



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA LEGAL
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA MÉDICA

ANA CATARINA MARTINS REIS

**Expressão de genes e quantificação de *Lactobacillus paracasei* e
Lactobacillus rhamnosus presentes em lesões dentinárias de crianças
com cárie da primeira infância**

FORTALEZA-CEARÁ

2019

ANA CATARINA MARTINS REIS

**Expressão de genes e quantificação de *Lactobacillus paracasei* e
Lactobacillus rhamnosus presentes em lesões dentinárias de crianças
com cárie da primeira infância**

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Lidiany Karla A. Rodrigues Gerage

FORTALEZA-CEARÁ

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

R298e Reis, Ana Catarina Martins.
Expressão de genes e quantificação de *Lactobacillus paracasei* e *Lactobacillus rhamnosus* presentes em lesões dentinárias de crianças com cárie da primeira infância / Ana Catarina Martins Reis. – 2019.
67 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Programa de Pós-Graduação em Enfermagem, Fortaleza, 2019.
Orientação: Prof. Dr. Lidiany Karla A. Rodrigues Gerage.

1. Criança. 2. Cárie dentária. 3. Probiótico. 4. *Lactobacillus*. 5. RNA. I. Título.

CDD 610.73

ANA CATARINA MARTINS REIS

**Expressão de genes e quantificação de *Lactobacillus paracasei* e
Lactobacillus rhamnosus presentes em lesões dentinárias de crianças
com cárie da primeira infância**

Aprovada em: 24/07/19

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Lidiany Karla Azevedo Rodrigues Gerage
Universidade Federal do Ceará
Orientadora

Prof^a. Dr^a. Simone Duarte
Universidade de Indiana
Examinadora

Prof^a. Dr^a. Danielle Malta Lima
Universidade de Fortaleza
Examinadora

Prof^a. Dr^a. Beatriz Gonçalves Neves
Universidade Federal do Ceará
Examinadora

Prof^a. Dr^a. Helliada Vasconcelos Chaves
Universidade Federal do Ceará
Examinadora

AGRADECIMENTOS

A Deus, nosso eterno pai, que ilumina cada um dos meus dias, me dando força e perseverança em todos os momentos da minha vida.

Em especial a minha família! Ao meu marido, Yulo Castelluccio, pelo amor, amizade e compreensão, ao meu tesouro, minha filha Mirela Castelluccio, aos meus pais, Mônica Martins e Givaldo Reis pela dedicação e formação, ensinando-me os mais importantes valores do ser humano e a minha irmã Pauline Reis pela amizade e companheirismo.

À Universidade Federal do Ceará (UFC) na pessoa do seu Reitor Prof. Henry de Holanda Campos

A minha orientadora, Prof^a. Lidiany Karla Azevedo Rodrigues Gerage, pela oportunidade, confiança, apoio e constante aprendizado. E a sua equipe, pela contribuição.

Ao Programa de Pós Graduação em Microbiologia Médica (PPGMM) na pessoa de sua coordenadora, Prof^a Rossana de Aguiar Cordeiro e da ex-coordenadora Prof^a Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante.

Aos amigos do PPGMM pela amizade, aprendizado e cumplicidade. Em especial, Cecília Costa, Jamila Ricarte, Bruno Amando, Francisco Ruliglésio Rocha e Crister José Ocadaque.

Aos professores do PPGMM. Especialmente, Prof^a Cibele Barreto Mano de Carvalho e Prof^a Débora Castelo Branco de Souza Collares Maia pelos ensinamentos e experiências que levarei comigo para sempre.

Ao Programa de Pós Graduação em Odontologia (PPGO) na pessoa de sua coordenadora, Prof^a Cristiane Sá Roriz Fonteles.

Aos aos alunos e ex-alunos do PPGO, principalmente Weslanny de Andrade Moraes, Ramille Araújo Lima, Marcela Lima, Daniela da Silva Bezerra, Roberto Haniery Pontes Alves, Adriana Kelly de Sousa Santiago Barbosa, Nara Sena e Hellen Suzany pelo acolhimento e aprendizado.

Aos funcionários da Universidade Federal do Ceará, em particular David Queiroz de Freitas e Carolinda Oliveira pela imenso auxílio e empatia.

Aos Professores Dr. Rafael Nóbrega Stipp (FOP-Unicamp), Dr. José Roberto V. Silva (PPGB-UFC), Rodrigo Maranguape S. da Cunha (PPGB-UFC) e suas equipes pelo acolhimento e colaboração.

As professoras participantes da banca examinadora pelas valiosas considerações.

À Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) pela concessão da bolsa de estudos.

A todos, minha gratidão!

RESUMO

Lactobacillus paracasei e *Lactobacillus rhamnosus* pertencem ao grupo *Lactobacillus casei* e estão fortemente associadas à progressão da cárie, especialmente na dentina e considerando que o consumo de alimentos/probióticos é um importante fonte de *Lactobacillus*. Este estudo teve como objetivo analisar a expressão de genes cariogênicos relacionados à adesão (*spaC* e *spaE*), biossíntese de substâncias poliméricas extracelulares (*wzb*) e oxidação de piruvato (*spxB*) bem como, detectar e quantificar *L. paracasei*, *L. rhamnosus* e o grupo *L. casei* em lesões de cáries dentinárias ativas e inativas de crianças com cárie da primeira infância (CPI). Amostras de dentina (25 lesões ativas e 13 inativas) de crianças com CPI e idade entre 3-5 anos foram utilizadas no estudo. O RNA das amostras foi extraído e convertido em cDNA para a quantificação bacteriana e análise de expressão gênica por qPCR. Os teste *t* de Student ou U de Mann-Whitney foram aplicados para as comparações das médias dos grupos. Os resultados mostraram que as espécies do grupo *L. casei* fazem parte da comunidade microbiana viável das lesões de cárie dentinária, sendo o grupo *L. casei* ($p = 0,004$) assim como as espécies *L. paracasei* ($p = 0,001$) e *L. rhamnosus* ($p = 0,022$) mais abundantes nas lesões de dentina ativa em comparação com as lesões inativas. Os dados de expressão gênica revelaram que *spaC*, *spxB* e *spaE* foram igualmente expressos independente da atividade de lesão de cárie ($p > 0,05$), enquanto o gene *wzb* ($p = 0,006$) apresentou maior expressão nas lesões de dentina ativa. Este estudo fornece novos conhecimentos sobre a microbiota bucal relacionada ao estado da atividade da cárie dentinária, indicando que o grupo *L. casei* e as espécies *L. paracasei* e *L. rhamnosus* apresentam comportamentos diferentes em lesões ativas e inativas podendo estar relacionadas à progressão e atividade da lesão de cárie dentinária.

Palavras-chave: Criança, cárie dentária, probiótico, *Lactobacillus*, RNA

ABSTRACT

Lactobacillus paracasei and *Lactobacillus rhamnosus* belong to the group *Lactobacillus casei* and are strongly associated with the progression of caries, especially in dentin, and considering that food/probiotic consumption is an important source of *Lactobacillus*. This study aimed to analyse the expression profile of genes related to adhesion (*spaC* and *spaE*), extracellular polymeric substance regulation (*wzb*) and pyruvate oxidation (*spxB*) of the *L. paracasei* and *L. rhamnosus* as well as to detect and quantify the *L. casei* group, *L. paracasei* and *L. rhamnosus* bacteria in active and arrested dentin caries lesions of children with early childhood caries (ECC). Total RNA was extracted from dentin samples (25 active and 13 arrested lesions) of pre-school children with ECC aged 3–5 years. The samples were converted to cDNA and qPCR analyses were performed for bacterial quantification and gene expression analyses. Student's t-test or Mann-Whitney U test were used for mean comparisons of the groups. The *L. casei* group species were found to be part of the viable microbial community in dentin caries lesions, with the *L. casei* group ($p= 0.004$), *L. paracasei* ($p= 0.001$), and *L. rhamnosus* ($p= 0.022$) being more abundant in active dentin lesions compared to the arrested ones. Gene expression data revealed *spaC*, *spxB* and *spaE* were equally expressed regardless of the caries lesion activity ($p>0.05$), while the *wzb* gene ($p= 0.006$) showed higher expression in active dentin lesions. This study provides insights about oral microbiota related to dentin caries activity status, indicating that the *L. casei* group, and the species *L. paracasei* and *L. rhamnosus* can have different behavior in active and inactive lesions and may be linked to dentin lesion progression and activity.

Keywords- Child, dental caries, probiotic, *Lactobacillus*, RNA

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Formação do biofilme em três etapas. | 15 |
| Figura 2. Desenho conceitual da estrutura do biofilme. | 16 |
| Figura 3. Esquema de desenvolvimento da placa dental. | 17 |
| Figura 4. Esquema da formação do biofilme dental. | 18 |
| Figura 5. Estágios do desenvolvimento da cárie dental. | 20 |
| Figura 6. Esquema simplificado da estrutura dentária. | 21 |
| Figura 7. Aspecto clínico de lesões de dentina. | 21 |
| Figura 8. Organograma experimental deste estudo. | 34 |
| Figura 9. Proporção do grupo <i>L. casei</i> e das espécies <i>L. paracasei</i> e <i>L. rhamnosus</i> em relação ao total de bactérias (TB). | 40 |
| Figura 10. Quantificação do grupo <i>L. casei</i> e das espécies <i>L. paracasei</i> e <i>L. rhamnosus</i> em lesões de cárie dentinária ativa (n= 25) e inativa (n= 13). | 41 |
| Figura 11. Expressão dos genes <i>spaC</i> , <i>spxB</i> (<i>L. paracasei</i>) <i>spaE</i> e <i>wzb</i> (<i>L. rhamnosus</i>) em lesões de cárie dentinárias ativas (n= 25) e inativas (n= 13). | 42 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1. <i>Primers</i> projetados nesse estudo. | 37 |
| Tabela 2. Lista de <i>primers</i> utilizados. | 37 |
| Tabela 3. Condições térmicas ideais para qPCR. | 39 |

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

| | |
|-----------------------------------|------------------------------------|
| CPI | Cárie da primeira infância |
| °C | Grau Celsius |
| cDNA | DNA complementar |
| CO₂ | Dióxido de carbono |
| Des | Desmineralizada |
| DNA | Deoxyribonucleic acid |
| ECC | Early Childhood Caries |
| EPS | Extracellular Polymeric Substances |
| H₂O₂ | Peróxido de hidrogênio |
| MgCl₂ | Cloreto de magnésio |
| Min | Minuto |
| ml | Mililitro |
| ng | Nanograma |
| PCR | Polymerase Chain Reaction |
| PEC | Polissacarídeos extracelulares |
| pH | potencial Hidrogeniônico |
| PIC | Polissacarídeos intracelulares |
| qPCR | Quantitative PCR |
| Re | Remineralizada |
| RNA | Ribonucleic acid |
| RNase | Ribonuclease |
| rRNA | ribosomal RNA |
| s | Segundo |
| UV | Radiação ultravioleta |
| µl | Microlitro |

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 12 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA | 15 |
| 2.1 Microbiota bucal | 15 |
| 2.2 Biofilme | 15 |
| 2.2.1 Biofilme dental | 17 |
| 2.3 Cárie dentária | 19 |
| 2.3.1 Cárie de dentina | 21 |
| 2.3.2 Aspectos microbiológicos | 23 |
| 2.3.3 Prevenção da cárie dentária | 24 |
| 2.4 Cárie da primeira infância (CPI) | 26 |
| 2.5 <i>Lactobacillus</i> X Cárie | 28 |
| 2.6 O grupo <i>Lactobacillus casei</i> | 30 |
| 2.6.1 Fisiologia e morfologia | 31 |
| 3 HIPÓTESES | 34 |
| 4 OBJETIVOS GERAIS | 34 |
| 4.1 Objetivos específicos | 34 |
| 5. MATERIAL E MÉTODOS | 35 |
| 5.1 Desenho experimental e locais de estudo | 35 |
| 5.2 Coleta das amostras | 36 |
| 5.3 Extração e purificação do RNA | 36 |
| 5.4 Síntese do DNA complementar (cDNA) | 37 |
| 5.5 Desenho e especificidade dos iniciadores (primers) | 37 |
| 5.4 qPCR | 39 |
| 5.6 Análise estatística | 40 |
| 6. RESULTADOS | 41 |
| 7. DISCUSSÃO | 44 |
| 8. CONCLUSÕES | 48 |
| 9. REFERÊNCIAS | 49 |
| ANEXOS | 63 |

1 INTRODUÇÃO

A cárie dentária é uma doença polimicrobiana, mediada por biofilme (Fejerskov, 2004; Philip *et al.*, 2018). É resultante do consumo frequente de açúcares e/ou carboidratos associado à disbiose de bactérias acidogênicas/acidúricas e que pode acarretar na perda dos dentes (Mira, 2018; Solbiati e Frias-Lopez, 2018; Zhan, 2018). A cárie dentária é uma das doenças crônicas mais comuns em crianças, com prevalência cinco vezes maior que a asma (Jiang *et al.*, 2014; Simon Soro e Mira, 2015), atingindo uma grande proporção da população mundial (Gao *et al.*, 2016; Tanner *et al.*, 2016).

A cárie que acomete crianças menores de seis anos de idade é denominada cárie da primeira infância (CPI) e é caracterizada pela existência de um ou mais dentes decíduos cariados (lesões cavitadas ou não), perdidos (devido à cárie) ou restaurados (AAPD, 2014). A CPI é um grave problema de saúde pública devido ao seu início precoce, rápida progressão clínica, alto custo do tratamento e impacto negativo na qualidade de vida de crianças em idade pré-escolar (Li *et al.*, 2015; Colombo *et al.*, 2017).

Diversos micro-organismos estão associados à cárie, sendo o *Streptococcus mutans* um dos mais estudados. Contudo, pesquisas mostram uma baixa incidência deste micro-organismo em lesões de cárie dentinária em crianças com CPI (Aas *et al.*, 2008; Simon Soro *et al.*, 2014). Mais recentemente, Bezerra *et al.* (2016) não observaram diferenças na prevalência de *S. mutans* entre lesões de cárie de dentina ativas e inativas em crianças com CPI. Estes resultados sugerem que o *S. mutans* pode deter um papel apenas secundário na progressão da cárie em dentina, quando comparado a outros micro-organismos, como os *Lactobacillus* spp.

Lactobacillus spp. são apontados como colonizadores tardios, não sendo necessários para a iniciação da cárie (Young e Featherstone, 2013; Obata *et al.*, 2014; Takahashi e Nyvad, 2016); sendo frequentemente detectado em CPI, principalmente em cárie dentinária (Badet e Thebaud, 2008; Li *et al.*, 2015; Shimada *et al.*, 2015; Mitrakul *et al.*, 2017). Um importante determinador ecológico para a manutenção da colonização de *Lactobacillus* na boca parece ser a presença de lesões de cárie (Caufield *et al.*, 2015).

A contagem de *Lactobacillus* é significativamente maior em crianças com CPI e a tendência oposta é observada para crianças livres de cárie (Ledder *et al.*, 2018). Vale destacar que o consumo de alimentos/probióticos é um importante fonte de *Lactobacillus* (Caufield *et al.*, 2015). Dentre as espécies de *Lactobacillus*, o *L.*

rhamnosus e o *L. paracasei* estão fortemente associadas à progressão da cárie (Kneist *et al.*, 2010) e juntamente com *L. casei*, constituem o grupo *Lactobacillus casei* (Tindall, 2008). O grupo *L. casei* é grupo predominante em biofilmes de crianças com CPI (Badet e Thebaud, 2008; Neves *et al.*, 2017) e as espécies *L. paracasei* e *L. rhamnosus*, são espécies bacterianas amplamente utilizadas na indústria de alimentos/probióticos e apresentam a capacidade de sobreviver na cavidade bucal (Smokvina *et al.*, 2013; Toh *et al.*, 2013; Surachat *et al.*, 2017).

Pesquisas mostram que o *L. rhamnosus* é o probiótico mais utilizado e clinicamente pesquisado do grupo *L. casei* para a prevenção da cárie, seguido por *L. paracasei* (Lebeer *et al.*, 2007; Twetman e Keller, 2012; Cagetti *et al.*, 2013; Seminário-Amez *et al.*, 2017; Coqueiro *et al.*, 2018; Pahumunto *et al.*, 2019). No entanto, tem sido sugerido que a colonização da cavidade bucal por estes micro-organismos probióticos pode contribuir para a progressão da cárie (Maltz e Beighton, 2012), induzindo à perda mineral, especialmente nas lesões cavitadas dentinárias (Schwendicke *et al.*, 2014). Isso indica que, sob condições específicas de crescimento, como baixo pH, as espécies probióticas também podem ser cariogênicas (Vuotto *et al.*, 2014).

Durante a progressão, a cárie atinge a dentina, que é composta principalmente por matéria orgânica, como colágeno, e possui um pH mais ácido (Hojo *et al.*, 1994, Takahashi e Nyvad, 2016). As lesões de dentina ativa apresentam uma progressão ao longo do tempo, que indica uma maior possibilidade de severidade da doença, enquanto as lesões inativas exibem uma ausência ou escassez de progressão (Nyvad e Fejerskov, 1997; Filstrup *et al.*, 2003). Atualmente, apenas o uso do diagnóstico clínico para a atividade de cárie permite a análise da natureza dinâmica da doença, embora diferenças da microbiota entre lesões ativas e inativas possam elucidar o papel de cada micro-organismo (Takahashi e Nyvad, 2016).

L. paracasei e *L. rhamnosus* são anaeróbios facultativos, Gram-positivos, não-formadores de esporos, geralmente catalase-negativos e imóveis (Salveti *et al.*, 2012; Goldstein *et al.*, 2015). São também capazes de fermentar glicose, por meio da fermentação heterolática, produzindo assim ácido lático. Dependendo do pH do meio, estas bactérias podem produzir etanol, ácido acético e CO₂ (Sharpe, 1979; Salvetti *et al.*, 2012).

Além da produção de ácido, as espécies do grupo *L. casei* apresentam alta tolerância a pH muito baixo (Obata *et al.*, 2014). Outra característica importante dos membros do grupo *L. casei* é a produção de H₂O₂ resultante da expressão do gene *spxB*

(Zotta *et al.*, 2014; Savo Sardaro *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2017). Além disso, *L. paracasei* e *L. rhamnosus* têm genes relacionados à adesão, como os genes *spaC* e *spaE*, que codificam a proteína pilina (Toh *et al.*, 2013; Ceapa *et al.*, 2016) e o gene *wzb*, envolvido na síntese de substância polimérica extracelular (EPS) (Nadkarni *et al.*, 2014). No entanto, sabe-se poucos detalhes sobre a expressão de genes de *L. paracasei* e *L. rhamnosus* presentes na carie dentária (Nadkarni *et al.*, 2014; Ciandrini *et al.*, 2017).

Neste contexto, pressupõe-se que *L. paracasei* e *L. rhamnosus* estejam associadas à cárie dentinária, especialmente na CPI e possuam elementos genéticos mais ativos específicos para adesão, formação de biofilme e produção de agentes biocidas, nas lesões dentinárias que apresentam atividade de cárie.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Microbiota bucal

O desenvolvimento e a expansão da biologia molecular proporcionou uma maior compreensão do universo microbiano, revelando que o microbioma bucal maduro é composto por aproximadamente 700 espécies microbianas (bactérias e em menor proporção fungos, protozoários e vírus) contudo, 50% destes micro-organismos são incultiváveis (Aas *et al.*, 2005; Simon Soro e Mira, 2015; Zhang *et al.*, 2018). Estes micro-organismos podem viver em suspensão (células planctônicas) ou sésseis (biofilmes), sendo a maioria comensais e alguns potencialmente patogênicos tornando-se capaz de causar doenças bucais, como a cárie dental (Simon Soro e Mira, 2015; Bowen *et al.*, 2018; Hanque *et al.*, 2019).

A cavidade bucal é um ecossistema microbiano aberto e complexo, exposto a vários fatores exógenos (como a dieta), favorecendo a colonização por uma variedade de micro-organismos (Svec *et al.*, 2009). Sua colonização ocorre logo após o nascimento e é baseada em interações bactéria-hospedeiro e inter-bactéria (Kriebel *et al.*, 2018). *Staphylococcus epidermidis* e *Streptococcus* spp. são detectadas horas após o nascimento, sendo *Streptococcus salivarius* relatado como a espécie pioneira (Cortelli *et al.*, 2008; Nelson-Filho *et al.*, 2013).

Bactérias presentes na cavidade bucal geralmente formam uma complexa comunidade ecológica reconhecida como biofilme (Zhang *et al.*, 2018; Hanque *et al.*, 2019) que se deposita na superfície dos elementos dentários.

2.2 Biofilme

O biofilme representa um fenótipo predominante de quase todas as bactérias em seu *habitat* natural (Zhang *et al.*, 2018; Hanque *et al.*, 2019). Para atingir esta condição, os micro-organismos devem possuir quatro características biológicas fundamentais: auto-organização (autopoiese), resistência às perturbações ambientais (homeostase), cooperação e capacidade de resposta às mudanças ambientais (Gutmann e Manjarrés, 2018).

A formação do biofilme é um processo dinâmico e transcorre em três etapas (Figura 1). Primeiramente, ocorre a adsorção de moléculas orgânicas e inorgânicas em

uma superfície sólida levando à formação de uma camada condicionadora e o início da adesão de células microbianas, mediada por fímbrias, pili, flagelos e polissacarídeos extracelulares. A segunda etapa é a fase de colonização do biofilme, com a formação de microcolônias, sendo esta fixação influenciada pelo pH, temperatura, disponibilidade nutricional, hidrofobicidade da superfície, entre outros. E na última fase, dá-se o desenvolvimento e expansão do biofilme, que inevitavelmente, ocorrerá desde que não haja interrupção ativa em seu ciclo de vida. Nesse estágio, as microcolônias podem atrair colonizadores secundários formando uma comunidade coesa que originará à estrutura final do biofilme. Eventualmente, o biofilme pode apresentar uma fase de dispersão, estágio no qual as células virulentas se desprendem do biofilme regressando ao fenótipo planctônico (Gutmann e Manjarrés, 2018).

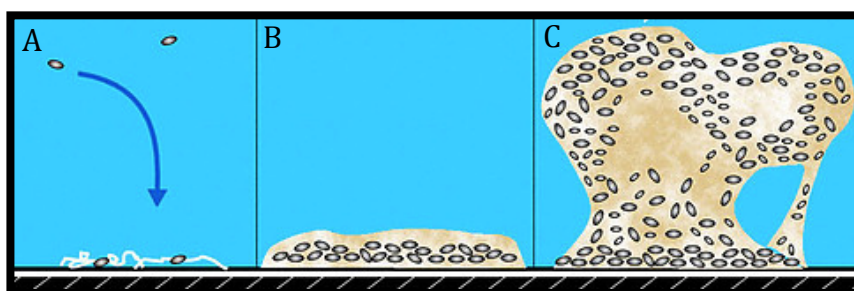


Figura 1. Formação do biofilme em três etapas: A- adesão de células planctônicas; B- colonização; C- formação de microcolônias e desenvolvimento/expansão do biofilme. Fonte: Usada com permissão do Centro Engenharia de Biofilme da Universidade Estadual de Montana, Bozeman, MT 59717-3980.

O biofilme da cavidade bucal apresenta características de um biofilme clássico (Figura 2), possui uma estrutura complexa, tridimensional (formato de cogumelo), altamente organizada e hidratada por canais de água que permitem a difusão interna de nutrientes e oxigênio. É composto por espécies microbianas envolvidas pela substância polimérica extracelular (EPS) e ancoradas a superfícies sólidas, tais como o esmalte dentário (Struzycka, 2014; Ciandrini *et al.*, 2017).

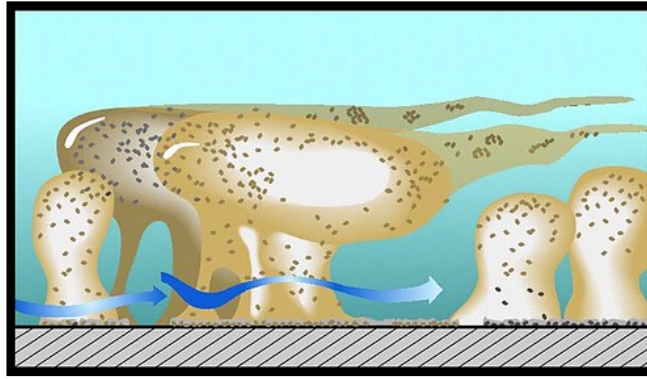


Figura 2. Desenho conceitual da estrutura do biofilme, representando os aglomerados microbianos fixos a superfície e os canais através dos quais a água pode fluir (transportando nutrientes através do biofilme). Fonte: Usada com permissão do Centro de Engenharia de Biofilme da Universidade Estadual de Montana, Bozeman, MT 59717-3980.

2.2.1 Biofilme dental

Em 1683 Anton van Leeuwenhoek, o primeiro pesquisador a observar microscopicamente o biofilme dental, examinou sua própria placa dental e concluiu que naquele material existiam “animalículos vivos” inertes (Huang *et al.*, 2011).

A placa dental é um biofilme polimicrobiano presente na superfície do dente que pode causar problemas de saúde, como a cárie dentária (Simon Soro e Mira 2015; Nadkarni *et al.*, 2014; Ciandrini *et al.*, 2017; Berger *et al.*, 2018).

A primeira fase para o desenvolvimento do biofilme dental é a formação de uma fina película chamada de película adquirida constituída por glicoproteínas salivares, como as proteínas ricas em prolina, amilase, estatina, mucinas e aglutinina. A película adquirida auxilia na adesão bacteriana (Heller *et al.*, 2017). Após a formação da película adquirida, os colonizadores iniciais dos dentes são cocos e bastonetes Gram positivos, anaeróbios facultativos, incluindo os gêneros *Streptococcus* e *Actinomyces* (Li *et al.*, 2004; Jiao *et al.*, 2014).

Tais colonizadores iniciais fornecem uma base para o desenvolvimento de biofilme dental. *Streptococcus* spp. reconhecem os componentes na película, através de uma interação específica entre uma proteína presente no pili de *S. sanguinis* e amilase salivar (Okahashi *et al.*, 2011). *Actinomyces* spp. ligam-se às proteínas ricas em prolina

e estatina (Li *et al.*, 2001). Uma vez que os colonizadores iniciais se fixam à superfície, a matriz do biofilme se desenvolve continuamente, ocorrendo a adsorção e co-agregação de espécies bacterianas (Kriebel *et al.*, 2018).

As adesinas desses primeiros colonizadores permitem co-agregação de bactérias Gram-negativas com menor nível de aderência à película, incluindo membros dos gêneros *Veillonella* e *Fusobacterium*. Bactérias pertencentes ao gênero *Fusobacterium*, como *Fusobacterium nucleatum*, são capazes de se co-agregar com colonizadores iniciais e tardios (Figura 3). Sendo denominadas de espécies “pontes”, promovendo o sucesso do desenvolvimento do biofilme dental (Kriebel *et al.*, 2018).

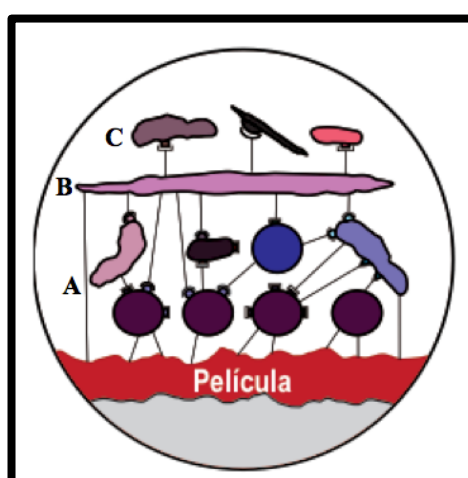


Figura 3. Esquema de desenvolvimento do biofilme dental (placa dental). Os colonizadores iniciais (A) são a base para o biofilme dental, após a fixação destes microorganismos ocorre a co-agregação de outras espécies bacterianas, incluindo *F. nucleatum* (B) que se liga aos colonizadores iniciais e tardios (C). Fonte: Adaptada.

O biofilme dental é uma estrutura metabolicamente dinâmica e constantemente ativa. Os processos alternados de diminuição e aumento do pH do biofilme ocasionam a desmineralização e remineralização das estruturas dentárias, respectivamente. Em condições saudáveis, esse processo está em equilíbrio e não é danoso à superfície do esmalte dentário (Badet e Thebaud, 2008; Struzycka, 2014). No entanto, quando o biofilme dental é superexposto aos açúcares da dieta do hospedeiro, a estrutura e composição do biofilme é alterada e a comunidade microbiana residente torna-se apta a metabolizar carboidratos e produzir ácidos que levam à cárie dentária (Bowen *et al.*, 2018) (Figura 4). A cárie é uma doença clássica induzida por biofilme e que, se nada for

feito, pode resultar na destruição da estrutura dentária (Berger *et al.*, 2018; Bowen *et al.*, 2018).

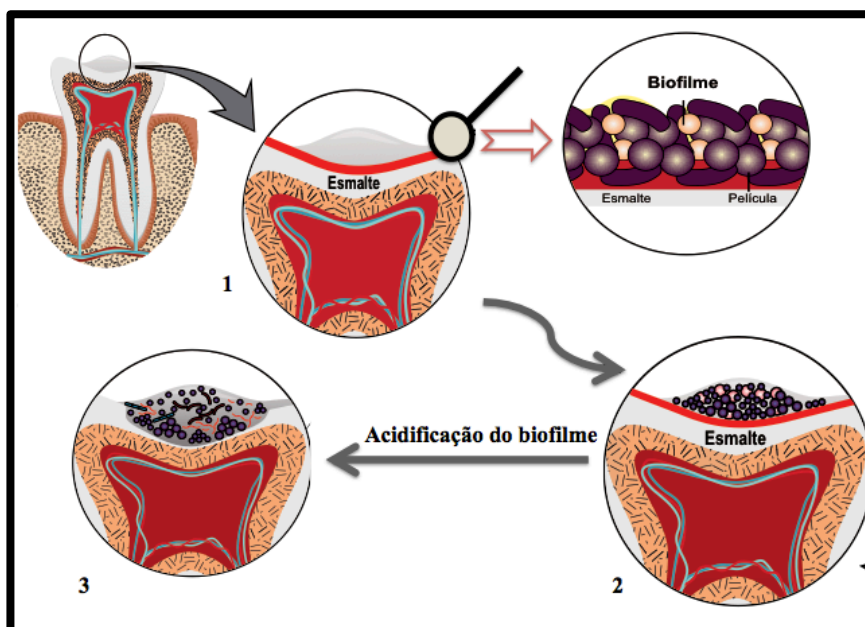


Figura 4. Esquema da formação do biofilme dental. A fase inicial para desenvolvimento do biofilme é formação da película, seguida da adesão de micro-organismos (1) e expansão do biofilme (2). O aumento da acidificação do biofilme, pela exposição frequente aos açúcares da dieta, leva a alteração da diversidade microbiana e à cárie dentária (3). Fonte: Adaptada.

2.3 Cárie dentária

As doenças bucais constituem um grande problema de saúde pública em todo o mundo, sendo a cárie dentária considerada a doença humana mais prevalente, afetando 80-90% da população, tanto nos países em desenvolvimento quanto nos desenvolvidos, sendo a principal razão da perda dentária (Gao *et al.*, 2016; Mier *et al.*, 2017; Zhan, 2018).

Os custos do tratamento de cárie dentária e suas complicações impõem pesadas cargas financeiras sobre indivíduos, famílias e sociedade como um todo. As despesas com tratamento odontológico em países de alta renda aumentam, em média, em US\$

100 (75 €) por pessoa por ano. Visto em nível global, o gasto do está em torno de US\$ 172 bilhões (Gao *et al.*, 2016; Mier *et al.*, 2017).

A cárie dentária é uma doença biofilme-açúcar dependente, associada a uma etiologia complexa, incluindo fatores genéticos, ambientais e comportamentais (Fejerskov, 2004; Tanner *et al.*, 2016). A desmineralização do esmalte dentário e da dentina é resultante da metabolização de açúcares e da consequente produção de ácidos orgânicos por micro-organismos presentes na placa dentária (Haque *et al.*, 2019). Assim, o aparecimento de uma lesão de cárie é determinado pela coexistência de três fatores principais: micro-organismos cariogênicos, carboidratos derivados da dieta e fatores do hospedeiro. A exposição insuficiente ao flúor, higiene bucal ineficaz e fluxo salivar inadequado podem contribuir para a aceleração da doença (Struzycka, 2014; Yildiz *et al.*, 2016).

Embora alguns fatores estejam associados à cárie, a frequência e a quantidade de açúcares consumidos desempenham um papel crítico no desenvolvimento da doença (Takahashy e Nyvad 2011; Tanner *et al.*, 2016). Estudos mostram que indivíduos que consomem uma dieta rica em açúcar possuem um biofilme dental com um maior espectro de bactérias acidogênicas e tolerantes a ácidos (Tanner *et al.*, 2016; Mitrakul *et al.*, 2017). Desta forma, o consumo frequente de carboidratos fermentáveis têm mostrado uma forte influência na ecologia do biofilme dental e no desenvolvimento de cárie (Anderson *et al.*, 2018). Historicamente, a dieta está correlacionada com a cárie, o início do cultivo e consumo de cereais (cerca de 12.000 anos atrás) e a disponibilidade de grãos e açúcar refinados (revolução industrial) afetaram a microbiota bucal para uma configuração associada à cárie (Adler *et al.*, 2013). Esta influência ocorre porque a fermentação dos hidratos de carbono pelas bactérias, resulta na produção de ácidos (lático, acético, propiônico e fórmico), gerando um pH ácido abaixo do “valor crítico” de dissolução de substratos dentários (5,5 para hidroxiapatita, 4,5 para fluoroapatita e 6,7 para cimento) pelo aumento da concentração de íons de hidrogênio. A consequente subsaturação de cálcio e fosfato (hidroxiapatita) do biofilme oral ocasiona um processo de desmineralização dos tecidos dentários. Se os ataques ácidos forem muito frequentes ou tiverem maior duração em relação aos períodos de pH neutro, a cárie poderá se desenvolver (Struzycka, 2014; Yildiz *et al.*, 2016).

A estrutura dentária desmineralizada (des) pode ser remineralizada (re) quando a produção de ácidos diminui (substratos esgotados) ou através da neutralização dos

ácidos, por meio de agentes tamponantes extrínsecos à placa dentária como, o cálcio, fosfato e fluoretos. A saliva tem grande importância neste processo, pelo seu fluxo, composição (mineral) e reservatório de fluoretos protegendo a estrutura dentária (Fejerskov, 2004; Gao *et al.*, 2018; Zhan, 2018)

O equilíbrio des-re é a chave para iniciação, progressão ou reversão da cárie dentária. Ocorrendo um desequilíbrio no processo des-re (des>re) uma lesão irreversível poderá surgir. Em nível clínico, a cárie inicia-se com a mancha branca no esmalte (desmineralização), podendo avançar e levar à cavitação do esmalte (cárie de esmalte), que poderá progredir e atingir a dentina (cárie de dentina) (Takahashi e Nyvad, 2011; Takahashi e Nyvad, 2016) (Figura 5).

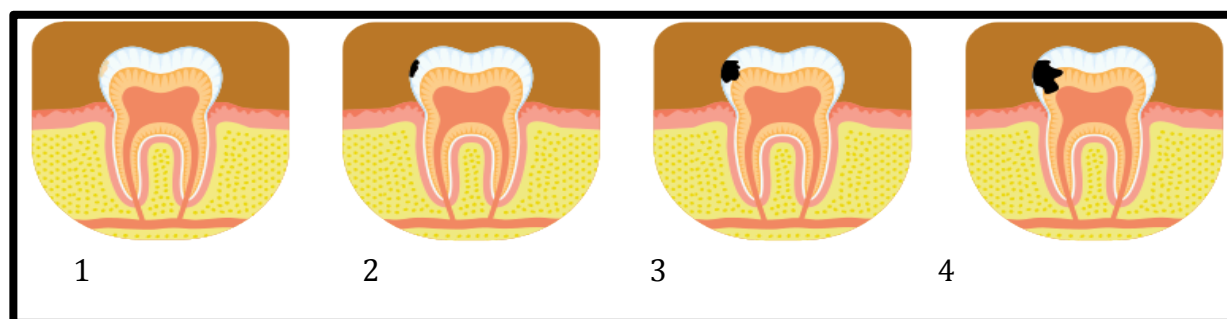


Figura 5. Estágios do desenvolvimento da cárie dental. A cárie inicia-se com uma mancha branca (1), podendo evoluir levando à cavitação no esmalte dental (2) e posteriormente atingir a dentina, caracterizando uma lesão dentinária (3 e 4). Fonte: Própria.

A cárie dentária pode ser diagnosticada clinicamente em seus estágios iniciais (lesões em esmalte) ou em estágios mais avançados (cavitação na dentina). Entretanto, tão importante quanto a detecção da doença é a avaliação da atividade da cárie (Chole *et al.*, 2019), pois permite identificar quando o processo está em progressão, ou seja a doença está em curso.

2.3.1 Cárie de dentina

A dentina é um substrato de origem conjuntiva, mineralizado e que constitui a maior parte da estrutura do dente, sendo recoberta pelo esmalte na porção coronária (Figura 6). É composta aproximadamente de 70% de hidroxiapatita, 18% de material

orgânico e 12% de água. A matriz orgânica da dentina é formada de fibrilas colágenas e substância fundamental interfibrilar (Katchburian e Arana, 1999).

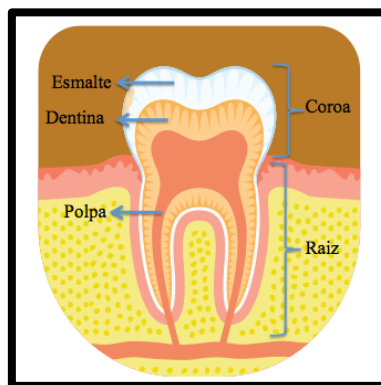


Figura 6. Esquema simplificado da estrutura dentária. Fonte: Própria

A cárie dentinária envolve tanto a desmineralização quanto a degradação do colágeno e, como a cárie de esmalte, pode ser classificada em lesão ativa ou inativa, que correspondem a um processo de progressão ou paralisação, respectivamente (Takahashi e Nyvad, 2016). Nas lesões ativas as cavidades dentinárias apresentam uma consistência amolecida de cor branca/amarela, aspecto úmido, com pH ácido, enquanto nas cavidades cariosas dentinárias inativas a dentina é dura, pigmentada/escura, aspecto seco e com um pH fracamente ácido, o que indica uma tendência à remineralização (Takahashi e Nyvad, 2016) (Figura 7).

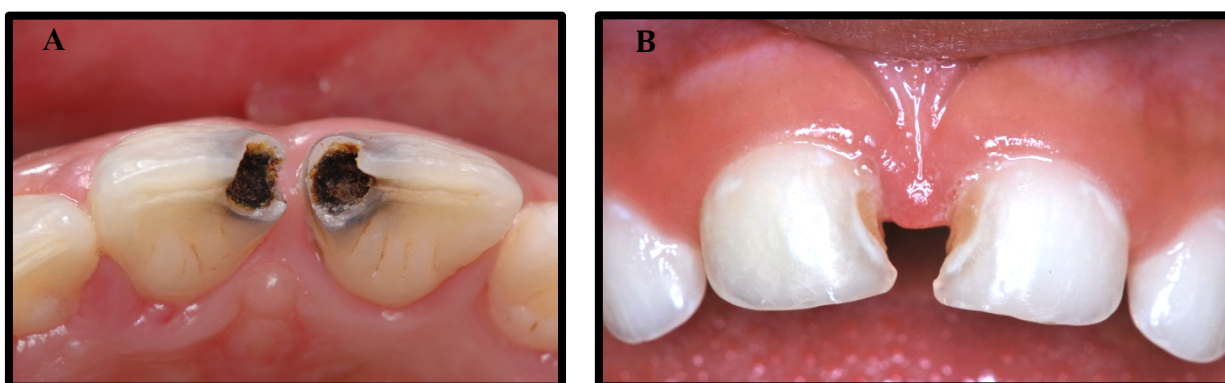


Figura 7. Aspecto clínico de lesões de dentina inativa (A) e ativa (B). Fonte: Própria.

A avaliação da atividade é essencial para a escolha do tratamento correto, pois as lesões ativas podem ser paralisadas quando o fator etiológico é removido. Para isso, a dieta com baixa exposição a carboidratos fermentáveis, o controle do biofilme e presença de flúor na cavidade bucal apresentam grande importância no controle da doença, principalmente a manutenção do pH do biofilme acima de um nível crítico (4,5 ou 5,5). No entanto, a análise da gravidade da lesão é fundamental para decidir quando intervir cirurgicamente com uma restauração dentária (Slayton *et al.*, 2016).

Com risco reduzido e controle efetivo da doença, algumas lesões de cárie não progridem ou podem ser detidas pelo processo de remineralização. Na cárie inativa, as lesões remineralizadas apresentam superfícies altamente mineralizadas com colorações escuras e muitas vezes indesejáveis. Tal coloração ocorre devido à incorporação de pigmentos durante o processo de remineralização e não requer tratamento restaurador, a menos que afete a forma, a função ou a estética do dente (Chole *et al.*, 2019).

Apesar de os aspectos clínicos que distinguem as lesões dentinárias ativas e inativas, as diferenças nas microbiotas entre essas cavidades ainda não foram completamente elucidadas (Takahashi e Nyvad, 2016).

2.3.2 Aspectos microbiológicos da cárie

A cárie dentária não pode ser considerada uma doença infecciosa em termos clássicos, mas sim consequência de uma microbiota característica (Mira, 2018). O conceito de microbiota associada à cárie dentária tem recebido significativa atenção nos últimos anos (Obata *et al.*, 2014). Portanto, entender a microbiologia da cárie dentária não é um mero exercício acadêmico; também fornece a base para a prevenção, o diagnóstico e as estratégias de tratamento (Mira, 2018).

Os micro-organismos cariogênicos têm como características: metabolizar açúcares (sacarose, glicose, frutose lactose e amido), produzir ácidos orgânicos (acidogênicos), sobreviver em condições de baixo pH (acidúricos) bem como produzir polissacarídeos extracelulares (PEC) e intracelulares (PIC) (Selwitz *et al.*, 2007; Gao *et al.*, 2016).

Durante a progressão, a diversidade microbiana da cárie sofre alterações. A frequência do consumo de açúcares resulta no aumento da acidificação do biofilme dental, levando à proliferação de cepas acidogênicas e acidúricas de forma adaptativa e à supressão de espécies sensíveis ao ácido, ou seja, à medida que a cárie progride, o

ambiente ácido é estabelecido e bactérias inicialmente cultivadas em pH 7 são mortas por estresse ácido (Simon Soro *et al.*, 2014; Jiango *et al.*, 2014). Portanto, a cárie dentária transcorre quando membros acidogênicos da microbiota bucal obtém uma vantagem ecológica e seletiva sobre outras espécies, perturbando o equilíbrio homeostático do biofilme e iniciando o processo da doença (Fejerskov, 2004; Philip *et al.*, 2018). As bactérias relacionadas à cárie aumentam, e bactérias benéficas são reduzidas, transformando uma placa bacteriana não cariogênica em cariogênica (Lin *et al.*, 2017; Philip *et al.*, 2018).

A composição bacteriana varia entre lesões de esmalte e dentina. Calcula-se que as lesões cariosas contenham de 100 a 200 filotipos diferentes. Estudos de metatranscriptômica revelaram que *Streptococcus* spp., *Veillonella* spp., *Rothia* spp. e *Leptotrichia* spp. estão em níveis mais altos em cárie de esmalte e *Streptococcus sanguinis*, *Atopobium* spp., *Schlegelella* spp., *Pseudoramibacter* spp. e *Lactobacillus* spp. estão associados à cárie de dentina (Gross *et al.*, 2012; Simon Soro *et al.*, 2014; Simon Soro e Mira, 2015).

Fungos como *Candida albicans* também fazem parte do microbioma da cárie e podem aumentar a virulência cariogênica dos biofilmes. Com relação aos vírus, sua presença ainda precisa ser elucidada (Simon Soro e Mira, 2015; Tanner *et al.*, 2016).

Técnicas de sequenciamento e metagenômica demonstraram que *S. mutans* é responsável por apenas 0,02% dos micro-organismos viáveis na cárie de dentina (Gross *et al.*, 2012; Simon Soro *et al.*, 2013; Simon Soro e Mira, 2015). Os *Lactobacillus* spp. têm sido apontados como bom indicador de risco de cárie dentinária (Young e Featherstone, 2013; Obata *et al.*, 2014). Após o estabelecimento da lesão, eles contribuem para progressão da doença, sendo detectados com maior frequência em lesões de cárie de dentina (Obata *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2015), quando há um aumento da gravidade da doença e frequência da acidificação do biofilme (Takahashi e Nyvad, 2008; Obata *et al.*, 2014).

2.3.3 Prevenção da cárie dentária

A natureza polimicrobiana da cárie dentária deve ser lembrada ao se projetar diagnósticos, estratégias preventivas e abordagens terapêuticas contra a doença (Mira *et al.*, 2018). Terapias antimicrobianas são ineficazes no tratamento da cárie e outras

doenças polimicrobianas que não seguem os postulados clássicos de Koch (Simom Soro e Mira, 2015).

O controle da cárie dentária permanece dependente em grande parte da higiene oral mecânica, duas vezes por dia sob a forma de escovação com dentifrícios fluoretados, abordagem preventiva que está em vigor há mais de 50 anos. O uso de produtos à base de flúor foi responsável pelas reduções significativas na prevalência de cáries em países desenvolvidos na segunda metade do século XX. No entanto, a cárie não tratada ainda continua a ser a doença humana mais comum no mundo (Fejerskov, 2004; Philip *et al.*, 2018).

A alta prevalência da cárie mesmo em populações conscientes onde os indivíduos geralmente escovam seus dentes com dentifrícios fluoretados é preocupante e ressalta a necessidade de desenvolver novas medidas preventivas sinérgicas ou complementares ao flúor (Philip *et al.*, 2018).

O metabolismo do açúcar foi identificado como um elemento central, que distingue saúde e doença cárie. A diminuição da exposição à sacarose e outros substratos fermentáveis é particularmente difícil de alcançar na sociedade atual, onde os alimentos cariogênicos estão amplamente disponíveis. Além disso, a restrição da ingestão de sacarose por si só é improvável prevenir completamente a cárie dentária se, a ingestão frequente de amidos persistir. Portanto, minimizar os fatores etiológicos que contribuem para a doença ainda é um grande desafio (Philip *et al.*, 2018; Solbiati e Frias-Lopez, 2018).

O enfoque histórico na prevenção e gestão oral da cárie está na eliminação da placa dentária dos dentes. Contudo, a evolução contemporânea está cada vez mais destacando os aspectos benéficos do microbioma bucal saudável. A microbiota de placa comensal tem uma relação simbiótica com o hospedeiro, não apenas agindo como uma barreira para patógenos oportunistas, mas também realizando processos metabólicos benéficos (Kilian *et al.*, 2016). Uma abordagem ecológica na prevenção da cárie, pode potencialmente preservar os efeitos favoráveis do microbioma bucal residente, reduzindo os fatores de virulência de micro-organismos cariogênicos que são responsáveis pela disbiose do biofilme dental (Philip *et al.*, 2018).

Um alternativa para tratar ou prevenir a disbiose microbiana relacionada à cárie poderia ser através do aumento do crescimento e sobrevivência da microbiota bucal associada à saúde (Twetman e Keller, 2012). Neste contexto, o uso de bactérias probióticas como moduladores do ecossistema bucal ganhou interesse nas últimas

décadas (Zaura *et al.*, 2018). No entanto, o emprego de probióticos não tem sido eficaz na redução de taxas de cárie (Cagetti *et al.*, 2013) e os dados ainda são insuficientes e inconsistentes para recomendar o uso de probióticos no controle da doença (Vuotto *et al.*, 2014; Gruner *et al.*, 2016). Ademais, a confiança efetiva deste tratamento é limitada, sendo necessários estudos clínicos de longo prazo e pesquisas que investiguem o efeito dos probióticos sobre a composição do microbioma bucal com métodos baseados em DNA/RNA (Zaura *et al.*, 2018).

Futuras estratégias preventivas podem incluir a inibição de sinais de comunicação intercelular, de compostos de adesão e da redução do pH. A perturbação de moléculas de adesão pode ser uma estratégia para prevenir ou modular a ligação de micro-organismos cariogênicos ao dente (Simón Soro e Mira, 2015).

Cabe destacar que a restauração dentária, procedimento mais comumente utilizado para a recuperação de dentes cariados cavitados, não altera a disbiose do microbioma bucal, o que pode levar ao desenvolvimento de cáries contínuas, adjacentes às restaurações existentes, em populações de alto risco como as crianças (Simon Soro e Mira, 2015; Zhan, 2018).

2.4 Cárie da primeira infância (CPI)

A CPI é um sério problema de saúde pública (Li *et al.*, 2105), sendo uma das doenças mais prevalentes do mundo com um incidência de 1,76 bilhão, em crianças com dentes decíduos (Vos *et al.*, 2016). No Brasil, a prevalência de cárie em crianças entre 18 e 36 meses é de 27% (Brasil, 2004) e aos 5 anos de idade, uma criança brasileira possui, em média 2,43 dentes cariados e destes, menos de 20% estão restaurados. Na região Nordeste, este índice ainda é maior, 2,89 dentes apresentam cárie (Brasil, 2010).

Curiosamente, a CPI não se limita a países subdesenvolvidos (Colak *et al.*, 2013; Meyer e Enax, 2018). Nos EUA, aproximadamente 23% das crianças de 2 a 5 anos apresentam cárie dentária em dentes decíduos (Dye *et al.*, 2015), a Austrália mostra uma prevalência de cárie acima de 50% (Chrisopoulos *et al.*, 2016) e na Grécia a prevalência chega a 36% (Oulis *et al.*, 2012).

A CPI é difundida mundialmente pelo termo “Early Childhood Caries” (ECC) e o seu sinal clínico inicia-se com manchas brancas e opacas nos dentes ao longo da margem gengival, seguindo pelos primeiros molares. Nesta fase, somente o esmalte dentário é afetado e o tratamento consiste na mudança de hábitos alimentares, reforço da

higiene bucal e aplicação tópica de flúor. A evolução desta doença é rápida e progressiva e consistirá no aparecimento de cavidades com perda de estrutura dentária que, se não for tratada, atinge a dentina e posteriormente a polpa do dente (Jayakumar *et al.*, 2011; AAPD, 2014; Mitrakul *et al.*, 2017).

O esmalte dos dentes decíduos é formado em um período significativamente mais curto (24 meses) do que os dentes permanentes (até 16 anos). A consequência do menor tempo de desenvolvimento do esmalte dental é a formação de um esmalte muito fino (metade da espessura do que o dos dentes permanentes) e uma microestrutura menos organizada. Como consequência, os ácidos são capazes de desmineralizar o esmalte de dentes decíduos mais rapidamente que o esmalte de dentes permanentes (Guedes *et al.*, 2014; Meyer e Enax, 2018).

Vale ressaltar que a progressão da cárie em crianças é preocupante, pois a cárie é o fator de risco mais importante para o desenvolvimento de novas lesões de cárie. Assim, crianças com lesão ativa de cárie em sua dentição decídua também podem apresentar lesões de cárie em sua dentição permanente (Guedes *et al.*, 2014).

E embora não seja uma doença potencialmente fatal, a CPI pode afetar a qualidade de vida das crianças, resultando não apenas em dor localizada, mas também pode reduzir o crescimento e desenvolvimento, devido ao consumo insuficiente de alimentos e ao desconforto alimentar causado pelos dentes cariados (Colombo *et al.*, 2017).

Ademais, dentes decíduos cariados não tratados podem afetar as crianças fisicamente e psicologicamente, influenciando na comunicação, nutrição, sono, bem como na socialização, aprendizado, concentração e redução da auto-estima (Colak *et al.*, 2013).

Fatores socioeconômicos e comportamentais como o nível de escolaridade dos responsáveis, renda familiar, tabagismo passivo, alimentação noturna (mamadeira ou leite materno), frequência alimentar noturna (2x por mais de 15 min) e desmame tardio (1 a 3 anos) podem influenciar a CPI (Jayakumar *et al.*, 2011; Colak *et al.*, 2013; Colombo *et al.*, 2017; Mitrakul *et al.*, 2017). Além dos fatores socioeconômicos e comportamentais, a presença de micro-organismos acidogênicos/acidúricos contribuem para o risco da ocorrência e gravidade do quadro clínico da CPI. Crianças com CPI são colonizadas prematuramente por micro-organismos cariogênicos que são responsáveis pela mudança bioquímica, particularmente pela produção de ácido na superfície do dente

e conseqüentemente, são essenciais para o desenvolvimento da CPI (Selwitz *et al.*, 2007; Colombo *et al.*, 2017).

A placa dental presente no esmalte dental clinicamente sadio de crianças consiste, principalmente, de *Streptococcus* spp. e *Actinomyces* spp. Com uma dieta pobre em açúcar, estes micro-organismos vivem como comensais em um ambiente de homeostase controlando um ao outro. Assim que os açúcares, especialmente alimentos e bebidas açucarados, são consumidos, a microbiota da placa comensal absorverá esses sacarídeos e os metabolizará em ácidos, principalmente ácido láctico (Takahashi e Nyvad, 2011; Meyer e Enax, 2018).

Crianças com CPI apresentam um alto nível de *Lactobacillus* spp. (Mitrakul *et al.*, 2017). Dentre os *Lactobacillus* spp., o grupo *L. casei* é preponderante em biofilmes de crianças com CPI (Badet e Thebaud 2008; Neves *et al.*, 2017).

Futura intervenção e tratamento da CPI será mais eficaz com a adequada identificação das espécies de *Lactobacillus*, suas especificações genéticas e características fisiopatológicas associadas à CPI. É importante destacar que a existência de uma ligação entre diferentes espécies de *Lactobacillus* e CPI precisa ainda ser elucidada (Li *et al.*, 2015).

2.5 *Lactobacillus* x Cárie

Lactobacillus spp. são bactérias Gram-positivas, geralmente imóveis, não formadoras de esporos e produzem ácido láctico como produto principal ou único do metabolismo fermentativo (Ahirwar *et al.*, 2017). A classificação das bactérias ácido-láticas em diferentes gêneros baseia-se largamente na morfologia, fermentação da glicose, capacidade de produzir ácido láctico e tolerância ao ácido. No entanto, a classificação do gênero *Lactobacillus* ainda permanece incerta devido à dificuldade de classificá-los por testes bioquímicos (Ahirwar *et al.*, 2017).

Embora mais de 150 espécies de *Lactobacillus* tenham sido isoladas de vários locais do corpo humano, plantas, alimentos e meio ambiente, apenas cerca de uma dúzia de espécies foram encontradas na cavidade bucal humana (Li *et al.*, 2015).

A boca de recém-nascidos pode abrigar espécies de *Lactobacillus* desde o nascimento, logo após passar pelo canal vaginal. Os *Lactobacillus* spp. também são encontrados em recém-nascidos alimentados com leite materno, sendo esporadicamente identificados em bebês alimentados com fórmulas. Após o desmame e antes da erupção

dos dentes, os *Lactobacillus* spp. são raramente encontrados na cavidade bucal. O leite materno pode ser a principal fonte de *Lactobacillus* spp. de bebês, pelo menos até os dentes emergirem. Após a erupção dos dentes, a aquisição destes micro-organismos está relacionada à alimentação e à transmissão pela saliva de seres humanos infectados (Holgerson *et al.*, 2013; Vestman *et al.*, 2013; Caufield *et al.*, 2015).

O surgimento dos dentes e das fissuras oclusais originam um ambiente retentivo para a colonização dos *Lactobacillus* spp. presentes nos alimentos. No entanto, o mecanismo determinante para a colonização dos *Lactobacillus* spp na cavidade bucal parece ser a presença de cárie. Crianças livres de cárie geralmente não abrigam níveis notáveis de *Lactobacillus* spp., diferindo das crianças com cárie (Caufield *et al.*, 2015).

A associação entre *Lactobacillus* spp. e cárie dentária remota para o século XX. Os *Lactobacillus* spp. foram relatados como o principal agente etiológico da cárie dentária antes dos anos 50, quando o *S. mutans* começou a dominar a literatura (Badet e Thebaud 2008; Svec *et al.*, 2009; Caufield *et al.*, 2015).

As espécies de *Lactobacillus* encontradas em lesões de cárie apresentam características específicas quando comparadas às características de outros lactobacilos; são mais cariogênicas, produtoras de ácidos fortes, tolerantes ao fluoreto e podem metabolizar o xilitol, manitol e sorbitol (Almståhl *et al.*, 2013; Piwat *et al.*, 2015). Além disso, estas bactérias geralmente estão associadas com a cárie mais avançada e são mais relatadas em crianças do que em adultos (Anderson *et al.*, 2018).

Lactobacillus spp. também tem sido estudado como agente benéfico à saúde bucal atuando como probiótico na prevenção da cárie dental. Pela Organização Mundial de Saúde, os probióticos são: 'micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, são benéficos para a saúde do hospedeiro' (Svec *et al.*, 2009; O'Sullivan *et al.*, 2009; Toh *et al.*, 2013). Pesquisas mostraram que *L. rhamnosus* e *L. paracasei* estão entre as espécies probióticas mais utilizadas e clinicamente pesquisadas na profilaxia da cárie (Lebeer *et al.*, 2007; Cageti *et al.*, 2013; Seminar e Amez *et al.*, 2017; Twetman e Keller 2012; Coqueiro *et al.*, 2018).

A maioria das pesquisas já realizadas avaliam a capacidade destes micro-organismos de se co-agregar com cepas associadas à cárie e reduzir o número de bactérias cariogênicas, especialmente *S. mutans* (Lebeer *et al.*, 2007; Cageti *et al.*, 2013; Seminar e Amez *et al.*, 2017; Twetman e Keller 2012; Coqueiro *et al.*, 2018). A terapia probiótica como prevenção ou combate a doença bucal está apenas começando a evoluir, sendo necessária a consideração de outros fatores que afetam à cárie, como o tipo de

lesão, disponibilidade de carboidratos fermentáveis e a composição bacteriana da cavidade bucal (Vuotto *et al.*, 2014). Desta forma, o uso de probióticos como os *Lactobacillus* spp. para prevenir a cárie dentária ainda é controverso (Vuotto *et al.*, 2014). A colonização por micro-organismos acidogênicos e acidúricos na cavidade bucal pode contribuir para a progressão da cárie. Estudos *in vitro* demonstraram que os *Lactobacillus* spp. diminuem o pH do biofilme e possuem mais atributos cariogênicos que o *S. mutans* (Maltz e Beighton, 2012; Gruner *et al.*, 2016; Schwendicke *et al.*, 2017).

Durante a progressão a cárie pode atingir a dentina, a dentina além de minerais, possui uma porção orgânica de matriz de colágeno do tipo I. Ácidos bacterianos sozinhos não são capazes de desestabilizar a dentina (Hedenbjörk-Lager *et al.*, 2015). Uma vez que o colágeno da dentina é exposto, torna-se alvo para bactérias com atividade colagenolítica que se aderem a proteína colágeno. Várias espécies de *Lactobacillus* mostraram ligação ao colágeno tipo I (McGrady *et al.*, 1995). Caufield *et al.* (2015) encontraram proteínas putativas de ligação ao colágeno no genoma de *L. casei/paracasei*, *L. gasseri*, *L. rhamnosus*, *L. fermentum*, *L. salivarius*, *L. orales* e *L. vaginalis* isolados de crianças com CPI.

Pesquisas relatam uma coexistência entre *Lactobacillus* spp. e cárie em crianças entre 3-4 anos de idade (Badet e Thebaud 2008; Parisotto *et al.*, 2011; Gao *et al.*, 2016). Apesar de numerosas pesquisas relacionando o gênero *Lactobacillus* à cárie em crianças, a compreensão sobre o seu papel nesta doença ainda permanece incompleta. No entanto, *L. rhamnosus* e *L. paracasei* estão entre as espécies mais abundantes de *Lactobacillus* que habitam crianças com CPI parecendo desempenhar um papel importante na progressão da cárie dentária (Badet e Thebaud 2008; Svec *et al.*, 2009; Caufield *et al.*, 2015; Ahirwar *et al.*, 2017).

2.6 O grupo *Lactobacillus casei*

L. rhamnosus, *L. casei* e *L. paracasei* são espécies intimamente relacionadas, tanto filogeneticamente quanto fenotipicamente e são considerados em conjunto como o grupo *L. casei* (Stefanovic *et al.*, 2017).

O grupo *L. casei* faz parte do gênero *Lactobacillus*, que é o maior gênero da família Lactobacillaceae, composto por mais de 170 espécies e 17 subespécies (Toh *et al.*, 2013; Huang *et al.*, 2018). A diferenciação fenotípica das espécies do gênero

Lactobacillus é difícil e geralmente não é confiável, muitas vezes sendo necessária a identificação por meio da biologia molecular (Goldstein *et al.*, 2015).

Este grupo ocupa um conjunto diversificado de nichos ecológicos, sendo comercialmente, encontrados em produtos lácteos (especialmente queijo), vegetais (picles, vinho e etc.) e como probióticos.

Os principais sítios de colonização das espécies do grupo *L. casei* são o intestino, a boca e a vagina. Micro-organismos lácteos introduzidos ao ambiente bucal e intestinal, através de alimentos funcionais, são capazes de evoluir e sobreviver nestes ambientes. A diversidade de nicho entre estas espécies intimamente relacionadas, sugere uma adaptação genética considerável durante sua evolução (Svec *et al.*, 2009; O'Sullivan *et al.*, 2009). A ampla distribuição ecológica das espécies do grupo *L. casei* refletem sua flexibilidade metabólica e aplicação generalizada (Smokvina *et al.*, 2013).

2.6.1 Fisiologia e morfologia

Na cavidade bucal, o grupo *L. casei* está associado à progressão da cárie dentária, ele fermenta a glicose usando fermentação heterolática, produzindo ácido lático. Na prática, os perfis de fermentação a partir da glicose são utilizados para a distinção das espécies do gênero *Lactobacillus* (Sharpe, 1979). No entanto, não é possível identificar as espécies do grupo *L. casei* através deste método.

Esses micro-organismos são Gram-positivos, anaeróbios facultativos e possuem faixas de conteúdo de GC entre 45 e 47 mol%. Contudo, a sua morfologia pode oscilar entre os membros do grupo, incluindo células em forma de bacilos, podendo apresentar extremidades quadradas, isoladas ou em cadeias e com tamanho variando de 0,7 - 1,1 por 2,0 - 4,0 μm (Salvetti *et al.*, 2012; Goldstein *et al.*, 2015).

O Brain Heart Infusion (BHI) Agar suplementado com sangue e o Rogosa Agar são os meios mais utilizados na cultura dos *Lactobacillus* spp., vale ressaltar que o segundo é um meio seletivo. Nestes meios, espécies do grupo *L. casei* podem formar colônias brancas leitosas com cerca de 1 mm de diâmetro. A morfologia das colônias é arredondada, lisa, não transparente e mucóide (Goldstein *et al.*, 2015).

Os membros do grupo *L. casei* são acidogênicos/acidúricos, produzem o H_2O_2 , e bacteriocinas (Li *et al.*, 2017; Ciandrini *et al.*, 2017). A produção do H_2O_2 , é mediada pelo gene *spxB*, através da catalisação e oxidação do piruvato (Zotta *et al.*, 2014).

Ciandrini *et al.* (2017) observaram que cepas de *L. rhamnosus* e *L. paracasei* são capazes de inibir a formação de biofilme de *S. mutans* e *S. oralis*, evidenciando uma diminuição de UFC/mL, bem como a produção de biomassa. Esta atividade inibitória pode estar relacionada com a produção e liberação do H₂O₂ (Reis *et al.*, 2012).

A produção de H₂O₂ pode ser um mecanismo de competição interespecífica no biofilme bucal (Zhu *et al.*, 2014). Ser capaz de lidar com a presença de espécies reativas de oxigênio é uma importante adaptação de nicho (Wuyts *et al.*, 2017). A produção de H₂O₂ pode inibir a síntese de DNA, levando à morte celular, favorecendo a sobrevivência de micro-organismos não adaptados a essas condições ambientais (Teapaisa *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2017). Zhu *et al.* (2014) observaram a expressão de *spxB* em biofilme bucal, sugerindo um papel ativo desse gene na fisiologia do biofilme.

A adesão bacteriana às superfícies representa a primeira etapa para o desenvolvimento do biofilme. O grupo *L. casei* possui um bom grau de adesão, mas uma capacidade limitada de produzir biomassa (Badet e Thebaud 2008; Piwat *et al.*, 2015; Ciandrini *et al.*, 2017). A adesão também é o primeiro passo para a colonização, levando ao comensalismo ou doenças infecciosas aos tecidos do hospedeiro. A adesão bacteriana depende de interações reversíveis ou irreversíveis. O estágio inicial e reversível é mediado por um complexo de interações físico-químicas, incluindo hidrofobicidade. A hidrofobicidade da superfície celular microbiana, apesar de ser uma interação inespecífica, é um dos fatores determinantes da adesão bacteriana em superfícies. Algumas cepas de *L. paracasei* e *L. rhamnosus* mostram um alto nível de hidrofobicidade na placa dentária (Badet e Thebaud 2008; Toh *et al.*, 2013; Rintahaka *et al.*, 2014; Nadkarni *et al.*, 2014).

O *L. paracasei* e *L. rhamnosus* têm boa capacidade de adesão ao colágeno e podem formar biofilmes (Lebeer *et al.*, 2012; Smokvina *et al.*, 2013, Toh *et al.*, 2013, Miljkovic *et al.*, 2015). Nota-se que a adesão à mucosa é mediada por fimbrias ou pili (von Ossowski *et al.*, 2010). Pili são apêndices protéicos superficiais (pilina), delgados, alongados e heteroméricos (Rintahaka *et al.*, 2014). O papel funcional do pili é essencialmente facilitar a adesão celular ao “primeiro contato” e estruturalmente o pili de *L. rhamnosus* e *L. paracasei* é semelhante aos de patógenos Gram-positivos (Toh *et al.*, 2013; Rintahaka *et al.*, 2014).

Estudos mostraram uma correlação entre adesão, características superficiais e agregação de cepas de *L. paracasei* da cavidade bucal. Porém, não está claro o

mecanismo de adesão dessas bactérias na estrutura dentária (Piwat *et al.*, 2015; Ciandrini *et al.*, 2017).

Nas espécies *L. rhamnosus* e *L. paracasei*, a proteína pilina é codificada por diferentes genes, incluindo *spaC* e *spaE* (Kankainen *et al.*, 2009; von Ossowski *et al.*, 2010; Lebeer *et al.*, 2012; Smokvina *et al.*, 2013, Toh *et al.*, 2013; Rintahaka *et al.*, 2014; Nadkarni *et al.*, 2014). Vale ressaltar, que algumas cepas de *L. casei* não possuem os genes que codificam a proteína pilina (Toh *et al.*, 2013).

A adesão bacteriana também associada é à formação do biofilme (Ciandrini *et al.*, 2017). O desenvolvimento do biofilme no *L. rhamnosus* é fortemente modulado por fatores ambientais, como baixo pH e provavelmente mediado por vias genéticas (Lebeer *et al.*, 2007). Em *L. rhamnosus*, três proteínas podem desempenhar um papel no controle da produção de PEC, entre elas proteína-tirosina fosfatase (gene *wzb*) responsável pela regulação da biossíntese da substância polimérica extracelular (EPS) (Lebeer *et al.*, 2007; Nadkarni *et al.* 2014). A produção de EPS influencia nas propriedades de adesão do biofilme dental (Badet e Thebaud, 2008). Assim, é plausível que espécies de *Lactobacillus* associados à cárie dentinária, em especial a CPI, possuam elementos genéticos específicos para a adesão, formação de biofilme e produção de agente biocida.

3 HIPÓTESES

1. As espécies *L. paracasei* e *L. rhamnosus* e o grupo *L. casei* fazem parte da comunidade bacteriana metabolicamente ativa de cárie dentinária de crianças com CPI.
2. *L. paracasei* e *L. rhamnosus* estão associados à atividade de cárie dentinária.
3. Uma menor expressão dos genes *wzb*, *spxB*, *spaC* e *spaE* será observada em lesões dentinárias inativas.

4 OBJETIVOS GERAIS

Analisar a expressão de genes, bem como detectar e quantificar células metabolicamente ativas de *Lactobacillus paracasei* e *Lactobacillus rhamnosus* presentes em lesões dentinárias ativa e inativa de crianças com CPI.

4.1 Objetivos específicos

- Verificar e mensurar a presença de células do grupo *L. casei* metabolicamente ativas em cárie ativa e inativa de dentina de crianças com CPI;
- Analisar a expressão dos genes *spaC* e *spxB* na espécie *L. paracasei* e *spaE* e *wzb* em *L. rhamnosus* presentes em lesões de cárie dentinária ativa e inativa de crianças com CPI;
- Examinar a proporção de colonização pelas espécies *L. paracasei*, *L. rhamnosus* e o grupo *L. casei*, em relação às bactérias totais existentes em lesões de cárie dentinária ativa e inativa de crianças com CPI.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Desenho experimental e locais de estudo

Este trabalho foi organizado em três etapas (Figura 8) realizadas em locais distintos. A primeira etapa da pesquisa foi a seleção e exame clínico das crianças com CPI em três escolas públicas localizadas na cidade de Fortaleza/CE, seguida da coleta do substrato dentinário cariado que ocorreu na Clínica de Dentística Restauradora da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem (FFOE/UFC). A etapa de biologia molecular (extração e purificação do RNA e a síntese do cDNA) foi executada no Laboratório de Biologia Molecular do Programa de Pós Graduação em Odontologia (PPGO/UFC). Os desenhos dos *primers*, extração de DNA, PCR e qPCR foram realizadas do Laboratório de Biologia Celular e Molecular da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP) da Universidade estadual de campinas (UNICAMP).

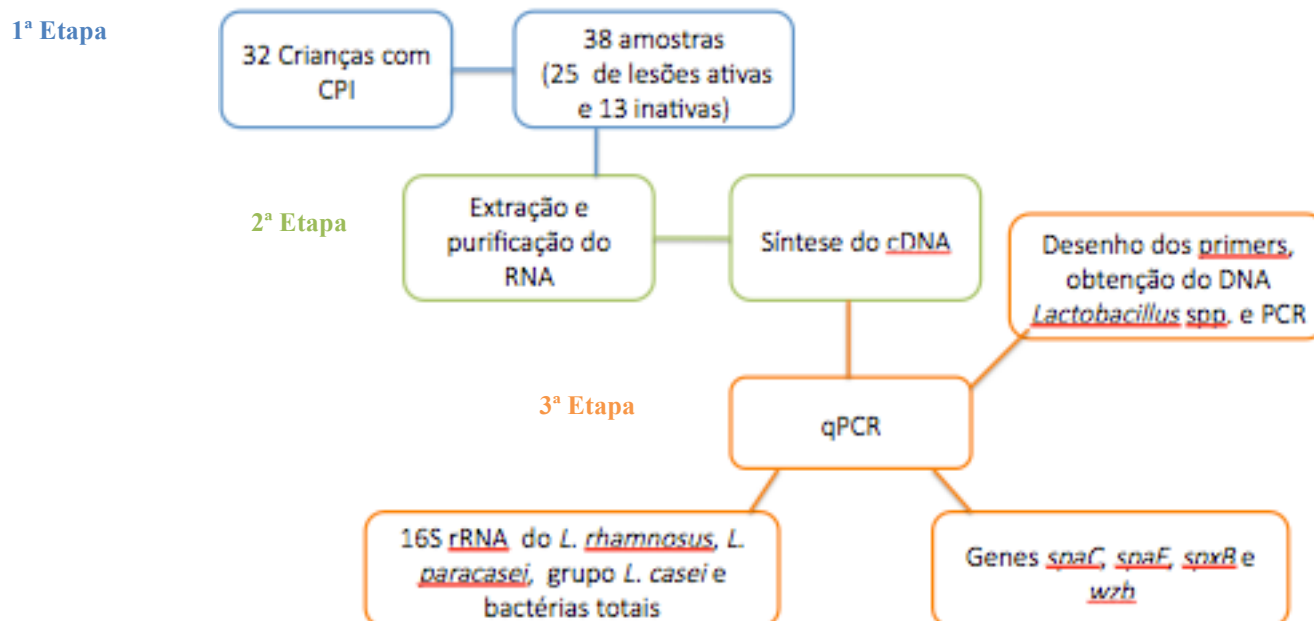


Figura 8. Organograma experimental deste estudo

5.2 Coleta das amostras

As amostras de dentina utilizadas neste estudo foram resultantes de estudo anterior aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da UFC/PROPESQ (protocolo No. 548.405, Ceará, Brasil/Anexo 1) (Bezerra *et al.*, 2016). Vale ressaltar, que a utilização das amostras armazenadas foi aprovada pelo CEP da UFC/PROPESQ (protocolo nº 3.227.777, Ceará, Brasil/Anexo 2).

Em resumo, 32 crianças (menores de 6 anos de idade) de três escolas públicas de Fortaleza (Ceará, Brasil), diagnosticadas com CPI participaram da pesquisa. A atividade de cárie foi avaliada e classificada sob condições padronizadas por dois examinadores calibrados. As amostras de dentina cariada foram coletadas com auxílio de curetas esterilizadas e livres de RNase (SS White Duflex, Rio de Janeiro, RJ). As amostras foram imediatamente transferidas para microtubos estéreis livres de RNase (Axygen, Union City, CA, EUA), contendo solução estabilizadora de RNA (RNAlater™ Ambion Inc., Austin, TX, EUA) e armazenadas a 4 °C por 18h, conforme recomendado pelo fabricante. Após esse período, os tubos foram armazenados a -80 °C até a extração do RNA (Bezerra *et al.*, 2016).

5.3 Extração e purificação do RNA

As amostras de dentina foram processadas de acordo com Bezerra *et al.* 2016. Inicialmente foram descongeladas, centrifugadas ($11.000 \times g/1 \text{ min}/4 \text{ }^\circ\text{C}$) e cuidadosamente transferidas para tubos criogênicos contendo 0,16 g de esferas de zircônia de 0,1 mm de diâmetro (Biospec Products, Bartlesville, OK, EUA). Os tubos foram acomodados em Mini-Beadbeater (Biospec Products Inc., Bartlesville, OK, EUA) para a ruptura mecânica das células bacterianas. Após a lise, 850 μl de tampão RLT (Qiagen, Valencia, CA, EUA) com 10% de β -mercaptoetanol (β -ME) foram adicionados e a suspensão foi centrifugada. Após centrifugação ($11.000 \times g / 2 \text{ min} / 4 \text{ }^\circ\text{C}$), alíquotas de 350 μl do sobrenadante foram submetidas à extração de RNA utilizando o RNeasy Mini Kit™ (Qiagen, Valencia, CA, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. As amostras foram então tratadas com Turbo™ DNase (Applied Biosystems, Ambion, Austin, TX, EUA) para remoção do DNA genômico. A solução de RNA foi purificada novamente usando o kit RNeasy Minielute™ CleanUp (Qiagen, Dus, Bundesland, Alemanha) de acordo com as instruções do fabricante. A concentração de RNA e a

pureza (razões de absorbância: A_{260}/A_{280} e A_{260}/A_{230}) foram medidas usando um espectrofotômetro Nanodrop 2000c (Thermo Scientific, Wilmington, DE, EUA).

5.4 Síntese do DNA complementar (cDNA)

Para a síntese, utilizou-se o kit de síntese de cDNA iScript™ (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, EUA), de acordo com o fabricante. A fim de se obter 35 µl de cDNA, 12 µl de água livre de nucleases, 7 µl de Mix 5x iScript, 1 µl da transcriptase reversa iScript e, aproximadamente, 15 µl de RNA (de acordo com a concentração do RNA) foram misturados e aquecidos. Posteriormente, as amostras de cDNA foram normalizadas a uma concentração de 10 ng/µl e armazenadas em -20° C.

5.6 Desenho e especificidade dos iniciadores (*primers*)

Dois *primers* específicos para a detecção de genes de *Lactobacillus paracasei* foram projetados utilizando Primer3 (http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi) e BLAST® (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), e as sequências genéticas (Tabela 1) foram depositadas no GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Os outros dois genes utilizados nesse estudo (*spaE* e *wzb*) foram previamente descritos por Nadkarni *et al.* (2014). Todos os oligonucleotídeos utilizados nesta pesquisa (Tabela 2) foram sintetizados pela Exxtend (Campinas, SP, Brasil) e as sequências analisadas em PCR *in silico* através das ferramentas BLAST® e Netprimer® (<https://www.premierbiosoft.com/netprimer/>) e testadas experimentalmente com PCR em tempo real com a análise da curva de diluição, coeficiente de correlação (R^2), eficiência e curva de dissociação (especificidade). A especificidade também foi confirmada experimentalmente com reações de PCR convencional. As reações foram padronizadas para cada *primer* e o DNA genômico (obtido de cepas de coleção) foi utilizado como controle positivo (*L. paracasei*: *primers* da Tabela 1 e *L. rhamnosus*: para *spaE* e *wzb*). As amplificações do PCR foram realizadas em um termociclador Veriti™ (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) utilizando 200 µM de dNTPs, 2,5 mM de MgCl₂, 0,3 µM de cada *primer*, 1,25 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e, aproximadamente, 10 ng de DNA genômico, alcançando um volume de 25 µl. As condições térmicas de cada *primer* foram testadas seguindo o

padrão inicial: desnaturação do DNA a 95 °C por 5 min, 35 ciclos a 95 °C por 30 s, anelamento dos primers a 55 °C (para primers da Tabela 1), 58 °C (para *spaE* e *wzb*) e 60 °C (para o grupo *L. casei*, *L. paracasei* e *L. rhamnosus*) por 30 s, extensão a 72 °C por 30 s, e finalização da reação a 72 °C por 5 min. Os produtos de PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose a 2% e tampão Tris-borato-EDTA. O DNA foi corado e visualizado sob iluminação UV (Gel Logic 100 Imaging System, Kodak, Tokyo, Japan).

Tabela 1. *Primers* projetados nesse estudo.

| Gene | Locus | Descrição | Primer | Sequencia 5' - 3' | Produto (pb) |
|-------------|------------|------------------|-------------|---------------------|--------------|
| <i>spxB</i> | LBPG_02063 | Piruvato oxidase | spxBLbp For | GTGCCGACGTTATTTCTTG | 200 |
| | | | spxBLbp Rev | ATCACAACAATCGCAGCTC | |
| <i>spaC</i> | LBPG_02639 | Proteína pilina | spaCLbp For | GGTCAGGGAGAAGCGTACT | 202 |
| | | | spaCLbp Rev | CGGTGTGACGACTTACCAT | |

Tabela 2. Lista de *primers* utilizados.

| Genes | Sequência (5' 3') | Referencias |
|-------------------------|--|---------------------------------|
| <i>Bactéria</i> Total* | F: TCCTACGGGAGGCAGCAGT R: GGA CTACCAGGGTATCTAATCCTGTT | (Nadkarni <i>et al.</i> , 2010) |
| Grupo <i>L. casei</i> * | F: GCGGACGGGTGAGTAACACG R: GCTTACGCCATCTTTCAGCCAA | (Furet <i>et al.</i> , 2004) |
| <i>L. paracasei</i> * | F: GTGCTTGCACCGAGATTCAACATG R: TGCGGTTCTTGGATCTATGCG | (Furet <i>et al.</i> , 2004) |
| <i>L. rhamnosus</i> * | F: GTGCTTGCATCTTGATTTAATTTT R: TGCGGTTCTTGGATCTATGCG | (Furet <i>et al.</i> , 2004) |
| <i>spxB</i> | F: GTGCCGACGTTATTTCTTG R: ATCACAACAATCGCAGCTC | (Este estudo) |
| <i>spaC</i> | F: GGTCAGGGAGAAGCGTACT R: CGGTGTGACGACTTACCAT | (Este estudo) |
| <i>wzb</i> | F: CTTGAACGCTGCACTCATCTC R: CGGATTAACGGTCAGTTGTTAGA | (Nadkarni <i>et al.</i> , 2014) |
| <i>spaE</i> | F: TGGCCGTCAATTAACACAAA R: TATGACGCGTAAGCAAGCAC | (Nadkarni <i>et al.</i> , 2014) |

*16S rDNA

5.5 qPCR

Os *primers* utilizados para a detecção e quantificação do *L. rhamnosus*, *L. paracasei* e do grupo *L. casei* foram desenhados por Furet *et al.* (2004). Os ensaios de qPCR foram realizados para quantificar o gene 16S rRNA do *L. rhamnosus*, *L. paracasei* e do grupo *L. casei*, bem como avaliar o nível de expressão dos genes *spaC*, *spaE*, *spxB* e *wzb*. As curvas padrão foram preparadas utilizando diluições seriadas de 400 ng a 0,0004 ng (limite de detecção) de DNA genômico extraído a partir de *L. paracasei* (ATCC 335) e *L. rhamnosus* (ATCC 53103). Uma curva do padrão da amplificação (*standard amplification curve*) e uma curva de ponto de fusão (*melting-point curve*) foram obtidas para cada par de *primers*. As condições térmicas do qPCR são especificadas na Tabela 3. As reações foram realizadas com o sistema de PCR em tempo real StepOne™ (Applied Biosystems), usando uma placa de 48 poços MicroAmpFast Optical (Applied Biosystems) coberta com filme adesivo (Applied Biosystems). A Cada poço eram adicionados 5 µl de Power SYBR™ Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), 3,4 µl de água isenta de nuclease, 0,3 µl de cada *primer* direto/inverso (*forward/reverse*) e 1 µl de cDNA (10 ng/µl) ou 1 µl de DNA genômico. Os ensaios foram realizados em duplicata e as análises finais foram baseadas na média das duas reações. O controle negativo consistiu de reação sem cDNA. Após o ciclo final de qPCR, foram realizadas análises do limiar do ciclo (*cycle threshold/CT*), os valores da temperatura de fusão (*melting temperature/Tm*), curva de fusão (*melting curve*) e curva padrão (coeficiente de correlação (R^2) e % de eficiência) de todas as amostras amplificadas. A quantificação bacteriana foi considerada negativa, quando seus valores de CT e Tm estavam abaixo do nível de detecção das curvas padrão de DNA (Colombo *et al.*, 2017). As curvas padrão foram usadas para transformar os valores do ciclo de quantificação (*quantification cycle/Cq*) em massa de cDNA amplificado.

Tabela 3. Condições térmicas ideais para qPCR

| Espécies ou genes | Condições térmicas | | | | |
|-------------------------|---------------------------|--------------|------------|------------|--------|
| | pré-aquecimento | desnaturação | anelamento | extensão | ciclos |
| <i>L. rhamnosus</i> * | 50°C, 2 min/ 95°C, 10 min | 95°C, 15 s | 60°C, 30 s | 60°C, 30 s | 40 |
| <i>L. paracasei</i> * | | | | | |
| Grupo <i>L. casei</i> * | 95°C, 10 min | 95°C, 15 s | 60°C, 30 s | 60°C, 30 s | 40 |
| <i>spaC</i> | 95°C, 15 min | 95°C, 15 s | 55°C, 30 s | 60°C, 60 s | 40 |
| <i>spxB</i> | | | | | |
| <i>spaE</i> | 95°C, 15 min | 95°C, 15 s | 58°C, 30 s | 60°C, 60 s | 40 |
| <i>wzb</i> | | | | | |

* Furet *et al.*, 2004

5.6 Análise estatística

Todas as análises foram realizadas por intermédio do programa BioEstat 5.3 (Ayres *et al.*, 2007), considerando um nível de confiança de 95%. Após examinar o padrão de distribuição da amostra (teste de normalidade D'Agostino & Pearson), os dados foram expressos como média e desvio padrão e comparados entre os grupos pelo teste *t* de Student ou teste U de Mann-Whitney, para dados paramétricos ou não paramétricos, respectivamente. Entre os dois tipos de lesões de cárie, quantificação do grupo *L. casei* e expressão do *wzb* foram comparadas com o teste *t* de Student, enquanto o teste U de Mann-Whitney foi utilizado para a dosagem de *L. paracasei*, *L. rhamnosus* e os genes *spxB*, *spaC* e *spaE*. O teste U de Mann-Whitney também foi aplicado para analisar a proporção das espécies *L. paracasei*, *L. rhamnosus* e o grupo *L. casei* em relação as bactérias totais.

6 RESULTADOS

Os resultados mostraram que o grupo *L. casei* e as espécies *L. paracasei* e *L. rhamnosus* fazem parte da comunidade metabolicamente ativa em lesões de cárie dentinária de crianças com CPI, uma vez que esses micro-organismos foram detectados nas 38 amostras (25 de lesões ativas e 13 de inativas) de tecido dentinário, independentemente do tipo de lesão (ativa ou inativa). A proporção do grupo *L. casei* ($p= 0,018$), *L. paracasei* ($p= 0,022$) e *L. rhamnosus* ($p= 0,009$) em relação a dosagem de bactérias totais (TB) foi significativamente maior nas lesões de dentina ativa e é ilustrada na Figura 9.

Além disso, o grupo *L. casei* ($p= 0,004$) e as espécies *L. paracasei* ($p= 0,001$) e *L. rhamnosus* ($p= 0,022$) foram mais abundantes nas lesões dentina ativa (Figura 10).

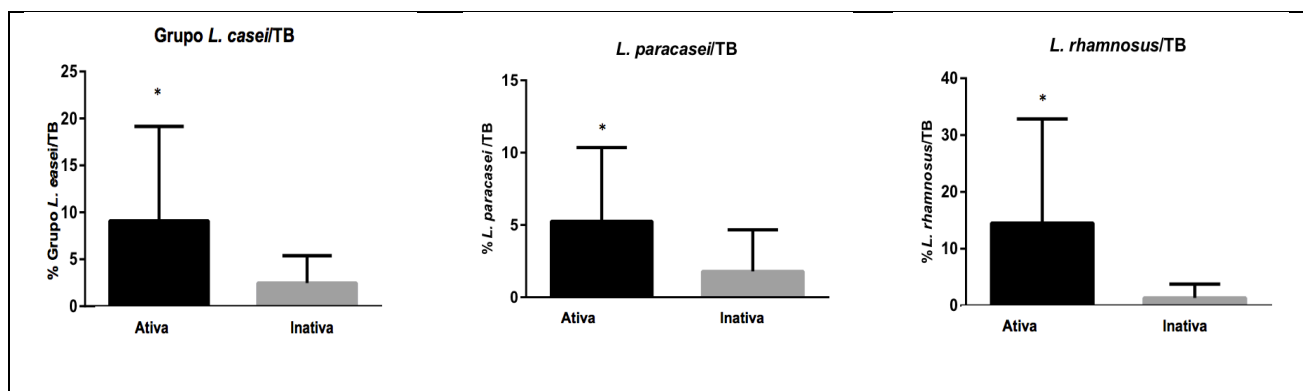


Figura 9. Proporção do grupo *L. casei* e das espécies *L. paracasei* e *L. rhamnosus* em relação ao total de bactérias (TB). Os dados são expressos em barras (média \pm desvio padrão). *Diferença estatística ($p < 0,05$) entre os grupos de acordo com o teste de Mann-Whitney.

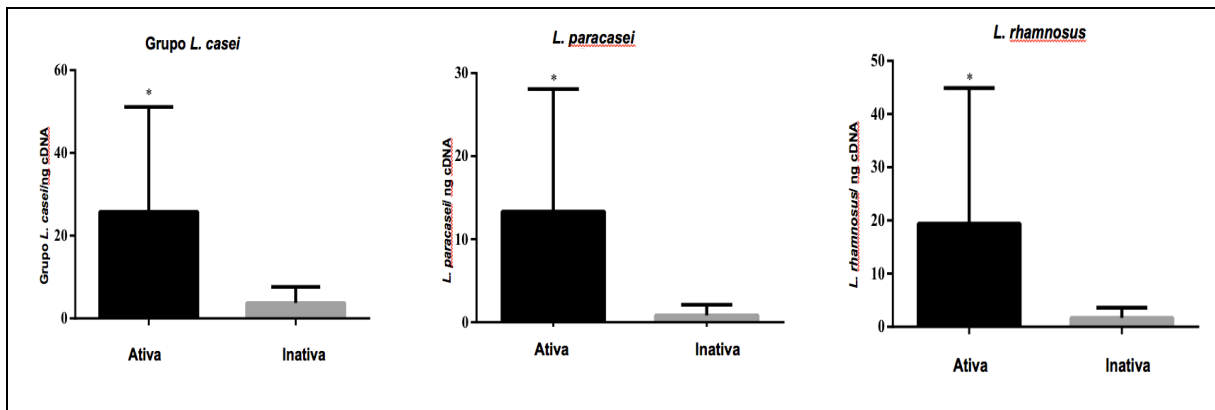


Figura 10. Quantificação do grupo *L. casei* e das espécies *L. paracasei* e *L. rhamnosus* em lesões de cárie dentinária ativa (n= 25) e inativa (n= 13). Os dados estão expressos em barras (média \pm desvio padrão). *Diferença estatística ($p < 0,05$) entre os grupos de acordo com o teste t de Student ou Mann-Whitney.

Os *primers* desenhados neste estudo para avaliar a expressão dos genes *spaC* e *spxB* em *L. paracasei* foram igualmente expressos em lesões ativas e inativas ($p > 0,05$). Para os genes em *L. rhamnosus*, também observa-se uma equivalência do *spaE* em ambas as lesões ($p > 0,05$), no entanto o gene *wzb* apresentou maior expressão em lesões ativas, quando comparada às lesões inativas ($p = 0,006$) (Figura 11).

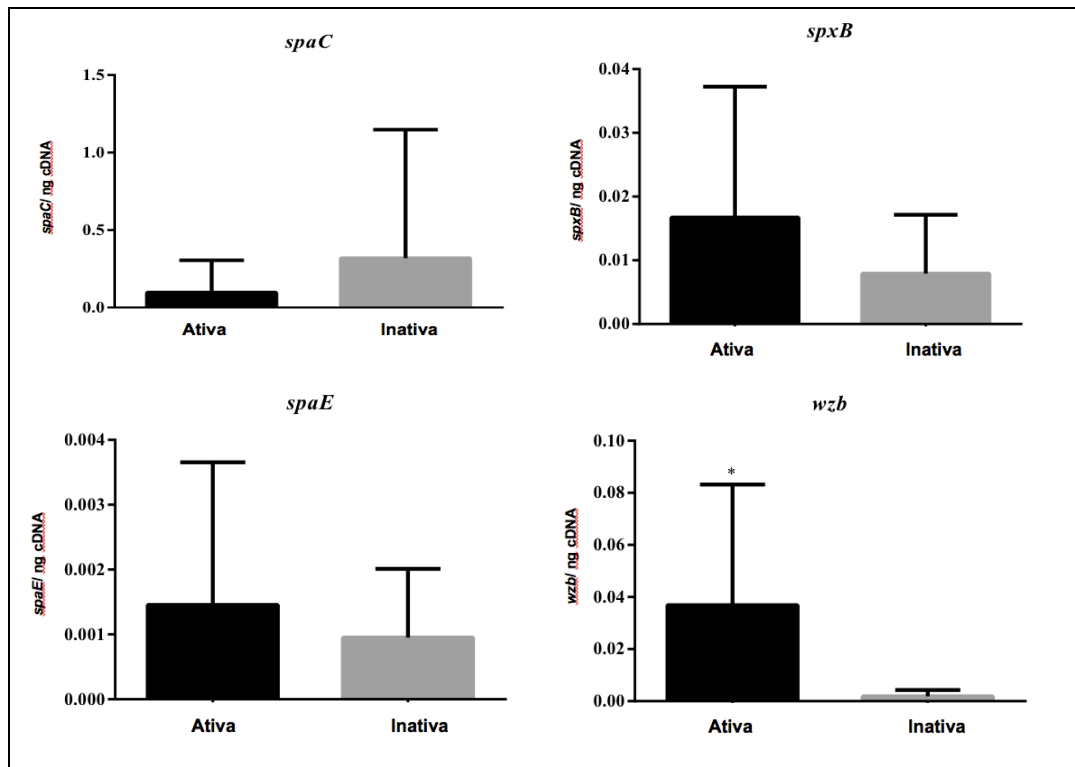


Figura 11. Expressão dos genes *spaC*, *spxB* (*L. paracasei*) *spaE* e *wzb* (*L. rhamnosus*) em lesões de cárie dentinárias ativas (n= 25) e inativas (n= 13). Os dados são expressos em barras (média ± desvio padrão). *Diferença estatística (p <0,05) entre os grupos de acordo com o teste *t* de Student.

7. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos corroboram com estudos prévios que mostraram que *L. rhamnosus*, *L. paracasei* e o grupo *L. casei* são frequentemente isolados de lesões dentinárias de crianças com CPI (Nancy e Dorignac, 1992; Marchant *et al.*, 2001; Švec *et al.*, 2009; Caufield *et al.*, 2015; Takahashi, 2015), constituindo-se como um grupo bacteriano metabolicamente ativo na cárie dentinária e provavelmente relacionado à progressão da cárie (Kneist *et al.*, 2010). A progressão da cárie está associada à acidificação (redução do pH) do biofilme dental o que leva ao aumento da gravidade da doença (Obata *et al.*, 2014; Takahashi e Nyvad, 2016). Esta acidificação resulta na proliferação de cepas acidogênicas e acidúricas (como os membros do grupo *L. casei*) de forma adaptativa e na supressão de espécies sensíveis ao ácido (Jiang *et al.*, 2014; Caufield *et al.*, 2015).

Nesta pesquisa, foi observada uma maior abundância do *L. rhamnosus*, *L. paracasei* e o grupo *L. casei* nas lesões dentinárias ativas, quando comparadas às inativas. Ao analisar DNA de biofilmes de crianças com CPI, Neves *et al.* (2017) obtiveram resultados similares para o grupo *L. casei*. Este resultado era esperado, uma vez que estes micro-organismos possuem um papel crucial na progressão da cárie (Obata *et al.*, 2014; Piwat *et al.*, 2015, Ahirwar *et al.*, 2017). Os *Lactobacillus* spp. fermentam a glicose, produzindo ácido lático (Sharpe, 1979; Salvetti *et al.*, 2012). O ácido lático é o ácido dominante nas lesões ativas da dentina, acarretando os baixos níveis de pH encontrados neste tipo de lesão (Hojo *et al.*, 1994; Takahashi e Nyvad, 2016). Em contraste, as lesões dentinárias inativas apresentam um pH fracamente ácido, o que pode estar relacionado às menores quantidades de *L. paracasei*, *L. rhamnosus* e o grupo *L. casei* em lesões inativas (Shimada *et al.*, 2015; Takahashi e Nyvad, 2016).

Pesquisas sugerem que o uso de cepas probióticas, especialmente *L. rhamnosus* e *L. paracasei*, pode ser benéfico na manutenção da saúde bucal, desempenhando um importante papel como agente antagônico no crescimento de *S. mutans* (Twetman e Keller, 2012; Cagetti *et al.*, 2013; Seminario-Amez *et al.*, 2017; Coqueiro *et al.*, 2018; Pahumunto *et al.*, 2019). No entanto, com o conceito atual da cárie como resultado da disbiose, a redução de um único grupo de bactérias, mesmo sendo considerados patogênicas, faz pouco sentido (Zaura e Twetman, 2019). Além disso, dados clínicos

têm sido apontados como insuficientes para demonstrar a efetividade e confiança destes probióticos no controle da cárie dentária (Twetman e Keller, 2012; Cagetti *et al.*, 2013; Seminário-Amez *et al.*, 2017; Coqueiro *et al.* 2018). A falta de eficácia desta bacterioterapia pode estar atrelada ao fato do *S. mutans* participar da ascensão da cárie, enquanto os *Lactobacillus* spp. são oportunistas favorecidos pelo ambiente ácido criado no início da lesão, já que estes são mais acidúricos que *S. mutans* (Takahashi e Nyvad 2011). Assim, estudos *in vitro*, em que estes micro-organismos são cultivados juntos, parecem não ser uma forma adequada para se testar os efeitos probióticos dos *Lactobacillus* spp. no controle da cárie dentária (Twetman e Keller, 2012), principalmente na cárie dentinária.

Vale ressaltar que embora raras, as infecções como abscessos, associadas a *L. paracasei* e *L. rhamnosus* têm sido relatadas (Salminen *et al.*, 2004, Burns *et al.*, 2007; Chan *et al.*, 2010; Sherid *et al.*, 2016, Pararajasingam e Uwagwu, 2017, Harding-Theobald e Maraj, 2018), demonstrando seu comportamento como patógenos oportunistas.

Cepas de *Lactobacillus* podem produzir e liberar compostos antimicrobianos como peróxido de hidrogênio (H_2O_2) que desempenha um papel antagônico contra os estreptococos do grupo mutans (Szkaradkiewicz-Karpinska *et al.*, 2018). *L. rhamnosus* e *L. paracasei* ocasionaram uma diminuição da formação de biofilmes de estreptococos (*S. mutans* e *S. oralis*) formados *in vitro* (Ciandrini *et al.*, 2017), o H_2O_2 impede o crescimento de outras espécies bacterianas através da inibição da síntese de DNA, atuando como um mecanismo de competição interespecífica em biofilmes orais (Reis *et al.*, 2012; Zhu *et al.*, 2014). Neste estudo, o gene *spxB* foi expresso em lesões dentinárias, apresentando uma tendência numericamente maior em lesões ativas, no entanto, não foi observada diferença estatisticamente significativa entre as lesões de dentina ativas e inativas. Isso pode ser o resultado de uma condição semelhante para os dois tipos de lesões, uma vez que esse gene catalisa a conversão de piruvato em acetilfosfato, CO_2 e H_2O_2 (Zotta *et al.*, 2014; Zhu *et al.*, 2014). Além disso, um estudo recente concluiu que a progressão da cárie dentária parece estar associada a cepas de *Lactobacillus* spp. que não produzem H_2O_2 (Szkaradkiewicz-Karpinska *et al.*, 2018).

O gene *spaC* codifica o pilus, regulando o mecanismo de adesão de *L. paracasei* e *L. rhamnosus*. Este é o principal fator de ligação destas espécies bacterianas, além de estimular a formação de biofilme (Lebeer *et al.*, 2012; Toh *et al.*, 2013; Tripathi *et al.*,

2013, von Ossowski *et al.*, 2013). O gene *spaC* foi igualmente expresso em lesões ativas e inativas, o que sugere que este apêndice celular emprega o mesmo mecanismo de adesão para ambos os tipos de lesões dentinárias (ativas e inativas). O *spaC* está posicionado na ponta pilus e tem mais habilidades adesivas que o gene *spaE*, relatado como uma subunidade secundária localizada na base do pilus (von Ossowski *et al.*, 2010). Considerando que os presentes achados mostraram valores de expressão muito baixos para o *spaE*, quando comparados ao gene *spaC*, é possível que o primeiro não tenha atingido níveis mensuráveis de atividade nos dois tipos de lesões. Como não há diferenças estatisticamente significativas para os valores de expressão relacionados a ambos os genes de adesão, nenhuma relação pode ser sugerida para os genes *spaC* e *spaE* em *L. paracasei* e *L. rhamnosus* presentes em lesões de cárie dentinárias.

Por outro lado, o gene *wzb*, mesmo apresentando valores baixos, mostraram uma maior expressão em lesões dentinárias ativas. Desta maneira, pode-se pressupor que a regulação da biossíntese de EPS (função do *wzb*) (Lebeer *et al.*, 2007; Nadkarni *et al.*, 2014) é mais relevante em lesões ativas. Este resultado era esperado porque a presença de biofilmes conciso está mais associada ao desenvolvimento de cárie inativa (Cury e Tenuta, 2009; Maltz *et al.*, 2010). Além disso, é importante notar que o processo inverso está relacionado a lesões ativas, uma vez que a progressão da cárie está fortemente associada à presença de biofilme dental (Wolff e Larson, 2009). Pesquisas utilizando isolados clínicos de *L. rhamnosus* provenientes de polpa dentária, mostraram que o silenciamento da expressão de *wzb* resultou numa maior redução na formação de biofilme e que o biofilme de *L. rhamnosus* é intensamente modulado por fatores ambientais, como baixo pH (Lebeer *et al.*, 2007; Lebeer *et al.*, 2012; Nadkarni *et al.*, 2014) comumente encontrado em lesões de dentina ativa (Hojo *et al.*, 1994). Até onde se sabe, o presente estudo é o primeiro que mostrou a expressão deste gene em cárie dentinária.

As espécies do grupo *L. casei* ocupam vários nichos ecológicos, como o trato gastrointestinal humano, a vagina e a cavidade oral (O'Sullivan *et al.*, 2009; Salvetti *et al.*, 2012; Caufield *et al.*, 2015; Goldstein *et al.*, 2015). Este estudo demonstrou que genes descritos em cepas probióticas (Lebeer *et al.*, 2007; von Ossowski *et al.*, 2010; Rintahaka *et al.*, 2014; Savo Sardaro *et al.*, 2016) são expressos em isolados clínicos de *L. paracasei* e *L. rhamnosus*. Assim, é possível que micro-organismos de produtos

lácteos/probióticos sejam capazes de sobreviver na boca (Marchant *et al.*, 2001; Wolff e Larson, 2009) e estar associados à progressão da cárie.

8. CONCLUSÕES

O grupo *L. casei* e as espécies *L. paracasei* e *L. rhamnosus* fazem parte da comunidade metabolicamente ativa da cárie dentinária de crianças com CPI.

L. paracasei e *L. rhamnosus* e o grupo *L. casei* são mais abundantes na cárie dentinária ativa.

A maior expressão do gene *wzb* nas lesões ativas pode estar associada à maior virulência dos micro-organismos presentes nas lesões com processos progressivos de cárie.

Este é um estudo pioneiro, utilizando cDNA para a detecção e quantificação do gene *wzb* em amostras clínicas.

REFERÊNCIAS

- Aas JA, Griffen AL, Dardis SR, Lee AM, Olsen I, Dewhirst FE, Leys EJ, Paster BJ. Bacteria of dental caries in primary and permanent teeth in children and young adults. *J Clin Microbiol.* 2008;46:1407-1417.
- Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE. Defining the Normal Bacterial Flora of the Oral Cavity. *J Clin Microbiol.* 2005;43:5721–5732.
- Adler CJ, Dobney K, Weyrich LS, Kaidonis J, Walker AW, Haak W, Bradshaw CJ, Townsend G, Soltysiak A, Alt KW, Parkhill J, Cooper A. Sequencing ancient calcified dental plaque shows changes in oral microbiota with dietary shifts of the Neolithic and Industrial revolutions. *Nat Genet.* 2013;45:450-5.
- Ahirwar, SS, Gupta MK, Gupta G, Singh V. Screening, Isolation and Identification of Lactobacillus Species from Dental Caries of Children. *Int J Curr Microbiol App Sci.* 2017;6:497-503.
- Almståhl A, Lingström P, Eliasson L, Carlén A. Fermentation of sugars and sugar alcohols by plaque Lactobacillus strains. *Clin Oral Investig.* 2013;17:1465-70.
- American Academy of Pediatric Dentistry: policy on early childhood caries (ECC): classifications, consequences and preventive strategies. *Pediatric Dentistry.* 2014;36:50-52.
- Anderson AC, Rothballer M, Altenburger MJ, Woelber JP, Karygianni L, Lagkouvardos I, Hellwig E, Al-Ahmad A. In-vivo shift of the microbiota in oral biofilm in response to frequent sucrose consumption. *Sci Rep.* 2018;21:14202
- Ayres M, Ayres Junior M, Ayres DL, Santos AS. *BioEstat 5.0: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas.* Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá: MCT, IDSM, CNPq; 2007. 5th ed; 364 p.

Badet C, Thebaud NB. Ecology of lactobacilli in the oral cavity: a review of literature. *Open Microbiol J.* 2008;2:38-48.

Berger D, Rakhamimova A, Pollack A, Loewy Z. Oral Biofilms: Development, Control, and Analysis. *High Throughput.* 2018; 31: 7.

Bezerra DS, Stipp RN, Neves BG, Guedes SFF, Nascimento MM, Rodrigues LKA. Insights into the virulence traits of *Streptococcus mutans* in dentine carious lesions of children with early childhood caries. *Caries Res.* 2016;50:279-287.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Projeto SB Brasil 2003: condições de saúde bucal da população brasileira 2002-2003: resultados principais / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica. – Brasília: Ministério da Saúde, 2004.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. SB Brasil 2010: Pesquisa Nacional de Saúde Bucal: resultados principais / Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. – Brasília : Ministério da Saúde, 2012.

Burns D, Hurst JR, Hopkins S, Patch D, Burroughs AK, Agarwal B. *Purpura fulminans* associated with *Lactobacillus paracasei* liver abscess. *Anaesth Intensive Care.* 2007;35:121-123.

Cagetti MG, Mastroberardino S, Milia E, Cocco F, Lingström P, Campus G. The Use of Probiotic Strains in Caries Prevention: A Systematic Review. *Nutrients.* 2013;5: 2530-2550.

Caufield PW, Schön CN, Saraithong P, Argimón S. Oral Lactobacilli and dental caries: a model for niche adaptation in humans. *J Dent Res.* 2015;94:110S-118.

Ceapa C, Davids M, Ritari J, Lambert J, Wels M, Douillard FP, Smokvina T, de Vos WM, Knol J, Kleerebezem M. The Variable Regions of *Lactobacillus rhamnosus*

Genomes Reveal the Dynamic Evolution of Metabolic and Host-Adaptation Repertoires. *Genome Biol Evol.* 2016;8:1889-905.

Ciandrini E, Campana R, Baffone W. Live and heat-killed *Lactobacillus* spp. interfere with *Streptococcus mutans* and *Streptococcus oralis* during biofilm development on titanium surface. *Arch Oral Bio.* 2017;78:48-57.

Chole D, Dound S, Bakle S, Kundoor S, Gandhi N, Hatte, N. Arrested Caries Lesion: Minimal Invasive Treatment Approach- A case report. *IOSR-JDMS.* 2019;18:18-22

Chrisopoulos S, Harford JE, Ellershaw A. Oral health and dental care in Australia: key facts and figures 2015. Cat. no. DEN 229. Canberra: AIHW. 2016.

Colak H, Dülgergil CT, Dalli M, Hamidi MM. Early childhood caries update: A review of causes, diagnoses, and treatments. *J Nat Sci Biol Med.* 2013;4:29-38

Colombo NH, Kreling PF, Ribas LFF, Pereira JA, Kressirer CA, Klein MI, et al. Quantitative assessment of salivary oral bacteria according to the severity of dental caries in childhood. *Arch Oral Biol.* 2017;83:282-288.

Coqueiro AY, Bonvini A, Raizel R, Tirapegui J, Rogero MM. Probiotic supplementation in dental caries: is it possible to replace conventional treatment? *Nutrire.* 2018; 43:6.

Cury JA, Tenuta LMA. Enamel remineralization: controlling the caries disease or treating early caries lesions. *Braz Oral Res.* 2009;23:23-30.

Cortelli JR, Aquino DR, Cortelli SC, Franco GCN, Fernandes CB, Roman-Torres CVG, Costa FO. Detection of periodontal pathogens in oral mucous membranes of edentulous individuals. *J Periodontol.* 2008;79:1962–1965.

Dye B, Thornton-Evans G, Li X, Iafolla T. Dental caries and tooth loss in adults in the United States, 2011-2012. *NCHS Data Brief.* 2015;197:197.

Fejerskov O. Changing paradigms in concepts on dental caries: consequences for oral health care. *Caries Res.* 2004;38:182-191.

Filstrup SL, Briskie D, da Fonseca M, Lawrence L, Wandera A, Inglehart MR. Early childhood caries and quality of life: child and parent perspectives. *Pediatr Dent.* 2003;25:431-440.

Furet J, Quéneé P, Tailliez P. Molecular quantification of lactic acid bacteria in fermented milk products using real-time quantitative PCR. *Int J Food Microbiol.* 2004;97:197-207.

Gao X, Jiang S, Koh D, Hsu, CS. Salivary biomarkers for dental caries. *Periodontol* 2000. 2016;70:128-141.

Goldstein EJC, Tyrrell KL, Citron DM. *Lactobacillus* species: taxonomic complexity and controversial susceptibilities. *Clin Infect Dis.* 2015;15:98-107.

Gross EL, Beall CJ, Kutsch SR, Firestone ND, Leys EJ, Griffen AL. Beyond *Streptococcus mutans*: dental caries onset linked to multiple species by 16S rRNA community analysis. *PLoS One.* 2012;7:e47722.

Gruner D, Paris S, Schwendicke F. Probiotics for managing caries and periodontitis: Systematic review and meta-analysis. *J Dent.* 2016;48:16-25.

Gueimonde M, Sánchez B, G de Los Reyes-Gavilán C, Margolles A. Antibiotic resistance in probiotic bacteria. *Front Microbiol.* 2013;18:202.

Guedes RS, Piovesan C, Ardenghi TM, Emmanuelli B, Braga MM, Ekstrand KR, et al. Validation of Visual Caries Activity Assessment: A 2-yr Cohort Study. *J Dent Res.* 2014; 93: 101S–107S.

Gutmann JL, Manjarrés V. Historical and Contemporary Perspectives on the Microbiological Aspects of Endodontics. *Dent J.* 2018;22:6.

Haque M, Sartelli M, Haque SZ. Dental Infection and Resistance-Global Health Consequences. *Dent J.* 2019;1:7.

Harding-Theobald E, Maraj B. Spontaneous Bacterial Peritonitis due to *Lactobacillus paracasei* in Cirrhosis. *Case Rep Gastrointest Med.* 2018;5714053.

Hedenbjörk-Lager A, Bjørndal L, Gustafsson A, Sorsa T, Tjäderhane L, Åkerman S, Ericson D. Caries correlates strongly to salivary levels of matrix metalloproteinase-8. *Caries Res.* 2015;49:1-8.

Heller D, Helmerhorst EJ, Oppenheim FG. Saliva and serum protein exchange at the tooth enamel surface. *J Dent Res.* 2017;96:437–443.

Hojo S, Komatsu M, Okuda R, Takahashi N., Yamada T. Acid profiles and pH of carious dentin in active and arrested lesions. *J Dent Res.* 1994;73:1853-1857.

Holgerson PL, Vestman NR, Claesson R, Ohman C, Domellöf M, Tanner AC, Hernell O, Johansson I. Oral microbial profile discriminates breast-fed from formula-fed infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2013;56:127-36.

Huang CH, Li SW, Huang L, Watanabe K. Identification and Classification for the *Lactobacillus casei* Group. *Front Microbiol.* 2018;22:1974.

Huang R, Li M, Gregory RL. Bacterial interactions in dental biofilm. *Virulence.* 2011; 2:435-44.

Jayakumar A, Gurunathan D. Relationship between low birth weight in children and early Childhood caries – a systematic review. *Int J Pharm Bio Sci.* 2017;8:484-488.

Jiang W, Ling Z, Lin X, Chen Y, Zhang J, Yu J, et al. Pyrosequencing analysis of oral microbiota shifting in various caries states in childhood. *Microb Ecol.* 2014;67:962-969.

Jiao Y, Hasegawa M, Inohara N. The role of oral pathobionts in dysbiosis during periodontitis development. *J Dent Res.* 2014 93:539–546.

Kankainen M, Paulin L, Tynkkynen S, von Ossowski I, Reunanen J, Partanen P. Comparative genomic analysis of *Lactobacillus rhamnosus* GG reveals pili containing a human- mucus binding protein. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009;106:17193-17198.

Katchburian E, Arana V. *Histologia e Embriologia Oral*. 1.ed. São Paulo, Panamericana, 1999.

Kilian M, Chapple IL, Hannig M, Marsh PD, Meuric V, Pedersen AM, Tonetti MS, Wade WG, Zaura E. The oral microbiome - an update for oral healthcare professionals. *Br Dent J*. 2016;18:657-666.

Kneist S, Schmidt F, Callaway A, Willershausen B, Rupf S, Wicht M, Thiede B. Diversity of *Lactobacillus* species in deep carious lesions of primary molars. *Eur Arch Paediatr Dent*. 2010;11:181-6.

Kriebel K, Hieke C, Müller-Hilke B, Nakata M and Kreikemeyer B. Oral Biofilms from Symbiotic to Pathogenic Interactions and Associated Disease –Connection of Periodontitis and Rheumatic Arthritis by Peptidylarginine Deiminase. *Front. Microbiol*. 2018;9:53.

Lebeer S, Claes I, Tytgat HL, Verhoeven TL, Marien E, von Ossowski I, et al. Functional analysis of *Lactobacillus rhamnosus* GG pili in relation to adhesion and immunomodulatory interactions with intestinal epithelial cells. *Appl Environ Microbiol*. 2012;78: 185-193.

Lebeer S, Verhoeven TLA, Vélez MP, Vanderleyden J, Keersmaecker SCJ. Impact of environmental and genetic factors on biofilm formation by the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Appl Environ Microbiol*. 2007;73:6768-6775.

Ledder RG, Kampoo K, Teanpaisan R, McBain AJ. Oral Microbiota in Severe Early Childhood Caries in Thai Children and Their Families: A Pilot Study. *Front Microbiol*. 2018;9:2420.

Li J, Helmerhorst EJ, Leone CW, Troxler RF, Yaskell T, Haffajee AD, Socransky SS, Oppenheim FG. Identification of early microbial colonizers in human dental biofilm. *J Appl Microbiol.* 2004;97:1311-8.

Li T, Khah MK, Slavnic S, Johansson I, Strömberg N. Different type 1 fimbrial genes and tropisms of commensal and potentially pathogenic *Actinomyces* spp. with different salivary acidic proline-rich protein and statherin ligand specificities. *Infect Immun.* 2001;69:7224-33.

Li X, Chen X, Tu Y, Wang S, Chen H. Effect of probiotic *Lactobacilli* on the growth of *Streptococcus mutans* and multispecies biofilms isolated from children with active caries. *Med Sci Monit.* 2017;23:4175-4181.

Li Y, Argimón S, Schön CS, Saraithong P, Caufield PW. Characterizing diversity of *Lactobacilli* associated with severe early childhood caries: a study protocol. *Adv Microbiol.* 2015;1:9-20.

Maltz M, Beighton D. Multidisciplinary research agenda for novel antimicrobial agents for caries prevention and treatment. *Adv Dent Res.* 2012;24:133-136.

Maltz M, Jardim JJ, Alves, LS. Health promotion and dental caries. *Braz Oral Res.* 2010;24:18-25.

Marchant S, Brailsford SR, Twomey AC, Roberts GJ, Beighton D. The predominant microflora of nursing caries lesions. *Caries Res.* 2001;35:397-406.

McGrady JA, Butcher WG, Beighton D, Switalski LM. Specific and charge interactions mediate collagen recognition by oral *Lactobacilli*. *Dent Res.* 1995;74:649-57.

Meier T, Deumelandt P, Christen O, Stangl GI, Riedel K, Langer M. Global Burden of Sugar-Related Dental Diseases in 168 Countries and Corresponding Health Care Costs. *J Dent Res.* 2017;96:845-854.

Meyer F, Enax J. Early Childhood Caries: Epidemiology, Aetiology, and Prevention. *Int J Dent*. 2018;1415873.

Miljkovic M, Strahinic I, Tolinacki M, Zivkovic M, Kojic S, Golic N, Kojic M. AggLb Is the Largest Cell-Aggregation Factor from *Lactobacillus paracasei* Subsp. *paracasei* BGNJ1-64, Functions in Collagen Adhesion, and Pathogen Exclusion In Vitro. *PLoS One*. 2015;10:e0126387.

Mira A. Oral microbiome studies: potential diagnostic and therapeutic implications. *Adv Dent Res*. 2018;29:71-77.

Mitrakul K, Chanvitan S, Jeamset A, Vongsawan K. Quantitative analysis of *S. mutans*, *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* found in initial and mature plaques in Thai children with early childhood caries. *Eur Arch Paediatr Dent*. 2017;18:251-261.

Nadkarni MA, Chen Z, Wilkins MR, Hunter N. Comparative genome analysis of *Lactobacillus rhamnosus* clinical isolates from initial stages of dental pulp infection: identification of a new exopolysaccharide cluster. *PLoS One*. 2014;9:e90643.

Nadkarni MA, Martin FE, Jacques NA, Hunter N. Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set. *Microbiology*. 2002;148:257-266.

Nancy J, Dorignac G. Lactobacilli from the dentin and saliva in children. *J Clin Pediatr Dent*. 1991;16:107-111.

Nelson-Filho P, Borba IG, Mesquita KS, Silva RA, Queiroz AM, Silva LA. Dynamics of microbial colonization of the oral cavity in newborns. *Braz Dent J* 2013;24:415–419.

Neves BG, Stipp RN, da Silva Bezerra D, Guedes SFF, Rodrigues LKA. Molecular detection of bacteria associated to caries activity in dentinal lesions. *Clin Oral Investig*. 2017;21:2053–2061.

Nyvad B, Fejerskov O. Assessing the stage of caries lesion activity on the basis of clinical and microbiological examination. *Community Dent Oral Epidemiol.* 1997;25:69-75.

Oulis CJ, Tsinidou K, Vadiakas G, Mamai-Homata E, Polychronopoulou A, Athanasouli T. Caries prevalence of 5, 12 and 15-year-old Greek children: a national pathfinder survey. *Community Dent Health.* 2012;29:29-32.

O'Sullivan O, O'Callaghan J, Sangrador-Vegas A, McAuliffe O, Slattery L, Kaleta P, et al. Comparative genomics of lactic acid bacteria reveals a niche-specific gene set. *BMC Microbiol.* 2009;9:50.

Obata J, Takeshita T, Shibata Y, Yamanaka W, Unemori M, Akamine A, et al. Identification of the microbiota in carious dentin lesions using 16S rRNA gene sequencing. *PLoS One.* 2014;9:e103712.

Okahashi N1, Nakata M, Terao Y, Isoda R, Sakurai A, Sumitomo T, Yamaguchi M, Kimura RK, Oiki E, Kawabata S, Ooshima T. Pili of oral *Streptococcus sanguinis* bind to salivary amylase and promote the biofilm formation. *Microb Pathog.* 2011;50:148-54.

Pahumunto N, Sophatha B, Piwat S, Teanpaisan R. Increasing salivary IgA and reducing *Streptococcus mutans* by probiotic *Lactobacillus paracasei* SD1: A double-blind, randomized, controlled study. *J Dent Sci.* 2019.

Pararajasingam A, Uwagwu J. *Lactobacillus*: the not so friendly bacteria. *Case Reports.* 2017; bcr-2016-218423.

Parisotto TM, King WF, Duque C, Mattos-Graner RO, Steiner-Oliveira C, Nobre-Dos-Santos M, Smith DJ. Immunological and microbiologic changes during caries development in young children. *Caries Res.* 2011;45:377-85.

Philip N, Suneja B, Walsh LJ. Ecological Approaches to dental caries prevention: paradigm shift or shibboleth? *Caries Res.* 2018;52:153-165.

Piwat S, Sophatha B, Teanpaisan R. An assessment of adhesion, aggregation and surface charges of *Lactobacillus* strains derived from the human oral cavity. *Lett Appl Microbiol.* 2015;61:98-105.

Reis JA, Paula AT, Casarotti SN, Penna ALB. Lactic Acid Bacteria Antimicrobial Compounds: Characteristics and Applications. *Food Eng Rev.* 2012;4:124-140.

Rintahaka J, Yu X, Kant R, Palva A, von Ossowski I. Phenotypical analysis of the *Lactobacillus rhamnosus* GG fimbrial spaFED operon: surface expression and functional characterization of recombinant SpaFED pili in *Lactococcus lactis*. *PLoS One.* 2014;9:e113922.

Salveti E, Torriani S, Felis GE. The genus *Lactobacillus*: a taxonomic update. *Probiotics Antimicrob Proteins.* 2012;4:217-226.

Savo Sardaro ML, Levante A, Bernini V, Gatti M, Neviani E, Lazzi C. The *spxB* gene as a target to identify *Lactobacillus casei* group species in cheese. *Food Microbiol.* 2016;59:57-65.

Schwendicke F, Dörfer C, Kneist S, Meyer-Lueckel H, Paris S. Cariogenic effects of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG in a dental biofilm model. *Caries Res.* 2014;48:186-192.

Schwendicke F, Korte F, Dörfer CE, Kneist S, Fawzy El-Sayed K, Paris S. Inhibition of *Streptococcus mutans* Growth and Biofilm Formation by Probiotics in vitro. *Caries Res.* 2017;51:87-95.

Selwitz RH, Ismail A, Pitts NB. Dental caries. *Lancet.* 2007;6:51-9.

Seminario-Amez M, López-López J, Estrugo-Devesa A, Ayuso-Montero R, Jané-Salas E. Probiotics and oral health: A systematic review. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2017;22:e282-8.

Sharpe ME. Lactic acid bacteria in the dairy industry. *Int J Dairy Technol.* 1979;32:9-18.

Sherid M, Samo S, Sulaiman S, Husein H, Sifuentes H, Sridhar S. Liver abscess and bacteremia caused by lactobacillus: Role of probiotics? *BMC Gastroenterol.* 2016;16:138.

Shimada A, Noda M, Matoba Y, Kumagai T, Katsuyuki K, Sugiyama M. Oral lactic acid bacteria related to the occurrence and/or progression of dental caries in Japanese preschool children. *Biosci Microbiota Food Health.* 2015;34:29-36.

Simón-Soro A, Guillen-Navarro M, Mira A. Metatranscriptomics reveals overall active bacterial composition in caries lesions. *J Oral Microbiol.* 2014;6:10.3402.

Simón-Soro A, Mira A. Solving the etiology of dental caries. *Trends Microbiol.* 2015;23:76-82.

Slayton RL, Fontana M, Young D, Tinanoff N, Novy B, Lipman RD, Robinson L. *Dental Caries Management in Children and Adults. Discussion Paper, NAM, Washington, DC.* 2016.

Smokvina T, Wels M, Polka J, Chervaux C, Brisse S, Boekhorst J, et al. *Lactobacillus paracasei* comparative genomics: towards species pan-genome definition and exploitation of diversity. *PLoS One.* 2013;8:e68731.

Solbiati J, Frias-Lopez J. Metatranscriptome of the oral microbiome in health and disease. *J Dent Res.* 2018;00:1-9.

Stefanovic E, Kilcawley KN, Rea MC, Fitzgerald GF, McAuliffe O. Genetic, enzymatic and metabolite profiling of the *Lactobacillus casei* group reveals strain biodiversity and potential applications for flavour diversification. *J Appl Microbiol.* 2017;122:1245-1261.

Struzycka I. The oral microbiome in dental caries. *Pol J Microbiol.* 2014;63:127-35.

Surachat K, Sangket U, Deachamag P, Chotigeat W. In silico analysis of protein toxin and bacteriocins from *Lactobacillus paracasei* SD1 genome and available online databases. PLoS One. 2017; 24:e0183548.

Švec P, Sedláček I, Žácková L, Nováková D, Kukletová M. *Lactobacillus* spp. associated with early childhood caries. Folia Microbiol. 2009;54:53-58.

Szkaradkiewicz-Karpinska AK, Zeidler A, Goslinska-Kuzniarek O, Uram K, Szkaradkiewicz A. Oral Lactobacilli and salivary acidic proline-rich proteins (APRP-1/2) in dental caries. J Physiol Pharmacol. 2018;1:139-144.

Takahashi N, Nyvad B. Ecological hypothesis of dentin and root caries. Caries Res. 2016;50:422-431.

Takahashi N, Nyvad B. The role of bacteria in the caries process: ecological perspectives. J Dent Res. 2011;90:294-303.

Takahashi, N. Oral Microbiome Metabolism: From "Who Are They?" to "What Are They Doing?". Dent Res. 2015;94:1628-1637.

Tanner AC, Kressirer CA, Faller LL. Understanding caries from the oral microbiome perspective. J Calif Dent Assoc. 2016;44:437-446.

Teanpaisan R, Piwat S, Dahlén G. Inhibitory effect of oral *Lactobacillus* against oral pathogens. Lett Appl Microbiol. 2015;3:452-9.

Tindall BJ. The type strain of *Lactobacillus casei* is ATCC 393, ATCC 334 cannot serve as the type because it represents a different taxon, the name *Lactobacillus paracasei* and its subspecies names are not rejected and the revival of the name '*Lactobacillus zeae*' contravenes Rules 51b (1) and (2) of the International Code of Nomenclature of Bacteria. Opinion 82. Int J Syst Evol Microbiol. 2008;58:1764–1765.

Toh H, Oshima K, Nakano A, Takahata M, Murakami M, Takaki T, et al. Genomic adaptation of the *Lactobacillus casei* group. *PLoS One*. 2013;8:e75073.

Tripathi P, Beaussart A, Alsteens D, Dupres V, Claes I, von Ossowski I, de Vos WM, Palva A, Lebeer S, Vanderleyden J, Dufrêne YF. Adhesion and nanomechanics of pili from the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG. *ACS Nano*. 2013;7:3685-3697.

Twetman S, Keller MK. Probiotics for caries prevention and control. *Adv Dent Res*. 2012;24:98-102.

Vestman NR, Timby N, Holgerson PL, Kressirer CA, Claesson R, Domellöf M, Öhman C, Tanner AC, Hernell O, Johansson I. Characterization and in vitro properties of oral lactobacilli in breastfed infants. *BMC Microbiol*. 2013;15:193.

von Ossowski I, Pietila TE, Rintahaka J, Nummenmaa E, Makinen VM, Reunanen J, et al. Using recombinant Lactococci as an approach to dissect the immunomodulating capacity of surface piliation in probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG. *PLoS One*. 2013;8:e64416.

von Ossowski I, Reunanen J, Satokari R, Vesterlund S, Kankainen M, Huhtinen H, et al. Mucosal adhesion properties of the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG SpaCBA and SpaFED pilin subunits. *Appl Environ Microbiol*. 2010;76:2049-2057.

Vos T, Abajobir AA, Abate KH et al., “Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 328 diseases and injuries for 195 countries, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study,” *The Lancet*. 2016; 390:1211–1259.

Vuotto C, Longo F, Donelli G. Probiotics to counteract biofilm-associated infections: promising and conflicting data. *Int J Oral Sci*. 2014;6:189-94.

Wolff MS, Larson C. The cariogenic dental biofilm: good, bad or just something to control? *Braz Oral Res*. 2009;23:31-38.

Yildiz G, Ermis RB, Calapoglu NS, Celik EU, Türel GY. Gene-environment Interactions in the Etiology of Dental Caries. *J Dent Res*. 2016;95:74-9.

Young DA, Featherstone JD. Caries management by risk assessment. *Community Dent Oral Epidemiol*. 2013;41:e53-63.

Zaura E, Twetman, S. Critical Appraisal of Oral Pre- and Probiotics for Caries Prevention and Care. *Caries Res*. 2019;4:1-13.

Zhan L. Rebalancing the caries microbiome dysbiosis: targeted treatment and sugar alcohols. *Adv Dent Res*. 2018;29:110-116.

Zhang Y, Wang X, Li H, Ni C, Du Z, Yan F. Human oral microbiota and its modulation for oral health. *Biomed. Pharmacother*. 2018;99:883–893.

Zhu L, Xu Y, Ferretti JJ, Kreth J. Probing oral microbial functionality-expression of *spxB* in plaque samples. *PLoS One*. 2014;9:e86685.

Zotta T, Ricciardi A, Ianniello RG, Parente E, Reale A, Rossi F, et al. Assessment of aerobic and respiratory growth in the *Lactobacillus casei* group. *PLoS One*. 2014;9:e99189.

ANEXOS

ANEXO 1

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
CEARÁ/ PROPESQ



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: EXPRESSÃO DE GENES DE VIRULÊNCIA DE *Streptococcus mutans* EM DENTINA CARIADA ATIVA E INATIVA DE ESCOLARES DE 24 A 60 MESES

Pesquisador: Daniela da Silva Bezerra

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 23009913.0.0000.5054

Instituição Proponente: Departamento de Clínica Odontológica

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 548.405

Data da Relatoria: 07/03/2014

Apresentação do Projeto:

Projeto de pesquisa da doutoranda Daniela da Silva Bezerra sob orientação da Profa. Lidiany Karla Azevedo Rodrigues pautado no estudo da expressão de alguns genes específicos para virulência do *Streptococcus mutans*, os quais estão relacionados à capacidade de produzir e de resistir a ambientes ácidos em dentina cariada de lesões ativas e inativas de cárie precoce da infância. A amostra, calculada em um número de quarenta, será obtida de cavidades de cárie da infância detectadas no atendimento clínico de escolares na faixa etária de 24 a 60 meses, estudantes de escolas públicas municipais de Fortaleza, Ceará, Brasil. A coleta dar-se-á na Clínica de Dentística do Curso de Odontologia (FFOE), as quais serão armazenadas em freezer -80 oC e em seguida processadas para a extração e purificação do RNA bacteriano. Os dados serão analisados pelo programa REST 2009, com nível de significância em 5%.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: Avaliar a expressão de genes relacionados à virulência (acidúria e acidogenicidade) de *Streptococcus mutans* em dentina cariada oriunda de lesões ativas e inativas de crianças com diagnóstico de cárie precoce da infância, com idade entre 24 e 60 meses.

Objetivo Secundário: -Padronizar técnica de extração de RNA em dentina de amostra in vivo.

-Traçar um perfil sócio-econômico e comportamental das crianças com cárie precoce da infância,

Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1127

Bairro: Rodolfo Teófilo

CEP: 60.430-270

UF: CE

Município: FORTALEZA

Telefone: (85)3366-6344

Fax: (85)3223-2903

E-mail: compe@ufc.br

ANEXO 2

UFC - UNIVERSIDADE
FEDERAL DO CEARÁ /



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Prevalência e expressão gênica do grupo *Lactobacillus casei* coletados de lesões dentinárias de crianças com cárie da primeira infância

Pesquisador: ANA CATARINA MARTINS REIS

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 10111418.0.0000.5054

Instituição Proponente: Departamento de Patologia

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.227.777

Apresentação do Projeto:

Este projeto é pautado no estudo da expressão dos genes *spaC*, *spaE*, *wzb* e *spxB* do grupo *L. casei* em lesões de cárie dentária ativa e inativa de crianças com cárie da primeira infância (CPI). As amostras de cDNA de 32 crianças (menores de 6 anos de idade) diagnosticadas com CPI que serão neste estudo, vieram de uma pesquisa anterior aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFC/PROPESQ (No. do Parecer Substanciado 548.405, Ceará, Brasil) e estão armazenadas no Laboratório de Pesquisa do Programa de Pós-graduação em Odontologia.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Detectar e quantificar as células viáveis do grupo *L. casei* e as espécies *L. paracasei/casei* e *L. Rhamnosus*. Analisar a expressão dos genes *spaC*, *spaE*, *wzb* e *spxB* no grupo *L. casei* em lesões de cárie dentária ativa e inativa de crianças com CPI.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Riscos ou possíveis danos são mínimos, tendo em vista que este projeto utilizará somente amostras de cDNA coletadas em um estudo anterior (No. do Parecer Substanciado 548.405, Ceará,

Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1000
Bairro: Rodolfo Teófilo
UF: CE **Município:** FORTALEZA
Telefone: (85)3368-8344 **CEP:** 60.430-275
E-mail: compe@ufc.br

ANEXO 3

Artigos publicados:

King Saud University
Saudi Dental Journal
www.ksu.edu.sa
www.sciencedirect.com

ORIGINAL ARTICLE

Quantification and gene expression of *Lactobacillus casei* group species associated with dentinal lesions in early childhood caries

Ana Catarina Martins Reis^a, Daniela da Silva Bezerra^b, Erika Hart-Chú^c, Rafael Nóbrega Stipp^c, Sarah Florindo de Figueiredo Guedes^b, Beatriz Gonçalves Neves^d, Lidiany Karla Azevedo Rodrigues^{a,b,*}

^a Postgraduate Program in Medical Microbiology, Federal University of Ceará, R. Coronel Nunes de Melo 1315, 60430-270 Fortaleza, CE, Brazil
^b Postgraduate Program in Dentistry, Federal University of Ceará, R. Alexandre Baraúna, 949, 60430-160 Fortaleza, CE, Brazil
^c Department of Oral Diagnosis, Piracicaba Dental School, State University of Campinas, Av. Limeira, 901, 13414-903 Piracicaba, SP, Brazil
^d School of Dentistry, Federal University of Ceará, Rua Conselheiro José Júlio, S/N, 62010-080 Sobral, CE, Brazil

Received 3 June 2019; revised 15 January 2020; accepted 19 January 2020

ELSEVIER

Photodiagnosis and Photodynamic Therapy
Volume 26, June 2019, Pages 179-189

Scientific evidence in antimicrobial photodynamic therapy: An alternative approach for reducing cariogenic bacteria

Ana Catarina Martins Reis^a, Wanessa Fernandes Matias Regis^a, Lidiany Karla Azevedo Rodrigues^{a, b}

Show more

<https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2019.03.012> Get rights and content

Short Communication

ISSN: 2574-1241 DOI: 10.26717/BJSTR.2019.14.002588

BIOMEDICAL
Journal of Scientific & Technical Research

The Role of *Candida Albicans* and *Streptococcus Mutans* Spent Culture Supernatant in Single and Dual-Species Biofilm

Regis WFM, Reis ACM, Rocha FR, Guedes SFF, Maia DCBS and Rodrigues LKA*
Department of Operative Dentistry, Brazil

*Corresponding author: Rodrigues LKA, Faculty of Pharmacy, Dentistry and Nursing, Department of Operative Dentistry, Brazil

ARTICLE INFO

Received: February 01, 2019
Published: February 15, 2019

ABSTRACT

Citation: Regis WFM, Reis ACM, Rocha FR, Guedes SFF, Maia DCBS, Rodrigues LKA. The Role of *Candida Albicans* and *Streptococcus Mutans* Spent Culture Supernatant in Single and Dual-Species Biofilm. Biomed J Sci & Tech Res 14(4)-2019. BJSTR. MS.ID.002588.

ANEXO 4

Página do site da Universidade Estadual de Montana usada para a solicitação do uso das imagens (figura 1 e 2):

The screenshot shows the website interface for the Center for Biofilm Engineering. At the top, there is a navigation bar with the university logo and a search bar. The main content area is titled 'Download Image' and features a diagram of a biofilm structure. Below the diagram is a form with several fields and options:

- Your Name ***: A text input field.
- Affiliation Type ***: A radio button selection with options: Academic [general K-12 - higher education], Academic[medical/dental], Industry/Business, Federal or State agency, and Other.
- Affiliation Name ***: A text input field.
- Country ***: A dropdown menu labeled 'Select One'.
- State ***: A text input field with a note: 'If in US enter State abbreviation; for other countries enter N/A'.
- Email ***: A text input field with an envelope icon and a note: 'To receive download link'.
- What will image be used for? ***: A radio button selection with options: Presentation, Poster, Proposal, and Thesis.

A 'Submit' button is located at the bottom right of the form. On the left side of the page, there is a sidebar with a navigation menu including sections like 'Activities', 'Information', 'Resources', and 'Subscribe to our newsletter'.