



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

PAOLA SINGI

**INVESTIGAÇÃO DA VARIANTE GENÉTICA LTF rs1126478
COMO MARCADOR DE SUSCETIBILIDADE E DETECÇÃO
DE CÁRIE PELO MÉTODO ICDAS EM PRÉ-ESCOLARES**

Londrina
2020

PAOLA SINGI

**INVESTIGAÇÃO DA VARIANTE GENÉTICA LTF rs1126478
COMO MARCADOR DE SUSCETIBILIDADE E DETECÇÃO
DE CÁRIE PELO MÉTODO ICDAS EM PRÉ-ESCOLARES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina como pré-requisito para obtenção do título de doutor.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Karen Brajão de Oliveira
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Cássia Cilene Dezan Garbelini

Londrina
2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

S617 Singi, Paola .
Investigação da variante genética LTF rs1126478 como marcador de suscetibilidade e detecção de cárie pelo método ICDAS em pré-escolares / Paola Singi. - Londrina, 2020.
95 f.

Orientador: Karen Bração de Oliveira.
Coorientador: Cássia Cilene Dezan Garbelini.
Tese (Doutorado em Patologia Experimental) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, 2020.
Inclui bibliografia.

1. Cárie dentária - Tese. 2. Polimorfismo genético - Tese. 3. Lactotransferrina - Tese. 4. Pré-escolares - Tese. I. Bração de Oliveira, Karen . II. Cilene Dezan Garbelini, Cássia. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental. IV. Título.

CDU 616

PAOLA SINGI

**INVESTIGAÇÃO DA VARIANTE GENÉTICA LTF rs1126478
COMO MARCADOR DE SUSCETIBILIDADE E DETECÇÃO
DE CÁRIE PELO MÉTODO ICDAS EM PRÉ-ESCOLARES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina como pré-requisito para obtenção do título de doutor.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Karen Brajão de
Oliveira
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr^a. Regina Célia Poli Frederico
Universidade Pitágoras Unopar

Prof^a. Dr^a. Roberta Losi Guembarovski
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr^a. Luciana Tiemi Inagaki
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Pablo Guilherme Caldarelli
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 01 de abril de 2020.

À minha família e amigos pela cumplicidade e apoio

AGRADECIMENTOS

A palavra é GRATIDÃO.

Entendo que Deus nos prepara e permite que as adversidades se convertam em força e fé para prosseguir. Nunca é tarde e não há impossível para realizar sonhos e hoje estou feliz em dizer que consegui.

Por isso, meu primeiro Pai, Aquele que me fortalece e que nunca desistiu de mim, tem os planos mais perfeitos e me aceita sempre de braços abertos. Amoroso DEUS, obrigada!

Aos meus pais, Mauro Biscaia e Ivone Biscaia, gratidão pela vida e por aceitarem o desafio de me preparar para o mundo.

A minha segunda mãe, Míriam Biscaia, que sempre me encorajou, aconselhou e esteve comigo nos momentos bons e ruins.

Meus queridos irmãos Marcel Biscaia, Julliana Biscaia, Vivian Biscaia e Maurinho Biscaia, obrigada!

Aos meus familiares e ao meu padrinho Ivan Meneguzzo, professor, escritor e tio de quem sinto tantas saudades.

A família que amo, Júnior Singi, que divide a vida comigo há tantos anos, meu apoio diário e meu grande incentivador; meus filhos Mariana Biscaia e Lucca Biscaia pelo privilégio de ter vocês na minha vida. Amor eterno!

Minha afilhada linda Alicia Biscaia pela revisão dos artigos. Thank you!

Às minhas orientadoras Karen Brajão e Cássia Garbelini que me aceitaram, me acolheram, entenderam as minhas limitações e os percalços da minha jornada e sempre me presentearam com palavras de incentivo. Continuem fazendo a diferença na vida dos seus alunos.

Aos meus anjos da guarda Kleber Trugilo, Nádia Okuyama, Nilson De Jesus e Thaílla Pacheco... só lembro de dias agradáveis com vocês. Deus me deu o presente de conviver com vocês e escolheu o melhor time pra me ajudar a concluir esse trabalho. Agradeço pela paciência e por tornar meus dias mais leves e felizes.

As amigas queridas Ana Poletto e Rosário Mamani e Danielle Gregorio que dividiram comigo o nascimento desse trabalho e os longos meses de coleta; muito obrigada.

A Universidade Estadual de Londrina, que me presenteou todos os dias com uma linda paisagem, ar puro e o canto dos pássaros pela manhã.

A Bebê-Clínica e os professores Antônio Ferelle, Cássia Garbelini, Luciana Inagaki, Farli Boer, Marília Punhagui, Wanda Frossard, Leila Maria Pereira e também a Vanilda Pereira, Cirlene, Sandra Curti, Maria Cristina Rodrigues, Carlos Cesar e Valéria Santos, muito obrigada pelo apoio neste trabalho.

As residentes Marjóri Fritola, Ana Carolina Couto, Teila Gonçalves, Maitê Soares, Ana Paula Matias, Paula Crystina Rizental, Patrícia Kochany, Magdalena Torres, Manuella Bianchini e Bárbara Curi, obrigada por me ajudar e ceder espaço na agenda para essa pesquisa.

Caio Schavasrki e Jéssica Sovinski, obrigada pela ajuda na tabulação dos dados. Especial agradecimento a minha banca: professores Regina Poli, Roberta Losi, Luciana Inagaki e Pablo Caldarelli, muito obrigada por aceitarem estar comigo, ainda que à distância, e contribuírem de maneira preciosa na finalização desse trabalho.

Especialmente às lindas crianças da Bebê-Clínica e aos pais sem os quais nada disso poderia ter sido feito.

Esse ciclo se fecha na certeza que novas oportunidades e novos desafios virão, confiando que a mão de Deus é a força que não me faz desistir.

A palavra sempre será GRATIDÃO.

“Eu tentei 99 vezes e falhei, mas na centésima tentativa eu consegui, nunca desista de seus objetivos mesmo que esses pareçam impossíveis, a próxima tentativa pode ser vitoriosa”.

Albert Einstein

SINGI, Paola. **Investigação da variante genética *LTF* rs1126478 como marcador de suscetibilidade e detecção de cárie pelo método ICDAS em pré-escolares.** 2020. 95 f. Tese de Doutorado (Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, 2020.

RESUMO

A cárie dentária é considerada o maior problema de saúde bucal no mundo, acometendo adultos e crianças em todas as faixas etárias e classes sociais. Estudos tem associado a participação de proteínas salivares, como a lactotransferrina (*LTF*) na patogênese da cárie. A *LTF* é uma glicoproteína salivar importante, que interage com o biofilme dentário por diferentes mecanismos como atividade quelante de ferro ou ainda por modular o desenvolvimento do biofilme dentário e inibir a adesão do *Streptococcus mutans* na superfície dentária. Sabendo que variações genéticas podem alterar a expressão e produção de proteínas e já foram descritas muitas variações na sequência gênica da *LTF*, o objetivo deste estudo foi avaliar a influência da variante *LTF* rs1126478 (c.140A>G no exon 2, Lys47Arg) na suscetibilidade à cárie dentária em pré-escolares. O artigo 1 descreveu um protocolo para calibração de dentistas em diagnósticos de cárie dentária a partir do Sistema Internacional de Detecção e Avaliação de Cárie (ICDAS). Neste estudo transversal, quatro examinadores avaliaram 800 superfícies de molares decíduos em 20 pré-escolares. O treinamento teórico-prático foi conduzido por um odontopediatra com experiência em estudos epidemiológicos. Foram realizadas duas rodadas (1 e 2), cada uma consistindo de dois exames intra-orais sob condições padronizadas, com um intervalo de 7 dias entre os exames (n=10). A confiabilidade foi avaliada pelo índice kappa ponderado. As concordâncias intra-examinadores variaram de 0,56 a 0,76 e 0,72 a 0,83 nas rodadas 1 e 2, respectivamente. Para a concordância inter-examinadores a variação foi de 0,45 a 0,73 e 0,62 a 0,73 nas rodadas 1 e 2, respectivamente. O treinamento melhorou consideravelmente os resultados e o protocolo descrito permitiu estabelecer um alto grau de confiabilidade entre os examinadores. O artigo 2 descreveu um estudo caso-controle, no qual foram incluídas 448 crianças em idade pré-escolar de 3 a 6 anos; 219 do sexo masculino e 229 do sexo feminino. Após o exame intra-oral, a população do estudo foi dividida de acordo com os critérios do ICDAS em grupos: 48 crianças sem cárie (ICDAS 0), 248 crianças no grupo com lesão de mancha branca (ICDAS 1-2) e 152 crianças no grupo com cárie de esmalte e dentina (ICDAS 3-6). O polimorfismo do gene *LTF* rs1126478 foi genotipado pela técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) seguida da análise dos fragmentos de restrição (*Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP)), a partir do DNA extraído de saliva coletada das crianças. Por meio de modelo de regressão logística multinomial ajustado para fatores de confusão, observou-se que crianças com o genótipo AG apresentaram menor suscetibilidade à cárie quando comparadas àquelas com o genótipo AA (OR= 0,42; IC95%= 0,18-0,95; P= 0,038) e AA+GG (OR= 0,43; IC95%= 0,21-0,87; P= 0,020). Fatores intrínsecos e comportamentais, especialmente a frequência de ingestão de açúcar foram associados com processo de cárie. Este é o primeiro estudo a mostrar a associação da variação genética *LTF* rs1126478 no desenvolvimento de cárie, utilizando os critérios do ICDAS. O polimorfismo *LTF* rs1126478 foi associado com a cárie dentária em uma população

brasileira, entretanto mais análises são necessárias para confirmar a real influência deste polimorfismo no desenvolvimento da cárie.

Palavras-chave: dentição primária; polimorfismo genético; pré-escolares; lactoferrina.

SINGI, Paola. **Investigation of *LTF* rs1126478 genetic variant as a candidate marker for susceptibility and caries detection by the ICDAS method in preschool children.** 2020. 95 p. Doctoral thesis (Postgraduate Program in Experimental Pathology) – State University of Londrina, 2020.

ABSTRACT

Dental caries is considered a major oral health problem in the world affecting adults and children in all age groups and social classes. Studies have associated the participation of salivary proteins, such as lactotransferrin (LTF) in the caries pathogenesis. LTF is an important salivary glycoprotein, which interacts with dental biofilm, by different mechanisms such as iron chelating activity or by modulating the development of dental biofilm and inhibiting the adhesion of *Streptococcus mutans* on the tooth surface. Since genetic variations may alter the protein expression and its production, and many variations have been described in the *LTF* sequence, the aim of this study was to evaluate the influence of the *LTF* variant rs1126478 (c.140A>G on exon 2, Lys47Arg) on susceptibility to dental caries in preschool children. Article 1 described a protocol for calibrating dentists in diagnosing dental caries using the International Caries Detection and Assessment System (ICDAS). In this cross-sectional study, four examiners evaluate 800 surfaces of primary molars in 20 preschool children. Theoretical-practical training was conducted by a pediatric dentist with experience in epidemiological studies. Two rounds were performed (1 and 2), each consisting of two intra-oral exams under standardized conditions, with an interval of 7 days between exams (n = 10). Reliability was assessed using the weighted kappa index. Intra-examiner agreement ranged from 0.56 to 0.76 and 0.72 to 0.83 in rounds 1 and 2, respectively. For inter-examiner agreement, the variation was 0.45 to 0.73 and 0.62 to 0.73 in rounds 1 and 2, respectively. The training improved considerably the results and the described protocol allowed to establish a high degree of reliability among the examiners. Article 2 described a case-control study, in which 448 preschool children aged 3 to 6 years were included; 219 boys and 229 girls. After the intraoral examination, the study population was divided into groups according to the ICDAS criteria: 48 caries-free children (ICDAS 0), 248 children in the white spot group (ICDAS 1-2) and 152 children in the enamel and dentin caries group (ICDAS 3-6). The *LTF* rs1126478 polymorphism was genotyped by the polymerase chain reaction (PCR) technique followed by Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP), using DNA extracted of saliva collected from children. Using a multinomial logistic regression model adjusted for confounding factors, it was observed that children presenting the AG genotype were less likely to have caries when compared to those with the AA genotype (OR= 0.42; 95% CI = 0.18 -0.95; *P*= 0.038) and AA+GG (OR= 0.43; 95%CI= 0.21 – 0.87; *P*= 0.020). We found that intrinsic and behavioral factors, especially the frequency of sugar ingestion are risk factors associated with the development of cavities. This is the first study to show the influence of *LTF* rs1126478 genetic variation on the caries development, using the ICDAS criteria. *LTF* rs1126478 was associated with dental caries in the Brazilian population, however further analyses are necessary to prove the real influence of the *LTF* rs1126478 variation on the development of dental caries.

Keywords: genetic polymorphism; lactotransferrin; preschool children; primary dentition.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1 – Classificação da superfície dentária baseada na presença de restaurações de acordo com os critérios do ICDAS	22
Quadro 2 – Classificação da superfície dentária baseada na condição clínica da superfície de acordo com os critérios do ICDAS	22

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

A	Adenina
Arg	Arginina
ceo-d	Dentes cariados, com extração indicada, obturados - dentição decídua
CPI	Cárie na primeira infância
CPO-D	Dentes cariados, perdidos, obturados - dentição permanente
Cu ⁺²	Íon cúprico
DCR-OHD	Centro Detroit para Pesquisa sobre Disparidades de Saúde Bucal
DNA	Ácido dexossirribonucleico
dNTP	Desoxinucleotídeos trifosfatos
dmft	Dentes cariados, com extração indicada, obturados - dentição decídua (<i>Decayed, missing, filled teeth</i>)
Fe ⁺³	Íon férrico
G	Guanina
GI	Índice gengival
HWE	Equilíbrio Hardy-Weinberg (<i>Hardy-Weinberg equilibrium</i>)
IAPD	Associação Internacional de Odontopediatria (<i>International association of paediatric dentistry</i>)
ICDAS	Sistema Internacional de detecção e avaliação de cárie
IQR	Intervalo interquartil
Lys	Lisina
LTF	Lactotransferrina (em itálico quando se referir ao gene)
LPS	Lipopolissacarídeo
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
Mn ⁺²	Íon manganês
OMS/WHO	Organização Mundial da Saúde
OR	Odds ratio
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RFLP	Polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (<i>Restriction fragment length polymorphism</i>)
SNV	Variação de nucleotídeo único
SPSS	Pacote estatístico para as Ciências Sociais (<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>)
SUS	Sistema Único de Saúde
U	Unidade
UEL	Universidade Estadual de Londrina
WK	Kappa ponderado (<i>Weighted Kappa</i>)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	CÁRIE DENTÁRIA	18
3	MÉTODOS DE DETECÇÃO DE CÁRIE	20
4	LACTOTRANSFERRINA	23
4.1	POLIMORFISMOS GENÉTICOS DA LTF	24
5	OBJETIVOS.	26
5.1	OBJETIVO GERAL	26
5.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
6	PRODUÇÃO CIENTÍFICA	27
6.1	ARTIGO 1	28
6.2	ARTIGO 2	47
7	CONCLUSÕES	67
	REFERÊNCIAS	68
	APÊNDICES	74
	APÊNDICE A – TCLE	75
	APÊNDICE B – Questionário Sócio-demográfico	77
	ANEXOS	81
	A – Odontograma, biofilme visível e papila gengival	82
	B – Questionário de Frequência alimentar (QFAsq).....	83
	C – Aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos/CEP – UEL.....	89

1 INTRODUÇÃO

A cárie dentária é considerada um grave problema de saúde bucal afetando quase metade da população mundial, com acometimento de cerca de 2.4 bilhões de adultos e 621 milhões de crianças (KASSEBAUM *et al.*, 2015).

No Brasil, de acordo com a pesquisa nacional realizada em 2010, aos 5 anos de idade as crianças apresentavam um índice médio de dentes decíduos cariados, com extração indicada ou obturados (ceo-d) de 2,43, com predomínio do componenteariado (BRASIL,2012). Embora a prevalência de cárie tenha diminuído no Brasil (BRANCHER *et al.*, 2011; DOETZER *et al.*, 2015), existem grandes variações regionais para estes dados, com as médias do índice ceo-d mais elevadas nas regiões Norte, Centro-Oeste e Nordeste em comparação com as regiões Sul e Sudeste (BRASIL, 2012).

A cárie dentária é a condição bucal que mais afeta a qualidade de vida de crianças pré-escolares (ABANTO *et al.*, 2011; WONG *et al.*, 2011; HEMADI *et al.*, 2017),podendo causar transtornos e consequências negativas na qualidade de vida de crianças como, por exemplo, dificuldade de mastigar, diminuição do apetite, perda de peso, dificuldade para dormir e diminuição do rendimento escolar. Além de tudo, esse impacto negativo pode se manifestar por meio de alterações no comportamento da criança que incluem irritabilidade e baixa auto-estima (FILSTRUP *et al.*, 2003; FEITOSA; COLARES; PINKHAM, 2005).

Diante dos agravos a saúde e qualidade de vida que podem ser ocasionados pela cárie dentária no estado do Paraná, na cidade de Londrina, surgiu em 1985 um programa pioneiro de atenção Precoce à Saúde Bucal com a finalidade de construção de um novo cenário na Odontologia. O programa priorizava o início do atendimento no primeiro ano de vida seguido de acompanhamento da saúde bucal nos anos subsequentes. Como as práticas alimentares e de higiene bucal são controladas principalmente pelos pais ou cuidadores em idades precoces, a ideia central deste programa é a orientação aos pais e medidas preventivas às crianças, planejadas de acordo com avaliação do risco de cárie, com foco na educação familiar, na realização de cuidados preventivos em casa, como a limpeza da cavidade bucal, o controle da amamentação noturna após os seis meses, o consumo racional de açúcares e a aplicação tópica de fluoretos. Assim, as medidas educacionais e a frequência de acompanhamento das crianças a cada 3 ou 6 meses dependendo da faixa etária,

tendem a reforçar as informações odontológicas preventivas. Atualmente, a Clínica de Especialidades Infantis da Universidade Estadual de Londrina (UEL) presta serviços à comunidade, por meio do Sistema Único de Saúde (SUS), no atendimento odontológico de crianças de zero a cinco anos de idade, no programa educativo-preventivo e de pronto atendimento (CALDARELLI *et al.*, 2019).

De acordo com a declaração de Bangkok da IAPD de 2019 (*International Association of Paediatric Dentistry*) a cárie na primeira infância (CPI) é definida como a presença de uma ou mais superfícies cariadas (cavidades ou não cavidades), perdidas ou restauradas (devido à cárie) em qualquer dente decíduo de uma criança com menos de seis anos de idade (PITTS; BAEZ; DIAZ-GUALLORY, 2019). Além do impacto negativo na qualidade de vida das crianças e da família, a doença gera gastos substanciais para o sistema de saúde pública e é uma condição evitável com abordagens e políticas de prevenção e intervenção adequadas (PITTS; BAEZ; DIAZ-GUALLORY, 2019; TINANOFF *et al.*, 2019).

Por isso, a declaração de Bangkok recomenda quatro diretrizes básicas com intuito de diminuir a prevalência da CPI, que estão focadas na conscientização da família e profissionais de saúde; na limitação do consumo de alimentos açucarados para crianças com menos de 2 anos de idade; na indicação da escovação duas vezes ao dia com dentífrico fluoretado (mínimo de 1000 ppm) na quantidade adequada para a faixa etária e orientações no primeiro ano de vida com profissionais da saúde e acompanhamento preventivo com o dentista (PITTS; BAEZ; DIAZ-GUALLORY, 2019).

O avanço nas pesquisas tem mudado o entendimento do processo carioso para uma visão mais abrangente da doença incluindo seus estágios iniciais subclínicos. O conceito de cárie como doença multifatorial, infecciosa e transmissível está mudando. De acordo com Fejerskov (2004) uma doença infecciosa ocorre quando há transmissão de um agente patogênico para um indivíduo suscetível, porém no caso da cárie os microrganismos associados são residentes na microbiota bucal e onipresentes em toda a população. Já a definição de doença multifatorial é controversa, pois na ausência de açúcar a cadeia de causalidade é quebrada e a doença não ocorre. Portanto, a cárie dentária é caracterizada como uma doença biofilme sacarose dependente complexa (SHEIHAM; JAMES, 2015; GIACAMAN, 2017), com foco na participação central dos açúcares como fator determinante negativo no processo carioso. Já o acúmulo de biofilme sobre os dentes, em uma dieta abundante em sacarose, é considerado o fator necessário para desenvolvimento da

cárie (MALTZ *et al.*, 2016; TINANOFF *et al.*, 2019). Outros fatores como microrganismos, estrutura e morfologia dentária, composição e fluxo salivar, fatores comportamentais e genéticos podem influenciar indiretamente no curso da doença e são considerados fatores moduladores (KOGA *et al.*, 2002; PETERSEN, 2003; SHEIHAM; JAMES, 2015; GIACAMAN, 2017).

A saliva tem um papel crítico na modulação do processo de cárie, facilita a remoção de resíduos, apresenta capacidade tampão e remineralizante importantes no microambiente bucal (HEMADI *et al.*, 2017). Este último pode ser reforçado pelo flúor, fator determinante positivo para reparar lesões de cárie precoces (BOWEN *et al.*, 2014), pois interfere no processo des-remineralização, pela capacidade de ativar a precipitação de minerais perdidos pela estrutura dental (TENUTA; CHEDID; CURY, 2012). Embora seja composta por cerca de 99% de água, a saliva abriga em sua composição uma infinidade de substâncias antibacterianas, apresenta vários componentes da resposta imune inata ou adquirida, que interagem com o biofilme dentário (DOETZER *et al.*, 2015) e que são capazes de inibir a invasão, crescimento e metabolismo bacteriano por diferentes mecanismos (BRANCHER *et al.*, 2011; HEMADI *et al.*, 2017). Alguns componentes salivares têm efeito antibacteriano como as lisozimas, lactoperoxidases, imunoglobulinas, aglutininas, mucinas e lactotransferrinas (LTF). A LTF é uma das mais abundantes glicoproteínas salivares presente em diversos fluidos como saliva, lágrima, colostro e superfícies mucosas. Apresenta papel protetivo contra fungos, vírus e bactérias, porém seu papel na cárie dentária ainda não foi totalmente elucidado (BRANCHER *et al.*, 2011; MOSLEMI *et al.*, 2015).

Portanto, é importante o conhecimento da relação entre fatores moduladores e causais na patogênese da cárie (WERNECK; MIRA; TREVILATTO, 2010). O mecanismo pelo qual alguns indivíduos permanecem livres da doença tem atraído a atenção dos pesquisadores (KOGA *et al.*, 2002). Existem perguntas ainda não respondidas, como, por exemplo, o fato de indivíduos de uma mesma família, com hábitos comportamentais semelhantes, e expostos aos mesmos fatores ambientais apresentarem diferentes experiências e atividade de cárie. A resposta para estas diferenças pode estar na interação de fatores genéticos no processo da doença (TYAGI *et al.*, 2008; WERNECK; MIRA; TREVILATTO, 2010; OLSZOWSKI *et al.*, 2015). Werneck, Mira e Trevilatto (2010) declararam que a genética pode ter uma

participação significativa na explicação desta doença tão complexa com influência de cerca de 30 a 60% da hereditariedade (WANG, 2010; STANLEY *et al.*, 2014).

Embora a pesquisa genética aplicada à cárie exista há algumas décadas, só atualmente com maior conhecimento dos genes e de sua funcionalidade no genoma é que os estudos confirmam a participação de fatores genéticos na etiologia da cárie. Atualmente, quatro grupos de genes relacionados ao desenvolvimento do esmalte, ao metabolismo de carboidratos, a formação e composição salivar e genes da resposta imune têm sido relacionados à doença (VOLCKOVA, 2014; PIEKOSZEWSKA-ZIĘTEK, TURSKA-SZYBKA, OLCZAK-KOWALCZYK, 2017). Alguns estudos identificaram polimorfismos no gene da *LTF* que podem contribuir para um melhor conhecimento da suscetibilidade à cárie como polimorfismos em regiões promotoras ou de regulação gênica (AZEVEDO *et al.*, 2010; DOETZER *et al.*, 2015; WANG; QIN, 2018).

Em doenças complexas como a cárie, as variações alélicas isoladas geralmente têm pouco efeito sobre o fenótipo (TYAGI *et al.*, 2008). Por isso, a identificação do papel funcional dos polimorfismos e sua influência combinada na suscetibilidade e gravidade das doenças podem melhorar a compreensão da biologia deste processo. Por exemplo, desenvolvimento de testes genéticos preditivos de cárie, utilizando polimorfismos como marcadores associados à suscetibilidade ou proteção contra doença. Essas estratégias poderiam permitir uma melhor estratificação de risco e prognóstico em pacientes e determinação de regimes de tratamento adequados na população.

2 CÁRIE DENTÁRIA

As bactérias são as espécies mais abundantes, que habitam naturalmente a cavidade bucal humana (ROSIER; MARSH; MIRA, 2017) com destaque para os *Streptococcus mutans*, bactérias anaeróbicas facultativas gram-positivas (VELLIYAGOUNDER *et al.*, 2019). Devido ao limitado espaço da cavidade bucal, os microrganismos existentes podem apresentar uma variedade de interações, que podem ser sinérgicas, como transferência de genes e sinalização celular ou antagônicas, como competição por nutrientes e alterações de pH (MARSH e ZAURA, 2017). As bactérias que são comensais em condições de saúde podem se tornar patogênicas pela quebra do balanço ecológico, tanto pela mudança na expressão gênica quanto pelo aumento significativo em números na espécie (GIACAMAN, 2018).

O biofilme é uma comunidade microbiana associada à superfície do dente, que na presença frequente de carboidratos fermentáveis, principalmente a sacarose, sofre grandes alterações bioquímicas e fisiológicas facilitando o crescimento seletivo de *Streptococcus mutans* e outras espécies acidogênicas e ácido tolerantes (MOYNIHAN, KELLY, 2014; SHEIHAM; JAMES, 2015), como *Streptococcus sobrinus* e alguns lactobacilos responsáveis pela produção de ácidos orgânicos, entre eles, láctico, fórmico e acético que são capazes de dissolver as estruturas dentárias (KRZYSCIAK *et al.*, 2014; GIACAMAN, 2018; MARSH; ZAURA, 2017). Esse desequilíbrio no balanço ecológico leva a alterações no processo de remineralização devido a queda de pH no biofilme, com a dissolução dos minerais da estrutura dental ocorrendo em pH abaixo de 5,5 para o esmalte, e 6,5 para a dentina. (FEJERSKOV, 2004; TENUTA; CHEDID; CURY, 2012). Na dentição decídua este processo ocorre mais rápido, devido a menor concentração de minerais presentes na estrutura do esmalte, aumentando assim, a suscetibilidade desses dentes à cárie (TENUTA; CHEDID; CURY, 2012; KRZYSCIAK *et al.*, 2014).

A sacarose é considerada o açúcar mais cariogênico da dieta humana, é um dissacarídeo formado por uma molécula de glicose e uma frutose, unidos por uma ligação glicosídica atípica. A quebra dessa ligação por enzimas glicosiltransferases dos estreptococos libera uma grande quantidade de energia, que facilitam a formação de polissacarídeos extracelulares, ricos em glucanos, que formam uma matriz estabilizadora do biofilme, facilitando a colonização por microrganismos cariogênicos, além de fornecer proteção contra agentes antimicrobianos. (TENUTA; CHEDID;

CURY, 2012; BOWEN *et al.*, 2014; SHEIHAM; JAMES, 2015). A matriz de polissacarídeos também controla a difusão de substratos fermentáveis através do biofilme, permitindo sua utilização por bactérias nas camadas internas do biofilme e limitando a ação tamponante e de limpeza da saliva e permitindo que os ácidos produzidos no interior permaneçam em contato com a superfície dentária por mais tempo. Além disso, semelhante a outros açúcares simples, a sacarose também é metabolizada em ácidos por microrganismos acidogênicos residentes no biofilme (BOWEN *et al.*, 2014).

Por isso, a introdução de alimentos e bebidas açucaradas, especialmente a sacarose, na dieta da criança no primeiro ano de vida e a frequência de consumo, são fatores de risco fortemente associados a ocorrência de cárie na primeira infância. (CHAFFEE *et al.*, 2015; FELDENS *et al.*, 2018). Além disso, o alto consumo de açúcar também está relacionado a obesidade, problemas cardiovasculares e diabetes inclusive nas crianças (TINANOFF *et al.*, 2019).

A experiência da cárie na primeira infância é considerada um forte preditor para cárie na dentição permanente, principalmente se ocorrer até 5 anos de idade. Estudos epidemiológicos são essenciais para verificar as condições de saúde na população e determinar os fatores de risco e distribuição da doença.

3 MÉTODOS DE DETECÇÃO DE CÁRIE

A cárie dentária é um processo dinâmico e contínuo que pode apresentar diferentes estágios de evolução, desde alterações não detectáveis a olho nu, até destruição completa da estrutura dentária (PITTS, 2012; IRANZO-CORTÉS *et al.*, 2017). Atualmente existem mais de 29 diferentes métodos de detecção de cárie vigentes em diversos países (CHU; CHAU; LO, 2013; CASTRO; VIANNA; MENDES, 2019). Porém, os métodos mais utilizados para detecção de lesões de cárie estão baseados na inspeção visual (BADER; SHUGARS; BONITO, 2002; GIMENEZ *et al.*, 2013; IRANZO-CORTÉS *et al.*, 2017), que é um recurso bem aceito na prática clínica, não invasivo, de baixo custo e fácil execução (RODRIGUES *et al.*, 2013). Mesmo assim, ainda existe uma grande dificuldade na padronização de métodos de avaliação, principalmente quando se analisa os estágios iniciais da doença (SHOIAB *et al.*, 2009). Isto se explica porque a maioria dos profissionais só considera um dente cariado quando observam estágios bem estabelecidos da doença como: descoloração, cavitação e perda da anatomia original. Contudo, muito antes dos sinais clinicamente visíveis, já existe a presença de uma atividade subclínica da doença. O conhecimento deste processo é de fundamental importância, pois permite a instituição de um tratamento efetivo baseado na avaliação dos riscos individuais e monitoramento da atividade cariosa de forma ampla e eficiente (PITTS, 2012) muito antes do aparecimento da lesão irreversível (SHOIAB *et al.*, 2009). Diante disso, existe uma necessidade de se reconsiderar os critérios existentes utilizados para avaliação da presença de cárie (IRANZO-CORTÉS *et al.*, 2017).

As recomendações de novos métodos de detecção, monitoramento e avaliação de cárie avançaram muito além dos conceitos baseados em cárie de esmalte e dentina para um olhar mais abrangente, onde pequenas mudanças em tecidos duros já podem ser detectadas e tratadas usando métodos preventivos ou minimamente invasivos para paralisação ou mesmo regressão destas lesões (PITTS e STAMM, 2004). A crescente necessidade de melhores critérios de diagnóstico e avaliação da cárie dentária culminou com a elaboração do sistema ICDAS (Sistema Internacional de Detecção e Avaliação de Cárie), baseado na inspeção visual-tátil. Este método foi conduzido pelo Centro Detroit para Pesquisa sobre Disparidades de Saúde Bucal (DCR-OHD), e desenvolvido para fornecer aos clínicos, epidemiologistas e pesquisadores um sistema baseado em evidências que permite a detecção e

diagnóstico padronizado de cárie em diferentes ambientes e situações, visando uma classificação que otimize a reprodutibilidade diagnóstica e bom uso clínico (PITTS, 2004; ISMAIL *et al.*, 2007).

Atualmente, o método visual tátil mais utilizado é CPOD (dentes cariados, perdidos ou obturados na dentição permanente) que está baseado no nível de cavitação que os dentes apresentam (KASSEBAUM, 2015) e não considera a presença de lesões não-cavitadas (manchas brancas) como atividade de cárie (WHO, 2013).

A metodologia ICDAS utiliza dois escores, o primeiro se refere a condição da superfície dentária quanto a presença de restaurações e varia de 0 a 8 (Quadro 1). E o segundo dígito abrange todos os escores relacionados a condição da superfície dentária quanto a presença ou ausência de cárie, variando desde superfície hígida até presença de lesões extensas (Quadro 2).

Embora a maioria das pesquisas mantenha o nível de cavitação como parâmetro alguns estudos já estão incluindo os estágios de lesões pré-cavitadas e cavitadas baseados nos critérios do ICDAS (MOYNIHAN; KELLY, 2014; SHEIHAM; JAMES, 2015).

Assim, esse método propõe melhorar a incompatibilidade entre os sistemas atuais no âmbito da Cariologia, além de auxiliar de maneira positiva no prognóstico e tratamento das lesões, resultando na melhora da saúde a longo prazo (PITTS, 2012).

A recomendação da declaração de Bangkok de 2019 é que estudos epidemiológicos devem avaliar todos os estágios de cárie incluindo a presença de lesões de cárie não cavitadas para padronizar comparações entre países e regiões. Além disso, as crianças devem ser avaliadas aos três e cinco anos de idade para que se verifiquem as necessidades preventivas e restauradoras (PITTS; BAEZ; DIAZ-GUALLORY, 2019).

Quadro 1 - Classificação clínica da superfície dentária baseada na presença de restaurações de acordo com os critérios do ICDAS.

ICDAS	CONDIÇÃO QUANTO A PRESENÇA DE RESTAURAÇÕES
0	Sem restauração
1	Selante parcial
2	Selante total
3	Restauração estética (Resina, ART)
4	Amálgama
5	Coroa de aço
6	Coroa de ouro, cerâmica
7	Restauração ausente ou fraturada
8	Restauração provisória

Fonte: Ismail *et al.* (2007).

Quadro 2 - Classificação da superfície dentária baseada na condição clínica da superfície de acordo com os critérios do ICDAS.

ICDAS	CONDIÇÃO CLÍNICA DA SUPERFÍCIE
0	Hígido
1	Alteração restrita à fissura ou vista apenas após secagem
2	Alteração mais larga que a fissura ou vista com dente molhado
3	Cavidade localizada e restrita ao esmalte
4	Sombra sugestiva de lesão em dentina
5	Cavidade nítida com lesão em dentina (menos de 50% da face envolvida)
6	Cavidade extensa em dentina (mais de 50% da face envolvida)

Fonte: Ismail *et al.* (2007).

4 LACTOTRANSFERRINA

A lactotransferrina (LTF) foi inicialmente isolada do leite bovino em 1939 por Sorensen e Sorensen (ADLEROVA; BARTOSKOVA; FALDYNA, 2008) e descrita como “proteína vermelha do leite”, devido a intensa coloração vermelha quando incubada na presença de íons férrico (Fe^{+3}), sugerindo uma analogia com as transferrinas presentes no soro, por isso foi chamada de lactotransferrina ou lactoferrina (BAKER e BAKER, 2009). A LTF é glicoproteína multifuncional pertencente à família das transferrinas, com peso molecular de 80 kDa composta por 690 aminoácidos (VELLIYAGOUNDER *et al.*, 2003; AZEVEDO *et al.*, 2010; BRANCHER *et al.*, 2011). A molécula é composta por um único polipeptídeo com dois lóbulos globulares nas regiões N (amino) e C (acetil) terminal conectados por uma alfa hélice e cada lobo apresenta dois domínios, que formam uma fenda na qual o íon férrico está firmemente ligado em cooperação sinérgica com um ânion bicarbonato (STEIJNS; VAN HOOIJDONK, 2000; VELLIYAGOUNDER *et al.*, 2019), com atividade relacionada a regulação e homeostase do ferro, pode se ligar a íons Cu^{+2} , Fe^{+2} , Mn^{+2} e Zn^{+2} porém com menor afinidade. A LTF mantém a estabilidade de ligação ao ferro mesmo em pH baixos, em torno de 4, e pode ser encontrada na forma saturada ou insaturada por este íon (hololactoferrina ou apolactoferrina). (BAKER *et al.*, 2004; TONGUC-ALTIN *et al.*, 2015).

A LTF é amplamente expressa em diversos tecidos corporais e abundante na saliva, colostro, leite, lágrima e secreção nasal, além de importante constituinte de grânulos secundários de neutrófilos (BAKER e BAKER, 2009; AZEVEDO *et al.*, 2010; DOETZER *et al.*, 2015; FINE, 2015). É considerada uma proteína envolvida na homeostase corporal (BRANCHER *et al.*, 2011) que apresenta uma variedade de atividades biológicas. Apresenta função imunorregulatória não dependente de ferro, mediada pela sua natureza catiônica com atividades antibacteriana, antifúngica, antiviral, antitumoral e anti-inflamatória, sugerindo um papel dessa proteína na imunidade inata contra microrganismos patogênicos (STEIJNS; VAN HOOIJDONK, 2000; BAKER e BAKER, 2009; MOSLEMI *et al.*, 2015). Além dessa propriedade bactericida, a lactoferrina também pode neutralizar endotoxinas e inibir a indução de NF- κ B em monócitos em resposta ao lipopolissacarídeo (LPS), resultando em menor produção de IL-6 e TNF-alfa (JORDAN *et al.*, 2005). Além disso, apresenta atividade bacteriostática contra bactérias gram positivas ou gram negativas pela ação de

sequestro de ferro (VELLIYAGOUNDER *et al.*, 2003; VOLCKOVA *et al.*, 2014) ou ainda pode modular a agregação e desenvolvimento do biofilme dentário pela inibição da adesão do *Streptococcus mutans* na superfície dentária (BRANCHER *et al.*, 2011; MOSLEMI *et al.*, 2015; VELLIYAGOUNDER *et al.*, 2019).

4.1 POLIMORFISMOS GENÉTICOS DA *LTF*

Polimorfismos são alterações na sequência de DNA, herdadas, presentes na população (MAF) numa frequência igual ou superior a 1% e que dão origem a 2 ou mais alelos para um determinado *locus* (KARKI *et al.*, 2015). Podem acontecer em todo o genoma, incluindo regiões intergênicas, codificantes (codificam proteínas), regulatórias (controlam a expressão gênica) como também regiões intrônicas (regiões que separam regiões codificantes ou éxons dentro de um gene). Dependendo da localização, as variações genéticas podem influenciar a expressão gênica e a produção, estrutura e função das proteínas (BALASUBRAMANIAN *et al.*, 2004).

As variações de nucleotídeo único (SNV) são a forma mais comum de variação genética na cadeia de DNA e são importantes para o entendimento das bases moleculares de características individuais e relacionadas a doenças (LIU; WANG; WONG, 2010 e KARKI *et al.*, 2015).

Em humanos, o gene da *LTF* está localizado no cromossomo 3 na posição 3p21, apresentando 17 éxons, com tamanho entre 23 e 35 kb. A *LTF* é altamente conservada entre as espécies com igual número de aminoácidos codificados por 15 dos 17 éxons nas diferentes espécies (BRANCHER *et al.*, 2011).

Embora Brancher e colaboradores (2011) não tenham observado associações significativas na região promotora do gene *LTF* em 687 crianças brasileiras de doze anos de origem caucasiana, diversas variações na sequência da *LTF* foram descritas em doenças bucais, como periodontite (JORDAN *et al.*, 2005; WU *et al.*, 2009; ZUPIN *et al.*, 2017) e cárie (DOETZER *et al.*, 2015; VELLIYAGOUNDER *et al.*, 2019).

Entre elas, a SNV c.140 A>G (rs1126478) que é caracterizada pela troca de uma adenina (A) por uma guanina (G) na posição 140 da sequência codificante (éxon 2, códon 47). A variação é não-sinônima e leva a substituição de uma lisina por uma arginina na região α -helicoidal da proteína, causando alterações funcionais na

propriedade antimicrobiana da lactoferrina com importância em doenças causadas por bactérias como cárie e doença periodontal (WU *et al.*, 2009). Estudos indicaram um menor efeito antibacteriano contra gram-positivos associados à variante arginina (alelo G) em comparação com a variante lisina (alelo A) (VELLIYAGOUNDER *et al.*, 2003; FINE *et al.*, 2013; VOLCKOVA *et al.*, 2014).

Em 2010, um estudo envolvendo 110 estudantes brasileiros de 12 anos de idade, Azevedo e colaboradores encontraram uma associação significativa entre as superfícies cariadas e concentração salivar da LTF e o polimorfismo rs1126478. Fine *et al* (2013) encontraram na variante lisina *LTF* rs1126478, resultados significativos com efetiva resposta antimicrobiana e conseqüentemente uma redução de lesões de cárie nos indivíduos do grupo estudado.

Doetzer *et al* (2015) estudaram associação entre outros polimorfismos do gene *LTF* e associação com a suscetibilidade à cárie em 667 estudantes brasileiros de 12 anos de idade e encontraram que o alelo A do rs6441989 confere uma proteção contra atividade cariada. Abbasoğlu *et al* (2015) estudaram a cárie na primeira infância em 259 crianças de 2 a 5 anos na Turquia, concluindo que o genótipo CT do polimorfismo *LTF* rs4547741 foi um fator de proteção contra as cárie na dentição decídua desta população.

Considerando-se a escassez de estudos relacionados à presença de variantes genéticas associadas à presença de cárie dentárias, assim como a necessidade da compreensão dos múltiplos mecanismos que ocorrem a nível molecular envolvendo polimorfismos e cárie dentária, com potencial de fornecer novas abordagens, que possam levar a instituição de tratamentos adequados, antes mesmo do aparecimento de danos irreversíveis (WANG; QUIN, 2018), o presente trabalho avaliou a associação da variação de nucleotídeo único (SNV) rs1126478 do gene da *LTF* e cárie dentária em pré-escolares.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo Geral

Avaliar a associação da variante genética rs1126478 do gene *LTF* com a cárie dentária em crianças de 3 a 6 anos de acordo com a metodologia de detecção de cárie ICDAS.

5.2 Objetivos específicos

- Descrever um protocolo de calibração de dentistas na metodologia ICDAS;
- Verificar a prevalência de cárie em crianças de 3 a 6 anos de idade, atendidas na Bebê-Clínica da Universidade Estadual de Londrina, Londrina/PR;
- Identificar fatores ambientais, socioeconômicos e comportamentais relacionados à experiência de cárie na população estudada;
- Determinar a frequência alélica e genotípica da variante rs1126478 de *LTF* nesta população;
- Avaliar a influência da variante rs1126478 de *LTF* sobre a suscetibilidade à cárie e presença de biofilme bucal, por meio de estudo de associação caso-controle.

PRODUÇÃO CIENTÍFICA

6 PRODUÇÃO CIENTÍFICA

6.1 Artigo 1

A protocol for examiners calibration using ICDAS criteria in pediatric patients

Paola Singi¹, Karen Brajão de Oliveira², Cássia Cilene Dezan Garbelini³

¹Laboratory of Molecular Genetics and Immunology, Department of Pathological Sciences, Biological Sciences Center, State University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil.

²Adjunct Professor, Department of Pathological Sciences, State University of Londrina, Londrina, PR, Brazil.

³Associate Professor, Department of Oral Medicine and Dentistry for Children, State University of Londrina, Londrina, PR, Brazil.

Author to whom correspondence should be addressed: Cássia Cilene Dezan-Garbelini, Rua Benjamin Constant, 800, Centro, Londrina, PR, Brazil. 86010-350. Phone: 55 43 3323-9455. E-mail: dgcassia@gmail.com.

ABSTRACT

Objective: This paper describes a protocol to calibrate dentists, with no prior experience in dental caries diagnoses in epidemiological studies to assess caries according to ICDAS criteria in preschool children.

Methods: A cross sectional study was performed with four examiners, who trained, calibrated and examined 800 surfaces of primary molars in 20 preschool children. All oral examinations (round 1 and round 2) were conducted under standard conditions. After baseline training, each round was performed with an interval of 7 days, with participation of 10 children.

Results: Weighted Kappa scores for intra-examiner reliability ranged from 0.56 to 0.76 and 0.72 to 0.83 for round 1 and 2, respectively. Weighted Kappa scores for inter-examiner reliability ranged from 0.45 to 0.73 and 0.62 to 0.73 for round 1 and 2, respectively.

Conclusions: The exhaustive training considerably improved the results and the different methodologies allowed us to identify the points of disagreement during the process along with the necessary interventions to establish a high degree of reliability among examiners. The protocol presented credibility and emphasizes the relevance of this study mainly in this age group.

Clinical relevance: The protocol emphasizes the importance on minimal restorative management of dental caries mainly in this age group.

Keywords: Primary teeth, Dental caries, Preschool children, Calibration

INTRODUCTION

Dental caries is a dynamic and continuous process that can present different stages of evolution, from undetected visible changes to complete destruction of tooth structure [1,2]. Dental caries detection in early stages remains a major challenge [2-5]. However, changes in dental caries profile require an improvement in diagnostic methods. There are more than 29 different methods of dental caries detection in numerous countries [6-9]. The most used methods for caries detection are based on visual inspection [1,10,11] which is a well-accepted resource in clinical practice due its non-invasive, low cost and handily way to perform [2,11].

DMFT (Decay-Missing-Filled Teeth) index is recommended by World Health Organization [1,8,12] and the method is widely used in dental research. It is based on teeth cavitation level and does not consider the occurrence of non-cavitated lesions (white spot lesion) as a caries activity. The DMFT index gives an equal weight to missing teeth, untreated caries, or restored teeth; it does not discriminate caries lesion activity and does not include cavities in enamel [5,13]. Even so, it is still very hard to standard the evaluation of methods to dental caries detection, especially in initial stages of the disease [5,14]. This is explained because most professionals only consider a decayed tooth when they observe well-established stages of the disease as: discoloration, cavitation, or loss of original anatomy. However, there is disease subclinical activity even before clinically visible signs. Knowledge of this process is very important because it allows establishing an effective treatment based on individual risk evaluation and caries activity monitoring in a wide and efficient way [2] even before irreversible lesion appearance [14]. Therefore, it is pivotal to reconsider the existing criteria used to evaluate the presence of dental caries in all disease development stages [1].

There are arising recommendations for new strategies for dental caries detection. These suggestions assert for a transition from dental caries-based concepts on enamel and dentin to a more comprehensive picture which small changes in hard tissues could already be detected and treated using preventive or less invasive methods for stopping or even regressing these lesions [8,9,11,15]. The request for a better diagnosis and evaluation criteria of dental caries propitiated the development of the International Caries Detection and Assessment System (ICDAS), based on visual-tactile inspection. This method was conducted by the Detroit Center for Research on Oral Health Disparities, and it was developed to provide an evidence-based system

that allows standardized detection and diagnosis of dental caries in different settings and situations aiming a classification that causes diagnostic reproducibility and good clinical use [4, 9].

ICDAS can be used for assessing dental caries in both, adults and children, promoting prognosis and treatment of lesions resulting in improvement of long-term oral health [9]. ICDAS could be considered the better method for dental caries diagnostic [4,15,18], as soon as it has the advantage to provide preventive or minimally invasive interventions that reduce essentially curative treatments and leads to a better quality of life in all age groups, mainly children [7,16].

Regards pediatric patient management require greater difficulties demanding an additional theoretical and practical training time to standardize a vision of dental changes in early stages, especially at preschool age. This age group presents characteristic fears such as separation of parents, relationships with strangers, anxiety and pain, which may interfere with dental procedures [17]. The limited number of studies that use an ICDAS methodology for *in vivo* analysis of preschool children[15,16,19,20] justify the relevance of this study.

In front of exposed above, the aim of this study was to describe a protocol to calibrate dentists, with no prior experience in dental caries diagnoses in epidemiological studies, to assess caries according to ICDAS criteria in preschool children.

MATERIAL AND METHODS

This study was undertaken in the Department of Pediatric Dentistry of State University of Londrina, from February to August, 2017, a city in Brazil Southern.

Ethical considerations

Ethical approval was obtained from the Institutional Ethics Committee Involving Humans of the State University of Londrina, Londrina, PR, Brazil (CAAE: 56077916.2.0000.5231) in compliance with Brazilian National Health Council Resolution 466/12. All parents/guardians received information about study risks and benefits, and signed a statement of informed consent. For ethical reasons, all study participants that demanded dental care were referred to treatment at the Department of Pediatric Dentistry.

Participants

This cross-sectional study enrolled 20 preschool children, from 3 to 5 years old, both genders, from a community nursery school. The nursery school Valéria Veronesi was selected because it is located in downtown and serves children from all regions of the city. All children had complete deciduous dentition and no permanent or exfoliated deciduous teeth. The researchers had no previous contact with children and their oral status was unknown.

Eligibility criteria

Inclusion criteria were as follow: regular enrollment in preschool, age-compatible cognitive development, absence of systemic disease and complete primary dentition. Children with special needs and those that presented disruptive behavior (fear, anxiety, discomfort) in oral examination were excluded.

Examiner training

The more qualified professional (senior examiner) conducted all training about ICDAS criteria, according to the flowchart of the training stages (Figure1). Four examiners completed the 90-minutes ICDAS e-learning program (www.icdas.org) together and took part in theoretical and calibration practice training, prior to the first clinical reproducibility examination. The senior examiner conducted a baseline training of four hours with dental images projection (n=100) and subsequent diagnostic and discussion of each image. All these images were from personal collection and presented primary teeth with (in different stages) or without caries lesions. At this exercise each examiner assigned the ICDAS codes individually and after comparing the results, had a discussion until agreement establishment.

Subsequently all, examiners performed the first ICDAS practical training (clinical training) with one child who was not included in main sample. In this examination, all surfaces of the primary teeth (88 surfaces) were evaluated and the examination was repeated seven days later to evaluate intra and inter-examiner agreement (data not shown). Thus, the examiners completed the first stage of the training.

In second stage, ICDAS reproducibility was performed as described below in the ICDAS round 1 and the examiner with worse results was excluded from training.

At the beginning of third stage, clinical training was performed by oral examination of four preschool children, who were not part of main sample. Senior examiner led a clinical examination of one child full mouth (20 primary teeth, 352 surfaces) examined in the same day, according to criteria described in section Oral examination. ICDAS criteria were discussed during exam.

After this, three remaining examiners performed ICDAS theoretical-practical training in extracted teeth. Extracted teeth were consecutively numbered from 1 to 20, positioned sequentially on the stand and each examiner evaluated the face previously marked (sound or carious) and assigned ICDAS code. Then the 20 teeth were then photographed and analyzed about the assigned code to each surface evaluated in a 60 minutes discussion session.

At the end of third stage, three remaining examiners conducted oral examinations of 10 children.

Oral examination

All oral examinations were conducted under standard conditions, with aid of dental light, 3-1 syringe to dry, plane buccal mirror and blunt probe (WHO). Initially dental prophylaxis was done with dental brush and dental floss. First, teeth were evaluated wet, after that, dried for 5 seconds with compressed air according with the ICDAS criteria (4). All exams were performed in the morning between 08:00 AM and 11:30 AM. All surfaces of teeth 54, 55, 74 and 75 (mesial, distal, occlusal, buccal, lingual/palatal surfaces) were examined. In each round, each evaluator examined the child individually and a trained note taker registered results. Each examiner remained in the dental office while examining all were blind to the results themselves and to other examiners results until statistical analysis were done.

ICDAS first round

In first round of reproducibility, 14 children were invited to participate and 10 children composed main sample. The length of time for examination of each initial four examiners was recorded in an odontogram, as well as the values assigned to each dental surface for evaluation. After 7 days, the same children were re-examined (n= 10) by the same examiners. Four hundred molars surfaces were evaluated (40 first molars, 40 second molars). The statistical parameters were described as follows the one proposed by Foley (2012) (13).

ICDAS second round

In second round of reproducibility, 12 children were invited to participate and 10 composed the main sample. Four hundred molar surfaces were evaluated (40 first molars and 40 second molars). The length of time for examination of each three remaining examiners, and values assigned to each dental surface for evaluation were recorded in an odontogram. After 7 days, the same children were re-examined (n= 10) by the same examiners. All criteria for clinical examination are described in the previous section.

Statistical analysis

The Shapiro-Wilk test was used to test normality of quantitative variables. Those presenting normal distribution are presented as mean and standard deviation, otherwise they are presented as median and first and third quartile. In each round, the T test compared differences in age between sexes.

Weighted kappa score was used to determine the reliability of inter and intra-examiner to ICDAS for all examiners. Power agreements for kappa score were interpreted according to Foley (2012)(21): poor <0.20; fair 0.21 - 0.40; moderate 0.41 - 0.60; good 0.61 - 0.80; very good 0.81 - 1.00 (13).

Paired sample t-test was used to test differences in length of time to oral examination. Similarity in total distribution of dental caries diagnosis for each examiner was tested by the Stuart-Maxwell test for marginal homogeneity. The data were analyzed by IBM SPSS Statistics for Windows, version 25.0 (IBM Corp., Armonk, N.Y., USA SPSS) at a 5% significance level.

RESULTS

Twenty-six children were invited to attend the study, and of these 20 children completed it (n=20). 6 children were excluded, 2 because of disruptive behavior and four because missed of second examinations. In the first round, 4 (40%) boys and 6 (60%) girls, with a mean age of 4.07 years (standard deviation =0.54), participated in the study. In the second round, 3 (30%) boys and 7 (70%) girls, with a mean age of 4.92 years (standard deviation =0.25), participated in the study.

The reliability in each round of ICDAS criteria for each examiner are summarized in Table 1. Weighted Kappa scores for intra-examiner reliability ranged, respectively, from 0.56 to 0.76 (moderate to good) and 0.72 to 0.83 (good to very good), in first and second rounds. Weighted Kappa scores for inter-examiner reliability ranged from 0.45 to 0.73 (moderate to good) and 0.62 to 0.73 (good), in the first and second rounds, respectively. The greatest difference in intra-examiner kappa was observed for examiner 1 between the rounds (WK values 0.64 and 0.75, respectively). Weighted kappa values obtained in the second round were higher when compared to first round for examiners 1, 3 and 4, with a lower range in confidence interval evidencing the reliability of the method. Kappa scores for *in vitro* extracted teeth examination ranged from 0.94 to 0.97 (very good).

Table 2 describes the length of time for each examiner to perform oral examination. Although not significantly, a reduction in length of time for oral examination was consistently trend observed between rounds for examiners 1, 3 and 4.

Marginal homogeneity was used to analyze similarity in total distribution of diagnosis for each examiner (Table 3). In this study, the marginal homogeneity test between the three examiners showed no statistical differences ($P < 0.05$) for the intra and inter examiners agreement in the second round. In the first round, the marginal homogeneity test showed differences only for examiner 2 ($P = 0.02$) in intra-agreement.

According to our study (Table 4), most surfaces were sound and less than 18 percent of them were scored with enamel and/or dentin caries, but this data does not show the true caries frequency in this sample, since only molars were evaluated. We observed that the main source of disagreement occurred between codes 1 and 2 in first and second rounds, which are related to the presence of a dry or wet white spot.

DISCUSSION

This paper explored a new protocol to calibrate dentists with no prior experience in epidemiological studies and dental caries diagnosis in the ICDAS methodology. The calibration process of examiners can be considered fundamental for any method of disease diagnostic, whereas the high agreement between examiners validates the excellence of the method [22]. We describe in detail the method, tools, duration and frequency of training in baseline and during the period of training. This can be useful

for comparing clinical and epidemiological studies or even for combining different techniques [23].

Some studies reported that the ICDAS method presents good reliability for diagnosis of occlusal caries in primary teeth [15,20,24,25]. It's relevant because dental caries is a highly prevalent condition in primary dentition of the Brazilian population [26,27,28]. Once set, theoretical and practical training were essential for the examiners skills development in order to obtain a good visual-tactile performance, as analyzed in most of the studies [1,29]. Weighted kappa is a useful statistical tool for analysis of ordinal variables such as ICDAS because it attributes greater weight to the large differences in scores assigned to the examination than to the small differences [2,30]. According to Table 1, the first round of ICDAS presented acceptable results with Weighted kappa values for intra-examiner reliability, ranging from 0.56 to 0.76 and 0.48 to 0.73 for inter-examiners (moderate to good). After successive training, the second round showed scores with increased Weighted kappa for intra-examiner reliability ranging from 0.72 to 0.83 and 0.62 to 0.73 for inter-examiner (good to very good) indicating that the training improves performance. Qudeimat (2016) [29] obtained similar intra-examiner Kappa values that ranged from 0.66 to 0.81 and inter-examiner reproducibility ranged from 0.42 to 0.75 for the 1- and 3- months sessions. However, the authors did ICDAS reproducibility in extracted teeth, which contrasts with the kappa values of the current study that did analysis in preschool children. When comparing kappa values for extracted teeth in both studies, they are similar, which reiterates the difficulty of the methodology in pediatric patients. ICDAS methodology when performed in children, can present numerous difficulties, with different behaviors that require pediatric management, greater attention and agility in visualization and detection during the examination. This can be evidenced by inter-examiner kappa statistical values for extracted teeth were significantly increased, and ranged from 0.94 to 0.97 (very good). This fact can be justified by the ease of evaluation, performed in an extraoral environment, without saliva's interference, however with less ecological validity.

We chose to evaluate only primary molars, since we observed that the same child, when submitted to successive evaluations by several examiners, grows tired and makes it difficult to perform, mainly for the last examiners [11,23]. Preschool age children may have difficulty in collaborating which often complicates the oral examination in this age group; factors such as age, insecurity, anxiety, traumatic past

experience, difficulty in mouth opening and fatigue can lead to superficial and inaccurate examination and failure to observe important conditions [23,31]. ICDAS, even being a visual inspection examination, requires longer assessment time which can be a problem in children younger than 5 years [13,26,32]. As all surfaces are evaluated wet and then dried to check for possible white spot, the time of oral examination considerably increases. Nevertheless, in the present study there was no statistically difference in time spent between oral examinations among examiners.

In Brazil, some studies have used ICDAS to evaluate caries experience in children [18,26,33]. Braga et al. (2009)[18] presented a methodology very similar to that used in this study, with children (36 to 59 months), 3 examiners, extracted teeth training and photographs and a record of examination time. The authors conclude that ICDAS examination time is twice as long as compared to the WHO index and that longer training may increase the reproducibility of the method. Therefore, authors show that ICDAS is viable in epidemiological surveys with preschool children. Castro, Vianna and Mendes (2018) [7] found similar results and concluded that the ICDAS is appropriate for clinical studies but spends a more time for its execution and is more difficult than WHO index.

Bader, Shugars, Bonito (2002) [10] suggest that to obtain higher scores and increase method reliability is recommended that 3 or more examiners participate in the process. In this investigation, 4 examiners participated in the training and calibration process. However, in the process one examiner was excluded. The reasons for this exclusion were as follows: inconsistency intra-examiner agreement in the first round (Table 1) and bias detected in marginal homogeneity in the first round (data not show). This can be an important aspect of team training for epidemiological clinical oral investigation examinations in field studies. So it's desirable to start from a larger amount of examiners because eventually some must be excluded to avoid inconsistency. Despite several studies concluding the inexperience of the examiners in this methodology, it does not seem to influence the results, since other studies confirm excellent reliability results even for inexperienced dentists [4,5,6,11,18,34].

The marginal homogeneity test is an efficient tool used in raters' agreement analysis. In accordance with Sim and Wright (2005) [30]: "If differences are observed (bias) the categories of disagreement can be identified and training can improve the marginal proportions of the evaluators, leading to better agreement". So, in this study

only examiner 2 did show great disagreement intra and inter-examiner in marginal homogeneity test even after training which justifies exclusion of study.

According to Jablonski-Momeni et al. (2010) [35] training in ICDAS should therefore always include extracted teeth and examination of patients, to avoid major discrepancies between code 1 and 2, because most of the disagreements between examiners occurs between this codes [15]. Problems associated with these codes may be due to the difficulty in detecting and differentiating small changes in early lesions. In our training, wet and dry teeth images were used to minimize this problem.

Withal, during examiner training we analyzed one hundred dental images from primary dentition and discussed each image. The training with photographs is very important because it allows better discussion and elucidation of doubts about the real condition of the examined surface, which in person would not be possible, especially in pediatric patients [18,20,23,35]. It is crucial to remember that training tools as extracted teeth and photographs should not replace the *in vivo* exam. Different methodologies described to calibration methods can be combined to increase the results efficiency mostly in primary dentition.

Jablonski-Momeni et al. (2010) [35] suggest that short time intervals (did not specify the interval) may make it easier for examiners to remember the surface score examined and promote bias in study reliability. We thought a seven days time interval between rounds would be adequate to avoid erroneous estimates in the study. Since in literature there is no established protocol of time interval between the exams [35].

Considering the major limitation of this study, which is the difficult based on pediatric patient management, the theoretical and practical training can enable improvement of ICDAS reproducibility, facilitating the diagnosis of dental caries and perfecting the clinical vision. In addition, ICDAS *in vivo* has the advantage of the simultaneous development of skills in dental caries diagnosis and child behavior management.

CONCLUSION

In order to have good reliable results in epidemiological studies, it is necessary to have a well-described, well-founded and detailed examiner calibration process. Thus, the results obtained guarantee a high degree of safety for both the examiner and the team. The exhaustive training improved the results considerably and the different methodologies allowed the identification of the points of disagreement during the

process and the necessary interventions to establish a high degree of reliability among examiners. The protocol presented showed credibility and emphasizes the relevance of this study mainly in this age group. More research describing calibration protocols with different techniques or combined techniques may be useful for studies of concordance of examiners in order to determine an effective method in the caries diagnosis.

References

1. Iranzo-Cortes JE, Terzic S, Montiel-Company JM, Almerich-Silla JM. Diagnostic validity of ICDAS and DIAGNOdent combined: an in vitro study in pre-cavitated lesions. *Lasers Med Sci.* 2017;32(3):543-8.
2. Pitts N. *Cárie dentária: diagnóstico e monitoramento.* São Paulo: Artes Médicas; 2012. 232 p.
3. Rodrigues JA, de Oliveira RS, Hug I, Neuhaus K, Lussi A. Performance of experienced dentists in Switzerland after an e-learning program on ICDAS occlusal caries detection. *J Dent Educ.* 2013;77(8):1086-91.
4. Ismail AI, Sohn W, Tellez M, Amaya A, Sen A, Hasson H, et al. The International Caries Detection and Assessment System (ICDAS): an integrated system for measuring dental caries. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2007;35(3):170-8.
5. Zandona AG, Al-Shiha S, Eggertsson H, Eckert G. Student versus faculty performance using a new visual criteria for the detection of caries on occlusal surfaces: an in vitro examination with histological validation. *Oper Dent.* 2009;34(5):598-604.
6. Altarakemah Y, Al-Sane M, Lim S, Kingman A, Ismail AI. A new approach to reliability assessment of dental caries examinations. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2013; 41(4):309-16.
7. Castro ALS, Vianna MIP, Mendes CMC. Comparison of caries lesion detection methods in epidemiological surveys: CAST, ICDAS and DMF. *BMC Oral Health* 2018; 18 (1):122. <https://doi.org/10.1186/s12903-018-0583-6>.
8. Chu CH, Chau AM, Lo EC. Current and future research in diagnostic criteria and evaluation of caries detection methods. *Oral Health Prev Dent.* 2013; 11, (2): 181-9.
9. Pitts NB. Modern concepts of caries measurement. *J Dent Res.* 2004; 83 Spec No C:C43-7.

10. Bader JD, Shugars DA, Bonito AJ A systematic review of the performance of methods for identifying carious lesions. *J Public Health DentRadiol Endod.* 2002;62(4):201-13.
11. Gimenez T, Bittar DG, Piovesan C, Guglielmi CA, Fujimoto KY, Matos R, et al. Influence of examiner experience on clinical performance of visual inspection in detecting and assessing the activity status of caries lesions. *Oper Dent.* 2013;38(6):583-90.
12. WHO. *Oral Health Surveys: Basic Methods.* 2013; 5th.
13. Honkala E, Runnel R, Honkala S, Olak J, Vahlberg T, Saag M, et al. Measuring Dental Caries in the Mixed Dentition by ICDAS. *Int J Dent.* 2011;2011:150424.
14. Shoaib L, Deery C, Ricketts DN, Nugent ZJ. Validity and reproducibility of ICDAS II in primary teeth. *Caries Res.* 2009;43(6):442-8.
15. Braga, MM et al. In vitro comparison of Nyvad's system and ICDAS-II with lesion activity assessment for evaluation of severity and activity of occlusal caries lesions in primary teeth. *Caries research.* 2009; 43(5): 405-412.
16. Mendes FM, Braga MM, Oliveira LB, Antunes JL, Ardenghi TM, Bonecker M. Discriminant validity of the International Caries Detection and Assessment System (ICDAS) and comparability with World Health Organization criteria in a cross-sectional study. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2010;38(5):398-407.
17. Clinical Affairs Committee-Behavior Management Subcommittee. Guideline on Behavior Guidance for the Pediatric Dental Patient. *Pediatr Dent.* 2015;37(5):57-70.
18. Braga MM, Oliveira LB, Bonini GA, Bonecker M, Mendes FM. Feasibility of the International Caries Detection and Assessment System (ICDAS-II) in epidemiological surveys and comparability with standard World Health Organization criteria. *Caries Res.* 2009;43(4):245-9.
19. Piovesan C *et al.* Inequality in dental caries distribution at noncavitated and cavitated thresholds in preschool children. *Journal of public health dentistry.* 2014; 74 (2): 120-6.
20. Braga MM, de Benedetto MS, Imperato JC, Mendes FM. New methodology to assess activity status of occlusal caries in primary teeth using laser fluorescence device. *J Biomed Opt.* 2010;15(4):047005.julho 2010.
21. Foley JI. Dental students consistency in applying the ICDAS system within paediatric dentistry. *Eur Arch Paediatr Dent.* 2012;13(6):319-22.
22. Ismail AI. Visual and visuo-tactile detection of dental caries. *J Dent Res.*2004; 83 Spec No C:C56-66.

23. Christian B, Amezdroz E, Calache H, Gussy M, Sore R, Waters E. Examiner calibration in caries detection for populations and settings where in vivo calibration is not practical. *Community Dent Health*. 2017;34(4):248-53.
24. Ekstrand KR, Martignon S, Ricketts DJ, Qvist V. Detection and activity assessment of primary coronal caries lesions: a methodologic study. *Oper Dent*. 2007;32(3):225-35.
25. Kockanat A, Unal M. In vivo and in vitro comparison of ICDAS II, DIAGNOdent pen, CarieScan PRO and SoproLife camera for occlusal caries detection in primary molar teeth. *Eur J Paediatr Dent*. 2017;18(2):99-104.
26. de Amorim RG, Figueiredo MJ, Leal SC, Mulder J, Frencken JE. Caries experience in a child population in a deprived area of Brazil, using ICDAS II. *Clin Oral Investig*. 2012;16(2):513-20.
27. Rodrigues HB, Guedes IX, Guare RO, Leal SC, Lussi A, Diniz MB. Caries Experience According to ICDAS in Preschool Children from Private and Public Schools of a Community with a Nonfluoridated Water Supply. *Oral Health Prev Dent*. 2019;17(3):267-75.
28. BRASIL. Ministério da Saúde. Projeto SB Brasil 2010: Pesquisa Nacional de Saúde Bucal: resultados principais. Brasília: Ministério da Saúde, 2012.
29. Qudeimat MA, Alomari QD, Altarakemah Y, Alshawaf N, Honkala EJ. Variables affecting the inter- and intra-examiner reliability of ICDAS for occlusal caries diagnosis in permanent molars. *J Public Health Dent*. 2016;76(1):9-16.
30. Sim J, Wright CC. The kappa statistic in reliability studies: use, interpretation, and sample size requirements. *Phys Ther*. 2005;85(3):257-68.
31. Aminabadi NA, Puralibaba F, Erfanparast L, Najafpour E, Jamali Z, Adhami SE. Impact of temperament on child behavior in the dental setting. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospects*. 2011;5(4):119-22.
32. Novaes TF, Matos R, Raggio DP, Imparato JC, Braga MM, Mendes FM. Influence of the discomfort reported by children on the performance of approximal caries detection methods. *Caries Res*. 2010;44(5):465-71.
33. Braga MM, de Benedetto MS, Imparato JC, Mendes FM. New methodology to assess activity status of occlusal caries in primary teeth using laser fluorescence device. *J Biomed Opt*. 2010;15(4):047005.julho 2010.
34. Diniz MB, Rodrigues JA, Hug I, Cordeiro Rde C, Lussi A. Reproducibility and accuracy of the ICDAS-II for occlusal caries detection. *Community Dent Oral Epidemiol*. 2009;37(5):399-404.
35. Jablonski-Momeni A, Ricketts DN, Weber K, Ziomek O, Heinzl-Gutenbrunner M, Schipper HM, et al. Effect of different time intervals between examinations on the reproducibility of ICDAS-II for occlusal caries. *Caries Res*. 2010;44(3):267-71.

Box 1 - Classification of dental surfaces based on the presence of restorations according to the ICDAS criteria.

ICDAS code	Description
0	Sound
1	Sealant, partial
2	Sealant, full
3	Tooth colored restoration (resin or glass-ionomer cement)
4	Amalgam restoration
5	Stainless steel crown
6	Porcelain or gold crown
7	Lost or broken restoration
8	Temporary restoration

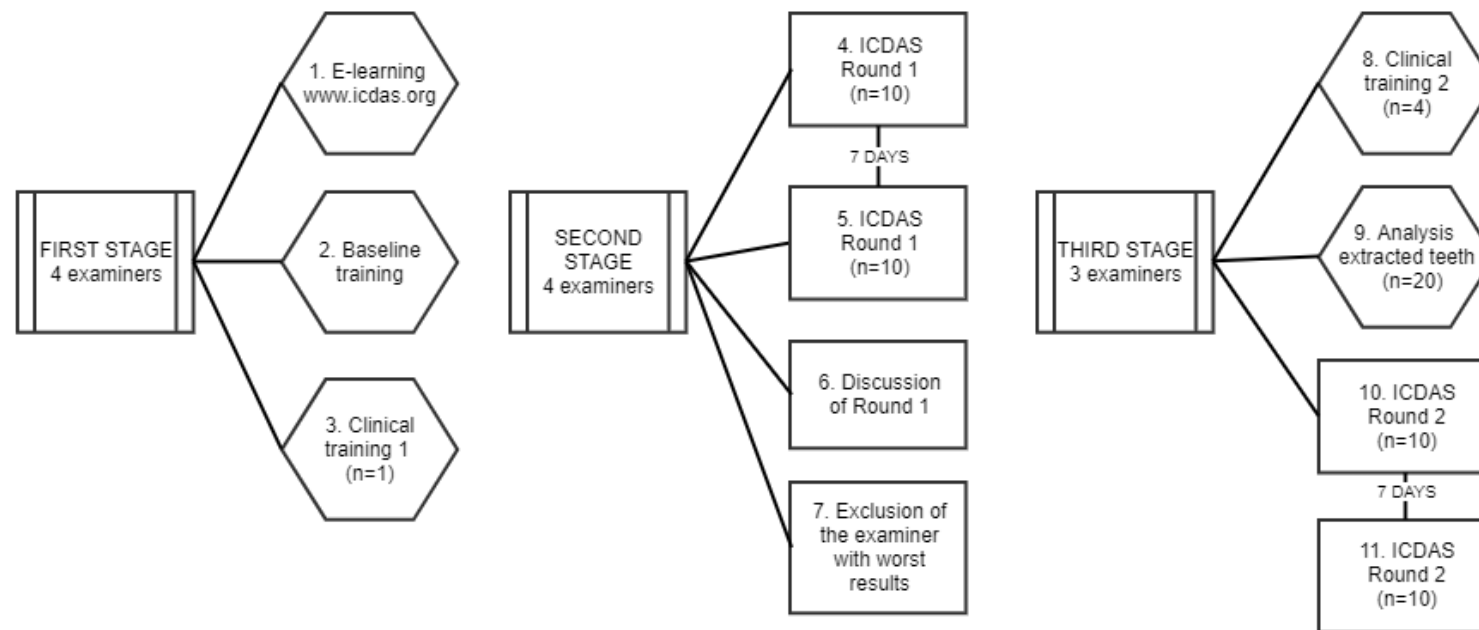
Adapted from Ismail, 2007

Box 2 - Classification of the carious status based upon the International Caries Detection and Assessment System (ICDAS)

ICDAS	Description
0	Sound tooth surface
1	Visual change in enamel-seen dry
2	Distinct visual change in enamel
3	Localized enamel breakdown because of caries with no visible dentin or underlying shadow
4	Underlying dark shadow from dentine
5	Distinct cavity with visible dentine
6	Extensive distinct with visible dentine

Adapted from Ismail, 2007

Figure 1 - Study flowchart describing the three stages of theoretical and practical training.



1st stage: Theoretical-practical leveling: this stage comprehended e-learning, baseline training and clinical training with one patient (1,2,3). Four examiners took part at this stage, one senior examiner (pediatric dentist, with 25 years of experience in the field) and 4 general dentists, with no previous experience in dental caries diagnose in epidemiological studies. 2nd stage: All four examiners took part at this stage that consisted of 2 consecutive oral examinations of 10 children, with seven days interval (4,5), discussion of round 1 and exclusion of the examiners with worst results (6,7) 3rd stage: Three examiners took part at this stage. It comprehended: a) clinical training reinforcement with 4 children; b) one training session with extracted teeth (8,9); c) ten children consecutives intraoral exams, with 7 days interval (10,11).

Table 1 - Weighted kappa values for intra- and inter-examiner for ICDAS-II examinations (95% confidence intervals in parentheses).

Examiners	1	2	3	4
1	0.64 (0.49-0.80) ¹	0.57 (0.42-0.72) ¹	0.48 (0.31-0.65) ¹	0.45 (0.29-0.62) ¹
	0.75 (0.64-0.87) ²	*	0.70 (0.52-0.81) ²	0.73 (0.61-0.86) ²
2		0.56 (0.39-0.73) ¹	0.73 (0.60-0.85) ¹	0.52 (0.34-0.69) ¹
		*	*	*
3		0.73 (0.60-0.85) ¹	0.74 (0.60-0.87) ¹	0.52 (0.33-0.70) ¹
		*	0.83 (0.74-0.92) ²	0.62 (0.50-0.75) ²
4				0.76 (0.61-0.90) ¹
				0.72 (0.60-0.84) ²

¹Weighted Kappa scores from the ICDAS Round 1 intra- and inter examiners (n=400 teeth surfaces).

²Weighted Kappa scores from the ICDAS Round 2 intra- and inter examiners (n=400 teeth surfaces).

*In the round 2, Examiner 2 presented the worst result, being excluded.

Table 2 - Time spent (in seconds) by examiners in 1st and 2nd oral examination in each round.

Examiners		1	2	3	4
Round 1	1 st Oral examination	183.10± 54.97	161± 80.22	133.7± 52.84	148.8± 48.65
	2 nd Oral examination	144.8± 41.91	163.9± 84.04	125.7± 57.05	136.5± 56.71
Round 2	1 st Oral examination	124.9± 31.45	*	112.5± 33.07	114.5± 45.45
	2 nd Oral examination	125.7± 36.84	*	120.1± 21.08	104.2± 31.65

Data were expressed as mean ± standard deviation. Paired sample t-test compared differences between time in oral examination in each round. No significant difference between times were found ($p > 0.05$).

Note*- Examiner 2 was excluded from Round 2.

Table 3 - Stuart-Maxwell test for marginal homogeneity to assess systematic differences in assessment of caries lesions intra- and inter-examiners in the Round 2.

Examiners	1	3	4
1	$P = 0.270$	$P = 0.210$	$P = 0.399$
3		$P = 0.104$	$P = 0.245$
4			$P = 0.272$

$P < 0.05$ indicates level of disagreement in the group.

Table 4 - Frequency of the scores attributed to dental surfaces according to ICDAS criteria.

ICDAS		EXAMINERS			
		1	2	3	4
		(%)	(%)	(%)	(%)
		1 st / 2 st	1 st / 2 st	1 st / 2 st	1 st / 2 st
ROUND 1	00	89.0/81.5	85.5/83.0	86.5/87.0	86.5/90.5
	01	2.5/11.0	8.0/6.0	7.5/6.5	3.5/3.5
	02	2.0/1.5	2.5/3.5	0.5/0.0	4.0/1.0
	03	1.5/1.5	0.5/1.5	0.0/1.0	2.0/1.5
	04	0.0/0.0	0.0/0.5	0.5/0.5	0.0/0.0
	05	2.5/4.0	2.5/3.0	4.5/2.5	2.0/2.0
	06	1.0/0.0	0.5/2.0	0.0/2.0	1.5/1.0
	30	1.5/0.5	0.0/0.5	0.0/0.5	0.5/0.5
	31	0.0/0.0	0.5/0.0	0.5/0.0	0.0/0.0
			100	100	100
ROUND 2	00	81.5/86.0	*	83.5/82.5	84.0/84.5
	01	8.0/2.0	*	3.0/2.5	4.0/0.0
	02	5.5/6.0	*	4.5/3.5	6.0/8.5
	03	1.0/1.5	*	4.0/5.5	2.0/3.0
	04	0.0/0.0	*	0.0/0.0	0.5/0.0
	05	2.5/2.5	*	3.0/4.0	0.5/1.0
	06	1.0/1.5	*	1.0/1.0	2.5/2.5
	30	1.0/0.5	*	0.0/0.0	0.0/0.0
	35	0.0/0.0	*	0.5/0.5	0.5/0.5
	80	0.0/0.0	*	0.5/0.5	0.0/0.0
		100	—	100	100

* Examiner 2 presented the worst results and was excluded from Round 2.

6.2 Artigo 2

***LTF* rs1126478 genetic variant association with dental caries according to ICDAS criteria in Brazilian preschool children**

Paola Singi¹, Cássia Cilene Dezan Garbelini², Karen Brajão de Oliveira^{1*}

¹ Laboratory of Molecular Genetics and Immunology, Department of Pathological Sciences, Biological Sciences Center, State University of Londrina, PR 445 Km 380 Celso Garcia Cid Highway, Londrina, Paraná, Brazil.

² Associate Professor, Department of Oral Medicine and Dentistry for Children, State University of Londrina, Londrina, PR, Brazil.

* Corresponding author E-mail: karen.brajao@uel.br; Tel: +55 43 3371 5728; Fax: +55 43 3371 4207

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the influence of the lactotransferrin (*LTF*) gene SNV rs1126478 (codon 47 140A/G in exon 2, Lys/Arg) on dental caries susceptibility in preschool children since *LTF* is an important salivary glycoprotein, which interacts with dental biofilm, and may present a role in dental caries. In this case-control study, 448 preschool children aged from 3 to 6 years were included. After oral examination, the study population was divided according to ICDAS criteria: caries-free group (ICDAS 0) with 48 patients, white-spot group (ICDAS 1-2) with 248 and enamel and dentin caries group (ICDAS 3-6) composed of 152 children. DNA from buccal mucosal cells of unstimulated saliva were collected and the *LTF* genetic variant rs1126478 was analyzed by PCR followed by Restriction Fragment Length Polymorphism (*RFLP*) analysis using the *Ear-I* restriction enzyme. Multinomial logistic regression model adjusted for confounding factors was performed and children with the AG genotype were less likely to have enamel and dentin caries when compared to those with the AA genotype (OR = 0.42, CI_{95%} = 0.18 – 0.95, *P* = 0.038) and AA+GG (OR= 0.43; IC_{95%}= 0.21-0.87; *P*= 0.020). The other tested models had no significant influence on caries development. To the best of our knowledge, this is the first study to show the influence of *LTF* genetic variation rs1126478 on the caries development, according to ICDAS criteria. *LTF* rs1126478 was associated with dental caries in the Brazilian population, however further analyses are necessary to prove the real influence of the *LTF* rs1126478 variation on the development of dental caries.

Keywords: genetic polymorphism, lactotransferrin, preschoolchildren, primary dentition.

INTRODUCTION

Dental caries is considered a major oral health problem in the world affecting adults and children, according to the World Health Organization (WHO, 2017). DMFT (Decay-Missing-Filled Teeth) index is recommended by World Health Organization (WHO, 2013) and the method is widely used in dental research (IRANZO-CORTES *et al.*, 2017; GARBIN *et al.*, 2019). It is based on teeth cavitation level and does not consider the occurrence of non-cavitated lesions (white spot lesions) as a caries activity. Therefore, it is pivotal to reconsider the existing criteria used to evaluate the presence of dental caries. Based on scientific evidence and the need for better criteria for diagnosis and evaluation of dental caries, the International Caries Detection and Assessment System (ICDAS) was developed (ISMAIL, 2007). ICDAS presents the advantage of a more sensitive method and provides preventive or minimally invasive interventions that reduces essentially curative treatments and leads to a better life quality in all age groups, mainly children (MENDES *et al.*, 2010).

During the last decades, dental caries has been described as a multifactorial, infectious and transmissible disease; however, this concept has changed in view of the complexity of this condition (GIACAMAN, 2017). Currently dental caries is characterized as a complex sugar dependent biofilm disease (SHEIHAM; JAMES, 2015; GIACAMAN, 2017), resulting from the mineral dissolution of dental tissues, mainly due to the acids production by bacteria that metabolize diet carbohydrates, mainly sucrose (YU *et al.*, 2015; FEJERSKOV; NYVAD; KIDD, 2017).

However, given the complexity of dental caries, factors such as composition and salivary flow, exposure to fluoride, dental morphology and structure (GIACAMAN, 2018) and genetic factors (WANG *et al.*, 2010; VOLCKOVA *et al.*, 2014) need to be observed even though they are not considered causal factors but as possible disease-modulating factors. Another important factor is the salivary composition; one of the most abundant salivary proteins is lactotransferrin (LTF). LTF interacts with dental biofilm (DOETZER *et al.*, 2015) inhibiting bacterial invasion, growth and metabolism by different mechanisms, but its role in dental caries has not yet been fully elucidated (BRANCHER *et al.*, 2011).

SNVs (Single nucleotide variations) are the most common form of genetic variation in the DNA chain and important for understanding the genetic basis of individual characteristics and also in pathological conditions (LIU; WANG; WONG, 2010; KARKI *et al.*, 2015). Several SNVs in the *LTF* gene have been associated in oral

diseases, such as herpes, periodontitis and caries (DOETZER *et al.*, 2015). Some studies have already identified SNVs in *LTF* gene that can contribute to a better understanding of caries susceptibility and the establishment of potential targets to be investigated (AZEVEDO *et al.*, 2010; FINE *et al.*, 2013; DOETZER *et al.*, 2015; WANG; QIN, 2018). The genetic component in this study is the SNV in the *LTF* gene that is characterized by the exchange of an adenine (A) for a guanine (G) at the 140 position of the coding sequence (codon 47). The variation is non-synonymous and leads to the substitution of a lysine for an arginine in the α -helical region of the protein, causing functional changes related to lactoferrin antimicrobial function (LI, 2020), which is important in diseases caused by bacteria such as caries and periodontal disease (WU *et al.*, 2009; (LI, 2020).

In this context, the understanding of genetic involvement in the pathogenesis of dental caries has the potential to provide new approaches to the prevention, monitoring and prognosis of this health condition. Therefore, this study aimed to evaluate the influence of the *LTF* gene SNV rs1126478 on the susceptibility to dental caries in preschool children.

MATERIAL AND METHODS

Ethical considerations

Ethical approval was obtained from the Institutional Ethics Committee Involving Humans of the State University of Londrina, Londrina, PR, Brazil (CAAE: 56077916.2.0000.5231) in compliance with Brazilian National Health Council Resolution 4666/12.

All parents/guardians received information about study risks and benefits, and signed a statement of informed consent prior to sample collection and interview (Appendix A). For ethical reasons, all study participants that demanded dental care received treatment at the Oral Health Program - Department of Pediatric Dentistry.

Participants

This case-control study includes children, aged from 3 to 6 years, attended in Oral Health Program at the Department of Pediatric Dentistry at the State University of Londrina from May 2017 to June 2018, This age range was adopted since it is the age

recommended by the World Health Organization for monitoring the prevalence of dental caries and oral health standards (WHO, 2013).

Among 456 children invited to attend the study, 448 completed all parts of it and eight were excluded for lack of scheduled appointments, disruptive behavior or difficulties during saliva collection.

Eligibility criteria

Inclusion criteria: enrollment in preschool, age-compatible cognitive development, absence of systemic disease, complete primary dentition.

Exclusion criteria: children with special needs and disruption behavior in oral examination.

Data collection

Information about oral hygiene habits, oral health care and current socio-demographic aspects were collected through interviews with parents or children caregivers (Appendix B). For dietary habits, a structured questionnaire was used, prepared in accordance with Colucci, Philippi and Slater (2004) (Annex B).

Oral examination

Caries examination and diagnosis were performed by three researchers previously trained and calibrated for the diagnosis of dental caries according to the International Caries Detection and Assessment System (ICDAS) criteria (Box 1). The training involved theoretical and practical leveling described previously by Poletto *et al.*, 2020.

Prior to the oral examination there was a performed evaluation of the visible biofilm without the use of dyes, evaluation of the gingival condition, prophylaxis with a brush and dental floss. All oral examinations were conducted under standard conditions according to the ICDAS criteria, with aid of dental light, 3-1 syringe to dry, plane buccal mirror, blunt probe (WHO). First, the teeth were evaluated wet, after that, dried for 5 seconds with compressed air according to the ICDAS criteria. The exams were always performed in the morning between 08:00 AM and 11:00 AM. All the teeth surfaces were examined. In each examination each evaluator examined the children individually and a trained note taker registered the results. No radiographs were taken in this study for ethical reasons.

Biofilm accumulation was checked by the Plaque Index (Silness and Løe, 1963) modified, without using dye, evaluating all the buccal surfaces of deciduous molars (Annex A).

Gingival papilla condition was checked by the Gingival Index (GI) (Silness and Løe, 1963) modified, with the same criteria, however evaluating only proximal surfaces of primary molars (Annex A).

Collection of saliva samples

Samples of unstimulated saliva from oral mucosa cells were collected by aspiration, at least one hour after breakfast, stored in tubes previously prepared for this purpose. The samples were immediately cooled, centrifuged at 4°C, 10000 x g for 1 min, and the secretion volume was measured before freezing. The salivary flow was expressed in mL of saliva secreted per minute (mL / min).

***LTF* genetic variant genotyping**

LTF rs1126478 genetic variant were analyzed by PCR followed by Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) analysis. All PCR reagents were purchased from Invitrogen™ (Carlsbad, CA, USA), and the restriction enzyme from New England Biolabs® (Ipswich, MA, USA). Briefly, primers were designed based on *LTF* gene reference sequence (NCBI genebank accession number: NM_002343.5). The PCR conditions were performed in a final volume of 25 µL with PCR buffer (1 x), dNTP (0.1 mM), 0.2 µM of each primer, MgCl₂ (1.5 mM), Taq DNA polymerase (1 U/reaction) and genomic DNA (approximately 3 ng/µL). PCR reactions were performed along with a negative control with no DNA addition to check for exogenous DNA contamination. The sequences of the primers flanking the polymorphism region were: 5'-GCCGTAGGAGGAGTGTTCAG -3' (forward) and 5'-CGCAATGG-CCTGGATACAC -3' (reverse), generating a 149 base-pairs (bp) amplicon (annealing temperature: 53°C). *Eco*RI restriction enzyme was used to determine c.140A>G genotypes, cleaving the 149 bp amplicon in 83 and 66 bp fragments for G allele while A allele fragments remains with 149 bp. Restriction conditions followed the manufacturer's instruction. Amplicons and restriction fragments were analyzed by electrophoresis on polyacrylamide gel (10%) silver stained.

Statistical analysis

Categorical variables were expressed as absolute numbers (n) and percentages (%) and continuous variables were expressed as median and interquartile range (IQR). The Kolmogorov–Smirnov test was performed to assess the distribution normality. The Kruskal-Wallis test was performed to assess the difference between groups regarding salivary flow. Hardy–Weinberg equilibrium and differences in genotype frequencies between groups were assessed by the Chi-square test, as well as the frequency of sucrose consumption. The independent association of genetic variation with caries susceptibility was assessed using multinomial logistic regression controlled by confounders (visible biofilm, frequency of consumption of stuffed cookies, chocolate milk and soft drinks). Adjusted odds ratios (ORs) and 95% confidence intervals (CI) were estimated. All tests were two-tailed, with a p-value (P) < 0.05 considered statistically significant. Statistical analyses were carried out using IBM SPSS Statistics for Windows, version 25.0 (IBM Corp., Armonk, N.Y., USA).

RESULTS

In this case-control study, 448 preschool children aged from 3 to 6 years (median = 4.6; IQR = 1.4) were included; 219 (48.9%) boys and 229 (51.1%) girls. After oral examination, the study population was divided according to ICDAS criteria in a caries-free group (ICDAS 0) with 48 (10.7%) patients, a white-spot group (ICDAS 1-2) with 248 (55.4%), and an enamel and dentin caries group (ICDAS 3-6) composed of 152 (33.9%) children.

Table 1 reports the general sample features: chronological age, sex, household income, mother's schooling, visible biofilm, gingival index, tooth brushing frequency, dental floss habits and salivary flow. In this, we noted that there was a greater proportion of children free of caries aged 3 to 4 years while the percentage of that with enamel and dentin caries was higher in children over 5 years old ($P = 0.002$). In addition, we also observed a higher biofilm frequency in the enamel and dentin caries group than in the others ($P < 0.001$). Considering the other variables analyzed, no differences between groups were found regarding children's sex ($P = 0.518$), gingival index ($P = 0.141$), frequency of tooth brushing ($P = 0.314$), dental flossing ($P = 0.623$), and salivary flow ($P = 0.112$).

Besides the general characteristics' analysis, we evaluated the association between the consumption (never, occasionally and usually) of some drinks and foods

rich in sucrose and the caries presence (Table 2). Not surprisingly, a greater proportion of children with enamel and dentin caries is an occasional or frequent consumer of chocolate powder ($P = 0.019$), soft drinks ($P = 0.002$), industrialized juices ($P = 0.042$), and chocolate milks ($P < 0.001$).

Distribution of alleles and genotypes of *LTF* rs1126478 genetic variation and susceptibility to caries development

All samples were genotyped for *LTF* genetic variation rs1126478 and the alleles and genotypes distributions are shown in Table 3. The groups were tested for Hardy–Weinberg equilibrium and only the enamel and dentin caries (ICDAS 3-6) group deviated from expected genotype frequency ($p < 0.001$).

Regarding differences in the genotype distribution, a chi-square test was used to analyze genotypic, dominant, recessive and allelic models. We noted that only genotypic model showed significant difference ($P = 0.048$), with a lower proportion of AG (35.5%) in the enamel and dentin caries (ICDAS 3-6) group than in the caries-free (ICDAS 0) group (56.3%).

In sequence, we verified through multinomial logistic regression model adjusted for confounding factors (age, visible biofilm, frequency of consumption of stuffed cookies, chocolate milk and soft drinks) how this genetic variation influences susceptibility to caries (Table 4). We found that children with the AG genotype were less likely to have enamel and dentin caries when compared to those with the AA or AA+GG genotypes (OR = 0.42, CI_{95%} = 0.18-0.95, $P = 0.038$ and OR = 0.43, CI_{95%} = 0.21-0.87, $P = 0.020$, respectively). The other tested models had no significant influence on the caries development.

Analysis of association of *LTF* rs1126478 genetic variation with biofilm development

Since the biofilm presence was associated with the caries development, we investigated whether *LTF* genetic variation rs1126478 is also related to the biofilm development (the “absence of biofilm” group deviated from the HWE); however, no association was observed (Table 5)

DISCUSSION

To the best of our knowledge, this is the first study showing the influence of *LTF* rs1126478 genetic variation on the caries development, diagnosed according to ICDAS criteria, in a preschool population participating in an Oral Health Program. The inclusion of the genetic factor in this work together with other factors previously investigated in other populations, such as sex, age group, family income and socioeconomic status (WERNECK; MIRA; TREVILATTO, 2010; WANG; QIN, 2018) may contribute to explain the caries prevalence in this population.

Differences between groups regarding sex and age have been widely discussed and, according to Wang and colleagues (2010), these variables strongly influence the phenotypic variation in permanent dentition, but the same does not occur in primary dentition. In our study, we did not identify any differences regarding sex, but we found a higher proportion of children with caries above five years of age when compared to younger children. This result is in agreement with most caries studies in this age range that reports a higher prevalence of caries among older preschool compared to younger children (WYNE, 2008; ABBASOĞLU *et al.*, 2015; GARBIN *et al.*, 2019). It's relevant because the age which sugar is inserted in the child's diet and the intake frequency are risk factors strongly associated with the incidence of early childhood caries (CHAFFEE *et al.*, 2015; FELDENS *et al.*, 2018; TINANOFF *et al.*, 2019).

In addition, we observed that the presence of visible biofilm was strongly associated with caries experience (MARSH, 2010; DOETZER *et al.*, 2015). Biofilm is a complex association of microorganisms adhered to the dental surface that may present pathogenic potential under certain conditions (GIACAMAN, 2018). Doetzer and colleagues (2015) in their study with Brazilian children also observed an association between biofilm and caries in groups with high and low caries experience. Although in our study the association between biofilm and caries was positive, we need to point out that only a few children presented abundant biofilm; dental plaque dye couldn't be used because it disables subsequent dental caries diagnosed by ICDAS. Likewise, only 0.4% (2 children) had bleeding on probing. We believe that the good quality of children's periodontal health is due to the participation of all of them in the Oral Health Program.

Regarding behavioral factors such as tooth brushing frequency and flossing, we did not find any significant differences between groups. Similar results were observed

in an epidemiological study conducted in Brazil by Feldens and colleagues (2010), in which no association between early childhood caries and behavioral habits was found. However, since the preventive program also acts in educating parents or guardians about the importance of good oral hygiene practices for children, we believe that the similarity in tooth brushing frequency and flossing among groups may be due to parental care.

We also assessed the frequency of some sucrose-rich foods and drinks intake by these children, based on knowledge of the carious condition as sucrose-dependent. We saw that caries were associated with the occasional or frequent ingestion of some foods such as chocolate powder, soft drinks, industrialized juices, and chocolate milks. Likewise, Abbasoğlu and colleagues (2015) studying children aged 2 to 5 years found that daily consumption of sugar and acidic drinks increased the risk of developing early childhood caries by almost 3 times. A prospective cohort study in Brazilian population also found higher daily frequency of consuming soft drinks, cookies and other sweets at age 12 months was associated with early childhood caries in this population (FELDENS *et al.*, 2018).

However, in addition to studying the factors described above, a major challenge is to use an effective methodology for detecting dental caries including its initial stages (ISMAIL *et al.*, 2007). A sensitive and reproducible detection method, which considers white-spot lesions as a caries phenotype, can improve the sensitivity of studies evaluating the effect of genes on dentitions (WANG *et al.*, 2010; WANG; QIN, 2018); the ICDAS index appears to meet these conditions. However, several studies involving the genetic factor used for caries diagnosis the DMFT index that does not consider white-spot as caries (AZEVEDO *et al.*, 2010; VOLCKOVA *et al.*, 2014; ABBASOĞLU *et al.*, 2015; DOETZER *et al.*, 2015). DMFT/dmft does not promote a good staging of the degree of the disease (WANG; QIN, 2018), because the diagnosis is made at a stage in need of invasive intervention. Thus, this is the first genetic study to use the ICDAS criteria and we observed that just over 10% of the sample (n = 48) was caries free in a total of 448 children. If we had used the DMFT index, we would have had 248 children with white-spot lesion allocated to the caries-free group (n = 296) and only 152 in the caries group, which could create bias in the data analysis. Therefore, our study suggests that the ICDAS method may be more accurate in identifying caries and reliable for genetic studies.

On the other hand, this makes it difficult to obtain a high number of children in the caries free group, due to the high exigency the ICDAS criteria for inclusion of individuals in this group. Furthermore, samples collection sequentially was carried out for 14 months, based on appointments previously scheduled in the oral health program. The groups were divided only after the end of the samples collection to reflect the real condition of the studied population and minimise error and bias.

In the last decade, the number of studies reporting the participation of the genetic component in dental caries has increased (LI, 2020). They have already demonstrated the association of caries with enamel development genes, immune response, carbohydrate metabolism and saliva formation and composition (AZEVEDO *et al.*, 2010; VOLCKOVA *et al.*, 2014; ABBASOĞLU *et al.*, 2015; PIEKOSZEWSKA-ZIETEK;TURSKA-SZYBKA; OLCZAK-KOWALCZYK, 2017; WANG; QIN, 2018; WEBER *et al.*, 2018).

By multivariate analysis, we investigated whether this variation of the *LTF* gene influences the development of dental caries in a controlled population aged 3 to 6 years. Multivariate analysis is useful to elucidate the interactions of environmental factors and genetic variants that influence a given trait (ABBASOĞLU *et al.*, 2015). Thus, considering the influence of age, biofilm presence, consumption of sweets and drinks (confounders factors) we found that the AG genotype was independently associated with enamel and dentin caries and that it offered a protective role against caries development compared to the AA and AA+GG genotypes. Data obtained in this study were compared using the ABraOM (Online Archive of Brazilian Mutations) platform, a web-based public database, and although the control group had a small sample size, the allele frequency was similar to that found for the Brazilian population.

The rs1126478 variation of the *LTF* gene leads to a change from the amino acid lysine (allele A) to arginine (allele G). This variation in DNA is related to a change in the protein region that seems to have a key role in the non-iron-dependent antimicrobial function of lactoferrin (WU *et al.*, 2009). Studies have indicated a lesser antibacterial effect against gram positive associated with the arginine variant (allele G) compared to the lysine variant (allele A). Additionally, it has been suggested that heterozygous or homozygous individuals for the A allele (lysine variant) present the oral microbiota with lower levels of *Streptococcus mutans* due to the increased antimicrobial activity of this variant against gram positive bacteria (VELLIYAGOUNDER *et al.*, 2003; FINE *et al.*, 2013; VOLCKOVA *et al.*, 2014).

Although our study did not evaluate the participants' oral microbiota to check the influence of variants on the levels of cariogenic bacteria, we found that this genetic variation is not associated with the formation of dental biofilm in our patients.

Azevedo and colleagues (2010), in a study involving 110 12-year-old Brazilian students, found a significant association of decayed surfaces and LTF salivary concentration according to *LTF* SNV rs1126478. Fine et al. (2013) found that the SNV rs1126478 can influence the development of caries and that about 60% to 80% of salivary anti-*S mutans* activity can be attributed to LTF.

Regarding dental caries susceptibility, Volckova and colleagues (2014) evaluated 637 children aged from 11 to 13 years and found no association between SNV rs1126478 and dental caries in the Czech population. Likewise, Wang et al (2018) demonstrated no association between *LTF* rs1126478 polymorphism and the susceptibility of caries in Chinese pediatric patients. On the other hand, Fine and colleagues (2013) found in 30 adult subjects population that the AA genotype presents protective role against smooth and proximal surfaces caries.

Although our result was different – the AG genotype as a protective factor in susceptibility to caries, it is important to consider some relevant characteristics of our study: the study population has a significant size, we evaluated all dental surfaces (n = 39424) and, mainly, we used a diagnostic criterion based on the inclusion of the initial stages of caries (presence of white spot). It is also necessary to consider that our study has a limitation in relation to the low number of caries free children, even the samples having been collected from participants of an oral health program, due to the high prevalence of caries in the Brazilian population. This limitation is a consequence of the rigor adopted in the experimental design. Therefore, even if the adjusted analysis pointed to the AG genotype as a protective factor against caries, further studies are recommended, including the prevalent homozygote to identify the real influence of the *LTF* rs1126478 variation on the dental caries development.

CONCLUSION

We found that intrinsic and behavioral factors, especially the frequency of sugar ingestion are risk factors associated with the development of cavities. In addition, the ICDAS methodology proved to be satisfactory in identifying early stages of the disease. *LTF* rs1126478 was associated with dental caries in the Brazilian population, however

further analyses are necessary to prove the real influence of the *LTF* rs1126478 variation on its development.

Funding:

The authors declare no potential conflicts of interest with respect to the authorship and/or publication of this article.

This work was supported by CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Brazil grant 1663042.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank parents and caregivers of the Program in Oral Health for Children at the State University of Londrina who made this study possible and a special thank you to Nilson de Jesus Carlos our laboratory technician, for his support in carrying out the experimental analyses.

REFERENCES

ABBASOĞLU, Z. *et al.* Early childhood caries is associated with genetic variants in enamel formation and immune response genes. **Caries research**, v. 49, n. 1, p. 70-77, 2015.

AZEVEDO, L.F. *et al.* Analysis of the association between lactotransferrin (LTF) gene polymorphism and dental caries. **Journal of Applied Oral Science**, v. 18, n. 2, p. 166-170, 2010.

BRANCHER, J.A. *et al.* Analysis of polymorphisms in the lactotransferrin gene promoter and dental caries. **International journal of dentistry**, v. 2011, 2011.

CHAFFEE, B.W. *et al.* Feeding practices in infancy associated with caries incidence in early childhood. **Community dentistry and oral epidemiology**, v. 43, n. 4, p. 338-348, 2015.

COLUCCI, A.C.A.; PHILIPPI, S.T.; SLATER, B. Desenvolvimento de um questionário de frequência alimentar para avaliação do consumo alimentar de crianças de 2 a 5 anos de idade. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, n. 4, p. 393-401, 2004.

DOETZER, A.D. *et al.* Lactotransferrin gene polymorphism associated with caries experience. **Caries research**, v. 49, n. 4, p. 370-377, 2015.

FEJERSKOV O., NYVAD B., KIDD E. **Cárie Dentária: Fisiopatologia e Tratamento**. 3rd ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017.

FELDENS, C.A. *et al.* Early feeding practices and severe early childhood caries in four-year-old children from southern Brazil: a birth cohort study. **Caries research**, v. 44, n. 5, p. 445-452, 2010.

FELDENS, C.A. *et al.* Feeding frequency in infancy and dental caries in childhood: a prospective cohort study. *International dental journal*, v. 68, n. 2, p. 113-121, 2018.

FINE, D.H. *et al.* A lactotransferrin single nucleotide polymorphism demonstrates biological activity that can reduce susceptibility to caries. **Infection and immunity**, v. 81, n. 5, p. 1596-1605, 2013.

GARBIN, C.A.S. *et al.* Caries Experience in Preschool Children over a 10-year Period. **Oral health & preventive dentistry**, v. 17, n. 3, p. 263-266, 2019.

GIACAMAN, R.A. Sugars and beyond. The role of sugars and the other nutrients and their potential impact on caries. **Oral diseases**, v. 24, n. 7, p. 1185-1197, 2018.

IRANZO-CORTES J.E.; TERZIC S.; MONTIEL-COMPANY J.M.; ALMERICH-SILLA J.M. Diagnostic validity of ICDAS and DIAGNOdent combined: an in vitro study in pre-cavitated lesions. **Lasers in medical sciences**. 2017;32(3):543-8.

ISMAIL, A.I. *et al.* The International Caries Detection and Assessment System (ICDAS): an integrated system for measuring dental caries. **Community dentistry and oral epidemiology**, v. 35, n. 3, p. 170-178, 2007.

KARKI, R. *et al.* Defining "mutation" and "polymorphism" in the era of personal genomics. **BMC medical genomics**, v. 8, n. 1, p. 37, 15 dez. 2015.

LI X, SU Y, LIU D, YANG J. The association between genetic variants in lactotransferrin and dental caries: a meta-and gene-based analysis. *BMC Med Genet*. 2020;21(1):1-8.

LIU, G.; WANG, Y.; WONG, L. FastTagger: an efficient algorithm for genome-wide tag SNP selection using multi-marker linkage disequilibrium. **BMC bioinformatics**, v. 11, n. 1, p. 66, 2010.

LÖE, H.; SILNESS, J. Periodontal disease in pregnancy I. Prevalence and severity. **Acta odontologica scandinavica**, v. 21, n. 6, p. 533-551, 1963.

MARSH, P.D. Microbiology of dental plaque biofilms and their role in oral health and caries. **Dental Clinics**, v. 54, n. 3, p. 441-454, 2010.

MENDES, F.M. *et al.* Discriminant validity of the International Caries Detection and Assessment System (ICDAS) and comparability with World Health Organization criteria in a cross-sectional study. **Community dentistry and oral epidemiology**, v. 38, n. 5, p. 398-407, 2010.

PIEKOSZEWSKA-ZIĘTEK, P.; TURSKA-SZYBKĄ, A.; OLCZAK-KOWALCZYK, D. Single nucleotide polymorphism in the aetiology of caries: systematic literature review. **Caries research**, v. 51, n. 4, p. 425-435, 2017.

SHEIHAM, A.; JAMES, W.P.T. Diet and dental caries: the pivotal role of free sugars reemphasized. **Journal of dental research**, v. 94, n. 10, p. 1341-1347, 2015.

TINANOFF, N. *et al.* Early childhood caries epidemiology, aetiology, risk assessment, societal burden, management, education, and policy: Global perspective. **International journal of paediatric dentistry**, v. 29, n. 3, p. 238-248, 2019.

VELLIYAGOUNDER, K. *et al.* One of two human lactoferrin variants exhibits increased antibacterial and transcriptional activation activities and is associated with localized juvenile periodontitis. **Infection and immunity**, v. 71, n. 11, p. 6141-6147, 2003.

VOLCKOVA, M. *et al.* Lack of association between lactotransferrin polymorphism and dental caries. **Caries research**, v. 48, n. 1, p. 39-44, 2014.

WANG, M.; QIN, M. Lack of association between LTF gene polymorphisms and diferente caries status in primary dentition. **Oral diseases**, v. 24, n. 8, p.1545-1553, 2018.

WANG, X. *et al.* Genes and their effects on dental caries may differ between primary and permanent dentitions. **Caries research**, v. 44, n. 3, p. 277-284, 2010.

WEBER, M. *et al.* Redefining the phenotype of dental caries. **Caries research**, v. 52, n. 4, p. 263-271, 2018.

WERNECK, R.I.; MIRA, M.T.; TREVILATTO, P.C.A critical review: an overview of genetic influence on dental caries. **Oral diseases**, v. 16, n. 7, p. 613-623, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Sugars and dental caries. World Health Organization, 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Oral health surveys**: basic methods. World Health Organization, 2013.

WU, Y.M. *et al.* Association between lactoferrin gene polymorphisms and aggressive periodontitis among Taiwanese patients. **Journal of periodontal research**, v. 44, n.3,p.418-424,2009.

WYNE, A.H. Caries prevalence, severity, and pattern in preschool children. **The journal of contemporary dental practice**, v.9, n.3, p. 24-31, 2008.

YU, L.X. *et al.* Genetic polymorphisms of the sortase A gene and social-behavioural factors associated with caries in children: a case–control study. **BMC Oral Health**, v. 15, n.1, p. 54, 2015.

Box 1- Classification of Caries Status Based on the International Caries Detection and Assessment System (ICDAS) Criteria.

ICDAS code	Clinical surface condition
0	Sound tooth surface
1	Visual change in enamel-seen dry
2	Distinct visual change in enamel
3	Localized enamel breakdown
4	Underlying dark shadow from dentine
5	Distinct cavity with visible dentine
6	Extensive distinct cavity with visible dentine

Table 1 - General characteristics of study participants

Variables	ICDAS			P
	0 n=48	1-2 n=248	3-6 n=152	
Age [n (%)]				0.002
3 to 4 years	23 (47.9)	64 (25.8)	33 (21.7)	
>4 to 5 years	15 (31.3)	98 (39.5)	52 (34.2)	
>5 years	10 (20.8)	86 (34.7)	67 (44.1)	
Sex [n (%)]				0.518
Boys	23 (47.9)	116 (46.8)	80 (52.6)	
Girls	25 (52.1)	132 (53.2)	72 (47.4)	
Household income**				0.012
≤ 1 minimum wage	10 (21.3)	47 (19.0)	49 (32.9)	
1 < x ≤ 3 minimum wage	26 (55.3)	160 (64.5)	83 (55.7)	
>3 minimum wage	11 (23.4)	41 (16.5)	17 (11.4)	
Mother's schooling				
≤ 8 years	1 (2.1)	3 (1.2)	9 (5.9)	0.023
>8 years	47 (97.9)	245 (98.8)	143 (94.1)	
Visible biofilm Index [n (%)]				<0.001
No	47 (97.9)	244 (98.4)	137 (90.1)	
Yes	1 (2.1)	4 (1.6)	15 (9.9)	
Gingival Index [n (%)]				0.141
No	48 (100)	248 (100)	150 (98.7)	
Yes	0 (0)	0 (0)	2 (1.3)	
Frequency of tooth brushing [n (%)]*				0.314
1-2 times per day	16 (33.3)	82 (33.1)	61 (40.4)	
≥ 3times per day	32 (66.7)	166 (66.9)	90 (59.6)	
Dental flossing [n (%)]*				0.623
Yes	32 (68.1)	165 (66.5)	94 (62.3)	
No	15 (31.9)	83 (33.5)	57 (37.7)	
Salivary flow (ml/min) [median (IQR)]	0.57 (0.40)	0.46 (0.41)	0.50 (0.33)	0.112

Contingence table was analyzed by two-sided χ^2 test, while continuous data by Kruskal-Wallis test. $P < 0.05$ considered significant (bold). *Missing data. ICDAS: International Caries Detection and Assessment System; ICDAS "0": Caries-free; ICDAS "1-2": White-spots presence; ICDAS "3-6": Presence of enamel and dentin caries; IQR: interquartile range. **Based on Brazilian minimum wage, approximately US\$ 295.00

Table 2 - Association of drinks and foods rich in sucrose with caries status according ICDAS criteria.

Variables	ICDAS			P
	0 n=48	1-2 n=248	3-6# n=152	
Plain cookies				0.443
Never*	5 (10.4)	27 (11)	10 (6.7)	
Occasionally*	26 (54.2)	109 (44.7)	75 (50.0)	
Usually*	17 (35.4)	108 (44.3)	65 (43.3)	
Wafer cookies				0.219
Never*	18 (37.5)	62 (25.3)	31 (20.8)	
Occasionally*	26 (54.2)	150 (61.2)	98 (65.8)	
Usually*	4 (8.3)	33 (13.5)	20 (13.4)	
Fruit iogurt				0.142
Never*	7 (14.6)	18 (7.4)	14 (9.3)	
Occasionally*	15 (31.3)	116 (47.7)	59 (39.4)	
Usually*	26 (54.2)	109 (44.9)	77 (51.3)	
Petiti suisse iogurt				0.255
Never*	13 (27.0)	52 (21.3)	29 (19.3)	
Occasionally*	21 (43.8)	144 (59.0)	82 (54.7)	
Usually*	14 (29.2)	48 (19.7)	39 (26.0)	
Fermented milk				0.258
Never*	16 (33.3)	47 (19.3)	30 (20.1)	
Occasionally*	17 (35.4)	114 (46.7)	71 (47.7)	
Usually*	15 (31.3)	83 (34.0)	48 (32.2)	
Sucrose				0.227
Never*	19 (39.6)	63 (26.3)	38 (25.2)	
Occasionally*	14 (29.2)	97 (40.4)	54 (35.8)	
Usually*	15 (31.3)	80 (33.3)	59 (39.0)	
Chocolate powder				0.019
Never*	22 (45.8)	62 (25.3)	32 (21.3)	
Occasionally*	9 (18.8)	55 (22.4)	34 (22.7)	
Usually*	17 (35.4)	128 (52.3)	84 (56.0)	
Bonbon				0.105
Never*	3 (6.2)	3 (1.2)	8 (5.3)	
Occasionally*	30 (62.5)	178 (72.7)	104 (68.9)	
Usually*	15 (31.3)	64 (26.1)	39 (25.8)	
Soft drink				0.002
Never*	32 (66.7)	125 (51.0)	53 (35.3)	
Occasionally*	14 (29.2)	99 (40.4)	80 (53.4)	
Usually*	2 (4.1)	21 (8.6)	17 (11.3)	

Industrialized juice				0.042
Never*	27 (56.3)	110 (44.9)	54 (36.0)	
Occasionally*	16 (33.3)	84 (34.3)	53 (35.3)	
Usually*	5 (10.4)	51 (20.8)	43 (28.7)	
Industrialized tea				0.304
Never*	36 (75.0)	182 (74.6)	107 (71.3)	
Occasionally*	12 (25.0)	49 (20.1)	31 (20.7)	
Usually*	0	13 (5.3)	12 (8.0)	
Chocolate milk				<0.001
Never*	30 (62.5)	71 (29.0)	51 (34.0)	
Occasionally*	15 (31.3)	138 (56.3)	79 (52.7)	
Usually*	3 (6.2)	36 (14.7)	20 (13.3)	
Stuffed cookies				0.073
Never*	38 (79.2)	150 (62.2)	97 (64.7)	
Occasionally*	6 (12.5)	78 (32.4)	47 (31.3)	
Usually*	4 (8.3)	13 (5.4)	6 (4.0)	
Chocolate bar				0.286
Never*	7 (14.6)	18 (7.3)	17 (11.3)	
Occasionally*	33 (68.8)	191 (78.0)	117 (78.0)	
Usually*	8 (16.6)	36 (14.7)	16 (10.7)	
Chocolate candy				0.350
Never*	13 (27.1)	50 (20.2)	23 (15.3)	
Occasionally*	32 (66.7)	188 (75.8)	118 (78.7)	
Usually*	3 (6.2)	10 (4.0)	9 (6.0)	

Contingence table was analyzed by two-sided χ^2 test and data were presented as absolute number and percentage. $P < 0.05$ considered significant (bold). *Reported by parents or caregivers of children. #Missing data. ICDAS: International Caries Detection and Assessment System; ICDAS "0": Caries-free; ICDAS "1-2": White-spots presence; ICDAS "3-6": Presence of enamel and dentin caries. *Occasionally- 1 time per week. *Usually- ≥ 2 times per week.

Table 3 - *LTF* rs1126478 genetic variation in different caries status by ICDAS criteria.

<i>LTF</i> SNV rs1126478	ICDAS			<i>P</i>
	0 (n=48)	1-2 (n=248)	3-6 (n=152)	
Genotypic				0.048
AA	12 (25.0)	99 (39.9)	59 (38.8)	
AG	27 (56.2)	106 (42.8)	54 (35.5)	
GG	9 (18.8)	43 (17.3)	39 (25.7)	
Dominant				0.144
AA	12 (25.0)	99 (39.9)	59 (38.8)	
AG + GG	36 (75.0)	149 (60.1)	93 (61.2)	
Recessive				0.128
AA + AG	39 (81.2)	205 (82.7)	113 (74.3)	
GG	9 (18.8)	43 (17.3)	39 (25.7)	
Overdominant				0.036
AG	27 (56.2)	106 (42.7)	54 (35.5)	
AA + GG	21 (43.8)	142 (57.3)	98 (64.5)	
Allelic				0.700
A	51 (53.0)	304 (61.3)	172 (57.0)	
G	45 (47.0)	192 (38.7)	132 (43.0)	

Data presented as absolute number and percentage. Two-sided χ^2 test, with $P < 0.05$ considered significant (bold). ICDAS: International Caries Detection and Assessment System; ICDAS "0": Caries-free; ICDAS "1-2": White-spots presence; ICDAS "3-6": Presence of enamel and dentin caries.

Table 4 - Susceptibility to dental caries according *LTF* rs1126478 genetic variation.

<i>LTF</i> SNV rs1126478	Adjusted odds ratio (CI _{95%})			
	ICDAS		3-6	<i>P</i>
1-2	<i>P</i>			
AG vs AA	0.50 (0.23-1.07)	0.075	0.42 (0.18-0.95)*	0.038
GG vs AA	0.64 (0.24-1.73)	0.381	0.92 (0.33-2.56)	0.877
AG + GG vs AA	0.53 (0.25-1.11)	0.092	0.54 (0.25-1.17)	0.120
GG vs AA + AG	0.99 (0.42-2.31)	0.981	1.55 (0.65-3.71)	0.325
AG vs AA + GG	0.58 (0.30-1.13)	0.109	0.43 (0.21-0.87)*	0.020
AG vs GG	0.77 (0.32-1.89)	0.572	0.45 (0.18-1.15)	0.094
G vs A allele	0.82 (0.52-1.30) [#]	0.401	0.87 (0.55-1.38) [#]	0.553

Multinomial logistic regression adjusted for age, visible biofilm, frequency of consumption of stuffed cookies, chocolate milk and soft drinks, with the "caries-free (ICDAS "0") group" as reference. CI_{95%}: 95% confidence interval; ICDAS: International Caries Detection and Assessment System; ICDAS "1-2": White-spots presence; ICDAS "3-6": Presence of enamel and dentin caries. [#]Not adjusted.

* $P < 0.05$ considered significant.

Table 5 - *LTF* rs1126478 genetic variation in visible biofilm.

<i>LTF</i> SNV rs1126478	Visible biofilm		<i>P</i>
	Absence (n=428)	Presence (n=20)	
Genotypic			0.551
	AA	161 (37.6)	9 (45.0)
	AG	181 (42.3)	6 (30.0)
	GG	86 (20.1)	5 (25.0)
Dominant			0.506
	AA	161 (37.6)	9 (45.0)
	AG + GG	267 (62.4)	11 (55.0)
Recessive			0.594
	AA + AG	342 (79.9)	15 (75.0)
	GG	86 (20.1)	5 (25.0)
Allelic			0.876
	A	503 (58.76)	24 (60.0)
	G	353 (41.24)	16 (40.0)

Data presented as absolute number and percentage. Two-sided χ^2 test, with $P < 0.05$ considered significant (bold).

7 CONCLUSÕES

- O treinamento na metodologia ICDAS mostrou resultados satisfatórios, estabelecendo boa concordância entre examinadores;
- A prevalência de cárie em crianças de 3 a 5 anos ainda permanece alta mesmo em crianças de um programa preventivo de saúde oral;
- Fatores intrínsecos e comportamentais, principalmente a frequência da ingestão de açúcar, são fatores de risco associados ao desenvolvimento de cárie;
- A escolaridade da mãe e a renda são fatores socioeconômicos relacionados com a experiência de cárie;
- O método de detecção de cárie ICDAS mostrou eficácia na detecção de cárie em seus estágios iniciais;
- Este estudo sugere que a variante LTF rs1126478 foi associado à cárie dentária na população brasileira, entretanto mais análises são necessárias para elucidar a real influência deste polimorfismo na suscetibilidade a cárie.

REFERÊNCIAS

ABBASOGLU, Z.; TANBOGA, I; KÜCHLER, E.C.; DEELEY, K.; WEBER, M.; KASPAR, C.; KORACHI, M.; VIEIRA, A.R. Early childhood caries is associated with genetic variants in enamel formation and immune response genes. **Caries research**, v. 49, n.1, p. 70–77, 2015.

ABANTO, Jenny et al. Impact of oral diseases and disorders on oral health-related quality of life of preschool children. **Community dentistry and oral epidemiology**, v. 39, n. 2, p. 105-114, 2011.

ADLEROVA, L.; BARTOSKOVA, A.; FALDYNA, M. Lactoferrin: a review. **Veterinarni Medicina**, v. 53, n. 9, p. 457-468, 2008

AZEVEDO, L.R.; MAZUR, R.F.; MOYSÉS, S.J.; MOYSÉS, S.T.; FAUCZ, F.R.; TREVILATTO, P.C. Analysis of the association between lactotransferrin (LTF) gene polymorphism and dental caries. **Journal of applied oral sciences**, v. 18, n.2, p.166-70, 2010.

BADER, J.D.; SHUGARS, D.A.; BONITO, A.J. A systematic review of the performance of methods for identifying carious lesions. **Journal of public health dentistry**. 2002;62(4):201-13.

BALASUBRAMANIAN, S.P. et al. Candidate gene polymorphisms in solid cancers. **European journal of surgical oncology** : the journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology, v. 30, n. 6, p. 593–601, ago. 2004.

BAKER, E.N.; BAKER, H.M. A structural framework for understanding the multifunctional character of lactoferrin. **Biochimie**, v. 91, n. 1, p. 3-10, 2009.

BAKER H.M.; ANDERSON B.F.; BAKER E.N. Dealing with iron: common structural principles in proteins that transport iron and heme. **Proceedings of the national academy of sciences U.S.A.**,100: 3579–3583, 2004.

BOWEN, W.H.; TENUTA, L.M.A; KOO,H.; CURY, J.A. Dental Caries: Etiology and Pathogenesis. In: LAMONT, R.J. et al. **Oral microbiology and immunology**. 3rd. John Wiley & Sons, 2014. p. 251-165.

BRANCHER, J.A. et al. Analysis of polymorphisms in the lactotransferrin gene promoter and dental caries. **International journal of dentistry**, v. 2011, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Projeto SB Brasil 2010**: Pesquisa Nacional de Saúde Bucal: resultados principais. Brasília: Ministério da Saúde, 2012.

CALDARELLI, P.G. et al. Saúde Bucal na atenção materno-infantil. In: DITTERICH, R.G.; GRAZIANI, G. F.; MOYSÉS, S. J. (ORGS) **Caminhos e trajetórias da saúde bucal no estado do Paraná**. 1 ed. Londrina: INESCO, 2019.p.151-154.

<<http://cfo.org.br/website/wpcontent/uploads/2019/07/livro-caminhos-e-trajetorias-da-saude-bucal-no-estado-do-parana.pdf> >

CASTRO A.L.S.; VIANNA M.I.P.; MENDES C.M.C. Comparison of caries lesion detection methods in epidemiological surveys: CAST, ICDAS and DMF. **BMC Oral health** 2018; 18 (1):122. <https://doi.org/10.1186/s12903-018-0583-6>.

CHAFFEE, B.W. et al. Feeding practices in infancy associated with caries incidence in early childhood. **Community dentistry and oral epidemiology**, v. 43, n. 4, p. 338-348, 2015.

CHU C.H.; CHAU A.M.; LO E.C. Current and future research in diagnostic criteria and evaluation of caries detection methods. **Oral health preventive dentistry**. 2013; 11, (2): 181-9

DOETZER, A.D.; BRANCHER, J.A.; PECHARKI, G.D.; SCHLIPF, N.; WERNECK, R.; MIRA, M.T.; RIESS, O.; BAUER, P.; TREVILLATO, P.C. Lactotransferrin gene polymorphism associated with caries experience. **Caries research**, v. 49, p. 370–7, 2015.

FEITOSA, S.; COLARES, V.; PINKHAM, J. The psychosocial effects of severe caries in 4-year-old children in Recife, Pernambuco, Brazil. **Cadernos de saúde pública**, v. 21, p. 1550-1556, 2005.

FEJERSKOV, O. Changing paradigms in concepts on dental caries: consequences for oral health care. **Caries research**, v. 38, n. 3, p. 182-191, 2004.

FELDENS, C.A. et al. Feeding frequency in infancy and dental caries in childhood: a prospective cohort study. **International dental journal**, v. 68, n. 2, p. 113-121, 2018.

FILSTRUP, S.L. *et al.* Early childhood caries and quality of life: child and parent perspectives. **Pediatric dentistry**, v. 25, n. 5, p. 431-440, 2003.

FINE, D.H. et al. A lactotransferrin single nucleotide polymorphism demonstrates biological activity that can reduce susceptibility to caries. **Infection and immunity**, v. 81, n. 5, p. 1596-1605, 2013.

FINE, D.H. Lactoferrin: A roadmap to the borderland between caries and periodontal disease. **Journal of Dental Research**. v. 94, n.6, p.768-76, 2015.

GIACAMAN, R.A. Sugars and beyond. The role of sugars and the other nutrients and their potential impact on caries. **Oral diseases**, v. 24, n. 7, p. 1185-1197, 2018.

GIMENEZ T, BITTAR DG, PIOVESAN C, GUGLIELMI CA, FUJIMOTO KY, MATOS R, et al. Influence of examiner experience on clinical performance of

visual inspection in detecting and assessing the activity status of caries lesions. **Operative dentistry**. 2013;38(6):583-90

HEMADI, A.S. et al. Salivary proteins and microbiota as biomarkers for early childhood caries risk assessment. **International journal of oral science**, v. 9, n. 11, p. e1-e1, 2017.

IRANZO-CORTES, J.E.; TERZIC, S.; MONTIEL-COMPANY, J.M.; ALMERICH-SILLA J.M. Diagnostic validity of ICDAS and DIAGNOdent combined: an in vitro study in pre-cavitated lesions. **Lasers in medical sciences**. 2017;32(3):543-8.

ISMAIL, A.I. et al. The International Caries Detection and Assessment System (ICDAS): an integrated system for measuring dental caries. **Community dentistry and oral epidemiology**, v. 35, n. 3, p. 170-178, 2007.

JORDAN, W.J. et al. A nonconservative, coding single-nucleotide polymorphism in the N-terminal region of lactoferrin is associated with aggressive periodontitis in an African-American, but not a Caucasian population. **Genes & immunity**, v. 6, n. 7, p. 632-635, 2005.

KARKI, R. et al. Defining “mutation” and “polymorphism” in the era of personal genomics. **BMC medical genomics**, v. 8, n. 1, p. 37, 2015.

KASSEBAUM, N.J. et al. Global burden of untreated caries: a systematic review and metaregression. **Journal of dental research**, v. 94, n. 5, p. 650-658, 2015.

KOGA, T.; OHO, T.; SHIMAZAKI, Y.; NAKANO, Y. Immunization against caries. **Vaccine**, v. 20, p. 2027-44, 2002.

KRZYSCIAK, W.; JURCZAK, A.; KOSCIELNIAK, D.; BYSTROWSKA, B.; SKALNIAK, A. The virulence of *Streptococcus mutans* and the ability to form biofilms. **European journal of clinical microbiology & infectious diseases**, v. 33, n. 4, p. 499-515, 2014.

LIU, G.; WANG, Y.; WONG, L. FastTagger: an efficient algorithm for genome-wide tag SNP selection using multi-marker linkage disequilibrium. **BMC bioinformatics**, v. 11, n. 1, p. 66, 2010.

MALTZ, M. et al. Decisão de tratamento restaurador baseada em evidências científicas. In: **Cariologia: Conceitos Básicos, Diagnóstico e Tratamento Não Restaurador**, São Paulo: Artes médicas, 2016.

MARSH, P.D.; ZAURA, E. Dental biofilm: ecological interactions in health and disease. **Journal of clinical periodontology**, v. 44, p. S12-S22, 2017.

MOSLEMI, M. et al. Relationship of salivary lactoferrin and lysozyme concentrations with early childhood caries. **Journal of dental research, dental clinics, dental prospects**, v. 9, n. 2, p. 109, 2015.

MOYNIHAN, P.J.; KELLY, S.A.M. Effect on caries of restricting sugars intake: systematic review to inform WHO guidelines. **Journal of dental research**, v. 93, n. 1, p. 8-18, 2014.

PETERSEN, P.E. The world oral health report 2003: continuous improvement of oral health in the 21 st century- the approach of the WHO global oral health programme. **Community dentistry and oral epidemiology**, v.31, (Suppl.1), p. 3-24, 2003.

PIEKOSZEWSKA-ZIĘTEK, P.; TURSKA-SZYBKA, A.; OLCZAK-KOWALCZYK, D. Single nucleotide polymorphism in the aetiology of caries: systematic literature review. **Caries research**, v. 51, n. 4, p. 425-435, 2017.

PITTS, N.; BAEZ, R.; DIAZ-GUALLORY, C., et al. Early Childhood Caries: IAPD Bangkok Declaration. **International journal of paediatric dentistry**. 2019; v.29, p.384-386.

PITTS, N.B.; STAMM, J. W. International Consensus Workshop on Caries Clinical Trials (ICW-CCT)—final consensus statements: agreeing where the evidence leads. **Journal of dental research**, v. 83, n. 1_suppl, p. 125-128, 2004.

PITTS, N.B. Modern concepts of caries measurement. **Journal of dental research**, v. 83, n. 1_suppl, p. 43-47, 2004.

PITTS N. **Cárie dentária: diagnóstico e monitoramento**. São Paulo: Artes Médicas; 2012. 232 p.

RODRIGUES J.A., de OLIVEIRA R.S., HUG I., NEUHAUS K., LUSSI A. Performance of experienced dentists in Switzerland after an e-learning program on ICDAS occlusal caries detection. **Journal of dental education**. 2013;77(8):1086-91.

ROSIER, B.T.; MARSH, P.D.; MIRA, A. Resilience of the oral microbiota in health: mechanisms that prevent dysbiosis. **Journal of dental research**, v. 97, n. 4, p. 371-380, 2018.

SHEIHAM, A.; JAMES, W.P.T. Diet and dental caries: the pivotal role of free sugars reemphasized. **Journal of dental research**, v. 94, n. 10, p. 1341-1347, 2015.

SHOAIB L.; DEERY C.; RICKETTS D.N.; NUGENT Z.J. Validity and reproducibility of ICDAS II in primary teeth. **Caries research**,. 2009;43(6):442-8.

STANLEY, B.O.C.; FEINGOLD, E; COOPER, M.; VANYUKOV, M.M.; MAHER, B.S.; SLAYTON, R.L.; WILLING, M.C.; REIS, S.E.; McNEIL, D.W.; CROUT, R.J; WEYANT, R.J.; LEVY, S.M.; VIEIRA, A.R.; MARAZITA, M.L.; SHAFFER, J.R.

Genetic association of MPPED2 and ACTN2 with dental caries. **Journal of dental research**, v.93. n.7, p. 626-632, 2014.

STEIJNS, J.M.; VAN HOOIJDONK, A.C.M. Occurrence, structure, biochemical properties and technological characteristics of lactoferrin. **British journal of nutrition**, v. 84, n. S1, p. 11-17, 2000.

TENUTA, L. M.; CHEDID, S. J.; CURY, J. A. Uso de fluoretos em odontopediatria: mitos e evidências. MAIA, L.C. **Odontologia integrada na infância**. São Paulo: Santos, p. 153-77, 2012.

TINANOFF, N. *et al.* Early childhood caries epidemiology, aetiology, risk assessment, societal burden, management, education, and policy: Global perspective. **International journal of paediatric dentistry**, v. 29, n. 3, p. 238-248, 2019.

TYAGI, R.; KHULLER, N.; SHARMA, A.; KATRI, A. Genetic basis of dental disorders: a review. **Journal of oral health and community dentistry**, v. 2, n.3, p. 55-61, 2008.

TONGUC-ALTIN, K. *et al.* Development of novel formulations containing Lysozyme and Lactoferrin and evaluation of antibacterial effects on Mutans Streptococci and Lactobacilli. **Archives of oral biology**, v. 60, n. 5, p. 706-714, 2015.

VELLIYAGOUNDER, K. *et al.* One of two human lactoferrin variants exhibits increased antibacterial and transcriptional activation activities and is associated with localized juvenile periodontitis. **Infection and immunity**, v. 71, n. 11, p. 6141-6147, 2003.

VELLIYAGOUNDER, K. *et al.* Role of lactoferrin and lactoferrin-derived peptides in oral and maxillofacial diseases. **Oral diseases**, v. 25, n. 3, p. 652-669, 2019.

VOLCKOVA, M.; LINHARTOVA, P.B.; TREFNA, T.; VLAZNY, J.; MUSILOVA, K.; KUKLETOVA, M.; KUKLA, L.; HOLLA, L.I. Lack of association between lactotransferrin polymorphism and dental caries. **Caries research**, v. 48, p. 39–44, 2014.

WANG, M.; QIN, M. Lack of association between LTF gene polymorphisms and different caries status in primary dentition. **Oral diseases**, v. 24, n. 8, p. 1545-1553, 2018.

WANG, X.; SHAFFER, J.R.; WEYANT, R.J.; CUENCO, K.T.; De SENSI, R.S.; CROUT, R.; Mc NEIL, D.W.; MARAZIT, M.L. Genes and their effects on dental caries may differ between primary and permanent dentitions. **Caries research**, v.44, p. 277–284, 2010.

WERNECK, R.I.; MIRA M.T.; TREVILATTO, P.C. A critical review: an overview of genetic influence on dental caries. **Oral diseases**, v. 16, p. 613-23, 2010.

WONG, H. M. et al. Oral health-related quality of life in Hong Kong preschool children. **Caries research**, v. 45, n. 4, p. 370-376, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Oral health surveys: basic methods**. World Health Organization, 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. **Sugars and dental caries**. World Health Organization, 2017.

WU, Y.M. et al. Association between lactoferrin gene polymorphisms and aggressive periodontitis among Taiwanese patients. **Journal of periodontal research**, v. 44, n. 3, p. 418-424, 2009.

ZUPIN, L. et al. LTF and DEFB 1 polymorphisms are associated with susceptibility toward chronic periodontitis development. **Oral diseases**, v. 23, n. 7, p. 1001-1008, 2017.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
“ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO GENÉTICO E CÁRIE DENTÁRIA EM
CRIANÇAS ATENDIDAS NA BEBÊ-CLÍNICA DA UEL”

Prezado(a) Senhor(a):

Gostaríamos de convidá-lo (a) para participar da pesquisa “ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO GENÉTICO E CÁRIE DENTÁRIA EM CRIANÇAS ATENDIDAS NA BEBÊ-CLÍNICA DA UEL”, a ser realizada na Bebê-Clínica (situada na rua Benjamin Constant, 800 Centro, telefone 3321-6336). O objetivo da pesquisa é avaliar a presença de cárie nas crianças de 3 a 5 anos de idade que estão sendo acompanhadas na Bebê-Clínica, e investigar a associação da cárie e fatores genéticos através do estudo do DNA da saliva dessas crianças. A participação do seu filho(a) é muito importante e ela se daria da seguinte forma: primeiramente será realizada uma análise do prontuário do seu filho(a) desde o primeiro atendimento na Bebê-Clínica até o presente momento, depois será feita uma entrevista sobre a condição de saúde bucal de seu filho(a), um exame físico bucal e coleta de uma amostra de saliva. Todos esses procedimentos são simples, rápidos e indolores.

Informamos que os riscos durante a coleta de saliva são mínimos, podendo causar um leve incômodo, que eventualmente pode resultar em choro da criança, neste caso a coleta será interrompida e o paciente excluído da amostra. Durante a entrevista, os riscos eventualmente podem estar relacionados ao constrangimento que as perguntas do questionário possam ocasionar aos pais e cuidadores. Caso ocorra algum tipo de desconforto o participante será prontamente atendido e amparado pela pesquisadora.

Esclarecemos que a participação da criança é totalmente voluntária, podendo o (a) senhor (a): recusar-se a participar, ou mesmo desistir a qualquer momento, sem que isto acarrete qualquer ônus ou prejuízo a seu filho(a). Esclarecemos, também, que as informações serão utilizadas somente para os fins desta pesquisa e serão tratadas com o mais absoluto sigilo e confidencialidade, de modo a preservar a identidade da criança. As amostras de DNA que porventura restarem após a análise do polimorfismo serão congeladas para utilização em pesquisas futuras.

Informamos que esta pesquisa atende e respeita os direitos previstos no Estatuto da Criança e do Adolescente-ECA, lei Federal nº 8069 de 13 de julho de 1990, sendo eles: à vida, à saúde, à alimentação, à educação, ao esporte, ao lazer, à profissionalização, à cultura, à dignidade, ao respeito, à liberdade e à convivência familiar e comunitária. Garantimos também que será atendido o Artigo 18 do ECA:” É dever de todos velar pela dignidade da criança e do adolescente, pondo-os a salvo de qualquer tratamento desumano, violento, aterrorizante, vexatório ou constrangedor.” Esclarecemos ainda, que o (a) seu filho(a) não pagará e nem será remunerado(a) por sua participação. Garantimos, no entanto, que todas as despesas decorrentes da

pesquisa serão ressarcidas, quando devidas e decorrentes especificamente da participação do seu filho(a). Os benefícios esperados são o conhecimento da prevalência da cárie na população estudada e melhor conhecimento dos fatores genético que possam estar ligados a cárie. Caso o(a) senhor(a) tenha dúvidas ou necessite de maiores esclarecimentos poderá nos contatar, Prof. Dr. Emerson José Venâncio (emersonjvst@gmail.com) no Laboratório de Imunologia IV (salas 39 e 40) Departamento de Ciências Patológicas, no Campus Universitário, telefone (43) 3371-5766, ou procurar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina, situado junto ao LABESC - Laboratório Escola, no Campus Universitário, Rodovia Celso Garcia Cid, PR 445 KM 380 telefone 3371-5455, email: cep268@uel.br. Este termo deverá ser preenchido em duas vias de igual teor, sendo uma delas devidamente preenchida, assinada e entregue ao (à) senhor (a).

Londrina, ____ de _____ de 2017.

Pesquisador Responsável: Paola Singi

APÊNDICE B - Questionário sociodemográfico



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ASSOCIAÇÃO DA VARIANTE GENÉTICA rs1126478 DA LACTOTRANSFERRINA E CÁRIE DENTÁRIA EM CRIANÇAS ATENDIDAS NA BEBÊ - CLÍNICA DA UEL

Formulário N.: _____ Prontuário N.: _____ Data: ___ / ___ / ___

I – DADOS PESSOAIS

Nome completo:

Data de nascimento: _____ Idade: _____ anos

Endereço: _____

Telefone: _____

Telefone de um parente para contato: _____

Nome da mãe:

Idade: _____ anos

Escolaridade da mãe:

() 1º grau completo () 1º grau incompleto () 2º grau completo

() 2º grau incompleto () 3º grau (completo ou cursando)

Nome do pai:

Idade: _____ anos

Escolaridade do pai:

() 1º grau completo () 1º grau incompleto () 2º grau completo

() 2º grau incompleto () 3º grau (completo ou cursando)

Moradia: () própria () própria em aquisição () alugada () cedida
() outros

Quantas pessoas residem na casa? _____

Quantas pessoas tem algum tipo de renda (trabalho remunerado, pensão, aposentadoria).

Listar os moradores e a renda mensal de cada um

Morador	Renda

Qual a cor de sua pele ou raça?

() branca () preta () amarela () parda () indígena () ignorado

Classificação econômica (ABEP, 2014)

	Quantidade de itens				
	0	1	2	3	4 ou +
Televisão em cores	0	1	2	3	4
Rádio	0	1	2	3	4
Banheiro	0	4	5	6	7
Automóvel	0	4	7	9	9
Empregada mensalista	0	3	4	4	4
Máquina de lavar	0	2	2	2	2
Vídeo cassete ou DVD	0	2	2	2	2
Geladeira	0	4	4	4	4
Freezer (independente ou parte da geladeira duplex)	0	2	2	2	2

II- SAÚDE GERAL

A saúde de seu filho(a) é:

() excelente () muito boa () boa () razoável () ruim

Seu filho(a) teve problemas de saúde nos últimos seis meses?

() sim () não

Se sim, qual o tipo de problema? _____

Seu filho(a) está tomando algum medicamento?

sim não (pular para a questão 5)

Qual medicamento?

analgésico/ anti-inflamatórios

Qual? _____ antiespasmódicos

Qual? _____

antimicrobianos Qual? _____

psicofármacos Qual? _____

outros Qual? _____

III- SAÚDE BUCAL

Há quanto tempo foi a última visita do seu filho(a) ao dentista?

menos de 3 meses menos de 6 meses menos de 1 ano

Onde?

Bebê - Clínica particular (liberal) particular (plano ou convênio)

Por que?

dor consulta de rotina/ reparos/ manutenção

sangramento cavidade no dente

feridas, caroços ou manchas outros: _____

Qual a frequência que seu filho(a) vai ao dentista?

regularmente a cada seis meses

uma vez ao ano

somente quando apresenta algum problema

Como você classificaria a saúde bucal do seu filho(a)?

não sabe péssima ruim regular boa ótima

Como você classificaria a aparência dos dentes e gengivas do seu filho?

não sabe péssima ruim regular boa ótima

Como você classificaria a mastigação do seu filho(a)?

não sabe péssima ruim regular boa ótima

Nos últimos meses seu filho(a) teve dor de dente ou na gengiva?

nenhuma dor pouca dor média dor muita dor

Quantas vezes ao dia seu filho(a) escova os dentes?

uma duas três quatro cinco mais de cinco

Você costuma passar fio dental nos dentes do seu filho(a)?

sim não

Quando usa?

uma vez ao dia duas vezes ao dia quando se lembra quando percebe restos alimentares

Seu filho(a) teve algum trauma nos dentes decíduos?

sim não

Qual a dimensão do trauma? Especificar

ANEXOS

ANEXO A – Odontograma, biofilme visível e condição da papila gengival

BIOFILME VISÍVEL NA SUPERFÍCIE VESTIBULAR DOS MOLARES SEM EVIDENCIAÇÃO (Índice de Silness e Løe, 1963 modificado)

54	55	64	65	74	75	84	85

- 0 – Ausência de biofilme visível
- 1 – Biofilme não visível, mas removido do sulco gengival com sonda periodontal
- 2 – Biofilme visível após secagem
- 3 – Biofilme abundante, visível mesmo sem secagem

CONDIÇÃO DA PAPILA GENGIVAL DA FACE PROXIMAL (Índice de Silness e Løe, 1963 modificado)

54	55		64	65		74	75		84	85	
Distal	Mesial	Distal	Distal	Mesial	Distal	Distal	Mesial	Distal	Distal	Mesial	Distal

- 0 – Sadio
- 1 – Margem gengival vermelha, sem sangramento após sondagem
- 2 – Margem gengival vermelha, com sangramento após sondagem
- 3 – Sangramento após jato de ar

ANEXO B – Questionário de Frequência Alimentar Semiquantitativo (QFAsq)

ANEXO 1

QFA

No de identificação: _____

Data: ____/____/____

1 - Dados de identificação:

Nome da Criança:
Responsável pelas informações (grau de parentesco):
Endereço:
Telefone:
Nome da Mãe:
Nome do Pai:
Gênero: () M () F
Data de nascimento: ____ / ____ / ____
Peso: _____ kg
Altura: _____ cm
Criança freqüenta creche/escola: () Não () Sim – Nome _____ Desde qual idade? _____ Período: () Matutino () Vespertino () Integral
Caso a criança freqüente mais de um local: Nome: _____ Desde qual idade? _____ Período: () Matutino () Vespertino () Integral

QUESTIONÁRIO DE FREQUÊNCIA ALIMENTAR SEMIQUANTITATIVO

(QFAsq)

Assinale com um X a quantidade de cada alimento que a criança consumiu habitualmente durante os últimos 6 meses

Arroz, Pão, Massa, Batata

Arroz Cozido (3 colheres de sopa) <input type="radio"/> 1 Nunca <input type="radio"/> 2 Menos de 1 vez por mês <input type="radio"/> 3 1 a 3 vezes por mês <input type="radio"/> 4 1 vez por semana <input type="radio"/> 5 2 a 4 vezes por semana <input type="radio"/> 6 1 vez por dia <input type="radio"/> 7 2 ou mais vezes por dia	Batata Cozida / Purê (1 colher de servir) <input type="radio"/> 1 Nunca <input type="radio"/> 2 Menos de 1 vez por mês <input type="radio"/> 3 1 a 3 vezes por mês <input type="radio"/> 4 1 vez por semana <input type="radio"/> 5 2 a 4 vezes por semana <input type="radio"/> 6 1 vez por dia <input type="radio"/> 7 2 ou mais vezes por dia	Batata Frita (1 escumadeira) <input type="radio"/> 1 Nunca <input type="radio"/> 2 Menos de 1 vez por mês <input type="radio"/> 3 1 a 3 vezes por mês <input type="radio"/> 4 1 vez por semana <input type="radio"/> 5 2 a 4 vezes por semana <input type="radio"/> 6 1 vez por dia <input type="radio"/> 7 2 ou mais vezes por dia	Biscoitos sem Recheio Tucs® (3 ou 4 unidades) <input type="radio"/> 1 Nunca <input type="radio"/> 2 Menos de 1 vez por mês <input type="radio"/> 3 1 a 3 vezes por mês <input type="radio"/> 4 1 vez por semana <input type="radio"/> 5 2 a 4 vezes por semana <input type="radio"/> 6 1 vez por dia <input type="radio"/> 7 2 ou mais vezes por dia
Biscoitos com Recheio Chocolate, Wafer (3 unidades) <input type="radio"/> 1 Nunca <input type="radio"/> 2 Menos de 1 vez por mês <input type="radio"/> 3 1 a 3 vezes por mês <input type="radio"/> 4 1 vez por semana <input type="radio"/> 5 2 a 4 vezes por semana <input type="radio"/> 6 1 vez por dia <input type="radio"/> 7 2 ou mais vezes por dia	Cereal Matinal tipo Snowflakes® (1 xícara) <input type="radio"/> 1 Nunca <input type="radio"/> 2 Menos de 1 vez por mês <input type="radio"/> 3 1 a 3 vezes por mês <input type="radio"/> 4 1 vez por semana <input type="radio"/> 5 2 a 4 vezes por semana <input type="radio"/> 6 1 vez por dia <input type="radio"/> 7 2 ou mais vezes por dia	Macarrão Cozido (1 escumadeira) <input type="radio"/> 1 Nunca <input type="radio"/> 2 Menos de 1 vez por mês <input type="radio"/> 3 1 a 3 vezes por mês <input type="radio"/> 4 1 vez por semana <input type="radio"/> 5 2 a 4 vezes por semana <input type="radio"/> 6 1 vez por dia <input type="radio"/> 7 2 ou mais vezes por dia	Macarrão Nissin Miojo® (1/3 do pacote) <input type="radio"/> 1 Nunca <input type="radio"/> 2 Menos de 1 vez por mês <input type="radio"/> 3 1 a 3 vezes por mês <input type="radio"/> 4 1 vez por semana <input type="radio"/> 5 2 a 4 vezes por semana <input type="radio"/> 6 1 vez por dia <input type="radio"/> 7 2 ou mais vezes por dia
Pão Francês (1/2 unidade) <input type="radio"/> 1 Nunca <input type="radio"/> 2 Menos de 1 vez por mês <input type="radio"/> 3 1 a 3 vezes por mês <input type="radio"/> 4 1 vez por semana <input type="radio"/> 5 2 a 4 vezes por semana <input type="radio"/> 6 1 vez por dia <input type="radio"/> 7 2 ou mais vezes por dia	Essesantes - Maizena®, Farinha Láctea®, Mucilon®, Cremogema® (1 ou 2 colheres de sopa) <input type="radio"/> 1 Nunca <input type="radio"/> 2 Menos de 1 vez por mês <input type="radio"/> 3 1 a 3 vezes por mês <input type="radio"/> 4 1 vez por semana <input type="radio"/> 5 2 a 4 vezes por semana <input type="radio"/> 6 1 vez por dia <input type="radio"/> 7 2 ou mais vezes por dia		
	Feijão <input type="radio"/> 1 Nunca <input type="radio"/> 2 Menos de 1 vez por mês <input type="radio"/> 3 1 a 3 vezes por mês <input type="radio"/> 4 1 vez por semana <input type="radio"/> 5 2 a 4 vezes por semana <input type="radio"/> 6 1 vez por dia <input type="radio"/> 7 2 ou mais vezes por dia		
	Feijão (1/2 concha) <input type="radio"/> 1 Nunca <input type="radio"/> 2 Menos de 1 vez por mês <input type="radio"/> 3 1 a 3 vezes por mês <input type="radio"/> 4 1 vez por semana <input type="radio"/> 5 2 a 4 vezes por semana <input type="radio"/> 6 1 vez por dia <input type="radio"/> 7 2 ou mais vezes por dia		

Verduras e legumes

Obs.: As sopas com os legumes deverão ser informados no grupo dos salgados e preparações (a seguir). Neste momento, assinale apenas quando o alimento for consumido cozido, refogado ou em salada.

Abóbora (2 colheres de sopa)	Alface (2 folhas)	Repolho (1 colher de sopa)	Tomate (3 fatias)
<input type="radio"/> 1 Nunca <input type="radio"/> 2 Menos de 1 vez por mês <input type="radio"/> 3 1 a 3 vezes por mês <input type="radio"/> 4 1 vez por semana <input type="radio"/> 5 2 a 4 vezes por semana <input type="radio"/> 6 1 vez por dia <input type="radio"/> 7 2 ou mais vezes por dia	<input type="radio"/> 1 Nunca <input type="radio"/> 2 Menos de 1 vez por mês <input type="radio"/> 3 1 a 3 vezes por mês <input type="radio"/> 4 1 vez por semana <input type="radio"/> 5 2 a 4 vezes por semana <input type="radio"/> 6 1 vez por dia <input type="radio"/> 7 2 ou mais vezes por dia	<input type="radio"/> 1 Nunca <input type="radio"/> 2 Menos de 1 vez por mês <input type="radio"/> 3 1 a 3 vezes por mês <input type="radio"/> 4 1 vez por semana <input type="radio"/> 5 2 a 4 vezes por semana <input type="radio"/> 6 1 vez por dia <input type="radio"/> 7 2 ou mais vezes por dia	<input type="radio"/> 1 Nunca <input type="radio"/> 2 Menos de 1 vez por mês <input type="radio"/> 3 1 a 3 vezes por mês <input type="radio"/> 4 1 vez por semana <input type="radio"/> 5 2 a 4 vezes por semana <input type="radio"/> 6 1 vez por dia <input type="radio"/> 7 2 ou mais vezes por dia
Molho de Tomate (1 colher de sopa)	Cenoura (1/2 colher de servir)	Chuchu (1 colher de sopa)	Mandioquinha (1/2 colher de sopa)
<input type="radio"/> 1 Nunca <input type="radio"/> 2 Menos de 1 vez por mês <input type="radio"/> 3 1 a 3 vezes por mês <input type="radio"/> 4 1 vez por semana <input type="radio"/> 5 2 a 4 vezes por semana <input type="radio"/> 6 1 vez por dia <input type="radio"/> 7 2 ou mais vezes por dia	<input type="radio"/> 1 Nunca <input type="radio"/> 2 Menos de 1 vez por mês <input type="radio"/> 3 1 a 3 vezes por mês <input type="radio"/> 4 1 vez por semana <input type="radio"/> 5 2 a 4 vezes por semana <input type="radio"/> 6 1 vez por dia <input type="radio"/> 7 2 ou mais vezes por dia	<input type="radio"/> 1 Nunca <input type="radio"/> 2 Menos de 1 vez por mês <input type="radio"/> 3 1 a 3 vezes por mês <input type="radio"/> 4 1 vez por semana <input type="radio"/> 5 2 a 4 vezes por semana <input type="radio"/> 6 1 vez por dia <input type="radio"/> 7 2 ou mais vezes por dia	<input type="radio"/> 1 Nunca <input type="radio"/> 2 Menos de 1 vez por mês <input type="radio"/> 3 1 a 3 vezes por mês <input type="radio"/> 4 1 vez por semana <input type="radio"/> 5 2 a 4 vezes por semana <input type="radio"/> 6 1 vez por dia <input type="radio"/> 7 2 ou mais vezes por dia

Frutas

Banana (1 unidade)	Maçã / Pera (1 unidade)	Laranja (1 unidade)	Suco de Laranja (1/2 copo)
<input type="radio"/> 1 Nunca <input type="radio"/> 2 Menos de 1 vez por mês <input type="radio"/> 3 1 a 3 vezes por mês <input type="radio"/> 4 1 vez por semana <input type="radio"/> 5 2 a 4 vezes por semana <input type="radio"/> 6 1 vez por dia <input type="radio"/> 7 2 ou mais vezes por dia	<input type="radio"/> 1 Nunca <input type="radio"/> 2 Menos de 1 vez por mês <input type="radio"/> 3 1 a 3 vezes por mês <input type="radio"/> 4 1 vez por semana <input type="radio"/> 5 2 a 4 vezes por semana <input type="radio"/> 6 1 vez por dia <input type="radio"/> 7 2 ou mais vezes por dia	<input type="radio"/> 1 Nunca <input type="radio"/> 2 Menos de 1 vez por mês <input type="radio"/> 3 1 a 3 vezes por mês <input type="radio"/> 4 1 vez por semana <input type="radio"/> 5 2 a 4 vezes por semana <input type="radio"/> 6 1 vez por dia <input type="radio"/> 7 2 ou mais vezes por dia	<input type="radio"/> 1 Nunca <input type="radio"/> 2 Menos de 1 vez por mês <input type="radio"/> 3 1 a 3 vezes por mês <input type="radio"/> 4 1 vez por semana <input type="radio"/> 5 2 a 4 vezes por semana <input type="radio"/> 6 1 vez por dia <input type="radio"/> 7 2 ou mais vezes por dia
Suco de outras frutas Maracujá, Abacaxi (só o caldo) (1/2 copo)		Mamão (1 fatia)	Goiaba (1/2 unidade)
<input type="radio"/> 1 Nunca <input type="radio"/> 2 Menos de 1 vez por mês <input type="radio"/> 3 1 a 3 vezes por mês <input type="radio"/> 4 1 vez por semana <input type="radio"/> 5 2 a 4 vezes por semana <input type="radio"/> 6 1 vez por dia <input type="radio"/> 7 2 ou mais vezes por dia		<input type="radio"/> 1 Nunca <input type="radio"/> 2 Menos de 1 vez por mês <input type="radio"/> 3 1 a 3 vezes por mês <input type="radio"/> 4 1 vez por semana <input type="radio"/> 5 2 a 4 vezes por semana <input type="radio"/> 6 1 vez por dia <input type="radio"/> 7 2 ou mais vezes por dia	<input type="radio"/> 1 Nunca <input type="radio"/> 2 Menos de 1 vez por mês <input type="radio"/> 3 1 a 3 vezes por mês <input type="radio"/> 4 1 vez por semana <input type="radio"/> 5 2 a 4 vezes por semana <input type="radio"/> 6 1 vez por dia <input type="radio"/> 7 2 ou mais vezes por dia

Carnes e Ovos

Bife (1 unidade) <input type="radio"/> 1 Nunca <input type="radio"/> 2 Menos de 1 vez por mês <input type="radio"/> 3 1 a 3 vezes por mês <input type="radio"/> 4 1 vez por semana <input type="radio"/> 5 2 a 4 vezes por semana <input type="radio"/> 6 1 vez por dia <input type="radio"/> 7 2 ou mais vezes por dia	Carne cozida (Panela ou moida (1/2 fatia/3 colheres de sopa)) <input type="radio"/> 1 Nunca <input type="radio"/> 2 Menos de 1 vez por mês <input type="radio"/> 3 1 a 3 vezes por mês <input type="radio"/> 4 1 vez por semana <input type="radio"/> 5 2 a 4 vezes por semana <input type="radio"/> 6 1 vez por dia <input type="radio"/> 7 2 ou mais vezes por dia	Lingüiça Perdigão® (1/2 gomo) <input type="radio"/> 1 Nunca <input type="radio"/> 2 Menos de 1 vez por mês <input type="radio"/> 3 1 a 3 vezes por mês <input type="radio"/> 4 1 vez por semana <input type="radio"/> 5 2 a 4 vezes por semana <input type="radio"/> 6 1 vez por dia <input type="radio"/> 7 2 ou mais vezes por dia	Presunto Sadia® (1 fatia) <input type="radio"/> 1 Nunca <input type="radio"/> 2 Menos de 1 vez por mês <input type="radio"/> 3 1 a 3 vezes por mês <input type="radio"/> 4 1 vez por semana <input type="radio"/> 5 2 a 4 vezes por semana <input type="radio"/> 6 1 vez por dia <input type="radio"/> 7 2 ou mais vezes por dia
Bife de Fígado de Boi (1 unidade) <input type="radio"/> 1 Nunca <input type="radio"/> 2 Menos de 1 vez por mês <input type="radio"/> 3 1 a 3 vezes por mês <input type="radio"/> 4 1 vez por semana <input type="radio"/> 5 2 a 4 vezes por semana <input type="radio"/> 6 1 vez por dia <input type="radio"/> 7 2 ou mais vezes por dia	Frango (Cozido, Frito, Grelhado, Assado) (1 pedaço / 1 unidade) <input type="radio"/> 1 Nunca <input type="radio"/> 2 Menos de 1 vez por mês <input type="radio"/> 3 1 a 3 vezes por mês <input type="radio"/> 4 1 vez por semana <input type="radio"/> 5 2 a 4 vezes por semana <input type="radio"/> 6 1 vez por dia <input type="radio"/> 7 2 ou mais vezes por dia	Peixe (Cozido, Frito) (1/2 filé / 1/2 pedaço) <input type="radio"/> 1 Nunca <input type="radio"/> 2 Menos de 1 vez por mês <input type="radio"/> 3 1 a 3 vezes por mês <input type="radio"/> 4 1 vez por semana <input type="radio"/> 5 2 a 4 vezes por semana <input type="radio"/> 6 1 vez por dia <input type="radio"/> 7 2 ou mais vezes por dia	Ovo (Frito, Cozido) (1 unidade) <input type="radio"/> 1 Nunca <input type="radio"/> 2 Menos de 1 vez por mês <input type="radio"/> 3 1 a 3 vezes por mês <input type="radio"/> 4 1 vez por semana <input type="radio"/> 5 2 a 4 vezes por semana <input type="radio"/> 6 1 vez por dia <input type="radio"/> 7 2 ou mais vezes por dia

Leite, Queijo, Iogurte

Leite fluido integral (1 xícara) <input type="radio"/> 1 Nunca <input type="radio"/> 2 Menos de 1 vez por mês <input type="radio"/> 3 1 a 3 vezes por mês <input type="radio"/> 4 1 vez por semana <input type="radio"/> 5 2 a 4 vezes por semana <input type="radio"/> 6 1 vez por dia <input type="radio"/> 7 2 ou mais vezes por dia	Leite em Pó Integral diluído com água de abastecimento público (1 xícara) <input type="radio"/> 1 Nunca <input type="radio"/> 2 Menos de 1 vez por mês <input type="radio"/> 3 1 a 3 vezes por mês <input type="radio"/> 4 1 vez por semana <input type="radio"/> 5 2 a 4 vezes por semana <input type="radio"/> 6 1 vez por dia <input type="radio"/> 7 2 ou mais vezes por dia	Leite em Pó Integral diluído com água mineral (1 xícara) <input type="radio"/> 1 Nunca <input type="radio"/> 2 Menos de 1 vez por mês <input type="radio"/> 3 1 a 3 vezes por mês <input type="radio"/> 4 1 vez por semana <input type="radio"/> 5 2 a 4 vezes por semana <input type="radio"/> 6 1 vez por dia <input type="radio"/> 7 2 ou mais vezes por dia	Iogurte de Frutas (1 pote) <input type="radio"/> 1 Nunca <input type="radio"/> 2 Menos de 1 vez por mês <input type="radio"/> 3 1 a 3 vezes por mês <input type="radio"/> 4 1 vez por semana <input type="radio"/> 5 2 a 4 vezes por semana <input type="radio"/> 6 1 vez por dia <input type="radio"/> 7 2 ou mais vezes por dia
Danoninho® / Chambinho® (1 pote) <input type="radio"/> 1 Nunca <input type="radio"/> 2 Menos de 1 vez por mês <input type="radio"/> 3 1 a 3 vezes por mês <input type="radio"/> 4 1 vez por semana <input type="radio"/> 5 2 a 4 vezes por semana <input type="radio"/> 6 1 vez por dia <input type="radio"/> 7 2 ou mais vezes por dia	Leite Fermentado (Yakult®) (1 pote) <input type="radio"/> 1 Nunca <input type="radio"/> 2 Menos de 1 vez por mês <input type="radio"/> 3 1 a 3 vezes por mês <input type="radio"/> 4 1 vez por semana <input type="radio"/> 5 2 a 4 vezes por semana <input type="radio"/> 6 1 vez por dia <input type="radio"/> 7 2 ou mais vezes por dia	Margarina / Manteiga (1 colher de chá) <input type="radio"/> 1 Nunca <input type="radio"/> 2 Menos de 1 vez por mês <input type="radio"/> 3 1 a 3 vezes por mês <input type="radio"/> 4 1 vez por semana <input type="radio"/> 5 2 a 4 vezes por semana <input type="radio"/> 6 1 vez por dia <input type="radio"/> 7 2 ou mais vezes por dia	Queijo Mussarela Tirolez® (1 fatia) <input type="radio"/> 1 Nunca <input type="radio"/> 2 Menos de 1 vez por mês <input type="radio"/> 3 1 a 3 vezes por mês <input type="radio"/> 4 1 vez por semana <input type="radio"/> 5 2 a 4 vezes por semana <input type="radio"/> 6 1 vez por dia <input type="radio"/> 7 2 ou mais vezes por dia

Requeijão (1 colher de sobremesa) <input type="radio"/> 1 Nunca <input type="radio"/> 2 Menos de 1 vez por mês <input type="radio"/> 3 1 a 3 vezes por mês <input type="radio"/> 4 1 vez por semana <input type="radio"/> 5 2 a 4 vezes por semana <input type="radio"/> 6 1 vez por dia <input type="radio"/> 7 2 ou mais vezes por dia
--

Açúcar, Doces e Salgadinhos

Açúcar (1 1/2 colher de sobremesa)	Achocolatado em Pó (Nescau®, Toddy®) (1 1/2 colher de sobremesa)	Bolo Comum / Chocolate (1 fatia)	Chocolate / Bombom (1 unidade)
<input type="radio"/> 1 Nunca <input type="radio"/> 2 Menos de 1 vez por mês <input type="radio"/> 3 1 a 3 vezes por mês <input type="radio"/> 4 1 vez por semana <input type="radio"/> 5 2 a 4 vezes por semana <input type="radio"/> 6 1 vez por dia <input type="radio"/> 7 2 ou mais vezes por dia	<input type="radio"/> 1 Nunca <input type="radio"/> 2 Menos de 1 vez por mês <input type="radio"/> 3 1 a 3 vezes por mês <input type="radio"/> 4 1 vez por semana <input type="radio"/> 5 2 a 4 vezes por semana <input type="radio"/> 6 1 vez por dia <input type="radio"/> 7 2 ou mais vezes por dia	<input type="radio"/> 1 Nunca <input type="radio"/> 2 Menos de 1 vez por mês <input type="radio"/> 3 1 a 3 vezes por mês <input type="radio"/> 4 1 vez por semana <input type="radio"/> 5 2 a 4 vezes por semana <input type="radio"/> 6 1 vez por dia <input type="radio"/> 7 2 ou mais vezes por dia	<input type="radio"/> 1 Nunca <input type="radio"/> 2 Menos de 1 vez por mês <input type="radio"/> 3 1 a 3 vezes por mês <input type="radio"/> 4 1 vez por semana <input type="radio"/> 5 2 a 4 vezes por semana <input type="radio"/> 6 1 vez por dia <input type="radio"/> 7 2 ou mais vezes por dia
Salgadinho / Batata Chips® (1 pacote pequeno)			
<input type="radio"/> 1 Nunca <input type="radio"/> 2 Menos de 1 vez por mês <input type="radio"/> 3 1 a 3 vezes por mês <input type="radio"/> 4 1 vez por semana <input type="radio"/> 5 2 a 4 vezes por semana <input type="radio"/> 6 1 vez por dia <input type="radio"/> 7 2 ou mais vezes por dia			

Salgados e Preparações

Polenta (1 colher de servir / 1 fatia)	Sopa com Carne (legumes, feijão, macarrão) (1/2 prato)	Sopa sem Carne (legumes, feijão, macarrão) (1/2 prato)	Pão de Queijo (1 unidade pequena)
<input type="radio"/> 1 Nunca <input type="radio"/> 2 Menos de 1 vez por mês <input type="radio"/> 3 1 a 3 vezes por mês <input type="radio"/> 4 1 vez por semana <input type="radio"/> 5 2 a 4 vezes por semana <input type="radio"/> 6 1 vez por dia <input type="radio"/> 7 2 ou mais vezes por dia	<input type="radio"/> 1 Nunca <input type="radio"/> 2 Menos de 1 vez por mês <input type="radio"/> 3 1 a 3 vezes por mês <input type="radio"/> 4 1 vez por semana <input type="radio"/> 5 2 a 4 vezes por semana <input type="radio"/> 6 1 vez por dia <input type="radio"/> 7 2 ou mais vezes por dia	<input type="radio"/> 1 Nunca <input type="radio"/> 2 Menos de 1 vez por mês <input type="radio"/> 3 1 a 3 vezes por mês <input type="radio"/> 4 1 vez por semana <input type="radio"/> 5 2 a 4 vezes por semana <input type="radio"/> 6 1 vez por dia <input type="radio"/> 7 2 ou mais vezes por dia	<input type="radio"/> 1 Nunca <input type="radio"/> 2 Menos de 1 vez por mês <input type="radio"/> 3 1 a 3 vezes por mês <input type="radio"/> 4 1 vez por semana <input type="radio"/> 5 2 a 4 vezes por semana <input type="radio"/> 6 1 vez por dia <input type="radio"/> 7 2 ou mais vezes por dia
Pizza Mussarela Perdigão® (1/2 fatia)		Sanduíche (Misto, Hambúrguer, Simples) (1/2 unidade)	
<input type="radio"/> 1 Nunca <input type="radio"/> 2 Menos de 1 vez por mês <input type="radio"/> 3 1 a 3 vezes por mês <input type="radio"/> 4 1 vez por semana <input type="radio"/> 5 2 a 4 vezes por semana <input type="radio"/> 6 1 vez por dia <input type="radio"/> 7 2 ou mais vezes por dia		<input type="radio"/> 1 Nunca <input type="radio"/> 2 Menos de 1 vez por mês <input type="radio"/> 3 1 a 3 vezes por mês <input type="radio"/> 4 1 vez por semana <input type="radio"/> 5 2 a 4 vezes por semana <input type="radio"/> 6 1 vez por dia <input type="radio"/> 7 2 ou mais vezes por dia	

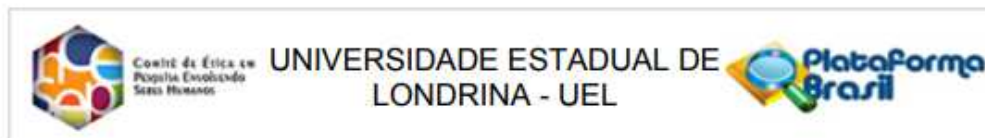
Bebidas

Café com Açúcar (1 xícara de Café)	Refrigerante Coca-Cola® (1/2 copo)	Suco Artificial tipo Tang® (1/2 copo)	Chá Industrializado (1/2 copo)
<input type="radio"/> 1 Nunca <input type="radio"/> 2 Menos de 1 vez por mês <input type="radio"/> 3 1 a 3 vezes por mês <input type="radio"/> 4 1 vez por semana <input type="radio"/> 5 2 a 4 vezes por semana <input type="radio"/> 6 1 vez por dia <input type="radio"/> 7 2 ou mais vezes por dia	<input type="radio"/> 1 Nunca <input type="radio"/> 2 Menos de 1 vez por mês <input type="radio"/> 3 1 a 3 vezes por mês <input type="radio"/> 4 1 vez por semana <input type="radio"/> 5 2 a 4 vezes por semana <input type="radio"/> 6 1 vez por dia <input type="radio"/> 7 2 ou mais vezes por dia	<input type="radio"/> 1 Nunca <input type="radio"/> 2 Menos de 1 vez por mês <input type="radio"/> 3 1 a 3 vezes por mês <input type="radio"/> 4 1 vez por semana <input type="radio"/> 5 2 a 4 vezes por semana <input type="radio"/> 6 1 vez por dia <input type="radio"/> 7 2 ou mais vezes por dia	<input type="radio"/> 1 Nunca <input type="radio"/> 2 Menos de 1 vez por mês <input type="radio"/> 3 1 a 3 vezes por mês <input type="radio"/> 4 1 vez por semana <input type="radio"/> 5 2 a 4 vezes por semana <input type="radio"/> 6 1 vez por dia <input type="radio"/> 7 2 ou mais vezes por dia
	Água (1/2 copo)	Chá Preto (Apichá) (1/2 copo)	
	<input type="radio"/> 1 Nunca <input type="radio"/> 2 Menos de 1 vez por mês <input type="radio"/> 3 1 a 3 vezes por mês <input type="radio"/> 4 1 vez por semana <input type="radio"/> 5 2 a 4 vezes por semana <input type="radio"/> 6 1 vez por dia <input type="radio"/> 7 2 ou mais vezes por dia	<input type="radio"/> 1 Nunca <input type="radio"/> 2 Menos de 1 vez por mês <input type="radio"/> 3 1 a 3 vezes por mês <input type="radio"/> 4 1 vez por semana <input type="radio"/> 5 2 a 4 vezes por semana <input type="radio"/> 6 1 vez por dia <input type="radio"/> 7 2 ou mais vezes por dia	

Outros

Leite em Pó à base de soja diluído com água de abastecimento público (1 xícara)	Leite em Pó à base de soja diluído com água mineral (1 xícara)	Achocolatado Toddynho® (1 unidade)	Bebida Isotônica Gatorade® (1/2 garrafa)
<input type="radio"/> 1 Nunca <input type="radio"/> 2 Menos de 1 vez por mês <input type="radio"/> 3 1 a 3 vezes por mês <input type="radio"/> 4 1 vez por semana <input type="radio"/> 5 2 a 4 vezes por semana <input type="radio"/> 6 1 vez por dia <input type="radio"/> 7 2 ou mais vezes por dia	<input type="radio"/> 1 Nunca <input type="radio"/> 2 Menos de 1 vez por mês <input type="radio"/> 3 1 a 3 vezes por mês <input type="radio"/> 4 1 vez por semana <input type="radio"/> 5 2 a 4 vezes por semana <input type="radio"/> 6 1 vez por dia <input type="radio"/> 7 2 ou mais vezes por dia	<input type="radio"/> 1 Nunca <input type="radio"/> 2 Menos de 1 vez por mês <input type="radio"/> 3 1 a 3 vezes por mês <input type="radio"/> 4 1 vez por semana <input type="radio"/> 5 2 a 4 vezes por semana <input type="radio"/> 6 1 vez por dia <input type="radio"/> 7 2 ou mais vezes por dia	<input type="radio"/> 1 Nunca <input type="radio"/> 2 Menos de 1 vez por mês <input type="radio"/> 3 1 a 3 vezes por mês <input type="radio"/> 4 1 vez por semana <input type="radio"/> 5 2 a 4 vezes por semana <input type="radio"/> 6 1 vez por dia <input type="radio"/> 7 2 ou mais vezes por dia
Cereal Neston® (6 colheres de sopa)	Biscoito Danyt's (3 unidades)	Chocolate em Barra (1/2 barra pequena)	Chocolates M&Ms (1 unidade pequena)
<input type="radio"/> 1 Nunca <input type="radio"/> 2 Menos de 1 vez por mês <input type="radio"/> 3 1 a 3 vezes por mês <input type="radio"/> 4 1 vez por semana <input type="radio"/> 5 2 a 4 vezes por semana <input type="radio"/> 6 1 vez por dia <input type="radio"/> 7 2 ou mais vezes por dia	<input type="radio"/> 1 Nunca <input type="radio"/> 2 Menos de 1 vez por mês <input type="radio"/> 3 1 a 3 vezes por mês <input type="radio"/> 4 1 vez por semana <input type="radio"/> 5 2 a 4 vezes por semana <input type="radio"/> 6 1 vez por dia <input type="radio"/> 7 2 ou mais vezes por dia	<input type="radio"/> 1 Nunca <input type="radio"/> 2 Menos de 1 vez por mês <input type="radio"/> 3 1 a 3 vezes por mês <input type="radio"/> 4 1 vez por semana <input type="radio"/> 5 2 a 4 vezes por semana <input type="radio"/> 6 1 vez por dia <input type="radio"/> 7 2 ou mais vezes por dia	<input type="radio"/> 1 Nunca <input type="radio"/> 2 Menos de 1 vez por mês <input type="radio"/> 3 1 a 3 vezes por mês <input type="radio"/> 4 1 vez por semana <input type="radio"/> 5 2 a 4 vezes por semana <input type="radio"/> 6 1 vez por dia <input type="radio"/> 7 2 ou mais vezes por dia

ANEXO C – Aprovação Comitê Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos CEP/UEL



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Associação do polimorfismo genético e cárie dentária em crianças atendidas na Bebê-Clinica da UEL.

Pesquisador: Emerson José Venancio

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.);

Versão: 2

CAAE: 56077916.2.0000.5231

Instituição Proponente: Programa de PG em Patologia Experimental

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.627.994

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um projeto de doutorado que tem como objetivo avaliar o polimorfismo genético do gene LTF e uma possível relação com a presença ou ausência de cáries dentárias. Serão incluídas no projeto 500 crianças de três a cinco anos de idade, atendidas na Bebê-Clinica da Universidade Estadual de Londrina (UEL). Sendo 250 com histórico de cárie e 250 sem histórico de cárie dentária.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar a presença de polimorfismos do gene LTF, expresso no DNA genômico da saliva de crianças, e sua relação com a cárie dentária.

Objetivos Secundários:

Realizar uma revisão sistemática sobre a associação de polimorfismos do gene LTF e a frequência de cárie dentária em crianças; verificar a prevalência de cárie na população estudada; identificar fatores ambientais e socioeconômicos relacionados a experiência de cárie; determinar a frequência do polimorfismo LTF 140 A/G; selecionar polimorfismos do gene LTF que possam ser investigados com relação a frequência de cárie em crianças; determinar a frequência dos polimorfismos

Endereço: LABESC - Sala 14

Bairro: Campus Universitário

CEP: 86.057-970

UF: PR

Município: LONDRINA

Telefone: (43)3371-5455

E-mail: cep268@uel.br



Conselho de Ética em
Pesquisa envolvendo
Serres Humanos

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE
LONDRINA - UEL



Continuação do Parecer: 1.627.994

selecionados do gene LTF em crianças com e sem cárie; avaliar a associação dos polimorfismos selecionados do gene LTF com a ocorrência de cárie em crianças; determinar a interação entre os polimorfismos do gene LTF e os fatores intrínsecos e extrínsecos relacionados a doença.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

A pesquisadora afirma que os riscos durante a coleta de saliva são mínimos, podendo causar um leve desconforto, que eventualmente pode resultar em choro da criança, neste caso a coleta será interrompida e o paciente excluído da amostra. Durante a entrevista os riscos estão relacionados ao eventual constrangimento que as perguntas do questionário possam ocasionar aos pais e cuidadores. Caso ocorra algum tipo de desconforto o participante será prontamente atendido e amparado pela pesquisadora.

Benefícios:

Segundo a pesquisadora "o benefícios esperados são o conhecimento da prevalência da cárie na população estudada e melhor conhecimento dos fatores genéticos que possam estar ligados a cárie.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Quanto à seleção

Critério de Inclusão: crianças na faixa etária de 3 a 5 anos, atendidas exclusivamente na Bebê-Clinica da UEL, crianças que não apresentem doenças sistêmicas, crianças que apresentem os dados clínicos completos no prontuário de atendimento na Bebê-Clinica da UEL.

Critério de Exclusão: crianças com dados incompletos em prontuários, crianças fora da faixa etária de 3 a 5 anos, que não retornarem para exame clínico; crianças com doenças sistêmicas que possam interferir na pesquisa.

Quanto a intervenção

Será realizado um estudo de coorte retrospectivo do prontuário de crianças atendidas na bebê clínica da UEL do ano 2013 a 2015. Na consulta será feita o exame clínico, seguido de uma profilaxia e coleta de saliva não estimulada por aspiração. A análise do polimorfismo do gene LTF (rs 1126478), será feita a partir da extração de DNA total de saliva usando o sistema de extração

Endereço: LABESC - Sala 14

Bairro: Campus Universitário

UF: PR

Município: LONDRINA

CEP: 86.057-970

Telefone: (43)3371-5455

E-mail: cep268@uel.br



Conselho de Ética em
Pesquisa Envolvendo
Serres Humanos

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE
LONDRINA - UEL



Continuação do Parecer: 1.627.994

Saliva Norgen de DNA

Isolation Kit (Norgen) seguindo as instruções do fabricante. A genotipagem será feita por Restriction Fragment Length Polymorphism-PCR (RFLP-PCR) como descritos por Wang et al., 2006; Wang et al., 2007; Golshani et al., 2015. Para a determinação do polimorfismo SNP (polimorfismos de nucleotídeos únicos) do gene LTF rs 1126478 (140 A/G, 2 éxon Lys/Arg) serão usados os oligonucleotídeos iniciadores 5'-CTG GCC GTA GGA GAA GGA G-3' e 5'-C CGG AAT GGC CTG GAT ACA C-3', sendo o produto de PCR de 152 pares de bases digerido com a enzima Ear I. Os produtos de PCR serão analisados por eletroforese em gel de poli-acrilamida seguido de coloração pela prata.

Quanto a análise estatística

A distribuição de normalidade dos dados quantitativos será avaliada pelo teste de D'Agostino com correção de Pearson. Dados com distribuição paramétrica serão descritos em média e desvio-padrão e dados com distribuição não paramétrica serão descritos como medianas e quartis. A associação das variáveis de estudo será avaliada por meio de regressão logística multivariada, considerando $P < 0.05$.

Quanto ao orçamento

O projeto prevê um custo de R\$ 12.500,00 para aquisição de material de consumo que será financiado pelos membros da equipe.

Quanto ao cronograma

Adequado.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

A folha de rosto foi substituída e está preenchida e assinada adequadamente. Apresentou a carta de aceite da instituição co-participante devidamente assinado - Bebê-Clinica/Uel. Apresentou o Termo de Confidencialidade e Sigilo devidamente assinado O TCLE - redigido em forma de convite, com linguagem acessível obedecendo a resolução 466/2012.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Recomenda-se aprovação.

Considerações Finais a critério do CEP:

Endereço: LABESC - Sala 14

Bairro: Campus Universitário

UF: PR

Município: LONDRINA

Telefone: (43)3371-5455

CEP: 86.057-970

E-mail: cep268@uel.br



Conselho de Ética em
Pesquisa Envolvendo
Serres Humanos

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE
LONDRINA - UEL



Continuação do Parecer: 1.627.994

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_675537.pdf	26/06/2016 17:27:34		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Confidencialidade.pdf	26/06/2016 17:26:47	Paola Singi	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Material_biologico.pdf	26/06/2016 17:24:46	Paola Singi	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.docx	26/06/2016 17:21:07	Paola Singi	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_CEP.docx	26/06/2016 17:20:32	Paola Singi	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_Rosto2.pdf	26/06/2016 16:34:02	Paola Singi	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Declaracao.pdf	10/05/2016 09:22:26	Paola Singi	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

LONDRINA, 07 de Julho de 2016

Assinado por:
Alexandrina Aparecida Maciel Cardelli
(Coordenador)

Endereço: LABESC - Sala 14

Bairro: Campus Universitário

UF: PR

Município: LONDRINA

CEP: 86.057-970

Telefone: (43)3371-5455

E-mail: cep268@uel.br