. BATISTA, L.R.; MOREIRA, E.A.; CORSO, C.T. Alimentação, estado nutricional e condição bucal da criança. **Rev Nutr**, v.20, n.2, p.191-6, 2007.
8. BOING, A.F.; BASTOS, J.L.; PERES, K.G.; ANTUNES, J.L.; PERES, M.A. Social determinants of health and dental caries in Brazil: a systematic review of the literature between 1999 and 2010. **Rev Bras Epidemiol**, v.17, n.2, p.1415-1790, 2014.
9. BÖNECKER, M.; MARCENES, W.; SHEIHAM, A. Caries reductions between 1995, 1997, and 1999 in preschool children in Diadema, Brazil. **Int J Paediatr Dent**, v.12, n.3, p.183-8, 2002.
10. BRASIL. Ministério da Saúde. Coordenação Nacional de Saúde Bucal. **Projeto SB Brasil: condições de saúde bucal da população brasileira 2002-2003: resultados principais**. Brasília, 2004.
11. BRASIL. Ministério da Saúde. **Projeto SB Brasil 2010: Pesquisa Nacional de Saúde Bucal**. Brasília, 2011.
12. BRETZ, W.A.; CORBY, P.M.; SCHORK, N.J.; ROBINSON, M.T.; COELHO, M.; COSTA, S.; MELO FILHO, M.R.; WEYANT, R.J.; HART, T.C. Longitudinal analysis of heritability for dental caries traits. **J Dent Res**, v.84, n.11, p. 1047-1051, 2005.
13. CONRY, J.P.; MESSER, L.B.; BORAAS, J.C.; AEPPLI, D.P.; BOUCHARD, T.J. Jr. Dental caries and treatment characteristics in human twins reared apart. **Arch Oral Biol**, v.38, n.11, p.937-48, 1993.

14. DEELEY, K.; LETRA, A.; ROSE, E.K.; BRANDON, C.A.; RESICK, J.M.; MARAZITA, M.L.; VIEIRA, A.R. Possible association of amelogenin to high caries experience in a Guatemalan-Mayan population. **Caries Res**, v.42, n.1, p.8-13, 2008.
15. DUVERGER, O.; OHARA, T.; SHAFFER, J.R.; DONAHUE, D.; ZERFAS, P.; DULLNIG, A.; CRECELIUS, C.; BENIASH, E.; MARAZITA, M.L.; MORASSO, M.I. Hair keratin mutations in tooth enamel increase dental decay risk. **J Clin Invest**, v.124, n.12, p. 5219-5224, 2014.
16. FINN, S. C. Dental caries in twins I: a comparison of caries experience of monozygotic twins, dizygotic twins and unrelated children. **Arch Oral Bio**, v.8, p. 571-85, 1963.
17. FUKAE, M.; TANABE, T.; UCHIDA, T.; YAMAKOSHI, Y.; SHIMIZU, M. Enamelins in the newly formed bovine enamel. **Calcif Tissue Int**, v.53, n.4, p. 257-61, 1993.
18. GE, Y.; CAUFIELD, P.W.; FISCH, G.S; LI, Y. Streptococcus mutans and Streptococcus sanguinis Colonization Correlated with Caries Experience in Children. **Caries Res**, v.42, n.6, p. 444-8, 2008.
19. GOLDBERG, S. The dental arches of identical twins. **Dent Cosm**, v.72, p.869-81, 1930.
20. GUEDES PINTO, A.C. **Odontopediatria**. 8 ed. São Paulo: Santos; 2010. p.970.
21. GUZMÁN-ARMSTRONG, S. Rampant caries. **J Sch Nurs**, v.21, n.5, p.272-8, 2005.
22. HAUBEK, D.; GJØRUP, H.; JENSEN, L.G.; JUNKER, I.; NYEGAARD, M.; BØRGLUM, A.D.; POUSEN, S.; HERTZ, J.M. Limited phenotypic variation of hypocalcified amelogenesis imperfecta in a Danish five-generation Family with a novel FAM83H nonsense mutation. **Int J Paediatr Dent**, v.21, n.6, p. 407-12, 2011.
23. HOROWITZ, S.O.; DEGEORGE, F.V. Caries experience in twins. **Science**, v.128, p.300-1, 1958.
24. HUNTER, P.B. Risk factors in dental caries. **Int Dent J**, v.38, n.4, p.211-7, 1988.
25. HU, C.C.; FUKAE, M.; UCHIDA, T.; QIAN, Q.; ZHANG, C.H.; RYU, O.H.; TANABE, T.; YAMAKOSHI, Y.; MURAKAMI, C.; DOHI, N.; SHIMIZU, M.; SIMMER, J.P. Cloning and characterization of porcine amelogenin RNAs. **J Dent Res**, v.76, n.11, p. 1720-9, 1997.
26. JEREMIAS, F.; KORUYUCU, M.; KÜCHLER, E.C.; BAYRAM, M.; TUNA, E.B.; DEELEY, K.; PIERRI, R.A.; SOUZA, J.F.; FRAGELLI, C.M.;

- PASCHOAL, M.A.; GENCAY, K.; SEYMEN, F.; CAMINAGA, R.M.; SANTOS-PINTO, L.dos; VIEIRA, A.R. Genes expressed in dental enamel development are associated with molar-incisor hypomineralization. **Arch Oral Biol**, v.58, n.10, p.1434-42, 2013.
27. KANG, S.W.; YOON, I.; CHO, J. Association between AMELX polymorphism and dental caries in Koreans. **Oral Dis**, v.17, n.4, p.399-406, 2011.
28. KRASSE, B. **Risco de cáries**. São Paulo: Quintessence; 1988. p. 113.
29. KLEIN, H.; PALMER, C. E. Studies on Dental Caries. V. Familial Resemblance in the Caries Experience of Siblings. **Public Health Reports**, v.53, p.1353-64, 1938.
30. KRISDAPONG, S.; PRASERTSOM, P.; RATTANARANGSIMA, K.; SHEIHAM, A. Relationships between oral diseases and impacts on Thai schoolchildren's quality of life: evidence from a Thai national oral health survey of 12- and 15-year-olds. **Community Dent Oral Epidemiol**, v.40, n.6, p.550-9, 2012.
31. LEÃO, M.M.; GARBIN, C.A.; MOIMAZ, S.A.; ROVIDA, T.A. Oral health and quality of life: an epidemiological survey of adolescents from settlement in Pontal do Paranapanema/SP, Brazil. **Cien Saude Colet**, v.11, p.3365-74, 2015.
32. MANSBRIDGE, J. Heredity and dental caries. **Quintessence Int**, v.38, p.38:337-47, 1959.
33. MOSES, J.; RANGEETH, B.N.; GURUNATHAN, D. Prevalence of dental caries, socio-economic status and treatment needs among 5-15 year old school going children of Chidambaram. **J Clin Diagn Res**, v.5, n.1, p.146-51, 2011.
34. MOYNIHAN, P.J. The role of diet and nutrition in the etiology and prevention of oral diseases. **Bull World Health Organ**, v.83, n.9, p.694-9, 2005.
35. NEWBRUN, E. **Cariologia**. São Paulo: Santos; 1988. p.326.
36. NICOLAS, G.G.; LAVOIE, M.C. Streptococcus mutans et les streptocoques buccaux dans la plaque dentaire. **Rev Can Microbiol**, v.57, n.1, p.1-20, 2011.
37. PARKER, E.J.; JAMIESON, L.M. Oral health comparisons between children attending an Aboriginal health service and a Government school dental service in a regional location. **Rural Remote Health**, v.7, p.625, 2007.
38. PATIR, A.; YILDIRIM, M.; POLETTA, F.A.; MEREB, J.C.; RESICK, J.M.; BRANDON, C.A.; ORIOLI, I.M.; CASTILLA, E.E.; MARAZITA, M.L.; SEYMEN, F.; COSTA, M.C.; GRANJEIRO, J.M.; TREVILATTO, P.C.; VIEIRA, A.R. Enamel formation genes influence enamel microhardness before and after cariogenic challenge. **Plos One**, v.7, n.9, p.1-9, 2012.

39. PERES, M.A.; DE OLIVEIRA, L.A.; TORRE, M.D.O.R.; SHEIHAM, A.; PERES, K.G.; BARROS, F.C.; HERNANDEZ, P.G.; MAAS, A.M.; ROMANO, A.R.; VICTORA, C.G. Social and biological early life influences on severity of dental caries in children aged 6 years. **Community Dent Oral Epidemiol**, v.33, n. 1, p. 53-63, 2005.
40. PIOVESAN, C.; ABELLA, C.; ARDENGHI, T.M. Child oral health-related quality of life and socioeconomic factors associated with traumatic dental injuries in schoolchildren. **Oral Health Prev Dent**, v.9, n.4, p. 405-11, 2011.
41. POTTER, R.H. Twin half-sibs: a research design for genetic epidemiology of common dental disorders. **J Dent Res**, v.69, n.8, p.1527-1530, 1990.
42. SALIDO, E.C.; YEN, P.H.; KOPRIVNIKAR, K.; YU, L.C.; SHAPIRO, L.J. The human enamel protein gene amelogenin is expressed from both the X and the Y chromosomes. **Am J Hum Genet**, v.:50, n.2, p.303-316, 1992.
43. SANTOS, A.P.; SÉLLOS, M.C.; RAMOS, M.E.; SOVIERO, V.M. Frequência de higiene oral e presença de biofilme visível na dentição decidua. **Braz Oral Res**, v.21, n.1, p.64-9, 2007.
44. SANTOS, M.C.; LINE, S.R. The genetics of amelogenesis imperfecta: a review of the literature. **J Appl Oral Sci**, v.13, n.3, p.212-7, 2005.
45. SARAVANAN, S.; ANURADHA, K.P.; BHASKAR, D.J. Prevalence of dental caries and treatment needs among school going children of Pondicherry, India. **J Indian Soc Pedod Prev Dent**, v.21, n.1, p.1-12, 2003.
46. SELWITZ, R.H; ISMAIL, A.I.; PITTS, N.B. Dental caries. **Lancet**, v.369, p.51-9, 2007.
47. SHEIHAM ,A.; JAMES, W.P. Diet and Dental Caries: The Pivotal Role of Free Sugars Reemphasized. **J Dent Res**, v.94, n.10, p.1341-7, 2015.
48. SHULER, C. F. Inherits risks for susceptibility to dental caries. **J Dent Educ**, v,65, n.10, p.1038-45, 2001
49. SHIMIZU, T.; HO, B.; DEELEY, K.; BRISEÑO-RUIZ, J.; FARACO, I.M.; SCHUPACK, B.I.; BRANCHER, J.A.; PECHARKI, G.D.; KUCHLER, E.C.; TANNURE, P.N.; LIPS, A.; VIEIRA, T.C.; PATIR, A.; YILDIRIM, M.; POLETTA, F.A.; MEREB, J.C.; RESICK, J.M.; BRANDON, C.A.; ORIOLI, I.M.; CASTILLA, E.E.; MARAZITA, M.L.; SEYMEN, F.; COSTA, M.C.; GRANJEIRO, J.M.; TREVILATTO, P.C.; VIEIRA, A.R. Enamel formation genes influence enamel microhardness before and after cariogenic challenge. **PLoS ONE** 2012:7(9), p. e45022.
50. SIMMER, J.P.; HU, J.C. Expression, structure, and function of enamel proteinases. **Connect Tissue Res**, v.43, p.441-9, 2002.

51. SLAYTON, R.; COOPER, M.E.; MARAZITA, M.L. Tuftelin, mutans streptococci, and dental caries susceptibility. **J Dent Res**, v.84, n.8, p.711-4, 2005.
52. SØRENSEN, T.I.; NIELSEN, G.G.; ANDERSEN, P.K.; TEASDALE, T.W. Genetic and environmental influences on premature death in adult adoptees. **N Engl J Med**, v.24, n.12, p. 727-32, 1988.
53. STEPHANOPOULOS, G.; GAREFALAKI, M.E.; LYROUDIA, K. Genes and related proteins involved in amelogenesis imperfecta. **J Dent Res**, v.84, n.12, p. 1117-26, 2005.
54. STOOKEY, G. K. The effect of saliva on dental caries. **J Am Dent Assoc**, v.139, p.11S-17S, 2008.
55. URZÚA, B.; ORTEGA-PINTO, A.; MORALES-BOZO, I.; ROJAS-ALCAYAGA, G.; CIFUENTES, V. Defining a new candidate gene for amelogenesis imperfecta: from molecular genetics to biochemistry. **Biochem Genet**, v.49, n.1-2, p. 104-21, 2011.
56. TINANOFF, N.; PALMER, C.A. Dietary determinants of dental caries and dietary recommendations for preschool children. **J Public Health Dent**, v.60, n.3, p.197-206, 2000.
57. WATT, R. Strategies and approaches in oral disease prevention and health promotion. **Bulletin of the world Health Association**, v.83, n.9, 2005.
58. WENDELL, S.; WANG, X.; BROWN, M.; COOPER, M.E.; DESENSI, R.S.; WEYANT, R.J.; CROUT, R.; McNEIL, D.W.; MARAZITA, M.L. Taste genes associated with dental caries. **J Dent Res**, v. 89, n. 11, p. 1198-202, 2010.
59. WERNECK, R.I.; LAZARO, F.P.; COBAT, A. A Major Gene Effect Controls Resistance to Caries. **J Dent Res**, v. 90, n.6, p. 735–739, 2011.
60. WRIGTH, J.T.; HART, T.C.; HART, P.S.; SIMMONS, D.; SUGGS, C.; DALEY, B.; SIMMERJ, H.U.J.; BARTLETT, J.D.; LI, Y.; YUAN, Z.; SEOW, W.K.; GIBSON, C.W. Human and mouse enamel phenotypes resulting from mutation or altered expression of AMEL, ENAM, MMP20 and KLK4. **Cells Tissues Organs**, v. 189, n.1-4, p. 224-229, 2009.
61. WRIGHT, J.T.; FRAZIER-BOWERS, S.; SIMMONS, D.; ALEXANDER, K.; CRAWFORD, P.; HAN, S.T.; HART, P.S.; HART, T.C. Phenotypic variation in FAM83H-associated amelogenesis imperfecta. **J Dent Res**, v.88, n.4, p.356-60, 2009.

62. WRIGHT, J.T.; TORAIN, M.; LONG, K.; SEOW, K.; CRAWFORD, P.; ALDRED, M.J.; HART, P.S.; HART, T.C. Amelogenesis imperfecta: genotype-phenotype studies in 71 families. **Cells Tissues Organs**. v.194, n. 24, p. 279-83, 2011.

ANEXOS

ANEXO A

Parecer consubstanciado


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 Nishihashi Suguimoto
 Presidente do C.E.P. UNOPAR