

CONHECIMENTO ATUAL DA DOENÇA CÁRIE E A RELAÇÃO DO *Streptococcus mutans* NA MICROBIOTA SALIVAR (PCR): UMA REVISÃO DE LITERATURA.

CURRENT KNOWLEDGE OF CARIES DISEASE AND THE RELATIONSHIP OF *Streptococcus mutans* IN SALIVAR MICROBIOTA (PCR): A LITERATURE REVIEW.

Luísa Schubach da Costa Barreto

Graduada em Odontologia pela Universidade Federal Fluminense (UFF)

Pós Graduada em Odontopediatria pela Universidade Federal Fluminense (UFF)

Mestranda em Ortodontia na Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)

Mônica Pestana Gomes

Graduada em Odontologia pela Universidade Federal Fluminense (UFF)

Especialista em Odontopediatria pela FUNBEO (Bauru – USP)

Mestre em Odontopediatria pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)

Doutoranda no Curso de Pós Graduação em Ciências e Biotecnologia da Universidade Federal Fluminense (UFF)

Profª. Adjunto da Disciplina de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia da UFF

Instituição de ensino onde o trabalho foi realizado: Pós Graduação em Odontopediatria da Universidade Federal Fluminense (UFF). Rua Mário Santos Braga, 28 - Centro, Niterói - RJ, CEP: 24020-140.

Seção: Odontopediatria; Revisão de Literatura.

Endereço para Correspondência:

Luísa Schubach da Costa Barreto

Rua Alfredo Ceschiatti, 55 – bloco 2/apt204 – Barra da Tijuca – Rio de Janeiro, RJ

CEP. 22.775-045

Tel. (021) 3348-7867 / (021) 994885574

E-mail: luisaschubach@gmail.com

Palavras-chave: Doença Cárie – *Streptococcus mutans* - Saliva – PCR

Keywords: Dental Caries – *Streptococcus mutans* - Saliva – PCR

INTRODUÇÃO

A etiologia da cárie dentária se encontra multifatorial, sabe-se que é causada por produtos ácidos gerados por bactérias na placa dental, formada nas superfícies do esmalte dentário. Das várias bactérias encontradas na placa, o *Streptococcus mutans* é reconhecido como o patógeno primário devido as suas habilidades em formar um biofilme rígido em superfícies dentárias rugosas e liberar ácido em condições de baixo ph bucal. (LOESCHE, 1986). No entanto, recentes estudos demonstraram que a sua presença não é fator necessário para que ocorra a evolução severa da doença cárie e que outras bactérias estariam presentes na progressão da lesão, como lactobacilos (LOZUPONE, 2013 e KNIGHT, 2009).

Os micróbios orais colonizam a cavidade oral de um bebê logo após o nascimento. Seu número aumenta gradualmente, devido à exposição das fontes microbianas externas. (PASTER, 2006). Com a erupção dos dentes decíduos, o número e a complexidade da microflora no ambiente oral aumentam progressivamente. (EDELSTEIN, 2006).

Métodos moleculares permitem determinar diferenças intraespécies com maior reprodutibilidade do que as fenotípicas. Como a saliva está continuamente em contato com todos os dentes, proporciona um melhor reflexo da colonização de *Streptococcus mutans*. A metodologia molecular à base de reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma ferramenta útil em epidemiologia molecular para estudos de cárie dentária e é eficaz na detecção e identificação de *Streptococcus mutans* em saliva de crianças (AAS, 2008), gera uma informação detalhada da composição da flora bucal o que favorece o acesso do risco individual do paciente e a severidade de cáries dentárias. (ROETERS, 1995).

O conceito e o entendimento da etiologia e da patogênese da cárie dentária desenvolveram-se durante o século passado e ainda predominam em dúvida, indicando a necessidade de reconsiderações (FEJERSKOV, 1997). O presente trabalho tem como objetivo avaliar o conhecimento atual da doença cárie, a transmissibilidade vertical de mãe para filho que estaria presente ou não na evolução da doença, a presença de microrganismos como fator causal das lesões cariosas especialmente o *Streptococcus mutans*, a utilização de métodos moleculares como reação em cadeia da polimerase (PCR) para avaliar a presença de bactérias na amostra salivar e o uso de fluoretos como método preventivo da doença cárie.

REVISÃO DE LITERATURA

A revisão de literatura utilizou como metodologia uma busca nos bancos de dados PubMed e Scielo com os termos “dental caries”, “*Streptococcus mutans*”, “saliva” e “PCR” para selecionar os artigos de interesse. Do total de 74 artigos encontrados, foram revisados 30 entre os anos de 1960 a 2017 para chegar às devidas conclusões da revisão.

As hipóteses levantadas envolvem os questionamentos acerca do conhecimento atual da doença cárie, a transmissibilidade vertical de mãe para filho que estaria presente ou não na evolução da doença, a presença de microrganismos como fator causal das lesões cáries especialmente o *Streptococcus mutans*, a utilização de métodos moleculares como reação em cadeia da polimerase (PCR) para avaliar a presença de bactérias na amostra salivar e o uso de fluoretos como método preventivo da doença cárie.

2.1 Conhecimento Atual da Doença Cárie

Apesar dos avanços em Odontologia preventiva, a cárie dentária ainda permanece como um problema de saúde pública em diversos países (SINGLA, 2016). É importante considerar a grande quantidade de microrganismos na saliva e na placa dentária durante o período de dentição decídua e mista para prevenir e também prever a susceptibilidade do indivíduo à cárie.

A doença cárie é um problema social, político, comportamental, médico e odontológico que só pode ser controlado com a compreensão da estrutura familiar, alimentação e nível socioeconômico da população (ISMAIL, 1998). Entretanto, os microrganismos atuantes no processo cariioso necessitam de um ambiente propício para sua instalação e multiplicação, proporcionados pelos hábitos de consumo frequente de açúcar e negligência de limpeza bucal. Desta maneira, torna-se importante enfatizar a prevenção da doença com mudanças de hábitos e atitudes.

Grytten et al (1988) demonstraram que os hábitos bucais da criança estão relacionados com os da mãe. Em consequência disto, os pais são responsáveis pela transmissão dos comportamentos favoráveis e desfavoráveis a seus filhos. Este também enfatizou que, quando se estabelece uma rotina de saúde bucal positiva, a educação em saúde se dá como um reforço natural. Estabelece-se,

portanto, o conceito de que uma rotina de saúde bucal positiva influenciada pelos responsáveis bem informados gera uma educação em saúde bucal por parte dos filhos.

A cárie é caracterizada, atualmente, por ser uma doença açúcar biofilme dependente dentre as mais frequentes no mundo e afeta as pessoas durante toda sua vida, tanto na infância ou adolescência. (SHEIHAM, 2015). A única causa para ocorrer doença cárie é a ingestão de açúcares e deve ser enfatizado o controle da dieta cariogênica em estratégias de prevenção.

2.2 Transmissibilidade Vertical de Mãe para Filho (a)

Durante décadas, as espécies acidogênicas de fermentação do *Streptococcus mutans* foram consideradas o principal agente causador da cárie dentária e a maioria das estratégias diagnósticas e terapêuticas tem sido direcionada para este microrganismo. No entanto, estudos recentes de Khodayar-Pardo et al, 2014 baseados em DNA e RNA de lesões cariosas, descobriram um ecossistema extraordinariamente diverso, onde *S. mutans* conta apenas como uma pequena fração da comunidade bacteriana. Isso apoia o conceito de que os consórcios formados por microrganismos múltiplos agem coletivamente, provavelmente sinergicamente, para iniciar e expandir a cavidade.

Assim, não se espera que as terapias antimicrobianas sejam efetivas no tratamento de cáries e outras doenças polimicrobianas que não acompanham os postulados clássicos de Koch (1987) para determinação de uma doença como transmissível. E a doença cárie, portanto, não atende os critérios de uma doença transmissível.

Thorild et al, 2002 estabeleceram a prevalência e a possível relação da colonização bucal por *Streptococcus* do grupo *mutans* em pares mãe-filho (crianças com 18 meses a 3 anos de idade), sustentando o conceito de transmissão vertical. Bonecker et al, 2014 concluíram ainda que, a mãe pode ser considerada a principal fonte de transmissão de *Streptococcus mutans* para o bebê, e, portanto, entende-se ser de suma importância a inclusão dessa informação na orientação das mães para a manutenção da saúde bucal de seus filhos.

No entanto, em estudos *in vivo* de Dyvia Singla et al, em 2016 concluíram que *Streptococcus sobrinus* tem papel ativo maior na patogenia da doença cárie quando comparado com *Streptococcus mutans*, dando uma elevada importância à detecção de espécies individuais quando associar susceptibilidade a cárie dentária em crianças.

Além disso, acredita-se que modelos de interação entre os genes aumentariam os riscos à doença cárie como genes da formação do esmalte dentário, da proteína salivar, da resposta imunológica e dieta cariogênica. (TORAMAN, 2016). Logo, não só a espécie do *Streptococcus mutans*, mas outros genes em interação teriam que estar presentes para ocorrer a doença cárie.

2.3 Presença de microrganismos (*Streptococcus mutans*)

Além disso, *Streptococcus mutans* vem sendo estudado e apresentado em conclusões de artigos como Murase et al, 2004 e Simon et al, 2014 de que tem altos níveis de concentração dessa bactéria em pacientes com baixa atividade de cárie. Isso pode ser explicado pela presença de diferentes espécies de microrganismos que exibem virulência variável e propriedades de aderência diferenciadas. Isso porque infecções bacterianas envolvem doenças periodontais e lesões cariosas em que bactérias como *S. mutans* e *S. sobrinus* são tanto periodontopatógenas como cariogênicas (ZHENG, 2015). Esses microrganismos se agregam e coexistem na placa dentária. O *Streptococcus mutans*, portanto, não é fator exclusivo para progressão da doença cárie.

2.4 Métodos de Análise Molecular (PCR)

O mais frequente método utilizado na literatura para estudar o *S. mutans* em pesquisas epidemiológicas em comunidades de alto risco é a técnica molecular da reação em cadeia da polimerase, a chamada análise em PCR (MOMENI, 2015). A análise molecular é uma ferramenta importante para a avaliação dos microrganismos orais já que investiga sua diversidade microbiológica e rota de transmissão, onde a bactéria se encontra. Além disso, independe de cultivos pois consiste na amplificação *in vitro* do DNA. (BURTSCHER e WUERTZ, 2003).

A ideia básica da reação em cadeia da polimerase foi formulada por Kary Mullis em 1983 e o primeiro procedimento de uso foi publicado em 1985. A grande descoberta que levou a consolidação da técnica de PCR foi a adoção da enzima *Taq* DNA polimerase, uma enzima termoestável capaz de tolerar temperaturas elevadas por um determinado período de tempo (TYLER, 1997). Isto permitiu que a reação da PCR ocorresse com múltiplos ciclos de síntese de DNA sem precisar da intervenção de um operador. Outra grande vantagem foi em relação às mudanças bruscas de temperatura, as quais passaram a ser feitas por um termociclador automático.

A reação em cadeia da polimerase promove o aumento do número de cópias de um fragmento de DNA específico. A região do DNA a ser amplificada é determinada pelo par de primers ou iniciadores, que são pequenas sequências de DNA, construídas artificialmente, complementares e

específicas a duas regiões distintas no DNA microbiano de interesse. Ou seja, são segmentos de DNA que pareiam suas bases com a fita molde funcionando como um “iniciador” para as cópias de DNA a serem formadas, uma vez que eles se hibridizam a fita molde. Os primers variam desde universais a grupo-específicos, como por exemplo, os primers para *Escherichia coli*, L-uid739 e R-uid1578 (MOMENI, 2015).

Cada ciclo de replicação *in vitro* de DNA envolve três etapas básicas: desnaturação, anelamento e extensão. Na desnaturação, normalmente a 94°C ocorre a separação da dupla fita de DNA para exposição dos sítios-alvo. Na segunda etapa, com a diminuição da temperatura, que pode ser, por exemplo, a 55°C ocorre o anelamento dos primers em regiões específicas de cada fita de DNA separada, que serve como molde, delimitando, assim, a região inicial e a região final da sequência genética a ser amplificada. Finalmente, na etapa de extensão, ocorre a síntese de DNA complementar à fita-molde e geralmente é feita em uma temperatura em torno de 72°C. Em 25 a 40 ciclos, é possível produzir em poucas horas milhões de cópias específicas de DNA, até mesmo quando a amostra de partida contém apenas uma única sequência alvo original (WALKER, 2001).

Devido à rapidez, especificidade e baixo custo, a análise em PCR, portanto, tem se tornado uma das técnicas mais usadas para a detecção de microrganismos patogênicos em amostras ambientais. (MOHN, 1995). No entanto, algumas vezes, o PCR pode apresentar alguns problemas, como a inibição da amplificação do fragmento de DNA de interesse ou amplificação de fragmentos incorretos. Existe ainda um limite de detecção do método da PCR que nos permite inferir que um microrganismo, às vezes, não está ausente na amostra analisada e sim, abaixo do limite de detecção do método (WANG, 1997).

Nos estudos de Damle et al, 2016, teve como objetivo avaliar as relações dos níveis salivares quantitativos de amostras contendo *Streptococcus mutans* em crianças de 3 a 6 anos e de 12 a 15 anos, apresentando padrões variáveis de atividade da cárie e assim, comparar a associação de *Streptococcus mutans* na saliva utilizando ensaios microbianos e moleculares (reação em cadeia de polimerase: PCR), concluiu-se que a contagem média de colônias de bactérias aumentou com o aumento da idade e também foi maior em crianças com atividade de cárie dentária. Com base nas matrizes geradas pela análise de PCR utilizando o coeficiente de desajuste em cadeia, a grande variedade de diversidade genética foi observada em casos de crianças com e sem atividade cariiosa

cl clinicamente detectável. Assim, evidencia o fato de que a presença desses microrganismos (*S.mutans*) estaria na saliva de crianças mesmo sem a ocorrência da doença cárie.

2.5 Uso de Fluoretos como Estratégia de Prevenção

Durante muitos anos, desde que se descobriu o efeito preventivo do flúor, acreditou-se que sua eficácia preventiva decorria da capacidade que o íon teria de formar fluorapatita ao invés de hidroxiapatita, no processo de formação dos prismas do esmalte dentário (CHAVES, 1977). O mecanismo pelo qual o flúor confere maior resistência ao esmalte dentário ocorre na superfície dessa estrutura, ao longo de toda a vida, através de sucessivos episódios de desmineralização e remineralização superficial, desencadeados pela queda de pH decorrentes da produção de ácidos a partir de carboidratos.

Além disso, o flúor ingerido retorna à cavidade bucal pela secreção salivar tendo aumento transitório da concentração do íon flúor quando ingerimos água fluoretada ou alimentos preparados com água fluoretada (CASCAES, 2012). Assim, os indivíduos que bebem regularmente água fluoretada apresentam uma concentração do íon flúor na saliva ligeiramente elevada em relação àqueles que não a consomem, o que confere eficácia a fluoretação das águas (Guia de Recomendações para o uso de fluoretos no Brasil, 2009).

De acordo com Cury e Tenuta, 2005, a ação do íon flúor é sempre a mesma, independente do meio de utilização. A presença contínua, ao longo de toda a vida do indivíduo, de pequenas quantidades de flúor no meio bucal é, portanto, indispensável para que o efeito preventivo se manifeste, com a formação de fluoreto de cálcio na etapa de remineralização (CURY, 1992). Admite-se que essa nova superfície, contendo flúor, é muito menos solúvel em ácidos do que a superfície de esmalte original (FEATHERSTONE, 1999). Para Shellis & Duckworth (1994), o flúor disponível topicamente é absorvido pelo microrganismo e, no seu interior, interfere na atividade enzimática e no controle do pH intracelular, reduzindo a produção de ácidos.

O biofilme acumulado sobre os dentes sendo exposto frequentemente à ingestão de açúcares, mesmo na presença do íon flúor, produzirá ácidos e o mineral do dente terá a tendência de se dissolver. Ocorre a evolução do processo cariioso por acelerar o processo de desmineralização do esmalte. (TENUTA, 2005). Dessa forma, é extremamente importante associar uma boa higiene oral com a redução do consumo de açúcar para prevenção e controle da doença cárie.

Em relação ao biofilme, avanços têm mostrado métodos eficazes de controle químico e mecânico de placa dentária, além de estudos no campo da engenharia genética a fim de eliminar componentes que conferem virulência às bactérias cariogênicas. Porém, o controle de placa é indispensável na elaboração de qualquer estratégia de prevenção, sendo a escovação e o fio dental as medidas eficazes bastante simples e amplamente utilizadas que, se tratando de crianças, a eficácia é diminuída devido às limitações psicomotoras próprias da idade, que dificultam o aprendizado e a realização adequada das mesmas (ALVES, 2009). Considerando-se essa limitação temporária das crianças, faz-se necessário identificar outros métodos de controle da cárie dentária, entre eles, o controle da dieta e o uso de fluoretos, uso este, portanto, indispensável, para a prevenção da doença cárie.

CONCLUSÕES

De acordo com o conhecimento atual da doença cárie, esta não atende os critérios de uma doença transmissível, torna-se fato afirmar, portanto, que transmissíveis são os hábitos e valores de saúde bucal, que representam fatores importantes para o estabelecimento e severidade da lesão cariiosa.

A exposição frequente a açúcares da dieta é o fator determinante negativo para o desenvolvimento da doença como comprovado ao revisar a etiologia da doença cárie.

Em relação às estratégias de prevenção contra a doença cárie, é necessário realizar a escovação e uso do fio dental diariamente, é desejável o controle da ingestão de açúcares na dieta e torna-se imprescindível a utilização de fluoretos. Sendo o fluoreto o fator determinante positivo para tentar contrabalancear o desequilíbrio do processo des-remineralização.

Assim, o equilíbrio entre saúde dental e a manifestação da doença cárie (uma doença biofilme-açúcar dependente) depende não só dos dentes serem escovados com dentifício fluoretado, mas principalmente de que a exposição à açúcares da dieta seja restrita ao possível.

Faltam estudos com análise microbiológica e molecular como reação em cadeia da polimerase (PCR) para determinar se as principais bactérias envolvidas no processo da doença cárie seriam

realmente fatores etiológicos imprescindíveis e critérios importantes em programas de prevenção já que foi demonstrado que o *Streptococcus mutans* não é fator exclusivo para progressão da doença cárie. Tendo a necessidade de especificar individualmente as espécies e quais interações de genes estariam presentes na doença cárie.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AAS, AJ; GRIFFEN, AL; DARDIS, ST et al. Bacteria of Dental Caries in Primary and Permanent Teeth in Children and Young Adults. **J Clin Microbiol**; April, v. 46, n. 4, p. 1407-1417; 2008.

ALVES, C; LIMA, RV. Dietary supplement use by adolescents. **J Pediatr**; v. 85, n. 4, p. 287-294; 2009.

BONECKER, SLC. Horizontal and vertical distribution of mesozooplankton species richness and composition down to 2,300 m in the southwest. **Atlantic Ocean Zoologia**. Oct. v. 31, n. 5, p. 445-462, 2014.

BURTSCHER, C and WUERTZ, S. Evaluation of the Use of PCR and Reverse Transcriptase PCR for Detection of Pathogenic Bacteria in Biosolids from Anaerobic Digestors and Aerobic Composters. **Appl Environ Microbiol**. Aug, v. 69, n. 8, p. 4618-4627, 2003.

CASCAES, AM et al. Conhecimento sobre uso de fluoretos em saúde bucal coletiva entre coordenadores municipais de saúde bucal do Estado de Santa Catarina. **Brasil Epidemiol Serv Saúde Brasília**, Mar, v. 21, n. 1, p. 89-98, 2012.

CHAVES, MM. Odontologia social. **Ed. Labor**, Rio de Janeiro. 1977

CURY, JA. Flúor: dos 8 aos 80?, **In Bottino** p. 375-82; 1992.

DAMLE, SG; LOOMBA, A; DHINDSA, A et al. Correlation between dental caries experience and mutans streptococci counts by microbial and molecular (polymerase chain reaction) assay using saliva as microbial risk indicator. **Dent Res J**, Nov-Dec; v. 13, n. 6, p. 552-559; 2016.

EDELSTEIN, B et al. Experience and policy implications of children presenting with dental emergencies to US pediatric dentistry training programs. **Pediat Dent**, Sep v. 28, n. 5, p. 431-7; 2006.

FEATHERSTONE, JD. Prevention and reversal of dental caries: role of low level fluoride. **Community Dent Oral Epidemiol**. Feb, v. 27, n. 1, p. 31-40; 1999.

FEJERSKOV, O. Concepts of dental caries and their consequences for understanding the disease. **Community Dent Oral Epidemiol**. Feb; v. 25, n. 1, p. 5-12; 1997.

GRYTEN, J; ROSSOW, I; HOLST, D et al. Longitudinal study of dental health behaviors and other caries predictors in early childhood. **Community Dent Oral Epidemiol**. Dec; v. 16, n. 6, p. 356-9; 1988.

ISMAIL, AI. Prevention of early childhood caries. **Community Dentistry and Oral Epidemiology**. Oct; v. 26, issue. S1, p. 49-61; 1998.

KHODAYAR-PARDO, P; MIRA, PL; COLLADO, MC et al. Impact of lactation stage, gestational age and mode of delivery on breast milk microbiota. **J Perinatol**. Aug, v. 34, n. 8, p. 599-605; 2014.

KNIGHT GM et al. Inability to form a biofilm of Streptococcus mutans on silver fluoride and potassium iodide-treated desmineralized dentin. **Quintessence Int**, Feb, v. 40, n. 2, p. 155-61; 2009.

LOESCHE, WJ. Role of Streptococcus mutans in human dental decay. **Microbiol Rev**. Dec, v. 50, n. 4, p. 353-380; 1986.

LOZUPONE, CA; STOMBAUGH, J; GONZALEZ, A et al. Meta-analyses of studies of the human microbiota. **Genome Research**. v. 23, n. 10, p. 1704-1714; 2013.

MOHN, WW Bacteria obtained from a sequencing batch reactor that are capable of growth on dehydroabietic acid. **Appl Environ Microbiol.** Jun; v. 61, n. 6, p. 2145-50; 1995.

MOMENI, SS; WHIDDON, J; CHEON, K et al. Assessment of two multilocus sequence typing (MLST) schemes available for *Streptococcus mutans*. **Arch Oral Biol.** Dec, v. 60, n. 12, p. 1769–1776.; 2015.

MURASE, K; FUJIWARA, T; UMEMURA, Y, et al. Ultrafine Membrane Compartments for Molecular Diffusion as Revealed by Single Molecule Techniques. **Biophysical Journal**; v86, n6 ,p4075-4093; 2004.

ROETERS, J; BURGERSDIJK, R; TRUIN, GJ et al. Dental Caries and its determinants in 2-to-5-year-old children. **Journal of Dentistry for Children** Nov-Dec, p401; 1995.

SHEIHAM, A; JAMES, WPT. Diet and Dental Caries: The pivotal role of free sugars reemphasized. **Journal of Dental Research.** Aug p10, 2015.

SHELLIS, RP & DUCKWORTH, RM. Studies on the cariostatic mechanisms of fluoride. **International Dental Journal**; v44, n3 suppl. 1)p263-273; 1994.

SIMON, S, MIRA, A. Solving the etiology of dental caries. **Trends Microbiol.** Feb;23(2):76-82; 2015.

SINGLA, D; SHARMA, A; SACHDEV, V; CHOPRA, R. Distribution of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in Dental Plaque of Indian Pre-School Children Using PCR and SB-20M Agar Medium. **J Clin Diagn Res.** Nov; 10(11): ZC60–ZC63. 2016

TENUTA, LMA; CURY JA. Fluoreto: da ciência à prática clínica. In: Assed S. (Org.). Bases científicas para a prática clínica. **São Paulo: Artes Médicas**, cap4, p113-152; 2005.

THORILD, I; LINDAU-JONSON, B; TWETMAN, S. Prevalence of salivary *Streptococcus mutans* in mothers and in their preschool children. **Int J Paediatr Dent.** Jan; v12, n1, p2-7; 2002.

TORAMAN, HE; VANHOLME, R; BOREN, E et al. Potential of genetically engineered hybrid poplar for pyrolytic production of bio-based phenolic compounds. **Bioresour Technol.** May; p207-229; 2016.

TYLER, KD; WANG, G; TYLER, SD; JOHNSON,, WM. Factors affecting reliability and reproducibility of amplification-based DNA fingerprinting of representative bacterial pathogens. **J Clin Microbiol.** Feb; v. 35, n. 2, p. 339–346; 1997.

WALKER, JR; CORPINA, RA; GOLDBERG, J. Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair. **Nature.** Aug v. 9, n. 412, p. 607-14; 2001.

WANG, RF; CAO, WW; CERNIGLIA, CE. PCR detection of *Ruminococcus* spp. in human and animal faecal samples. **Nature.** Aug, v. 11, n. 4, p. 259-265; 1997.

ZHENG, X et al. Combinatorial Effects of Arginine and Fluoride on Oral Bacteria. **J Dent Res**, Feb; v. 94, n. 2, p. 344-353; 2015.