

Avaliação das Variantes Genéticas dos Genes *AMELX* e *ENAM* na Cárie Dentária em Adolescentes

Genetic Variants of the *AMELX* Gene and of the *ENAM* Gene and Dental Caries in Adolescents

Gabriela Paschoalini Romagnoli^a; Paula Marino Costa^a; Maria Paula Jacobucci^c; Sandra Mara Maciel^b; Regina Célia Poli-Frederico^{*a}

^aUnopar, Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu Odontologia. PR, Brasil.

^bUniversidade Estadual de Maringá, Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Odontologia Integrada. PR, Brasil.

^cUnicesumar. PR, Brasil.

*E-mail: reginafrederico@yahoo.com.br

Resumo

A doença cárie é considerada, atualmente, como biofilme sacarose dependente, entretanto, estudos recentes apontam que fatores genéticos também podem influenciar seu desenvolvimento. Variantes nos gene amelogenina (*AMELX*) e enamelina (*ENAM*), responsáveis pela formação do esmalte, têm sido propostas como potencialmente envolvidos na doença. O objetivo deste estudo foi avaliar se a ocorrência de cárie dentária em adolescentes está relacionado às variantes nos genes *AMELX* e *ENAM*. Para a avaliação da prevalência de cárie foi utilizado o índice de dentes cariados, perdidos e obturados (CPO-D), segundo critérios da Organização Mundial de Saúde. As amostras de DNA foram extraídas das células da mucosa oral. Para a análise dos polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) dos genes *AMELX* (rs17878486) e *ENAM* (rs7671281) foi utilizada a técnica de amplificação de fragmentos de DNA pela reação em cadeia da polimerase foi realizada (PCR) em tempo real pelo sistema TaqMan (Applied Biosystems, Foster City, EUA). Para a análise estatística, foi utilizado o teste exato de Fisher e qui-quadrado com nível de significância de 5%. Apenas os fatores socioeconômicos influenciaram a experiência de cárie. Concluiu-se que o componente genético, na população deste estudo, não influenciou o desenvolvimento da cárie.

Palavras-chave: Polimorfismo genético. Adolescentes. Esmalte.

Abstract

Caries disease is currently considered a sucrose-dependent biofilm, however recent studies indicate that a genetic component can also influence its development. Variants in the amelogenin (AMELX) and enamel (ENAM) genes, responsible for the enamel formation, have been proposed as potentially involved in the disease. The purpose of this study was to evaluate whether the occurrence of dental caries in adolescents is related to variants in the AMELX and ENAM genes. To assess the caries prevalence, the index of decayed, missing and filled teeth (DMFT) were used, according to World Health Organization criteria. DNA samples were extracted from oral mucosa cells. For the analysis of single nucleotide polymorphisms (SNPs) of the AMELX (rs17878486) and ENAM (rs7671281) genes, the amplifying DNA fragments technique by the polymerase chain reaction was performed (PCR) in real time by the TaqMan system (Applied Biosystems, Foster City, USA). For the statistical analysis, Fisher's exact test and chi-square were used with a 5% significance level. Only socioeconomic factors influenced the caries experience. It was concluded that the genetic component in the population of this study, did not influence the development of caries.

Keywords: Genetic polymorphism. Adolescents. Enamel.

Introdução

A cárie dentária continua sendo um sério problema social e de saúde muito comum (GERRETH et al., 2017), afetando cerca de 35% da população mundial (KASSEBAUM et al., 2015) e 60–90% das crianças em idade escolar (PETERSEN, 2003).

Esta doença é considerada biofilme sacarose dependente complexa, em que a participação do açúcar assume um papel determinante no processo cariioso (SHEIHAM; JAMES, 2015). No entanto, evidências científicas demonstraram que a cárie dentária esta também intimamente associada com polimorfismos genéticos (ALYOUSEF et al., 2017; COGULU et al., 2016; ECKERT et al., 2017; PIEKOSZEWSKA-ZIETEK; TURSKA-SZYBKA; OLCZAR-KOWALCZYK; YILDIZ et al., 2016;), entretanto, alguns resultados ainda são contraditórios, especialmente, quando se trata de diferentes

populações étnicas e regiões geográficas (IZAKOVICOVA HOLLA et al., 2017; OLSZOWSKI et al., 2017).

Assim, os genes implicados na formação do esmalte dentário, quando mutados, estão envolvidos com a suscetibilidade à cárie dentária, e foram relatadas associações entre variação genética no genes amelogenina, tuftelina e enamelina e esta afecção (GERRETH et al., 2012; SHIMIZU et al., 2012).

Estudo realizado em crianças da Turquia demonstrou a possível interação entre a alteração genética do gene enamelina (*ENAM*) e o *Streptococcus mutans*, por tornar o hospedeiro suscetível ao desenvolvimento de cárie dentária (PATIR et al., 2008). É sugerido que a enamelina controla a formação de cristais juntamente com amelogenina, a mais abundante das proteínas da matriz do esmalte e, subsequentemente, construir uma estrutura de cristais de hidroxiapatita altamente organizada (BARTLETT, 2013). Dessa forma, sugere-

se que variações genéticas nesses genes devem contribuir para alterações estruturais no esmalte dentário que podem causar altos níveis de perdas minerais, maior suscetibilidade ao ataque bacteriano e deposição do biofilme (PATIR et al., 2008; SHIMIZU et al., 2012). Assim, a hipótese deste estudo foi que polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs) nos genes *AMELX* e *ENAM* devem ter relação com a cárie dentária. O objetivo deste trabalho foi investigar a influência dos polimorfismos nestes genes no desenvolvimento da cárie dentária em escolares de 14 a 19 anos.

2 Material e Métodos

A partir de um estudo transversal realizado em 2008, foi selecionada uma amostra de adolescentes pertencentes a escolas públicas de Londrina-PR, com idade entre 14 e 19 anos, de ambos os gêneros. Foi realizada uma coleta de amostras de saliva para a extração de DNA, aplicação de questionários e exame clínico para avaliação do índice de cárie (n=157).

Como variável dependente foram considerados níveis de lesões de cárie dentária, conforme aferido pelo índice CPO-D, seguindo os critérios de diagnóstico definidos pela Organização Mundial da Saúde. As avaliações bucais foram realizadas por um único examinador, previamente treinado e calibrado, registrando a prevalência da cárie dentária.

Os questionários foram aplicados para se obter as características sociodemográficas dos indivíduos e suas famílias. Foram registradas informações demográficas, socioeconômicas e hábitos alimentares, de higiene e saúde bucal.

Este estudo prévio foi submetido à avaliação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Pitágoras Unopar, recebendo parecer favorável para sua execução (Protocolo PP 0012/08).

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

2.1 Reação em cadeia da polimerase (pcr) em tempo real e análise dos polimorfismos de *AMELX* e *ENAM*.

As amostras de DNA foram extraídas de acordo com o método descrito por Aidar e Line (2007).

Os materiais coletados foram acondicionados sob refrigeração (-80 °C), para não haver a sua desnaturação. Os que não eram válidos foram descartados, totalizando a amostra de 123 alunos (n=123), exceto para a avaliação dos SNPs (rs17878486) no gene amelogenina, que a amostra foi constituída de 82 indivíduos (n=82). A perda amostral foi decorrente de problemas laboratoriais.

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

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

Os ensaios foram conduzidos em placas de 96 poços contendo um volume final de reação em cada poço de 20 uL consistindo de: DNA genômico 30ng, Máster Mix 1x e os *primers* 1x (ensaio desenvolvido pela *Applied Biosystems: C__2190967_10 para AMELX e C__25763290_10 para ENAM*).

A PCR pelo sistema TaqMan foi realizada em um termociclador automático (*Applied Biosystems 7500 Real Time PCR Systems*), sob as seguintes condições: 95 °C por 10 minutos (ativação inicial), seguido por 50 ciclos de 95 °C por 15 segundos (desnaturação do DNA) e 60 °C por 1 minuto e 30 segundos (pareamento dos *primers* e duplicação do DNA). Após a PCR completa, a placa foi lida e os resultados analisados para a discriminação alélica por meio do software detector de sequência (StepOne Plus Real-time PCR System - Applied Biosystems).

2.2 Análise estatística

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

3 Resultados e Discussão

Os resultados do levantamento epidemiológico realizado nos adolescentes das escolas públicas de Londrina-PR estão expressos no Quadro 1. Dos 123 participantes da pesquisa, 85 (69,1%) foram do gênero feminino e 81 (61,9%) de etnia branca e maior parcela tinha idade entre 14 e 15 anos (43,1%).

Quadro 1 - Distribuição das variáveis sociodemográficas e econômicas, comportamentais, de saúde bucal e genéticas na população de escolares de 14 a 19 anos de escolas públicas do município de Londrina/PR

Características	N	%
Sociodemográficas		
Gênero		
Feminino	38	30,9
Masculino	85	69,1
Idade		
14 a 15	53	43,1
16	35	28,5
17 ou +	35	28,5
Cor		
Branca	81	65,8
Não branca	42	34,1

Socioeconômicas		
Características	N	%
Renda familiar		
350 a 1245	46	45,5
1245 a 2075	30	29,7
Acima de 2075	25	24,8
Escolaridade materna		
0 a 8 anos	67	54,5
9 a 11 anos	40	32,5
Acima de 12	16	13,0
Visitas regulares ao dentista		
Sim	54	43,9
Não	69	56,1
Comportamentais		
Frequência de consumo de doces em geral		
1	32	26,0
2 ou +	91	74,0
Hábito de ingerir alimentos entre as refeições		
Sim	109	88,6
Não	14	11,4
Saúde bucal		
Histórico de cárie		
Com cárie	74	60,2
Sem cárie	49	39,8
Genética		
Enamelina		
CC	10	8,1
TT	93	75,6
CT	20	16,3
Amelogenina		
CC	4	4,9
TT	62	75,6
CT	82	19,5

Fonte: Dados da pesquisa.

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

Com relação à renda familiar, 45,5% dos adolescentes disseram ter o salário familiar entre R\$ 350,00 a R\$ 1245,00. A frequência de visitas ao dentista eram regulares para 56,1% dos participantes. Metade das mães apresentava escolaridade entre 0 a 8 anos de estudo.

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

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

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

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

Fonte: Dados da pesquisa.

Pode ser verificado que 94,6% dos escolares que apresentavam hábito de consumir alimentos entre as refeições tinham cárie dentária, enquanto que 20,4% daqueles que não tinham o hábito, estavam livres da doença. Dos que apresentavam a doença cárie, 78,4% consumiam mais de dois doces por dia.

A escolaridade materna também teve influência nesta pesquisa, sendo que as mães com menos anos de estudo tendiam a ter filhos com cárie dentária, ou seja, 60% dos filhos de mães, que tinham de 0 a 8 anos de estudo, apresentavam lesões cáries (Quadro 2).

A cárie dentária tem origem no biofilme sacarose dependente complexa, com foco na participação central dos açúcares como fator determinante negativo no processo cariioso (SHEIHAM; JAMES, 2015). Há alguns fatores biológicos que modulam a doença, como a má higiene bucal,

a presença de bactérias cariogênicas, exposição inadequada ao flúor, hábitos alimentares errados (SELWITZ; SMAIL; PITTS, 2007), genética (ABBASOĞLU et al., 2014) KANG; YOON; CHO, 2011), além dos fatores socioeconômicos e de funcionamento familiar (DUIJSTER; VERRIPS; VAN LOVEREN, 2014).

Estudos têm tentado comprovar que há um fator genético que influencia no estabelecimento da cárie (ABBASOĞLU et al., 2014; GERRETH et al., 2016; TANNURE et al., 2012; WANG et al., 2012). A variação nos genes que codificam o esmalte dentário, quando mutados, pode levar à perda de minerais (DEELEY et al., 2008). Amelogenina pode ser associada com a suscetibilidade à cárie dentária (KANG; YOON; CHO, 2011). Estudo realizado em crianças da Turquia mostrou a possível interação entre a alteração genética na enamelina e o *Streptococcus mutans*, pode agravar a saúde do indivíduo (PATIR et al., 2008).

Nesta pesquisa foram investigados estes dois genes envolvidos na formação do esmalte, o *AMELX* (rs 17878486) e o *ENAM* (rs76711281). Ambos não mostraram associação significativa com a cárie dentária nesta população do estudo. Assim como um estudo realizado em gêmeos por Silva et al. (2019) não foi possível provar a associação entre cárie dentária e fatores genéticos. Porém, outro estudo realizado em crianças polonesas, em que foram investigados polimorfismos de nucleotídeo único nos genes *AMELX*, *AMBN*, *TUFT1*, *KLK4*, sendo comprovado que existe contribuição para a ocorrência de cárie dentária em crianças polonesas (GERRETH et al., 2017).

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

O principal achado do estudo foi a associação significativa das variáveis comportamentais que se referem ao ingerir alimentos entre as refeições e a consumo diário de doces em geral com a cárie dentária, que corrobora com o estudo realizado por Yildiz et al. (2016). O fator primordial para a prevenção da cárie é o controle do açúcar (MOYNIHAN, 2005). A importância do consumo do açúcar na cárie dentária é erroneamente não explorada em estratégias preventivas (SHEIHAM; JAMES, 2015).

Um estudo realizado por Duijster et al. (2014) concluiu que houve associação entre o funcionamento familiar e a experiência de cárie infantil. Também foi observado que a mãe com menor escolaridade possuía uma probabilidade maior de ter filhos com cáries. Esse achado também foi obtido neste estudo, em que este fator de risco social teve associação estatística positiva com a presença da cárie dentária nos adolescentes.

A maioria dos estudos, que obteve relação positiva entre cárie dentária e fatores genéticos, foi realizado em populações mais homogêneas, diferente do grupo selecionado para este estudo. Entretanto, a possibilidade de outros

genes de formação de esmalte apresentarem polimorfismos aumentando a suscetibilidade à cárie não deve ser rejeitada (PANG et al., 2017).

Em um estudo realizado por Haworth et al. (2018), pesquisou-se a localização de um loco genético que poderia conter uma mutação associada com a doença cárie. Evidências apontaram associação entre rs1594318 e cárie em dentes deciduos e rs7738851 em dentes permanentes. Porém, quando a variante foi observada em diferentes grupos étnicos, esta se mostrou mais fraca em função da grande heterogeneidade na população de estudo.

Li et al. (2000) avaliaram associação genética dos polimorfismos em lactotransferrina (LTF) e o risco de cárie dentária. Análises mais profundas indicaram que rs1126478 estava associado ao risco dentário em indivíduos que já eram acometidos pela doença, principalmente, em sua forma moderada ou grave. Porém, a partir dessa metanálise não se observou associação significativa da variante genética rs1126478 em LTF com o risco de cárie dentária.

O estudo em questão possui algumas limitações. Não foram realizadas radiografias, de modo que lesões interproximal ou cárie secundária não puderam ser detectadas. Além disso, o número de participantes dos grupos com e sem experiência de cárie não apresentou o mesmo n amostral. Por problemas laboratoriais, não foi possível obter a frequência genotípica da amelogenina em todos os participantes. Considerando o limitado tamanho amostral, estes resultados precisam ser replicados em outras populações maiores.

4 Conclusão

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

Referências

- ABBASOĞLU, Z. et al. Early Childhood Caries Is Associated with Genetic Variants in Enamel Formation and Immune Response Genes. *Caries Res.*, v.49, p.70-77, 2014. doi: 10.1159/000362825
- AIDAR, M.; LINE, S.R. A simple and cost-effective protocol for DNA isolation from buccal epithelial cells. *Braz. Dent. J.*, v.18, n.2, p.148-152, 2007. doi:10.1590/S0103-64402007000200012.
- ALYOUSEF, Y.M. et al. Association of MBL2 gene polymorphism with dental caries in Saudi children. *Caries Res.*, v.51, p.12-16, 2017. doi: 10.1159/000489572.
- BARTLETT, J.D. Dental Enamel Development: Proteinases and Their Enamel Matrix Substrates. *ISRN Dent.*, v.16, p.1-24, 2013. doi: 10.1155/2013/684607.
- COGULU, D. et al. The role of vitamin D receptor polymorphisms on dental caries. *J. Clin. Pediatr. Dent.*, v.40, p.211-214, 2016. doi: 10.17796/1053-4628-40.3.211.
- DEELEY, K. et al. Possible association of amelogenin to high caries experience in a Guatemalan-Mayan population. *Caries Res.*, n.42, n.1, p.8-13, 2008. doi: 10.1159/000111744.

- DUIJSTER, D.; VERRIPS, G.H.; VAN LOVEREN, C. The role of family functioning in childhood dental caries. *Community Dent. Oral Epidemiol.*, v.42, n.3, p.193-205, 2014. doi: 10.1111/cdoe.12079.
- ECKERT, S. *et al.* Variants on chromosome 4q21 near PKD2 and SIBLINGS are associated with dental caries. *J Hum Genet.*, v.62, p.491-496, 2017. doi: 10.1038/jhg.2016.161.
- GERRETH, K. *et al.* Association of ENAM gene single nucleotide polymorphisms with dental caries in Polish children. *Clin. Oral Investig.*, n.20, p.631-636, 2016. doi: 10.1007/s00784-016-1743-1.
- GERRETH, K. *et al.* Chosen single nucleotide polymorphisms (SNPs) of enamel formation genes and dental caries in a population of Polish children. *Adv. Clin. Exp. Med.*, v.26, n.6, p.899-905, 2017. doi: 10.17219/acem/63024.
- HAWORTH, S. *et al.* Consortium-based genome-wide meta-analysis for childhood dental caries traits. *Hum. mol. genet.*, v.27, n.17, p.3113-3127, 2018. doi: 10.1093/hmg/ddy237.
- IZAKOVICOVA, H.L., *et al.* Vitamin D receptor TaqI gene polymorphism and dental caries in Czech children. *Caries Res.*, v.51, p.7-11, 2017. doi: 10.1159/000452635.
- JEREMIAS, F. *et al.* Genes Expressed in Dental Enamel Development Are Associated with Molar-Incisor Hypomineralization. *Arch. Oral Biol.*, v.58, n.10, p.1434-1442, 2013. doi: 10.1016/j.archoralbio.2013.05.005.
- KANG, S.; YOON W.I.; CHO J. Association between AMELX polymorphism and dental caries in Koreans. *Oral Dis.*, v.17, n.4, p.399-406, 2011. doi: 10.1111/j.1601-0825.2010.01766.x.
- KASSEBAUM, N.J. *et al.* Global burden of untreated caries: a systematic review and metaregression. *J. Dent. Res.*, v.94, n.5, p.650-658, 2015. doi: 10.1177/0022034515573272.
- MOYNIHAN, P.J. The role of diet and nutrition in the etiology and prevention of oral diseases. *Bull. World Health Organ.*, v.83, n.9, p.694-699, 2005. doi: 10.1590/S0042-96862005000900015.
- LI, X.; SU, Y.; LIU, D. The association between genetic variants in lactotransferrin and dental caries: a metaand gene-based analysis. *BMC med. genet.*, v.21, n.114, p.1-8, 2020. doi: 10.1186/s12881-020-01029-7.
- OLSZOWSKI, T. *et al.* The lack of association between FCN2 gene promoter region polymorphisms and dental caries in Polish children. *Caries Res.*, v.51, p.79-84, 2017. doi: 10.1159/000455054.
- PANG, L. *et al.* Variation in Enamel Formation Genes Influences Enamel Demineralization In Vitro in a Streptococcus mutans Biofilm Model. *Front. Physiol.*, v.8, p.1-11, 2017. doi: 10.3389/fphys.2017.00851.
- PATIR, A. *et al.* Enamel formation genes are associated with high caries experience in Turkish children. *Caries Res.*, v.42, n.5, p.394-400, 2008. doi: 10.1159/000154785.
- PETERSON, P.E. The World Oral Health Report 2003: continuous improvement of oral health in the 21st century – the approach of the WHO Global Oral Health Programme. *Community Dent Oral Epidemiol.*, v.31, p.3–23, 2003. doi: 10.1046/j.2003.com122.x.
- PIEKOSZEWSKA-ZIĘTEK, P.; TURSKA-SZYBKA A.; OLCZAK-KOWALCZYK D. Single nucleotide polymorphism in the aetiology of caries: systematic literature review. *Caries Res.*, v.51, p.425-435, 2017. doi: 10.1159/000476075.
- SELWITZ, R.H.; ISMAIL, A.I.; PITTS, N.B. Dental caries. *Lancet.*, v.369 n.9555, p.51-59, 2007. doi: 10.1016/S0140-6736(07)60031-2.
- SHEIHAM, A.; JAMES, W.P. Diet and dental caries: the pivotal role of free sugars reemphasized. *J. Dent. Res.*, v.94, n.10, p.1341-1347, 2015. doi: 10.1177/0022034515590377.
- SHIMIZU, T. *et al.* Enamel formation genes influence enamel microhardness before and after cariogenic challenge. *Plos One.*, v.7, n.9, p.e45022, 2012. doi: 10.1371/journal.pone.0045022.
- SILVA, M.J. *et al.* Genetic and early-life environmental influences on dental caries risk: a twin study. *Pediatrics.*, v.143, n. 5, p.167-174, 2019. doi: 10.1542/peds.2018-3499.
- TANNURE, P.N. *et al.* MMP13 polymorphism decreases risk for dental caries. *Caries Res.*, v.46, n. 4, p.401-407, 2012. doi: 10.1159/000339379.
- WANG, X. *et al.* Genetic and environmental factors associated with dental caries in children: the Iowa Fluoride Study. *Caries Res.*, v.46, n.3, p.177-184, 2012. doi: 10.1159/000337282.
- YILDIZ, G. *et al.* Gene-environment interactions in the etiology of dental caries. *J. Dent. Res.*, v.95, n.1, p.74-79, 2016. doi: 10.1177/0022034515605281.