

Biologia molecular na odontologia: métodos comumente utilizados na cariologia

Molecular biology in dentistry: methods commonly used in cariology

Natália Valarini¹, Renata Kirita Doi¹, Sandra Mara Maciel², Regina Célia Poli-Frederico³

1. Mestranda em Dentística pela Universidade Norte do Paraná, Londrina, PR, Brasil.

2. Professora Associada do Departamento de Odontologia da Universidade Estadual de Maringá e Professora Adjunta do Departamento de Odontologia da Universidade Norte do Paraná, Londrina, PR/Brasil

3. Professora Adjunta do Departamento de Odontologia da Universidade Norte do Paraná, Londrina, PR/Brasil.

DESCRIPTORES:

Biologia molecular; Cárie dentária; Prevenção.

RESUMO

Os avanços no conhecimento da biologia molecular e do genoma humano forneceram evidências de que a maioria das doenças humanas é influenciada por alterações em estruturas genéticas. Inúmeros estudos investigando a contribuição genética à cárie dentária são realizados. Novas técnicas e novos métodos de avaliações para as informações genéticas surgiram, criando novas terapias e tratamentos. O cirurgião-dentista deve estar preparado e informado sobre as novas possibilidades, para incorporá-las no cotidiano de sua clínica. O presente trabalho tem como objetivo atualizar o cirurgião-dentista, abordando conceitos e técnicas da biologia molecular na odontologia e na prevenção da cárie dentária.

Keywords:

Molecular biology; Dental caries; Prevention.

ABSTRACT

The advances in the knowledge of molecular biology and the human genome provide evidence that the majority of the human diseases are influenced by alterations in genetic structures. Several studies investigating the contribution of genetics in the dental caries are made. New techniques and methods of evaluation emerged, creating new therapies and treatments. The dentist clinician must be prepared and informed about the new possibilities, in order to incorporate it into the evolving discipline of dentistry. The present study aims to update the dentist clinician, approaching new concepts and techniques in molecular biology, in dentistry and in the prevention of dental caries.

Endereço para correspondência

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

INTRODUÇÃO

A cárie dentária é uma doença de caráter multifatorial e a interação de fatores do hospedeiro com microrganismos e dieta determinam sua manifestação. Apesar de muitos esforços, a cárie dentária ainda é uma das lesões bucais mais comuns e afeta, principalmente, jovens e crianças¹. Estabelecer a base genética para esta doença fornecerá subsídios para o desenvolvimento de novas estratégias de prevenção, diagnóstico, tratamento, avaliação de risco e compreensão de sua patogênese.

Em 2003, foi publicada a sequência do genoma humano, feito este que marcou uma nova era na ciência. Isso gerou novas informações que, combinadas com os avanços na biologia molecular e nas tecnologias de informática, culminou com o aparecimento de novas áreas de estudo, revolucionando abordagens terapêuticas na área odontológica.

Atualmente, na era pós-genômica, sabe-se que apenas a obtenção da sequência do DNA humano não fornece o conhecimen-

to completo para uma revolução na maneira de tratar e prevenir doenças. Os pesquisadores estão diante de novos desafios, como entender a função, interação (gene/gene; gene/ambiente), regulação do material genético e o papel destes fatores determinantes na doença e na saúde das pessoas. Além disso, a biologia molecular tem sido usada para identificar novas espécies bacterianas, auxiliando a definir seu papel na patogênese da cárie dentária².

Diante do intenso desenvolvimento da Biologia Molecular, o presente trabalho tem como objetivo apresentar ao cirurgião-dentista esta promissora ciência e, principalmente, mostrar a aplicação da tecnologia em genética molecular na prevenção da cárie dentária.

DESENVOLVIMENTO

DNA e Gene

O início da era da Genética se deu em 1865, quando o

monge Gregor Johann Mendel realizou experimentos de cruzamentos de ervilhas. Nascia, então, a Genética Clássica e os conceitos de gene, fenótipo, genótipo e transmissão de caracteres³.

Em 1953, o americano James Watson e o inglês Francis Crick, dois cientistas da Universidade de Cambridge na Inglaterra, revolucionaram mais uma vez a ciência, quando propuseram o modelo da estrutura helicoidal do DNA. Watson e Crick mostraram que a molécula de DNA era uma dupla hélice constituída de duas fitas pareadas, mantidas juntas por ligações químicas fracas, conhecidas como pontes de hidrogênio, cada uma com sua sequência de nucleotídeos - adenina, timina, citosina e guanina, que podem ser referidas como A,T,C e G - complementar a outra. Isto é, adenina parecia-se com timina e citosina, com guanina⁴. A aceitação do modelo de dupla hélice foi o ponto de partida para tentativas de esclarecer a genética em nível molecular⁵.

O nome DNA, ácido desoxirribonucleico, é dado pelo açúcar presente em sua molécula, a desoxirribose. O DNA é um polímero formado por monômeros chamados nucleotídeos. Estes, por sua vez, são compostos de um grupo fosfato, um açúcar e uma base nitrogenada. O gene é uma determinada sequência de nucleotídeos do DNA, que é responsável pela síntese de proteínas (enzimas). Nas células humanas, somente 1,5% do DNA codifica efetivamente proteínas⁶.

Expressão Gênica

O organismo humano é multicelular, diferentemente de bactérias que são organismos unicelulares. Enquanto uma bactéria deve produzir todas as proteínas necessárias para o seu funcionamento, o corpo humano possui diferenciação celular.

Isso exige controle a fim de definir quais genes serão ativados e as proteínas que serão produzidas em cada tecido, a cada etapa do desenvolvimento. O controle da expressão gênica é feito por sequências de DNA, que ativam o gene no momento em que este deve se expressar e na intensidade correta. A expressão gênica e seus estudos podem tentar explicar, por exemplo, por que uma célula em um determinado momento começa a se dividir descontroladamente e gerar um câncer.

Projeto Genoma Humano

O Projeto Genoma Humano (PGH) foi oficialmente iniciado em 1990, quando os Estados Unidos da América o lançaram como um programa com a finalidade de sequenciar o genoma humano. Com direção do NHI (National Institutes of Health) e do DOE (Departamento de Energia do Governo Americano), o projeto teve o envolvimento de 18 países, entre eles Inglaterra, Japão, Canadá, França, Brasil e Alemanha.

Em 2000, foi anunciada uma versão preliminar do genoma humano, com aproximadamente 90% de precisão. Em 2003, a versão final do genoma humano foi publicada.

O Brasil teve notável participação no estudo do genoma humano bem como de outras espécies. Em 1997, foi criada pela FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), a rede ONSA (Organization for Nucleotide Sequencing and Analysis), com a finalidade de capacitar laboratórios nacionais para a obtenção de independência tecnológica.

Genoma do *Streptococcus mutans*

Os avanços na genética bacteriana surgiram com a descoberta do código genético, seguida do desenvolvimento

da tecnologia do DNA recombinante. A sequência genômica é o modelo de todas as partes que funcionam na bactéria, e completar esta sequência é o primeiro passo para determinar como todas as partes funcionam e interação entre si⁷.

Décadas de estudos epidemiológicos, bioquímicos e animais implicaram que o *Streptococcus mutans* é o principal agente causador da cárie dentária. Apesar de aproximadamente trezentas espécies bacterianas terem sido associadas com a placa dentária, somente a presença do *S. mutans* tem sido ligada à formação dessa doença em humanos⁸.

O genoma do *Streptococcus mutans* foi sequenciado por pesquisadores da Universidade de Oklahoma e foi publicado no ano de 2002 em um trabalho intitulado "Genome sequence of *Streptococcus mutans* UA159, a cariogenic dental pathogen". Tal estudo forneceu bases para futuras estratégias de tratamentos para a cárie dentária⁹.

Suscetibilidade Genética à Cárie Dentária

Desde o início do século XX, pesquisadores já avaliavam a suscetibilidade genética à cárie dentária por meio de estudos com gêmeos monozigóticos e dizigóticos. Em 1927, um estudo com 301 pares de gêmeos, destes, 130 eram monozigóticos, e 171, dizigóticos. O estudo comparou a incidência de cárie em gêmeos monozigóticos e dizigóticos. Os resultados indicaram que gêmeos monozigóticos apresentavam incidência de cárie dentária similar do que gêmeos dizigóticos e que os dizigóticos de gêneros diferentes tinham variação maior¹⁰.

Dez anos depois, outro estudo foi realizado e mostrou que gêmeos idênticos tinham cárie em dentes correspondentes, entretanto uma análise estatística não foi completada. Tais estudos indicavam que a herança genética tinha participação na cárie dentária, mas as conclusões eram de que esta herança era apenas um fator contribuinte¹¹.

Com o passar do tempo, os estudos com gêmeos monozigóticos e dizigóticos evoluíram assim como as técnicas de avaliação. Quatro estudos detectaram um componente genético na suscetibilidade à cárie dentária e demonstraram que a cárie em gêmeos monozigóticos tinha uma concordância maior do que nos dizigóticos^{12,13,14,15}. Um forte componente genético na denteição primária que afetava a incidência de cárie também foi encontrado¹⁶. Tal associação não foi mais avaliada, e a morfologia e o tempo de erupção foram considerados fatores principais.

Conclusões similares foram verificadas em estudos e que havia influência genética na suscetibilidade à cárie nas denteições decídua e permanente¹⁷. O maior avanço no entendimento do papel da hereditariedade e a incidência da cárie dentária foi obtido com o estudo realizado intitulado "Minnesota Study of Twins Reared Apart"¹⁸. A maior vantagem do estudo foi a de que a maioria dos participantes tinha idade superior a quarenta anos e não vivia no mesmo ambiente logo após o nascimento até a data da análise. Foi sugerido que vários fatores genéticos podem estar envolvidos no processo da cárie dentária e na maior similaridade de cárie em gêmeos monozigóticos. Tais fatores são: salivares e da microbiota bucal, tempo e sequência de erupção dentária, morfologia dentária, forma do arco dentário, espaço dentário e propensão à dieta¹⁹.

Apesar de os estudos com gêmeos terem mostrado uma forte evidência da contribuição genética no risco à cárie dentária, nenhum demonstrou ligação com genes específicos.

Ínúmeros estudos são realizados, investigando, principalmente, a contribuição genética à cárie dentária por modificações no tecido dentário mineralizado^{20,21,22}, no metabolismo

do açúcar^{23,24,25}, nas funções das glândulas salivares²⁶ e resposta imune^{27,28,29,30,31,32,33,34,35,36}.

Técnicas em Biologia Molecular

Atualmente, existem muitos métodos para análise do DNA. Serão abordadas, em tópicos, as técnicas mais relevantes na área odontológica, com a finalidade de apresentar ao cirurgião-dentista as várias possibilidades existentes.

- Extração e purificação de ácidos nucleicos: os estudos genéticos necessitam de ácidos nucleicos íntegros e sem contaminantes que possam eventualmente prejudicar os testes moleculares. A extração de ácidos nucleicos pode ser realizada de várias maneiras, uma vez que muitos protocolos de extração foram descritos^{37,38,39,40,41,42,43,44}. O primeiro passo a ser realizado é a obtenção do material genético, que pode ser de células animais, células vegetais, de vírus ou bactérias. Após a coleta do material, as células precisam ser separadas. Se estas forem provenientes de meios de cultura, a separação pode ser realizada por meio de centrifugação. Quando as células são obtidas de um tecido, este deve ser homogeneizado. Depois de as células serem separadas, a etapa seguinte consiste na lise destes. O método desta ruptura celular varia de acordo com o tipo de célula, geralmente é realizado por meio de uma enzima, mas deve ser muito suave para evitar a quebra da molécula de DNA. Após a etapa de lise, é necessário que seja feita a precipitação alcoólica para isolamento do DNA. Atualmente, muitas empresas comercializam kits de extração de DNA de praticamente todo e qualquer tecido ou célula. A vantagem do uso dos kits é a rapidez com que estes DNAs podem ser obtidos e, além disso, diminuem a exposição do operador a reagentes químicos tóxicos. Em contrapartida, o custo destes kits é muito elevado.

- Eletroforese: é utilizada para visualizar fragmentos de DNA que são produzidos pela digestão com enzimas de restrição. Em uma matriz feita de agarose ou poliacrilamida, os DNAs, quando submetidos a um campo elétrico, em pH neutro, são atraídos para o polo positivo (ânodo) e repelidos do polo negativo (cátodo). Os fragmentos menores de DNA podem mover-se pela matriz com mais facilidade do que os maiores e, ao final, alcançarão distâncias maiores em relação à origem, quando comparados aos fragmentos maiores. A matriz de agarose possui tamanho de poros que separam fragmentos de 200pb a até 50kb, uma vez ajustada a concentração do gel. A poliacrilamida permite a separação de fragmentos menores de DNA até 1.100pb, ou até mesmo, distinguir fragmentos de DNA com diferenças de até um par de base. Após a separação em matriz de agarose, o DNA pode ser corado com brometo de etídio e ser visualizado sob luz ultravioleta (UV). As moléculas do brometo de etídio se intercalam entre os nucleotídeos na dupla hélice do DNA, o que permite a visualização dos fragmentos de DNA na matriz. Além do DNA a ser analisado, também é colocado um marcador de peso molecular que servirá como ponto de referência, pois forma fragmentos em pontos específicos e de tamanho diferentes. Normalmente o marcador usado é o DNA do fago lambda, digerido com uma enzima de restrição HindIII.

- Reação em Cadeia da Polimerase (Polymerase Chain Reaction - PCR): é a amplificação enzimática de uma sequência específica de DNA, com a finalidade de se obterem milhões de cópias desta. Descrita no final dos anos 80, essa técnica revolucionou a genética molecular. A reação em cadeia da polimerase (PCR) explora a capacidade de replicação do DNA. Em prática, num tubo de ensaio são adicionados: uma pequena quantidade de DNA genômico, quatro nucleotídeos (dATP, dCTP, dTTP e dGTP), a enzima Taq DNA polimerase, oligonucle-

otídeos, que atuam como primers (iniciadores) e uma solução tampão para fornecer quantidades ideais de pH e salinidade. Após essa etapa, o tubo de ensaio é colocado num aparelho chamado termociclador, onde passa por três passos: desnaturação, pareamento dos primers e síntese. No primeiro passo, o tubo é submetido a uma alta temperatura, normalmente 94°C por 5 minutos, para que haja ruptura das pontes de hidrogênio e separação das fitas de DNA. No segundo passo, a temperatura diminui para 30-65°C por 30 segundos, para que os primers se anelem às sequências complementares no DNA. A última etapa consiste em temperatura em torno de 72°C, durante 2 a 5 minutos, a fim de a Taq DNA polimerase atuar, executando a síntese da nova cadeia. Repetindo-se os passos por cerca de 25 a 30 ciclos, milhões de cópias do DNA serão produzidas. A PCR é um método muito utilizado na identificação de patógenos associados à cárie, placa bacteriana e doença periodontal.

- PCR em Tempo Real (Real-time PCR): trata-se de uma variação da PCR. A técnica utiliza um sistema fluorescente em plataforma capaz de detectar a luz oriunda da reação de amplificação. São utilizadas sondas específicas para a sequência do gene que se deseja avaliar. São conhecidas como TaqMan® e apresentam um fluoróforo capaz de absorver a energia luminosa emitida pelo aparelho e dissipá-la na forma de luz e calor, em comprimento de onda diferente do original. A fluorescência produzida pela amostra é detectada pelo sistema. Outra forma de acompanhar a PCR em tempo real é pela adição de um corante SYBR Green, que fluoresce somente quando é ligado à fita dupla de DNA. À medida que a reação ocorre, aumentam os fragmentos em cadeia dupla produzidos pela PCR, aumentando, dessa forma, a fluorescência. O corante SYBR Green apresenta vantagens como ser fácil de usar, sensível e barato. Entretanto, este produto liga-se a qualquer DNA de fita dupla, incluindo produtos não específicos da reação, o que resulta em uma superestimação da fluorescência. Em contrapartida, o sistema TaqMan® apresenta alta especificidade, mas tem um custo mais elevado.

Uma das vantagens da PCR em tempo real é que o método é mais automático e rápido que o da PCR convencional, pois dispensa a análise na eletroforese em gel de agarose. Além disso, a PCR em tempo real facilita a quantificação da expressão gênica em determinada amostra biológica.

- Polimorfismos de tamanhos de fragmentos de restrição (RFLP): o RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) é um método utilizado na detecção de mutações e polimorfismos genéticos por meio de enzimas. Com o advento da PCR e do conhecimento e da disponibilidade das sequências de DNA em bancos genômicos, o método passou a ser utilizado no formato PCR-RFLP, que permite analisar fragmentos de tamanhos menores⁴⁵.

- Amplificação Alelo Oligonucleotídeos-Específica (PCR-ASO): a PCR-ASO (Allele Specific Oligonucleotide Amplification) é uma adaptação da PCR e também é conhecida como ARMS (Amplification Refractory Mutation System)⁴⁶. É um sistema que permite análise direta de qualquer locus genético de interesse e pode ser aplicado para detecção de mutações genéticas de forma simples, rápida, confiável e de baixo custo.

- Reação em cadeia da polimerase utilizando primers arbitrários (Arbitrarily Primed PCR) -AP-PCR: A técnica de PCR, utilizando primers arbitrários (AP-PCR), consiste em uma variação da técnica de PCR. É caracterizada pela utilização de iniciadores de sequência arbitrária em ciclos de baixa estrinência, gerando um padrão de informações altamente ricas e reprodutíveis de fragmentos de DNA.

- Microarrays (microarranjos de DNA): nesta técnica, os fragmentos de genes são fixados em lâmina de vidro ou membranas de nylon, conhecido também como biochip ou chip biológico. Uma imagem da hibridização é gerada por meio

de leitores a laser ou leitores de fósforo. Tem como finalidade medir níveis de expressão de genes transcritos em larga escala, ou seja, esta técnica analisa o perfil do transcriptoma. Por causa da alta performance desta técnica, é possível avaliar a expressão diferencial de milhares de genes em somente um experimento.

- Checkerboard DNA-DNA hybridization: é uma técnica da biologia molecular, que verifica o grau de similaridade genética em sequências de DNA e é usado para verificar a distância genética de duas espécies bacterianas, por exemplo. É muito utilizado em estudos sobre patologias periodontais ou para verificação de bactérias do biofilme dental.

CONCLUSÃO

A cárie dentária continua sendo uma doença muito prevalente na população mundial, mas que pode ser prevenida ou controlada. Os avanços na biologia molecular e nas tecnologias geradas nos últimos anos permitiram que novas abordagens acerca desta e de outras doenças bucais fossem utilizadas.

Ainda que esta tecnologia seja cara e pouco acessível, é importante que o cirurgião-dentista esteja atualizado quanto às alternativas de métodos de diagnóstico existentes atualmente. Poder saber se o seu paciente tem uma predisposição genética a desenvolver cárie dentária, problemas periodontais ou reabsorções radiculares, a partir do DNA das células da mucosa epitelial da boca, é de grande valia no cotidiano do consultório.

Como dentistas, é possível notar que a minoria dos pacientes é livre da doença cárie. Quando examinados mais detalhadamente, fica evidente que estes têm os mesmos padrões e as mesmas práticas de higiene bucal que os pacientes com presença desta doença. Existem ainda pacientes que apresentam fortes fatores de risco para o desenvolvimento da doença periodontal, como o fumo, má higiene bucal, acúmulo de cálculo gengival e trauma oclusal, embora estejam livres desta doença. Fica claro que, nestes casos excepcionais, alguns elementos devem participar nessa resistência contra estas determinadas doenças.

Num futuro, talvez não tão distante, seja possível que nós, profissionais da odontologia, tenhamos contato com uma realidade completamente nova. Em algumas décadas, diferenças nos métodos e materiais utilizados nos tratamentos irão surgir. Dentistas serão capazes de aplicar técnicas de engenharia genética que estimulem a reparação do próprio corpo. Por exemplo, durante um tratamento endodôntico, os dentistas poderão aplicar células geneticamente desenvolvidas do tecido pulpar dentro do canal, a fim de que estas se multipliquem e deem origem a um novo tecido pulpar. Também será possível a existência de dentes de proveta, ou seja, dentes feitos em laboratório.

A obtenção desses conhecimentos irá propiciar a aplicação de terapias individualizadas que melhorarão, significativamente, a qualidade dos tratamentos e, conseqüentemente, a qualidade de vida das pessoas.

REFERÊNCIAS

1. Marshall T. Dental caries and beverage consumption in young children. *Pediatrics*, 2003; 112(3): 184-191.
2. Geurtsen W. Impact of molecular biology on restorative dentistry. *Pract Proced Aesthet Dent*, 2005; 17(4): 260.
3. Dolinsky LCB. As diversas aplicabilidades da genética no século XXI: uma nova era nas ciências biológicas - artigo de revisão. *Saúde e ambiente em revista*, 2007; 2(1): 21-25.

4. Borem A. A história da biotecnologia. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, 2005; 34:347.
5. Scheid NMJ, Delizoicov D, Ferrari N. A proposição do modelo de DNA: um exemplo de como a história da ciência pode contribuir para o ensino da genética. *CD-ROM Associação Brasileira de pesquisadores em educação em ciências*, 200; 1.
6. Farah SB. *DNA: Segredos e Mistérios*. 2ed. São Paulo: Sarvier, 2007. 538p.
7. Duncan MJ. Genomics of oral bacteria. *Crit Rev Oral Biol*, 2003; 14: 175.
8. Loesche WJ. Role of *Streptococcus mutans* in dental decay. *Microbiol Rev*, 1986; 50(4): 353-380.
9. Adjic D, McShan WN, McLaughlin RE, Savic G, Chang J, Carson MB, Primeaux C, Tian R, Kenton S, Jia H, Lin S, Oian Y, Li S, Zhu H, Najjar F, Lai H, White J, Roe BA, Ferretti JJ. Genome sequence of *Streptococcus mutans* UA159, a cariogenic dental pathogen. *Proc Nat Acad Sci USA*, 2002; 99(22): 14432-14439.
10. Bachrach F, Young M. A comparison of the degree of resemblance in dental characters shown in pairs of twins of identical and fraternal types. *Brit Dent J*, 1927; 48: 1293-1304.
11. Schuler CF. Inherited risks for susceptibility to dental caries. *J Dent Educ*, 2001; 65(10): 1038-1045.
12. Goldberg S. The dental arches of identical twins. *Dental Cosmos*, 1930; 72: 869-881.
13. Horowitz SO, DeGeorge FV. Caries experience in twins. *Science*, 1958; 300: 301.
14. Mansbridge J. Heredity and dental caries. *Quintessence Int*, 1959; 38: 337-347.
15. Finn SC. Dental caries in twins I: a comparison of caries experience of monozygotic twins, dizygotic twins and unrelated children. *Arch Oral Biol*, 1963; 8: 571-585.
16. Bordoni NDR, Manfredi C, Allegrotti I. Prevalence of dental caries in twins. *J Dent Children*, 1973; 40: 440-443.
17. Fairpo C. Total caries experience in monozygotic and like-sexed dizygotic twins of Caucasoid origin aged 5 to 15 years. *Arch Oral Biol*, 1979; 24: 491-494.
18. Boraas JC, Till MJ. A genetic contribution to dental caries, occlusion and morphology as demonstrated by twins reared apart. *J Dent Res*, 1988; 67: 1150-1155.
19. Conry JP, Borass JC, Aeppli DP, Bouchard TJ. Dental caries and treatment characteristics in human twins reared apart. *Arch Oral Biol*, 1993; 38: 937-948.
20. Wright JT, Fine JD et al. Oral involvement of recessive dystrophic epidermolysis bullosa inversa. *Am J Med Genet*, 1993; 47(8): 1184-1188.
21. Wright JT, Fine JD et al. Dental caries risk in hereditary epidermolysis bullosa. *Pediatr Dent*, 1994; 16(6): 262-265.
22. Kirkham JC, Robinson C et al. The chemical composition of tooth enamel in recessive dystrophic epidermolysis bullosa: significance with respect to dental caries. *J Dent Res*, 1996; 75(9): 1672-1678.
23. Zengo AN, Mandel IE. Sucrose tasting and dental caries in man. *Arch Oral Biol*, 1972; 17(3): 605-607.
24. Newbrun E, Hoover C et al. Comparison of dietary habits and dental health of subjects with hereditary fructose intolerance and control subjects. *J Am Dent Assoc*, 1980; 101(4): 619-626.
25. Saxen L, Jousimies-Somer H et al. Subgingival microflora, dental and periodontal conditions in patients with hereditary fructose intolerance. *Scand J Dent Res*, 1989; 97(2): 150-158.
26. Leone CW, Oppenheim FG. Physical and chemical aspects of saliva as indicators of risk for dental caries in humans. *J Dent Educ*, 2001; 65(10): 1054-1062.
27. Lehner T, Lamb RJ et al. Association between HLA-DR antigens and helper cell activity in the control of dental caries. *Nature*, 1981; 292(5825): 770-772.
28. De Vries RR, Zeylemaker P et al. Lack of association between HLA-DR antigens and dental caries. *Tissue Antigens*,

- 1985;25(3): 173-174.
29. Aine L, Maki M et al. Dental enamel defects in celiac disease. *J Oral Pathol Med*, 1990;19(6): 241-245.
30. Mariani P, Mazzilli MC et al. Coeliac disease, enamel defects and HLA typing. *Acta Pediatrics*, 1994;83(12):1272-1275.
31. Aine L. Coeliac-type permanent tooth enamel defects. *Ann Med*, 1996;28(1):9-12.
32. Madigan A, Murray PA et al. Caries experience and cariogenic markers in HIV positive children and their siblings. *Pediatr Dent*, 1996;18(2):129-136.
33. Aguirre JM, Rodriguez R et al. Dental enamel defects in celiac patients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 1997;84(6): 646-650.
34. Senpuku H, Yanagi K et al. Identification of Streptococcus mutans Pac peptide motif bonding with human MHC class II molecules (DRB1*0802,*1101,*1401 and *1405). *Immunology*, 1998;95(3):322-330.
35. Suzuki N, Kurihara Y et al. Dental caries susceptibility in mice is closely linked to H-2 region on chromosome 17. *Caries Res*, 1998;32(4):262-265.
36. Acton RT, Dasanayake AP et al. Association of MHC genes with levels of caries-inducing organisms and caries severity in African-American women. *Hum Immunol*, 1999;60(10):984-989.
37. Löffler J, Hebart H, Schumacher U, Reitze H, Einsele H. Comparison of different methods for extraction of DNA of fungal pathogens from culture and blood. *J Clin Microbiol*, 1997;35(12):3311-3312.
38. Kalmar T, Bachrati CZ, Marcsik A, Raskó I. A simple and efficient method for PCR amplifiable DNA extraction from ancient bones. *Nucleic Acid Res*, 2000;28(12):1038-1045.
39. Malago W, Franco HM, Matheucci E, Medaglia A, Henrique-Silva F. Large scale sex typing of ostriches using DNA extracted from feathers. *BMC Biotechnol*, 2002;12(19):869-881.
40. Schneegurt MA, Dore SY, Kulpa CF. Direct extraction of DNA from soils for studies in microbiol ecology. *Curr Issues Mol Biol*, 2003;5(1):1-8.
41. Coura C, Prolla JC, Meurer L, Ashton-Prolla P. An alternative protocol for DNA extraction from formalin fixed and paraffin wax embedded tissue. *J Clin Pathol*, 2005;58(8):894-895.
42. Amorim MR, Vargas FR, Llerena JC, Pombo-de-Oliveira MS. DNA extraction from fixed cytogenetic cells suspension. *Genet Mol Res*, 2007;6(3):1226-1232.
43. Amorim JH, Macena TN, Lacerda GV, Rezende RP, Dias JC, Brendel M, Cascardo JC. An improved extraction protocol for metagenomic DNA from a soil of the Brazilian Atlantic Rainforest. *Gen Mol Res*, 2008;7(4):440-443.
44. Maciel BM, Santos AC, Dias JC, Vidal RO, Dias RJ, Gross E, Cascardo JC, Rezende RP. Simple DNA extraction protocol for a 16S rDNA study of bacterial diversity in tropical landform soil used in bioremediation of oil waste. *Gen Mol Res*, 2009;8(1):375-388.
45. Hirata MH, Tavares V, Hirata RDC. Da biologia molecular à medicina: métodos comumente utilizados em farmacogenética. *Medicina*, 2006;39(4):522-534.
46. Newton CR, Graham A, Heptinstall LE, Powell SJ, Summers C, Kalsheker N, Smith JC, Markham AF. Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acid Res*, 1989;17(7):2503-2516.