



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CAMPUS DE SOBRAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

MARTHANA DE MARIA ARAÚJO MIRANDA

SOROTIPOS E GENES DE PROTEÍNAS DE LIGAÇÃO AO COLÁGENO DE
***Streptococcus mutans* NA CÁRIE NA PRIMEIRA INFÂNCIA**

SOBRAL
2022

MARTHANA DE MARIA ARAÚJO MIRANDA

SOROTIPOS E GENES DE PROTEÍNAS DE LIGAÇÃO AO COLÁGENO DE
Streptococcus mutans NA CÁRIE NA PRIMEIRA INFÂNCIA

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Ceará-Campus Sobral como requisito para obtenção de título de mestre. Área de concentração: Biologia Molecular e de Microrganismos

Orientadora: Prof.^a Dra. Beatriz Gonçalves Neves

Coorientadora: Prof.^a Dra. Lidiany Karla Azevedo Rodrigues Gerage

SOBRAL

2022

MARTHANA DE MARIA ARAÚJO MIRANDA

SOROTIPOS E GENES DE PROTEÍNAS DE LIGAÇÃO AO COLÁGENO DE
Streptococcus mutans NA CÁRIE NA PRIMEIRA INFÂNCIA

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Ceará-*Campus* Sobral como requisito para obtenção de título de mestre. Área de concentração: Biologia Molecular e de Microrganismos

Aprovada em: __/____/____.

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dra. Beatriz Gonçalves Neves (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof.^a Dra. Lidiany Karla Azevedo Rodrigues Gerage (Coorientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. ^a Dra. Fernanda Campos Machado
Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF)

Prof. Dr. Francisco César Barroso Barbosa
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

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

- M644s Miranda, Marthana de Maria Araújo.
SOROTIPOS E GENES DE PROTEÍNAS DE LIGAÇÃO AO COLÁGENO DE *Streptococcus mutans*
NA CÁRIE NA PRIMEIRA INFÂNCIA / Marthana de Maria Araújo Miranda. – 2022.
78 f.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Campus de Sobral, Programa de Pós-Graduação
em Ciências da Saúde, Sobral, 2022.
Orientação: Profa. Dra. Beatriz Gonçalves Neves .
Coorientação: Profa. Dra. Lidiany Karla Azevedo Rodrigues Gerage .
1. cárie na primeira infância. 2. dentina. 3. placa dentária. 4. Reação em Cadeia da Polimerase. 5.
sorotipagem. I. Título.

CDD 610

A Deus, o responsável por todas as vitórias
de minha vida, sem Ele nada seria possível

A ti Senhor, dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por todos os planos de minha vida, por ter me dado coragem e saúde para encarar este desafio.

Aos meus pais, **Maria de Fátima Araújo Miranda** e **Antônio Marcelo Miranda**, por todas as vezes que me colocaram à frente dos seus próprios sonhos, por todo apoio, dedicação e palavras de encorajamento. A eles todos os méritos de minhas conquistas.

Ao meu esposo **Rodrigo Nunes Rodrigues**, por ter me encorajado durante toda essa jornada, acreditando, incentivando e me apoiando incansavelmente, acreditando em mim até mais do que eu.

Às minhas irmãs **Mariana Araújo Miranda**, **Marcela Maria Araújo Miranda** e **Marna Maria Araújo Miranda**, por me apoiarem e torcerem para que esta etapa chegasse ao fim com muito sucesso.

Aos meus sogros **Teresa Graziela Nunes Rodrigues** e **Antônio Nilson Rodrigues Júnior** pelo amor, carinho e apoio incondicional que me deram. Vocês são minha segunda família.

À minha orientadora, Professora **Beatriz Gonçalves Neves** pela paciência, por todos os ensinamentos, por ter me incentivado a conquista deste sonho e pela disponibilidade de sempre. A ela todo meu respeito e admiração como ser humano e como profissional.

À Professora Dra. **Lidiany Karla Rodrigues Azevedo Gerage** pela orientação e colaboração durante a execução e escrita deste trabalho.

À **Universidade Federal do Ceará**, pelo ensino de qualidade, bem como pelos professores dos quais tive a oportunidade e a honra de ser aluna.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde**, na pessoa de seu coordenador, Professor Dr. **Filipe Nobre Chaves** e aos professores do curso que contribuíram com a minha formação acadêmica.

Ao Professor Dr. **Kazuhiko Nakano**, da Universidade de Osaka, Japão, pela doação das cepas controle.

Ao **Francisco Ruliglésio Rocha** e à **Wanessa Fernandes Matias Régis**, pela parceria na pesquisa e na execução da parte experimental deste trabalho.

Ao Professor Dr. **Francisco Wilker Mustafa Gomes Muniz** pela análise estatística e orientação na interpretação dos resultados.

Aos professores participantes da banca examinadora, Professora Dra. **Fernanda Campos Machado** e Professor Dr. **Francisco César Barroso Barbosa**, pela disponibilidade

em participar da banca desta defesa. Agradeço antecipadamente as valiosas colaborações e sugestões.

A **Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico** (FUNCAP) pela concessão da bolsa de estudo.

Ao **Laboratório de Biologia Molecular (LABIM)** do Programa de Pós-Graduação em Odontologia e ao **Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas (LACT)** da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem pelo apoio a esta pesquisa.

Por fim, a todos aqueles que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização desta dissertação, o meu sincero agradecimento.

RESUMO

A presença de múltiplos sorotipos e genes de proteínas de ligação ao colágeno (*cnm* e *cbm*) de *Streptococcus mutans* tem sido associada ao aumento do risco e severidade de cárie dentária. O presente estudo teve como objetivo investigar através da técnica de reação em cadeia da polimerase a ocorrência dos sorotipos (*c*, *e*, *f* e *k*) e dos genes de proteínas de ligação ao colágeno, *cnm* e *cbm*, de *S. mutans* em biofilme de crianças livres de cárie e em biofilme e lesões de cárie dentinária de crianças com Cárie na Primeira Infância (CPI). A população consistiu em 80 crianças brasileiras de 2 a 6 anos que tiveram amostras previamente coletadas e o DNA extraído e congelado. As amostras (n=107) foram divididas de acordo com os seguintes grupos: biofilme de crianças livres de cárie (BLC) (n=19); biofilme de crianças com lesões de cárie em esmalte (BLE) (n=16); biofilme de crianças com lesões de cárie em dentina (BLD) (n=34) e dentina cariada (DC), coletadas de lesões de cárie em dentina ativa (DCA) (n=28) e inativa (DCI) de crianças (n=10) com CPI. Os dados foram tabulados no Microsoft Excel e a análise estatística foi realizada pelo software estatístico Statistical Package for Social Sciences (SPSS). Os testes de Qui-quadrado e exato de Fisher foram utilizados para análise dos sorotipos de *S. mutans* e genes, e para comparação entre os grupos, foram aplicados os testes de Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis. Quanto à ocorrência dos sorotipos de *S. mutans* em amostras positivas para este microrganismo (n=78), observou-se que o sorotipo *c* foi o mais frequente (72,89%), seguido do *f* (28,2%), *k* (25,64%) e *e* (7,69%). Em biofilme, verificou-se que há 23,61 vezes mais chance de se detectar o sorotipo *c* no grupo BLD quando comparado com o grupo BLC (IC95%: 4,53 - 123,12; p<0,001). Além disso, observou-se que a detecção dos sorotipos *c*, *f* ou *k* está relacionada com amostras de biofilme de crianças com maior severidade de cárie. A presença de mais de um sorotipo em amostras de biofilme está associada a uma maior experiência de cárie das crianças quando comparada com a detecção de um único sorotipo (p=0,012) ou de nenhum sorotipo (p<0,001). Ao comparar os grupos BLD e DC, verificou-se que na dentina há 6,75 vezes mais chance de se detectar o sorotipo *f* (IC95%: 1,99 - 22,92; p=0,002), assim como o sorotipo *k* (IC95%: 1,43 - 16,73; p=0,011). Quanto à detecção dos genes *cnm/cbm*, observou-se que houve 12,77 mais chance de se identificar o gene *cbm* em dentina cariada quando comparado ao grupo BLD (IC95%: 3,32 - 49,07; p<0,001). Conclui-se que uma maior experiência de cárie de crianças com CPI está associada com a presença de múltiplos sorotipos de *S. mutans*. A detecção dos sorotipos *f* e *k* além do gene *cbm* em lesões de cárie dentinária está relacionada com uma maior severidade da doença cárie. Os achados desse estudo sugerem que sorotipos de *S. mutans* e o gene *cbm* podem apresentar um papel particularmente relevante em lesões de cárie dentinária de crianças com CPI.

Palavras-chave: cárie na primeira infância; dentina; placa dentária; sorotipagem; Reação em Cadeia da Polimerase; *Streptococcus mutans*

ABSTRACT

The presence of multiple serotypes and genes encoding collagen-binding proteins (*cnm* and *cbm*) of *Streptococcus mutans* has been associated with increased risk and severity of dental caries. The present study aimed to investigate, using the polymerase chain reaction technique, the occurrence of serotypes (*c*, *e*, *f* and *k*) and collagen binding genes, *cnm* and *cbm*, of *S. mutans* in biofilm of caries-free children, and in biofilm and dentin caries lesions of children with Early Childhood Caries (ECC). The population consisted of 80 Brazilian children aged 2 to 6 years who had samples previously collected and DNA extracted and frozen. The samples (n=107) were divided according to the following groups: biofilm from caries-free children (BLC) (n=19); biofilm from children with enamel caries lesions (BLE) (n=16); biofilm from children with carious dentin lesions (BLD) (n=34) and carious dentin (DC) collected from active (DCA) (n=28); and inactive dentin caries (DCI) (n=10) lesions of children with ECC. Data were tabulated in Microsoft Excel and statistical analysis was performed using the Statistical Package for Social Sciences (SPSS) statistical software. Chi-square and Fisher's exact tests were used to analyze *S. mutans* serotypes and genes. Mann-Whitney or Kruskal-Wallis tests were applied for comparison between groups. Regarding the prevalence of *S. mutans* serotypes in positive samples for this microorganism (n=78), it was observed that serotype *c* was the most frequent (72.89%), followed by *f* (28.2%), *k* (25.64%) and *e* (7.69%). In biofilm samples, it was found that there was 23.61 times greater chance of detecting serotype *c* in the BLD group when compared to the BLC group (95%CI: 4.53 - 123.12; p<0.001). Furthermore, it was observed that the detection of serotypes *c*, *f*, or *k* is related to biofilm samples from children with greater caries severity. The presence of more than one serotype in biofilm samples is associated with a greater experience of caries in children when compared with the detection of a single serotype (p=0.012) or no serotype (p<0.001). Comparing the BLD and DC groups, it was found that dentin is 6.75 times more likely to detect serotype *f* when compared to biofilm (95%CI: 1.99 - 22.92; p=0.002), as well as serotype *k* (95%CI: 1.43 - 16.73; p=0.011). Regarding the detection of the *cnm/cbm* genes, it was observed that there was 12.77 times more chance of identifying the *cbm* gene in carious dentin when compared to the BLD group (95%CI: 3.32 - 49.07; p<0.001). In this study, a greater caries experience in children with ECC was associated with multiple serotypes of *S. mutans*. The detection of serotypes *f* and *k* in addition to the *cbm* gene in dentin caries lesions is related to greater caries severity. The findings of this study suggest that serotypes of *S. mutans* and the *cbm* gene may play a particularly relevant role in dentin caries lesions in children with ECC.

Keywords: early childhood caries; dentin; tooth plaque; serotyping; Polymerase Chain Reaction; *Streptococcus mutans*

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Relação das sequências dos <i>primers</i> utilizados nas reações de PCR para identificação de sorotipos de <i>S. mutans</i> e dos genes de proteínas de ligação ao colágeno (<i>cnm/cbm</i>).....	43
Tabela 2 - Cepas padrão de identificação utilizadas no presente estudo para identificação de sorotipos de <i>S. mutans</i>	44
Tabela 3 - Prevalência de <i>S. mutans</i> , dos sorotipos <i>c, e, f, e k</i> de <i>S. mutans</i> e de genes de proteínas de ligação ao colágeno <i>cnm/cbm</i> em amostras de biofilme e de dentina cariada em crianças pré-escolares.....	45
Tabela 4 - Prevalência geral dos sorotipos <i>c, e, f, e k</i> de <i>S. mutans</i> , de múltiplos sorotipos e de genes de proteínas de ligação ao colágeno <i>cnm/cbm</i> em amostras de biofilme e de dentina cariada em crianças pré-escolares. Os dados de frequência relativa (%) estão expressos em relação aos grupos estudados e, em relação ao total de amostras do estudo como mostrado na última coluna (n=107).	46
Tabela 5 - Comparação entre os grupos de biofilme de crianças brasileiras livres de cárie (BLC), biofilme de crianças com lesões em esmalte (BLE) e biofilme de crianças com lesões de cárie em dentina (BLD) em relação aos sorotipos e gene <i>cbm</i> de <i>S. mutans</i>	47
Tabela 6 - Análise em relação à presença de sorotipos de <i>S. mutans</i> e do gene <i>cbm</i> em amostras de biofilme e severidade de cárie na primeira infância (ceod/ ceos) das crianças avaliadas neste estudo.....	49
Tabela 7 - Análise em relação à presença de um ou mais sorotipos de <i>S. mutans</i> em amostras de biofilme e severidade de cárie na primeira infância (ceod/ ceos) das crianças avaliadas neste estudo.....	50
Tabela 8 - Comparação entre os grupos de dentina cariada (DC) e de biofilme de lesões dentinárias (BLD) em crianças pré-escolares quanto à detecção de sorotipos e do gene <i>cbm</i> de <i>S. mutans</i>	51

Tabela 9 - Relação entre presença do gene de proteínas de ligação ao colágeno <i>cbm</i> e a presença de múltiplos sorotipos de <i>S. mutans</i> em amostras de biofilme e de dentina cariada em crianças pré-escolares.....	52
Tabela Suplementar 1 - Análise entre as amostras de dentina cariada ativa e inativa em crianças pré-escolares quanto à detecção de sorotipos e do gene <i>cbm</i> de <i>S. mutans</i>	53
Tabela Suplementar 2 - Distribuição dos sorotipos de <i>S. mutans</i> nas amostras positivas para o gene <i>cbm</i>	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BLC	Biofilme dentário de crianças livres de cárie
BLE	Biofilme dentário de crianças com somente lesões de cárie em esmalte
BLD	Biofilme dentário de crianças com lesões de cárie em dentina
Cbm	Collagen-binding protein of <i>S. mutans</i>
ceod	Índice de dentes cariados, perdidos devido à cárie e restaurados na dentição decídua
ceos	Índice de superfícies cariadas, perdidas devido à cárie e restauradas na dentição decídua
Cnm	Collagen-binding protein of <i>S. mutans</i>
CPI	Cárie na Primeira Infância
CPOD	Índice de dentes cariados, perdidos devido à cárie e restaurados na dentição Permanente
DC	Dentina cariada
DCA	Lesões dentinárias cavitadas ativas
DCI	Lesões dentinárias cavitadas inativas
DNA	Deoxyribonucleic Acid
ICDAS	International Caries Detection and Assessment System
OR	Odds ratio
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
RC	Razão de chance
RGP	Rhamnose-Glucose Polymers
STROBE	Strengthening the Reporting of Observational studies in Epidemiology

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alfa
β	Beta
$^{\circ}\text{C}$	Grau Celsius
μL	Microlitro
nM	Nanomolar
nm	Nanômetro
s	Segundo
<	Menor que
>	Maior que

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVOS	20
3. CAPÍTULO ÚNICO.....	21
4. CONCLUSÃO.....	55
REFERÊNCIAS	56
ANEXO A - PROTOCOLO COMEPE/UFC N°158/11, Ceará, Brasil	61
ANEXO B - PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP.....	62
ANEXO C - INSTRUÇÕES PARA AUTORES DO PERIÓDICO ARCHIVES OF ORAL BIOLOGY.....	66

1. INTRODUÇÃO GERAL

As doenças da cavidade bucal afetam aproximadamente 3,5 bilhões de pessoas no mundo, sendo a cárie dentária a condição bucal mais predominante, com maior prevalência em países de baixa renda e entre grupos socioeconomicamente menos favorecidos. Essa desordem persiste como um problema de saúde pública, tendo grande impacto negativo em indivíduos, comunidades e sociedade (PERES *et al.*, 2019; WHO, 2022).

A cárie dentária é considerada uma doença biofilme-açúcar dependente, multifatorial e dinâmica que resulta no desequilíbrio da desmineralização e remineralização dos tecidos dentais duros (PITTS *et al.*, 2017). A ingestão frequente de carboidratos causa acidificação prolongada do biofilme dental, levando subsequentemente a uma disbiose com um aumento da microbiota sacarolítica, acidogênica e acidúrica (ROSIER *et al.*, 2018).

Quando essa desordem ocorre em uma ou mais superfícies cariadas, cavitadas ou não, perdidas ou restauradas, devido à cárie, em qualquer dente decíduo de uma criança com menos de seis anos de idade, denomina-se de Cárie na Primeira Infância (CPI) (PITTS *et al.*, 2019). Quando não tratada, a CPI pode resultar em cavitação extensa e apresentar evolução rápida dos dentes comprometidos (HAJISHENGALLIS *et al.*, 2017), ocasionando dor crônica e infecções. Embora esses sejam os primeiros efeitos negativos da doença sobre a qualidade de vida dos indivíduos, é importante destacar que tal doença pode afetar a saúde geral da criança, podendo causar atraso de crescimento e de desenvolvimento, dificuldade na mastigação e na fala, diminuição do apetite, dificuldade para dormir, irritabilidade e diminuição do rendimento escolar (FELDENS *et al.*, 2010; NG; CHASE, 2013; TINANOFF *et al.*, 2019). No último levantamento epidemiológico de saúde bucal realizado no Brasil em 2010, constatou-se que a prevalência de cárie na dentição decídua foi de 53,4% em crianças de 5 anos (BRASIL, 2012).

A colonização dos dentes por bactérias resulta na formação da placa dental, biofilme formado por múltiplas espécies, normalmente em equilíbrio com o hospedeiro. Entretanto, modificações ambientais podem mudar a composição e as atividades metabólicas dos biofilmes orais, permitindo um aumento nas proporções de espécies que podem acarretar o desenvolvimento de doenças como a cárie (JENKINSON; LAMONT, 2005). Dentre as bactérias que colonizam a cavidade oral, a espécie bacteriana *Streptococcus mutans* tem sido considerada um dos principais microrganismos relacionados à etiologia da cárie dentária (AAS *et al.*, 2008; BECKER *et al.*, 2002; BEIGHTON *et al.*, 2004; CAUFIELD; CUTTER; DASANAYAKE, 1993; DASHPER *et al.*, 2019). Apesar de ser conhecido pelo importante

papel na doença cárie, o *S. mutans* não é o único microrganismo envolvido no processo (FAKHRUDDIN *et al.*, 2019; GROSS *et al.*, 2012; SHANMUGAM *et al.*, 2013; TAKAHASHI; NYVAD, 2011).

O potencial cariogênico de *S. mutans* é atribuído a vários fatores de virulência, tais como a capacidade de: (a) sintetizar grandes quantidades de polímeros extracelulares de glucano a partir de sacarose que auxiliam na colonização das superfícies dos dentes e no desenvolvimento da matriz polimérica extracelular, (b) transportar e metabolizar uma ampla variedade de carboidratos em ácidos orgânicos (acidogenicidade) e (c) adaptar-se às condições de estresse ambiental, como flutuações no pH, particularmente baixo pH (aciduricidade), tensão de oxigênio e disponibilidade de nutrientes (LEMOS; BURNE, 2008) e (d) aderir e formar biofilmes nas superfícies dentárias (LEMOS *et al.*, 2019).

A bactéria *Streptococcus mutans* tem quatro sorotipos conhecidos (*c*, *e*, *f* e *k*), baseados na composição química de seus polissacarídeos de superfície celular (NAKANO; OOSHIMA, 2009), sendo o sorotipo *c* predominante na cavidade oral e o mais prevalente na população (GARCIA *et al.*, 2021, GRONROOS *et al.*, 1995; MOMENI *et al.*, 2019; SIRIANI, 2012). Sabe-se que as pessoas podem adquirir diferentes sorotipos de *S. mutans* ao longo da vida (BABAEKHOU *et al.*, 2021). Os sorotipos são diferenciados com base nas cadeias laterais da glicose do polissacarídeo ramnose-glicose (RGP) na parede celular. O sorotipo *c* possui ligação α 1,2, o sorotipo *e* tem ligação β 1,2 e o sorotipo *f* contém a ligação α 1,3, logo esses sorotipos possuem ligações na cadeia lateral de glicose únicas, já o sorotipo *k* é caracterizado pela falta de resíduos glicosídicos (LINZER, 1986; NAKANO *et al.*, 2004a).

Abordagens de identificação baseadas em Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foram desenvolvidas e utilizadas para sorotipagem de *S. mutans* com base na variabilidade de genes associados à síntese de RGP. Uma das principais vantagens de usar o sistema de detecção baseado em PCR é a capacidade de detectar vários sorotipos em uma única amostra de saliva ou de placa sem a necessidade de cultura da bactéria (MOMENI *et al.*, 2019). O PCR multiplex para identificação dos sorotipos *c*, *e* e *f* de *S. mutans* foi estabelecido com base nas sequências de *rgpH* (sorotipo *c*), ORF3e (sorotipo *e*) e ORF2f (sorotipo *f*) do RGP (SHIBATA *et al.*, 2003). Posteriormente, após a descoberta e caracterização do sorotipo *k* foi desenvolvida uma abordagem de PCR com base em variações do gene *rgpF* em comparação com as cepas do sorotipo *c*, para que pudesse ser realizada a identificação do sorotipo *k* (NAKANO *et al.*, 2004b).

O microrganismo *S. mutans* é amplamente reconhecido por seu potencial cariogênico, sendo considerado um dos principais agentes etiológicos da cárie dentária, e os estudos mostram

uma associação positiva entre a experiência de cárie e a presença de *S. mutans* em níveis salivares (PANNU; GAMBHIR; SUJLANA, 2013). A distribuição de sorotipos de *S. mutans* em amostras de saliva e biofilme, em indivíduos com cárie e/ou livre de cárie, parece ser semelhante em diversos estudos, sendo o sorotipo *c* o mais prevalente, seguido do sorotipo *e* e do sorotipo *f* (ALALUUSUA; RENKONEN, 1983; CARLETTO-KÖRBER, 2015; GARCIA *et al.*, 2021; GONROOS *et al.*, 1995; LAPIRATTANAKUL *et al.*, 2009; NAKANO *et al.*, 2009, SHIBATA *et al.*, 2003). O sorotipo *k* foi encontrado em menor prevalência em alguns estudos em comparação aos demais sorotipos (BABAEKHOU *et al.*, 2020; ELYASSI, BABAEKHOU, GHANE 2022; CARLETTO-KÖRBER *et al.*, 2015; LAPIRATTANAKUL *et al.*, 2009; NAKANO *et al.*, 2009).

Poucos estudos examinaram a relação de sorotipos de *S. mutans* com a presença ou gravidade da cárie dentária. Dentre esses estudos, destaca-se o de Shibata *et al.* (2003) o qual ressaltou que crianças japonesas as quais apresentaram múltiplos sorotipos de *S. mutans*, parecem ter maior experiência de cárie do que aquelas em que um único sorotipo foi detectado. Um outro estudo realizado em Uniontown, Alabama, EUA, identificou que o sorotipo *c* foi estatisticamente associado a maiores escores de cárie em crianças mais velhas (MOMENI, *et al.* 2019). Ademais, uma pesquisa mais recente identificou que valores mais altos do número médio de dentes permanentes cariados, perdidos e obturados (CPOD) foram relacionados ao sorotipo *e* e, os menores valores foram encontrados para o sorotipo *f* (BABAEKHOU, 2020).

Além da doença cárie, *S. mutans* tem sido relacionado à endocardite bacteriana, e, algumas cepas têm sido associadas a outras patologias extra-orais como hemorragias cerebrais, nefropatia e aterosclerose (LEMOS *et al.*, 2019). Estudos realizados no Japão detectaram cepas de *S. mutans* em amostras de placas de ateroma e válvulas cardíacas de pacientes submetidos a cirurgias cardiovasculares. No material coletado, foi observado que a composição bacteriana nos tecidos cardiovasculares era marcadamente distinta da placa dentária, com um número limitado de microrganismos, incluindo *S. mutans* nas regiões cardiovasculares, demonstrando possivelmente ter origem na cavidade bucal (NAKANO *et al.*, 2006; NAKANO *et al.*, 2007; NEMOTO *et al.*, 2008). As cepas do sorotipo *k* foram originalmente designadas em estudos de cepas isoladas do sangue de pacientes com bacteremia e endocardite infecciosa, indicando que este sorotipo pode circular por todo o corpo mais facilmente em comparação com outros sorotipos. Sendo assim, acredita-se que esse sorotipo possa estar relacionado a doenças sistêmicas (NAKANO *et al.*, 2010; RAO & AUSTIN, 2014).

A relevância clínica do *S. mutans* nas doenças sistêmicas tem sido correlacionada à presença dos genes *cnm* e *cbm*, que codificam duas proteínas de ligação de colágeno (CBPs),

Cnm e Cbm respectivamente, as quais conferem adesão ao colágeno e laminina, e, podem facilitar a invasão de células endoteliais e epiteliais (NOMURA *et al.*, 2012; SATO *et al.*, 2004). Alguns estudos indicam que o gene *cnm* está presente em aproximadamente 15% dos isolados de *S. mutans*, enquanto o gene *cbm* é raramente encontrado (~2%) (ABRANCHES *et al.*, 2011; NOMURA *et al.*, 2012). Os genes *cnm* e *cbm*, que codificam as CBPs, apresentam uma distribuição desigual entre os diferentes sorotipos e são identificados com maior frequência entre os sorotipos menos prevalentes *e*, *f* e *k* (LAPIRATTANAKUL *et al.*, 2011; NOMURA *et al.*, 2009).

Sugere-se que a relação do *S. mutans* com a doença cárie ou sua virulência provavelmente resulta de uma combinação de atributos, como a presença de genes que codificam proteínas específicas capazes de se ligar ao colágeno (NOMURA *et al.*, 2009; SATO *et al.*, 2004). Uma associação entre a presença de genes de proteínas de ligação ao colágeno *cnm* e/ou *cbm* com aumento do risco e severidade da cárie tem sido sugerida em diferentes trabalhos (AVILLES-REYES *et al.*, 2017; MISAKI *et al.*, 2016; LAMBA *et al.*, 2020; ELYASSI; BABAEKHO; GHANE 2022). Estudos têm mostrado que 10-20% de isolados de *S. mutans* abrigam proteínas Cnm, que têm um efeito adicional no aumento dos valores de CPOD (NAKANO *et al.*, 2010).

Os resultados da pesquisa de Nomura *et al.* (2009) realizado com crianças japonesas de 3 a 8 anos de idade propõem que indivíduos com *S. mutans cnm+* apresentam maior risco de desenvolver cárie dentária em comparação àquelas que também tinham *S. mutans*, mas sem a presença do gene *cnm*. Os achados do estudo de Garcia *et al.* (2021) apontaram que a detecção de *S. mutans Cbp+* estava associada à recorrência de cárie dentária em crianças com cárie na primeira infância. Ademais, Matsumoto-Nakano (2018), demonstrou que a proteína de ligação ao colágeno de *S. mutans* (Cnm) desempenha um papel principal na colonização e progressão de lesões de cárie. Os achados do estudo de Nomura *et al.* (2016) sugerem que cepas de *S. mutans* positivas para CBP exibem alta colonização na polpa dentária, podendo ser um possível fator de virulência para várias doenças sistêmicas. Em um estudo realizado em canais radiculares infectados assintomáticos de pacientes brasileiros, uma alta prevalência do gene *cnm* de *S. mutans* foi detectada, sendo sugerido que este gene de proteína de ligação ao colágeno desempenhe um papel subestimado em infecções endodônticas (LIMA *et al.*, 2021).

Devido à alta proporção de colágeno tipo I na composição da matriz orgânica da dentina (TAKAHASHI; NYVAD, 2016), tem sido sugerido que a presença de Cnm pode facilitar a colonização dessas superfícies por certas cepas de *S. mutans*, contribuindo, assim, com a progressão de lesões de cárie (MILLER *et al.*, 2015). O estudo de Elyassi, Babaeekhou, Ghane

(2022) correlacionou o papel do gene *cnm* na patogenicidade da cárie dentária, tendo como resultado que a média de CPOD em indivíduos com *S. mutans cnm*-positivo foi maior em comparação com indivíduos que apresentaram *S. mutans cnm*-negativo.

Em virtude do *S. mutans* estar relacionado ao início e progressão da cárie dentária, e, especialmente à Cárie na Primeira Infância (HAJISHENGALLIS *et al.*, 2017; PARISOTTO *et al.*, 2010), estudos envolvendo este microrganismo podem ser realizados como uma estratégia para identificar o risco de pacientes desenvolverem essa doença, contribuindo com a prevenção e tratamento da CPI. Dessa forma, considerando que há poucos estudos que identificaram a presença de sorotipos e de genes *cnm/cbm* de *S. mutans* em crianças com cárie na primeira infância, assim como em lesões de cárie em dentina, o presente estudo tem como objetivo investigar através da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) a prevalência dos sorotipos (*c*, *e*, *f* e *k*) e dos genes de proteínas de ligação ao colágeno, *cnm* e *cbm*, de *Streptococcus mutans* em em biofilme de crianças livres de cárie e em biofilme e lesões de cárie dentinária de crianças com Cárie na Primeira Infância (CPI).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar a prevalência de sorotipos (*c, f, e e k*) e de genes de proteínas de ligação ao colágeno (*cnm e cbm*) de *Streptococcus mutans* em biofilme de crianças livres de cárie, e em biofilme e e dentina cariada de crianças com Cárie na Primeira Infância (CPI).

2.2 Objetivos específicos

Verificar a prevalência dos sorotipos *c, e, f e k* e dos genes *cnm e cbm* de *Streptococcus mutans* em biofilme de crianças livres de cárie, em biofilme de crianças com lesões de cárie em esmalte e em biofilme de crianças com lesões de cárie em dentina.

Verificar a prevalência dos sorotipos *c, e, f e k* e dos genes *cnm e cbm* de *Streptococcus mutans* em dentina cariada de lesões ativas e inativas de crianças com Cárie na Primeira Infância.

Avaliar a associação de diferentes sorotipos de *S. mutans* à atividade e a severidade da Cárie na Primeira Infância.

Avaliar a associação dos genes de proteínas de ligação ao colágeno (*cnm e cbm*) de *S. mutans* à atividade e a severidade da Cárie na Primeira Infância.

3. CAPÍTULO ÚNICO

CAPÍTULO ÚNICO – “SOROTIPOS E GENES DE PROTEÍNAS DE LIGAÇÃO AO COLÁGENO DE *Streptococcus mutans* EM CRIANÇAS BRASILEIRAS COM CÁRIE NA PRIMEIRA INFÂNCIA”. Marthana de Maria Araújo Miranda, Francisco Wilker Mustafa Gomes Muniz, Wanessa Fernandes Matias Régis, Lidiany Karla Azevedo Rodrigues Gerage, Beatriz Gonçalves Neves. Este artigo será submetido para publicação no periódico “Archives of Oral Biology” (ISSN 0003-9969), que possui classificação A2 do Qualis Referência do Portal de Periódicos da CAPES e fator de impacto 2,64.

**SOROTIPOS E GENES DE PROTEÍNAS DE LIGAÇÃO AO COLÁGENO DE
Streptococcus mutans EM CRIANÇAS BRASILEIRAS COM CÁRIE NA PRIMEIRA
INFÂNCIA**

***Streptococcus mutans* SEROTYPES AND COLLAGEN-BINDING PROTEIN GENES
IN BRAZILIAN CHILDREN WITH EARLY CHILDHOOD CARIES**

Marthana de Maria Araújo Miranda^a, Francisco Wilker Mustafa Gomes Muniz^b, Wanessa Fernandes Matias Régis^c, Lidiany Karla Azevedo Rodrigues Gerage^d, Beatriz Gonçalves Neves^{e*}

^aDiscente do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal do Ceará Campus Sobral, Sobral, Ceará, Brasil.

^bProfessor Adjunto, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil

^cDiscente do Programa de Pós-Graduação em Clínica Odontológica, Universidade Federal do Ceará, Campus Fortaleza, Ceará, Brasil.

^dProfessor Titular da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará, Campus Fortaleza, Fortaleza, Ceará, Brasil.

^eProfessor Adjunto do Curso de Odontologia da Universidade Federal do Ceará Campus Sobral, Sobral, Ceará, Brasil.

***Autor para correspondência:** Beatriz Gonçalves Neves, DDS, MSc, PhD.

Rua Conselheiro José Júlio, S/N. Centro, Sobral, Ceará, Brasil.

Código postal: 62.010-820.

Telefone: +55(88) 3695-4622

E-mail: beatrizneves@ufc.br

RESUMO

Objetivos: Investigar a prevalência dos sorotipos *c*, *e*, *f* e *k* de *Streptococcus mutans* e dos genes de proteínas de ligação ao colágeno *cnm* e *cbm* em biofilme e dentina cariada de crianças pré-escolares em diferentes níveis de severidade de Cárie na Primeira Infância.

Métodos: Este estudo transversal foi realizado em 107 amostras de biofilme e dentina cariada de 80 crianças brasileiras de 2 a 6 anos. A identificação dos sorotipos de *Streptococcus mutans* e dos genes, *cnm* e *cbm*, foi determinada através da Reação de Cadeia da Polimerase (PCR).

Resultados: Quanto à prevalência dos sorotipos de *S. mutans* em amostras positivas para este microrganismo (n=78), observou-se que o sorotipo *c* foi o mais prevalente (72,89%), seguido do *f* (28,2%), *k* (25,64%) e *e* (7,69%). Verificou-se que a detecção dos sorotipos *c*, *f* ou *k* está relacionada com biofilme de crianças com maior severidade de cárie, assim como a presença de múltiplos sorotipos de *S. mutans*. Além disso, verificou-se que na dentina há 6,75 mais chances de se detectar o sorotipo *f* quando comparado com o biofilme (IC95%: 1,99 - 22,92; p=0,002), assim como o sorotipo *k* (IC95%: 1,43-16,73; p=0,011). Observou-se que houve 12,77 mais chance de se identificar o gene *cbm* em dentina cariada quando comparado com biofilme de crianças com lesões de cárie em dentina (IC95%: 3,32 - 49,07; p<0,001).

Conclusões: Os achados desse estudo sugerem que sorotipos de *S. mutans* e o gene *cbm* podem apresentar um papel particularmente relevante em lesões de cárie dentinária de crianças com CPI.

Palavras-chave: biofilme; dentina; cárie dentária; *Streptococcus mutans*; *cnm*; *cbm*

Destaques:

- Sorotipos *c*, *f* e *k* foram observados em maior frequência em crianças com maior severidade de cárie.
- A frequência de sorotipos *f* e *k* foi maior em dentina cariada comparada ao biofilme.
- Crianças com maior severidade de cárie apresentaram múltiplos sorotipos de *S. mutans*.
- Gene *cbm* foi detectado em dentina cariada de lesões cavitadas de crianças com CPI.

1. Introdução

A doença cárie persiste como um problema de saúde pública global (Kassebaum et al., 2017), tendo grande impacto negativo em indivíduos de todas as idades, comunidades e sociedade (Peres et al., 2019; WHO, 2022). Quando esta condição acomete crianças menores de 6 anos é denominada Cárie na Primeira Infância (CPI), que pode apresentar uma rápida progressão e ocasionar sérias consequências para a saúde e qualidade de vida de crianças (Pitts et al., 2019; Tinanoff et al., 2019). Nos dentes decíduos, a cárie não tratada é a doença crônica infantil mais comum (WHO, 2022), afetando mais de 600 milhões de crianças no mundo (Pitts et al., 2019). No Brasil, a carga de doenças bucais é extremamente alta, com uma estimativa de que a cárie dentária não tratada na dentição decídua afete 13,5 milhões de crianças brasileiras de 0,5 a 12 anos (Hugo et al., 2022).

A cárie dentária é uma doença polimicrobiana de etiologia complexa, decorrente de uma disbiose do microbioma oral com um aumento da proporção de espécies acidogênicas e acidúricas no biofilme (Tinanoff et al., 2019). Dentre as bactérias que colonizam a cavidade oral, a espécie *Streptococcus mutans* é considerada um dos principais microrganismos associados com a cárie dentária (Lemos et al., 2019; Bhaumik et al., 2021), sendo relacionada com a progressão da Cárie na Primeira Infância (Parisotto et al., 2010) e detectada em lesões de cárie dentinária de crianças com CPI (Neves et al., 2017; Fakhruddin et al., 2022).

Os principais atributos do potencial cariogênico do *S. mutans* residem na capacidade de sintetizar grandes quantidades de polímeros extracelulares de glucano a partir da sacarose, na capacidade de transportar e metabolizar uma ampla gama de carboidratos em ácidos orgânicos e na capacidade de desenvolver-se sob condições de estresse ambiental, em especial baixo pH, ou seja, aciduricidade (Lemos & Burne, 2008; Lemos et al., 2019).

O microrganismo *S. mutans* pode ser classificado em quatro sorotipos conhecidos (*c*, *e*, *f* e *k*) (Nakano & Ooshima, 2009). Esses sorotipos são diferenciados com base na estrutura de polissacarídeos de ramnose-glicose (RGP) da parede celular bacteriana, com aproximadamente 75% das cepas isoladas da placa dentária pertencentes ao sorotipo *c*, 20% para o sorotipo *e*, e os 5% restantes classificados como sorotipos *f* ou *k* (Carletto-Korber, Gonzalez-Ittig, Jimenez, & Cornejo, 2015; Lapirattanakul et al., 2009). Alguns estudos têm sugerido que indivíduos com vários sorotipos apresentam maior experiência de cárie do que indivíduos com um único sorotipo de *S. mutans* (Shibata et al., 2003; Seki et al., 2006; Garcia et al., 2021).

Além disso, cepas de *S. mutans* podem expressar uma variedade de adesinas, dentre as quais, destacam-se as proteínas de ligação ao colágeno (CBP), Cnm e Cbm, codificadas pelos

genes *cnm* e *cbm* respectivamente, as quais são consideradas importantes antígenos de superfície celular (Sato et al., 2004, Nomura et al., 2012; Nomura et al., 2016; Avilés-Reyes et al., 2017). Estas proteínas podem desempenhar um papel ativo na adesão a superfícies assim como na invasão sistêmica na corrente sanguínea e em outros tecidos (Álvarez et al., 2021).

Devido à capacidade de algumas cepas de *S. mutans* de se ligar ao colágeno (Switalski et al., 1993), principal componente da matriz orgânica da dentina, tem sido sugerido que cepas de *S. mutans* CBP+ apresentam facilidade de colonização neste substrato com o estabelecimento de biofilmes dentro da dentina (Álvarez et al., 2021), contribuindo, assim, com a progressão de lesões cáries (Miller et al., 2015). Assim sendo, alguns estudos apontam uma associação entre cepas de *S. mutans* positivas para os genes *cnm/cbm* com o aumento do risco e severidade de cárie dentária (Elyassi; Babaeekho & Ghane, 2022; Esberg et al., 2017; Lamba et al., 2020; Misaki et al., 2016; Nomura et al., 2009). No entanto, poucos trabalhos têm investigado a relação dos sorotipos e de genes de ligação ao colágeno *cnm/cbm* de *S. mutans* na severidade e atividade da cárie dentária em crianças.

Diante do exposto, o presente estudo objetivou investigar a prevalência dos sorotipos e dos genes de proteínas de ligação ao colágeno, *cnm* e *cbm*, de *Streptococcus mutans* em biofilme e dentina cariada de crianças pré-escolares em diferentes níveis de severidade da cárie na primeira infância.

2. Materiais e métodos

2.1 Delineamento do estudo

Este estudo observacional e transversal foi realizado com amostras de biofilme e de dentina cariada, com DNA previamente extraído e congelado, coletadas de crianças pré-escolares (Neves et al., 2017; Neves et al., 2018). A identificação dos sorotipos (*c*, *e*, *f* e *k*) e dos genes (*cnm* e *cbm*), de *Streptococcus mutans* foi determinada através da Reação de Cadeia da Polimerase (PCR).

2.2 Aspectos éticos

As amostras de biofilme e de dentina cariada que foram utilizadas para este estudo foram coletadas e armazenadas durante a execução de estudos prévios. O consentimento verbal e por escrito foi obtido dos pais de todos os sujeitos. As amostras foram coletadas somente após a obtenção da aprovação das crianças e de seus pais (Neves et al., 2017; Neves et al., 2018)

(COMEPE/UFC N°158/11) (ANEXO A). Para análise por PCR das amostras coletadas previamente, este estudo foi submetido à apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará, tendo sido aprovado sob o número CAAE: 52162221.0.0000.5054 (ANEXO B). Este estudo seguiu as recomendações do STROBE Statement (Strengthening the Reporting of Observational studies in Epidemiology).

2.3 População do estudo

As amostras de DNA de biofilme e de dentina cariada selecionadas para este estudo foram previamente obtidas a partir de coletas realizadas em 80 crianças selecionadas por conveniência com faixa etária entre 2 a 6 anos, residentes da cidade de Fortaleza, Ceará, matriculadas em creches e escolas públicas municipais, para detecção de microrganismos relacionados à Cárie na Primeira Infância. Foram excluídas do estudo crianças com qualquer condição de saúde no momento do exame, que usaram antibióticos nos últimos 3 meses, e aqueles que não cooperaram durante o tratamento clínico exame. Nenhum dos indivíduos apresentava distúrbios das glândulas salivares ou doenças sistêmicas e nenhum apresentava sintomas espontâneos associados às lesões cariosas com amostras coletadas. O consentimento informado das respectivas crianças e suas famílias, sua vontade de participar e a criança ter menos de 71 meses de idade foram usadas como condições de inclusão (Neves et al., 2017; Neves et al., 2018).

Do total de amostras previamente coletadas (n=131), 107 amostras de DNA de biofilme e de dentina cariada foram incluídas e analisadas no presente estudo. Foram excluídas 24 amostras que não apresentaram volume suficiente para as análises de PCR.

As amostras de DNA de biofilme e de dentina cariada obtidas para este estudo (n=107) foram divididas de acordo com os seguintes grupos: biofilme dentário de crianças livres de cárie (BLC) (n=19), biofilme dentário de crianças com somente lesões de cárie em esmalte (BLE) (n=16), biofilme dentário de crianças com lesões de cárie em dentina (BLD) (n=34) e dentina cariada (DC) (n=38): 28 amostras de lesões dentinárias cavitadas ativas (DCA) e 10 amostras de lesões dentinárias cavitadas inativas (DCI).

2.4 Coleta de amostras

As amostras de biofilme e de dentina cariada utilizadas neste estudo foram coletadas de dentes decíduos de crianças pré-escolares durante a execução de estudos prévios. Os pacientes

selecionados, após a análise dos critérios de inclusão e exclusão, foram submetidos à coleta de amostras (Neves et al., 2017; Neves et al., 2018).

As crianças foram examinadas sob condições padronizadas de atendimento por dois examinadores calibrados. Para realização do exame clínico, foi realizada profilaxia profissional prévia em todos os pacientes. Além disso, foram utilizados sonda periodontal da OMS, espelho clínico e seringa de ar. Resumidamente, o exame clínico dos pacientes infantis foi realizado de acordo com o critério de ICDAS (Ismail et al., 2007) para severidade de cárie e de Nyvad (Nyvad et al., 1999; 2003) para atividade de cárie em condições padronizadas de atendimento.

Para avaliação da severidade de cárie, os códigos ICDAS 2 e 3 foram contabilizados juntos como uma medida de cárie de esmalte. A média total de superfícies cariadas com cárie de esmalte e/ou dentina foi calculada para os grupos BLE e BLD. Esses valores foram calculados a partir dos dados obtidos pelos critérios do ICDAS, empregando diferentes limiares: grupo BLE – lesões de cárie em esmalte (escores 2 e 3 para o ICDAS consideradas como cárie em esmalte). Para o grupo BLD, os escores ICDAS 2 a 6 foram considerados para o cálculo das superfícies cariadas. A severidade de cárie foi verificada através do índice de dentes cariados, perdidos devido à cárie e restaurados na dentição decídua (ceod) e o índice de superfícies cariadas, perdidas devido à cárie e restauradas na dentição decídua (ceos).

O biofilme dentário de cada criança foi coletado das superfícies vestibular e lingual dos dentes, incluindo dentes decíduos anteriores e posteriores com colheres de dentina estéreis (S.S. White Duflex, Rio de Janeiro, RJ, Brasil). As amostras de dentina cariada foram coletadas de lesões de cárie cavitadas em dentina (ICDAS 5 e 6) de dentes decíduos previamente selecionados. A coleta das amostras foi realizada com iluminação adequada em clínica odontológica e com auxílio de colheres de dentina estéreis sob isolamento absoluto. As amostras coletadas foram congeladas individualmente de forma asséptica em freezer -80 °C até a extração de DNA.

2.5 Extração de DNA

A extração do DNA das amostras de biofilme e de dentina cariada foi realizada previamente conforme descrito nos estudos de Neves et al., 2017 e Neves et al., 2018 com protocolo de extração orgânica baseado na purificação de fenol/clorofórmio e precipitação com álcool (Wilson, 2001). O DNA extraído de todas as amostras coletadas foi armazenado a -20° C até a análise por PCR.

2.6 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A partir do DNA obtido, as amostras foram testadas através da técnica de PCR para identificação de diferentes sorotipos de *Streptococcus mutans*, além de identificação de genes de proteínas de ligação ao colágeno, *cnm* e *cbm*. Os *primers* e cepas bacterianas utilizados neste estudo estão listados nas Tabelas 1 e 2. O DNA previamente extraído das cepas de *S. mutans* UA159 (sorotipo *c*), NN2002 (sorotipo *e*), OMZ-175 (sorotipo *f*) ou YT1 (sorotipo *k*) foi utilizado como controle positivo nas reações de PCR. Água livre de nucleases foi utilizada como controle negativo. As reações de PCR deste estudo foram realizadas em termociclador (Bio-Rad 184-5096; sistema CFX96™ Touch, Hercules, CA, E.U.A).

2.6.1 Detecção dos sorotipos de *S. mutans* em amostras de biofilme dentário e de dentina cariada

A presença de *S. mutans* nas amostras foi avaliada previamente através de PCR quantitativo (qPCR), utilizando *primers* específicos para *S. mutans* (Yano et al., 2002), de acordo com as condições descritas nos estudos de Neves et al., 2017 e Neves et al., 2018. As amostras de DNA de biofilme dentário e de dentina cariada, previamente armazenadas e congeladas, foram testadas através da técnica de PCR convencional com *primers* de identificação dos sorotipos *c*, *e*, *f* e *k* de *S. mutans*. Reações de PCR multiplex foram realizadas para identificação dos sorotipos *c*, *e* e *f*. Uma PCR *singleplex* foi utilizada para detecção do sorotipo *k*. As reações foram preparadas em duplicata em um volume para cada poço contendo 22,5µL de Platinum® PCR SuperMix (Invitrogen™ Life Technologies, Carlsbad, CA, E.U.A) além de 100nM dos *primers* (SC-F/SC-R; ou SE-F/SE-R; ou SF-F/SF-R) para identificação dos sorotipos *c*, *e* e *f*, ou 100nM dos *primers* (CEFK-F/K-R) para identificação do sorotipo *k* e 2µL de DNA da amostra a ser analisada. As reações de PCR foram realizadas de acordo com as seguintes condições: 95°C por 4 minutos, seguida por 35 ciclos de 95°C por 30 s, 60°C por 30 s e 72°C por 30 s e, finalmente, 72°C por 7 minutos (Nakano et al., 2004a; Momeni et al., 2019). As amplificações por PCR foram realizadas em duplicata usando *primers* e condições previamente publicados (Nakano et al., 2004b; Nomura et al., 2012; Oho et al., 2000; Shibata et al., 2003) (Tabela 1). Os produtos amplificados na PCR foram analisados por eletroforese em um gel de agarose a 1,5% usando o tampão de corrida Tris-borato-EDTA (TBE 1X). Um marcador de peso molecular de 100 pb (DNA Ladder 100 bp – Invitrogen) foi aplicado ao gel para dimensionar o tamanho dos fragmentos de DNA obtidos. As bandas de DNA foram coradas com SYBR Safe™ (Invitrogen) (1:10000 v/v), adicionado ao gel na fase de preparação,

e visualizadas sob luz ultravioleta (320 nm) no transiluminador modelo L-PIX EX (Loccus Biotecnologia, São Paulo – SP).

2.6.2 Detecção dos genes *cnm/cbm* relacionados à produção de proteínas de ligação ao colágeno

As amostras de DNA extraído de biofilme e de dentina cariada foram testadas quanto à detecção dos genes *cnm* e *cbm* de ligação ao colágeno por PCR multiplex, usando os primers de acordo com a Tabela 1. As reações foram preparadas em duplicata contendo em cada poço 22,5 µL do Platinum® PCR SuperMix (Invitrogen™ Life Technologies, Carlsbad, CA, E.U.A) + 100 nM dos primers (*cnm*-DF/*cnm*-DR; e *cbm*-EF/*cbm*-ER) e 2 µL de DNA da amostra a ser analisada. As reações de PCR foram realizadas de acordo com as seguintes condições: 95°C por 4 min, seguida por 35 ciclos de 95°C por 30 s, 60°C por 30 s e 72°C por 30 s e, finalmente, 72°C por 7 minutos (Nakano et al., 2004b; Momeni et al., 2019). Amostras de DNA das cepas de *S. mutans* OMZ-175 (*cnm*+) e YT1 (*cbm*+) foram utilizadas como controles positivos da reação. Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5% e observados em transiluminador de luz ultravioleta.

2.7 Análise estatística

Os dados foram tabulados no Microsoft Excel e exportados para o software estatístico Statistical Package for Social Sciences (SPSS) versão 27.0 (IBM Corp., Release 2016, IBM SPSS Statistics for Mac, Version 27.0 Armonk, NY: IBM Corp.). Nas comparações realizadas para a presença ou não de sorotipos ou genes de *S. mutans*, utilizou-se os testes de Qui-quadrado e, quando não possível, exato de Fisher. Além disso, para essas comparações, regressões logísticas bivariadas foram utilizadas para verificar a razão de chance e seus respectivos intervalos de confiança de 95% para a presença de sorotipos ou genes de *S. mutans*. Em relação à severidade de cárie dentária, o teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para verificar a distribuição dos dados. Uma distribuição assimétrica foi identificada. Dessa maneira, para a comparação entre os grupos, os testes de Mann-Whitney (comparação entre dois grupos) ou Kruskal-Wallis (comparação entre 3 grupos) foram utilizados. Ao se observar significância estatística, por meio do teste de Kruskal-Wallis, múltiplas comparações por pares foram realizadas por meio do teste de Mann-Whitney. Para tanto, apenas nessas análises, uma correção de Bonferroni foi realizada,

estabelecendo-se um valor de $p < 0,017$ para a significância estatística. Em todas as outras análises, a significância estatística foi estabelecida em $p < 0,05$.

3. Resultados

Um total de 78 das 107 amostras de biofilme e de dentina cariada analisadas apresentaram *S. mutans* em sua composição de acordo com a análise por qPCR previamente realizada (Neves et al., 2017; Neves et al., 2018). Quanto à prevalência dos sorotipos de *S. mutans* detectados em amostras positivas (+) para *S. mutans* (78/107; 72,89%), observou-se que o sorotipo *c* foi o mais prevalente (54/78; 69,23%), seguido do sorotipo *f* (22/78; 28,2%), sorotipo *k* (20/78; 25,64%) e sorotipo *e* (6/78; 7,69%). Os dados em relação à prevalência das amostras de biofilme e de dentina cariada em relação às amostras positivas para *S. mutans* estão demonstrados na Tabela 3.

No que diz respeito à identificação dos sorotipos neste estudo em relação ao total das amostras estudadas, destaca-se que a maior prevalência foi do sorotipo *c* (50,46%), seguido do sorotipo *f* (20,56%), *k* (18,69%) e *e* (5,6%) (Tabela 4). Além disso, verificou-se que em uma ($n=1$) das amostras do grupo de dentina cariada (DC) e em três amostras de biofilme ($n=3$), nas quais *S. mutans* havia sido identificado previamente por qPCR, os sorotipos não foram detectados (Tabela 3). Ademais, no geral, 23 (21,49%) das 107 amostras, foram positivas para dois ou mais diferentes sorotipos de *S. mutans* em uma mesma amostra (Tabela 4). As combinações mais frequentemente observadas para os múltiplos sorotipos foram os sorotipos *c* e *k* ($n=9$; 8,41%), seguido dos sorotipos *f* e *k* ($n=8$; 7,47%) (Tabela 4).

Considerando os grupos de biofilme dentário (BLC; BLE; BLD), verificou-se que há 23,61 vezes mais chance de se detectar o sorotipo *c* em biofilme de indivíduos com lesões de cárie em dentina (BLD) (IC95%: 4,53-123,12; $p < 0,001$) quando comparado com o grupo de biofilme de crianças livres de cárie. Também foi observado que no biofilme de crianças com lesões dentinárias (BLD), há 97% menos chance de o indivíduo não ter nenhum sorotipo de *S. mutans* quando comparado com o grupo de biofilme de crianças livres de cárie (Tabela 5).

Nas amostras de biofilme de indivíduos em que foi identificado *S. mutans* por qPCR, as crianças apresentavam mais superfícies e dentes cariados em comparação às demais crianças em que *S. mutans* não foi detectado ($p < 0,001$). Ademais, observou-se que a detecção dos sorotipos *c*, *f* ou *k* está relacionada com amostras de biofilme de crianças com uma maior severidade de cárie (ceod e ceos) (Tabela 6).

Quanto à presença de um ou mais sorotipos de *S. mutans* nas amostras de biofilme, constatou-se que a presença de múltiplos sorotipos está relacionada com uma maior experiência de cárie das crianças quando comparada com a detecção de um único sorotipo ($p=0,012$) ou quando comparada com nenhum sorotipo ($p<0,001$) (Tabela 7).

Quanto aos grupos de dentina cariada de lesões ativas e inativas (DCA; DCI), não foram observadas diferenças estatisticamente significantes quando comparados em relação à detecção dos sorotipos e dos genes de proteínas de ligação ao colágeno (*cnm/cbm*) de *S. mutans*. O sorotipo *e* não foi detectado em amostras de lesões de cárie em dentina. O sorotipo *k* não foi identificado de forma isolada, tendo sido observado em amostras de dentina quando dois ou mais sorotipos estavam presentes (Tabela Suplementar 1; Arquivos Suplementares).

Em outra análise, ao se comparar biofilme de crianças com lesões de cárie dentinária (BLD) e dentina cariada (DC), verificou-se que na dentina há 6,75 vezes maior chance de se detectar o sorotipo *f* quando comparado com o biofilme (IC95%: 1,99 - 22,92; $p=0,002$). Como também foi observado que há 4,89 vezes mais chance de se detectar o sorotipo *k* em dentina cariada em comparação ao biofilme de amostras do grupo BLD (IC95%: 1,43 - 16,73; $p=0,011$) (Tabela 8).

No que diz respeito à detecção dos genes *cnm/cbm* de *S. mutans*, somente o gene *cbm* foi detectado nas amostras estudadas. Do total de amostras de dentina cariada ($n=38$), o gene *cbm* foi detectado em 55,3% ($n=21$) das amostras. Quanto ao biofilme dentário, o gene *cbm* foi identificado somente em três amostras ($n=3$; 4,34%) do total de amostras de biofilme estudadas ($n=69$). Ao se comparar a detecção do gene *cbm* em biofilme e dentina cariada, observou-se que houve 12,77 mais chance de se identificar este gene em dentina cariada quando comparado ao biofilme de crianças com lesões de cárie em dentina (BLD) (IC95%: 3,32 - 49,07; $p<0,001$) (Tabela 8).

Quanto à relação entre a detecção do gene *cbm* e a presença de múltiplos sorotipos, verificou-se que 54,2% ($n=13$) das amostras identificadas com o gene *cbm* apresentavam um único sorotipo de *S. mutans* e 45,8% ($n=11$) apresentavam dois ou mais sorotipos identificados. Nas amostras de biofilme de crianças em que houve a detecção de pelo menos dois sorotipos de *S. mutans*, verificou-se que há 2,89 vezes mais chance do gene *cbm* ser identificado quando comparado com àquelas que possuíam somente um sorotipo de *S. mutans* (IC95%: 1,03-8,09; $p=0,043$) (Tabela 9).

Nas amostras com um único sorotipo identificado em que o gene *cbm* foi detectado ($n=13$), a prevalência do sorotipo *f* sozinho foi a mais alta ($n=10$; 76,92%), seguida do sorotipo *c* ($n=3$; 23,07%) (Tabela Suplementar 2; Arquivos Suplementares).

4. Discussão

É escassa na literatura a avaliação da distribuição de diferentes sorotipos de *S. mutans* e sua associação com Cárie da Primeira Infância (CPI). O presente estudo permitiu ampliar o conhecimento do papel dos sorotipos e genes de ligação ao colágeno de *S. mutans* em relação à severidade da cárie dentária. Este trabalho apresenta dados importantes sobre a detecção de sorotipos de *S. mutans* em lesões de cárie em dentina em crianças na primeira infância, sendo o primeiro estudo a relatar a presença do gene de ligação ao colágeno *cbm* e de diferentes sorotipos de *S. mutans* em amostras de dentina cariada.

Diversos países têm realizado pesquisas para determinar a prevalência dos sorotipos de *S. mutans* e os genes de proteínas de ligação ao colágeno (*cnm* e *cbm*) (Elyassi, Babaeekhou, Ghane, 2022; Lima et al., 2021; Momeni et al., 2019; Nakano et al., 2007; Nomura et al., 2012; Rosero et al., 2020; Swedan; Obeidat & Shakhatreh, 2018). No entanto, ainda são escassos, no Brasil, estudos que identificam a prevalência desses sorotipos e genes, correlacionando-os à cárie dentária, justificando a importância de elucidar a prevalência dos mesmos em diferentes populações.

A distribuição de sorotipos de *S. mutans* em amostras de saliva e biofilme, em indivíduos com lesão de cárie e/ou livres de cárie, parece ser semelhante em diversos estudos, sendo o sorotipo *c* o mais prevalente, seguido do sorotipo *e*, e do sorotipo *f* (Carletto-körper, 2015; Garcia et al., 2021; Lapirattanakul et al., 2009; Nakano et al., 2009, Shibata et al., 2003). No presente estudo, por outro lado, os resultados corroboram os achados dos estudos de Babaeekhou et al. (2021) e de Elyassi, Babaeekhou, Ghane (2022), que também demonstraram a predominância dos sorotipos *c* e *f* na população estudada, tendo sido observada prevalência do sorotipo *c* (47,5% e 47,7%) e do sorotipo *f* (17,9% e 27,5%), respectivamente, em cada estudo. Porém, em outros trabalhos, como os de Kavitha et al., (2019) e Rosero et al. (2020), a frequência do sorotipo *f* foi identificada em baixa quantidade ou não foi identificada.

Estudos mais recentes têm identificado uma prevalência mais alta do sorotipo *k* em amostras avaliadas (Babaeekhou et al. 2021; Elyassi, Babaeekhou, Ghane (2022), o que difere de outros trabalhos que identificaram o sorotipo *k* em pequenas proporções (Hirasawa & Takada, 2003; Nomura et al., 2009; Sato et al., 2004). A alta prevalência no presente estudo do sorotipo *k* deve-se provavelmente à inclusão de diferentes tipos de amostras coletadas de biofilme e de dentina cariada. Esse achado está alinhado com estudo de Momeni et al. (2019), o qual foi identificado o sorotipo *k* em alta proporção, utilizando 3 tipos de amostras, como a saliva, a placa dentária e os isolados de *S. mutans*, por detecção de PCR, para associação com

cárie. Cabe ressaltar que as diferenças entre as frequências dos sorotipos detectados podem estar relacionadas a diferentes populações estudadas.

Alguns estudos sugerem que os indivíduos normalmente abrigam um único sorotipo de *S. mutans* (Lapirattanakul et al., 2009; Shibata et al., 2003). No entanto, a detecção de múltiplos sorotipos de *S. mutans* é relatada na literatura (Babaeekhou et al. 2021; Elyassi, Babaeekhou & Ghane, 2022; Momeni et al., 2019, Nakano et al. 2007; Swedan et al. 2018). Neste estudo, 23 (21,49%) das 107 amostras foram positivas para dois ou mais sorotipos de *S. mutans*, sendo os sorotipos *c* e *k* a combinação mais frequentemente constatada. Este achado é semelhante ao observado no trabalho de Momeni et al. (2019) que identificou múltiplos sorotipos nas amostras de crianças analisadas.

A associação de sorotipos de *S. mutans* com a presença ou gravidade da cárie dentária é relatada na literatura (Shibata et al., 2003; Seki et al., 2006). Dentre esses estudos, destaca-se o de Shibata et al. (2003) o qual ressaltou que crianças japonesas, as quais apresentaram múltiplos sorotipos de *S. mutans*, parecem ter maior experiência de cárie do que aquelas em que um único sorotipo foi detectado. Além disso, uma pesquisa mais recente identificou que valores mais altos do número médio de dentes permanentes cariados, perdidos e obturados (CPOD) foram relacionados ao sorotipo *e* e, os menores valores foram encontrados para o sorotipo *f* (Babaeekhou, 2020). No estudo de Rosero et al., (2020), os sorotipos *e*, *f* e *k* estavam presentes apenas em indivíduos com cárie e o sorotipo *c* em indivíduos com e sem cárie. Neste estudo, achados semelhantes foram observados, uma vez que os sorotipos *f* e *k* foram detectados apenas nos grupos em que as crianças apresentavam cárie dentária. Além disso, os achados do presente estudo apontam para uma associação da presença de dois ou mais sorotipos de *S. mutans* no biofilme com uma maior severidade de cárie dentária em crianças quando comparado com um único sorotipo identificado ou nenhum sorotipo.

O microrganismo *Streptococcus mutans*, normalmente relacionado com o início da cárie dentária em esmalte (Takahashi e Nyvad, 2008) tem sido encontrado com abundância significativa na microbiota da cárie dentinária (Al-Hebshi et al., 2018; Fakhruddin et al., 2022; Jiang et al, 2014; Neves et al, 2017; Simon-Sóro et al., 2013). Alguns estudos revelam o potencial de *S. mutans* de se ligar ao colágeno (Momeni et al., 2019), o que é considerado um importante fator de virulência para esse microrganismo, permitindo assim, sobreviver a numerosos desafios ambientais encontrados (Lemos et al., 2019). Em um estudo realizado em tecidos pulpares, cepas de *S. mutans* com proteínas de ligação ao colágeno apresentaram alta colonização em polpa dentária, indicando uma possível capacidade de invasão dentinária por estas bactérias (Nomura et al., 2016).

Dessa forma, tem sido sugerido que *S. mutans* CBP+ podem colonizar vários locais na cavidade oral, especialmente superfícies ricas em colágeno, como a dentina, contribuindo para a expansão do nicho de *S. mutans* e severidade da cárie dentária (Garcia et al., 2021). Considerando que a dentina apresenta em sua composição colágeno tipo I, o qual é exposto durante o processo de desmineralização, acredita-se que este seja um substrato crucial para adesão bacteriana e formação de biofilme (Álvarez et al., 2021). Adicionalmente, tem sido relatado que as proteínas de ligação ao colágeno (CBP) mediam a co-agregação bactéria-bactéria e bactéria-fungo no microbioma oral (Álvarez et al., 2021). No presente trabalho, observou-se alta prevalência do gene *cbm* relacionada à ligação ao colágeno nas amostras de dentina cariada de lesões cavidadas em crianças com CPI, as quais foram todas positivas para *S. mutans*. Tais achados indicam o possível papel do *S. mutans* na progressão de cárie em dentina.

Em relação à presença dos genes *cnm/cbm* em biofilme dentário, o estudo de Lamba et al. (2020) observou a associação da distribuição do gene (*cnm+* e/ou *cbm+*) em placa dental e um perfil de cárie severa de crianças canadenses com CPI, o que corrobora os resultados deste estudo que indicam uma associação da presença do gene de ligação ao colágeno (*cbm*) de *S. mutans* em amostras de biofilme de crianças com CPI com uma maior experiência de cárie dentária.

Apesar de muitos estudos relatarem a detecção do gene *cnm* com uma maior frequência em diferentes amostras (Elyassi et al., 2022; Nomura et al., 2009; Nomura et al., 2016), neste estudo este gene não foi identificado, o que pode ser justificado pelo tipo de amostra que foi analisada. Outros estudos corroboram os resultados deste trabalho em que somente o gene *cbm* foi detectado, como o estudo de Lima et al. (2021) relacionado a infecções endodônticas e um estudo com crianças com cárie em que foram identificados isolados de *S. mutans* positivos para *cbm* (Momeni et al., 2019).

Dentre as limitações deste estudo, ressalta-se que é um estudo transversal com amostra de conveniência, sendo importante a realização de futuros estudos longitudinais com populações maiores para que se possa compreender o papel dos sorotipos e dos genes *cnm/cbm* de *S. mutans* na progressão da cárie dentária em crianças. Ademais, não foi possível identificar quais sorotipos apresentavam o gene *cbm* em amostras com múltiplos sorotipos, considerando que as análises não foram realizadas com isolados bacterianos.

Assim, a detecção de sorotipos de *S. mutans* bem como dos genes de ligação ao colágeno poderia ser usada como uma estratégia potencial para identificar o risco de progressão de cárie de crianças. Além disso, a função adesiva ao colágeno do *S. mutans* pode constituir novos alvos

para o tratamento da doença cárie. No entanto, mais estudos são necessários para que se possa compreender o processo de adesão bacteriana ao colágeno a fim de que futuras abordagens terapêuticas sejam desenvolvidas contra doenças bucais.

5. Conclusão

Este estudo é o primeiro a relatar a ocorrência de sorotipos e genes de ligação ao colágeno de *S. mutans* em amostras de dentina cariada em crianças brasileiras por meio da técnica de PCR. Uma maior ocorrência dos sorotipos *f* e *k* e do gene *cbm* foi observada nas amostras de dentina cariada de crianças com CPI. Além disso, a detecção dos sorotipos *c*, *f* e *k*, além de múltiplos sorotipos de *S. mutans* nas amostras de biofilme está relacionada com uma maior experiência de cárie das crianças. Ademais, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos dentina cariada ativa e inativa em relação aos sorotipos e genes *cnm/cbm* de *S. mutans*. Os achados deste estudo sugerem que o *S. mutans* possa ser considerado um microrganismo cariogênico particularmente relevante em lesões de cárie em dentina de crianças com CPI.

Reconhecimentos

A autora Marthana de Maria Araújo Miranda recebeu bolsa de estudos da Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) durante a realização do seu mestrado no Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Ceará. Esta pesquisa teve apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) – Edital Universal- Processo: 424723/2016-6. Os autores também agradecem o apoio do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Ceará, do Laboratório de Biologia Molecular (LABIM) do Programa de Pós-Graduação em Odontologia e do Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas (LACT) da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem.

Referências

Al-Hebshi, N.N., Baraniya, D., Chen, T., Hill, J., Puri, S., Tellez, M., Hasan, N.A, Colwell, R.R., Ismail, A. (2019). Metagenome sequencing-based strain-level and functional characterization of supragingival microbiome associated with dental caries in children, *Journal of Oral Microbiology*, 11(1), 1557986, DOI: 10.1080/20002297.2018.1557986

Álvarez, S.; Leiva-Sabadini, C.; Schuh, C.M.A.P.; Aguayo, S. (2021): Bacterial adhesion to collagens: implications for biofilm formation and disease progression in the oral cavity, *Critical Reviews in Microbiology*, DOI: 10.1080/1040841X.2021.1944054

Avilés-Reyes, A., Miller, J.H., Lemos, J.A., Abranches, J. (2017) Collagen-binding proteins of *Streptococcus mutans* and related streptococci. *Molecular Oral Microbiology*, 32(2), 89-106. doi: 10.1111/omi.12158.

Babaeekhou, L., Ghane, M., Ezatzade, F., & Eftekhari Toroghi, S. (2021). *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* distribution in the saliva and plaque of Iranian population: Higher prevalence of *S. mutans* serotypes *f* and *k*. *International Journal of Dental Hygiene*, 19(2), 193–200. <https://doi.org/10.1111/idh.12485>

Babaeekhou, L., Mehrizi, A.A.; Ghane, M. (2020). *Streptococcus mutans*, sugar consumption, and oral hygiene: Which one has more effect on decayed, missing, and filled teeth (DMFT) score in Iranian adults? *Dental Research Journal*, 17(2), 134-141. doi:10.4103/1735-3327.280884

Bhaumik, D., Manikandan, D., Foxman, B. (2021) Cariogenic and oral health taxa in the oral cavity among children and adults: A scoping review. *Archives of Oral Biology*, 129, 105204. doi: 10.1016/j.archoralbio.2021.105204.

Carletto-Korber, F.P., González-Ittig, R.E., Jimenez, M.G., Cornejo, L.S. (2015) Serotype diversity of *Streptococcus mutans* and caries activity in children in Argentina. *European Journal of Paediatric Dentistry*, 16, 177-80.

Drury, T.F., Horowitz, A.M., Ismail, A.I., et al. (1999) Diagnosing and reporting early childhood caries for research purposes. *Journal of Public Health Dentistry*, 59(3),192-7.

Elyassi M., Babaeekhou L., Ghane, G. (2022). *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* contributions in dental caries in Iranian and Afghan children: A report from serotype distribution and novel STs, *Archives of Oral Biology*. doi: 10.1016/j.archoralbio.2022.105431

- Esberg, A., Sheng, N., Mårell, L., Claesson, R., Persson, K., Borén, T., & Strömberg, N. (2017). *Streptococcus Mutans* Adhesin Biotypes that Match and Predict Individual Caries Development. *EBioMedicine*, 24, 205–215. doi:10.1016/j.ebiom.2017.09.027
- Fakhruddin, K.S., Samaranyake, L.P., Hamoudi, R.A., Ngo, H.C., Egusa, H. (2022) Diversity of site-specific microbes of occlusal and proximal lesions in severe- early childhood caries (S-ECC). *Journal of Oral Microbiology*, 14(1), 2037832. doi: 10.1080/20002297.2022.2037832.
- Garcia, B.A, Acosta, N.C., Tomar, S.L., Roesch, L.F.W., Lemos, J.A., Mugayar, L.R.F., Abranches, J. (2021). Association of *Candida albicans* and Cbp+ *Streptococcus mutans* with early childhood caries recurrence. *Scientific Reports*,11(1), 10802. doi: 10.1038/s41598-021-90198-3.
- Hirasawa, M., Takada, K. (2003). A new selective medium for *Streptococcus mutans* and the distribution of *S. mutans* and *S. sobrinus* and their serotypes in dental plaque. *Caries Research*, 37(3), 212-7. doi: 10.1159/000070447.
- Hugo, F.N., Bailey, J.A., Stein, C., Cunha, A.R.D., Iser, B.P.M., Malta, D.C., Giordani, J.M.D.A., Hilgert, J.B., Abreu, L.G., Kassebaum, N.J. (2022). Prevalence, incidence, and years-lived with disability due to oral disorders in Brazil: an analysis of the Global Burden of Disease Study 2019. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 55(suppl 1): e0284. doi: 10.1590/0037-8682-0284-2021.
- Ismail, A.I., Sohn, W., Tellez, M., Amaya, A., Sen, A., Hasson, H., Pitts, N.B. (2007). The International Caries Detection and Assessment System (ICDAS): an integrated system for measuring dental caries. *Community Dentistry and Oral Epidemiology*, 35(3),170-8. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0528.2007.00347.x>
- Jiang, W., Ling, Z., Lin, X., Chen, Y., Zhang, J., Yu, J., Xiang, C., Chen, H. (2014). Pyrosequencing analysis of oral microbiota shifting in various caries states in childhood. *Microbial Ecology*, 67(4), 962-9. doi: 10.1007/s00248-014-0372-y.
- Kavitha, M., Prathima, G.S., Kayalvizhi, G., Sanguida, A., Ezhumalai, G., Ramesh, V. (2019). Evaluation of *Streptococcus mutans* serotypes *e*, *f*, and *k* in saliva samples of 6-12-year-old

school children before and after a short-term daily intake of the probiotic lozenge. *Journal of the Indian Society of Pedodontics and Preventive Dentistry*, 37(1), 67-74.

Kassebaum, N. J. et al. (2017) Global, regional, and national prevalence, incidence, and disability-adjusted life years for oral conditions for 195 countries, 1990-2015: a systematic analysis for the global burden of diseases, injuries, and risk factors. *Journal of Dental Research*, 96, 4, 380-387. doi: 10.1177/0022034517693566

Lamba, G. S., Dufour, D., Nainar, S. M. H., Cioffi, I., Lévesque, C. M., & Gong, S.G. (2020). Association of *Streptococcus mutans* collagen binding genes with severe childhood caries. *Clinical Oral Investigations*, 24(10), 3467-3475. doi:10.1007/s00784-020-03217-4

Lapirattanakul, J., Nakano, K., Nomura, R., Nemoto, H., Kojima, A., Senawongse, P., Ooshima, T. (2009). Detection of serotype *k* *Streptococcus mutans* in Thai subjects. *Oral Microbiology and Immunology*, 24(5), 431–433. doi:10.1111/j.1399-302x.2009.00530.x

Lemos, J. A., & Burne, R. A. (2008). A model of efficiency: stress tolerance by *Streptococcus mutans*. *Microbiology*, 154(11), 3247–3255. doi:10.1099/mic.0.2008/023770-0

Lemos, J. A., Palmer, S. R., Zeng, L., Wen, Z. T., Kajfasz, J. K., Freires, I., Abranches, J., Brady, L. J. (2019). The Biology of *Streptococcus mutans*. *Microbiology Spectrum*, 7(1). doi:10.1128/microbiolspec.gpp3-0051-2018

Lima, A.R., Herrera, D.R., Francisco, P.A., Pereira, A.C., Lemos, J., Abranches, J., Gomes, B.P.F.A. (2021). Detection of *Streptococcus mutans* in symptomatic and asymptomatic infected root canals. *Clin Oral Investig*, Jun; 25(6), 3535-3542. doi: 10.1007/s00784-020-03676-9.

Miller, J.H., Avilés-Reyes, A., Scott-Anne, K., Gregoire, S., Watson, G.E., Sampson, E., Progulske-Fox, A., Koo, H., Bowen, W.H., Lemos, J.A., Abranches, J. (2015). The collagen binding protein Cnm contributes to oral colonization and cariogenicity of *Streptococcus mutans* OMZ175. *Infection and Immunity*, May; 83(5), 2001-10. doi: 10.1128/IAI.03022-14.

Misaki, T., Naka, S., Hatakeyama, R., Fukunaga, A., Nomura, R., Isozaki, T., & Nakano, K. (2016). Presence of *Streptococcus mutans* strains harbouring the *cnm* gene correlates with

dental caries status and IgA nephropathy conditions. *Scientific Reports*, 6(1). doi:10.1038/srep36455

Momeni, S. S., Ghazal, T., Grenett, H., Whiddon, J., Moser, S. A., & Childers, N. K. (2019). *Streptococcus mutans* serotypes and collagen-binding proteins Cnm/Cbm in children with caries analysed by PCR. *Molecular oral Microbiology*, 34(2), 64–73. <https://doi.org/10.1111/omi.12254>

Nakano, K., Nemoto, H., Nomura, R., Homma, H., Yoshioka, H., Shudo, Y., Hata, H., Toda, K., Taniguchi, K., Amano, A., Ooshima, T. (2007). Serotype distribution of *Streptococcus mutans* a pathogen of dental caries in cardiovascular specimens from Japanese patients. *Journal of Medical Microbiology*, 56(Pt 4), 551-556. doi: 10.1099/jmm.0.47051-0.

Nakano, K., Nomura, R., Nakagawa, I., Hamada, S., & Ooshima, T. (2004a). Demonstration of *Streptococcus mutans* with a Cell Wall Polysaccharide Specific to a New Serotype, k, in the Human Oral Cavity. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(1), 198–202. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.1.198-202.2004>

Nakano, K., Nomura, R., Shimizu, N., Nakagawa, I., Hamada, S., & Ooshima, T. (2004b). Development of a PCR method for rapid identification of new *Streptococcus mutans* serotype k strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(11), 4925–4930. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.11.4925-4930.2004>

Nakano, K., Nomura, R., Taniguchi, N., Lapirotanakul, J., Kojima, A., Naka, S., Senawongse, P., Srisatjaluk, R., Grönroos, L., Alaluusua, S., Matsumoto, M., Ooshima, T. (2010). Molecular characterization of *Streptococcus mutans* strains containing the cnm gene encoding a collagen-binding adhesin. *Archives of Oral Biology*, 55(1), 34–39. doi:10.1016/j.archoralbio.2009.11.008

Neves, B.G., Stipp, R.N., Bezerra, D.S., Guedes, S.F.F., & Rodrigues, L.K.A. (2017). Molecular detection of bacteria associated to caries activity in dentinal lesions. *Clinical Oral Investigations*, 21(6), 2053–2061. doi:10.1007/s00784-016-1995-9

Neves, B.G., Stipp, R.N., Bezerra, D.S., Guedes, S.F.F., & Rodrigues, L.K.A. (2018). Quantitative analysis of biofilm bacteria according to different stages of early childhood caries. *Archives of Oral Biology*, 96, 155-161. doi:10.1016/j.archoralbio.2018.09.007

Nomura, R., Nakano, K., Naka, S., Nemoto, H., Masuda, K., Lapirattanakul, J., Ooshima, T. (2012). Identification and characterization of a collagen-binding protein, *Cbm*, in *Streptococcus mutans*. *Molecular Oral Microbiology*, 27(4), 308–323. doi:10.1111/j.2041-1014.2012.00649.x

Nomura, R., Nakano, k., Taniguchi, N., Lapirattanakul, J., Nemoto, H., Grönroos, L., Alaluusua, S., & Ooshima, T. (2009) Molecular and clinical analyses of the gene encoding the collagen binding adhesin of *Streptococcus mutans*. *Journal of Medical Microbiology*, 58, 4, 469-475. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.007559-0>

Nomura, R., Ogaya, Y., Nakano, K. (2016) Contribution of the Collagen-Binding Proteins of *Streptococcus mutans* to Bacterial Colonization of Inflamed Dental Pulp. *PLoS One*, 21;11(7): e0159613. doi: 10.1371/journal.pone.0159613.

Nyvad, B., Machiulskiene, V., & Baelum, V. (2003). Construct and predictive validity of caries diagnostic criteria assessing lesion activity. *Journal of Dental Research*, 82, 117–122. <https://doi.org/10.1177/154405910308200208>

Nyvad, B., Machiulskiene, V., & Baelum, V. (1999). Reliability of a new caries diagnostic system differentiating between active and inactive caries lesions. *Caries Research*, 33, 252–260. <https://doi.org/10.1159/000016526>

Oho, T., Yamashita, Y., Shimazaki, Y., Kushiya, M., & Koga, T. (2000). Simple and rapid detection of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in human saliva by polymerase chain reaction. *Oral Microbiology and Immunology*, 15(4), 258–262. <https://doi.org/10.1034/j.1399-302x.2000.150408.x>

Parisotto, T.M., Steiner-Oliveira, C., Silva, C.M., Rodrigues, L.K., Nobre-dos-Santos, M. (2010). Early childhood caries and *mutans* streptococci: a systematic review. *Oral Health & Preventive Dentistry*, 8(1), 59-70.

Peres, M. A., Macpherson, L. M. D., Weyant, R. J., Daly, B., Venturelli, R., Mathur, M. R., Listl, S., Celeste, R.K., Guarnizo-Herreño, C.C., Kearns, C., Benzian, H., Allison, P., Watt, R. G. (2019). Oral diseases: a global public health challenge. *The Lancet*, 394(10194), 249–260. doi:10.1016/s0140-6736(19)31146-8

Pitts, N.B., Baez, R.J., Diaz-Guillory, C., Donly, K.J., Alberto Feldens, C., McGrath, C., Phantumvanit, P., Seow, W.K., Sharkov, N., Songpaisan, Y., Tinanoff, N., Twetman, S. (2019). Early Childhood Caries: IAPD Bangkok Declaration. *Journal of Dentistry for Children*, 86(2), 72. doi: 10.1111/ipd.12484.

Rosero, N.S., Prado, R.S., Guirao, A.A., Santos, Y. (2020). Molecular and serological typing of *Streptococcus mutans* strains isolated from young Galician population: relationship with the oral health status. *International Microbiology*, 23(4), 589-596. doi: 10.1007/s10123-020-00132-2.

Sato, Y., Okamoto, K., Kagami, A., Yamamoto, Y., Igarashi, T., & Kizaki, H. (2004). *Streptococcus mutans* Strains Harboring Collagen-binding Adhesin. *Journal of Dental Research*, 83 (7), 534–539. doi:10.1177/154405910408300705

Seki, M., Yamashita, Y., Shibata, Y., Torigoe, H., Tsuda, H., Maeno, M. (2006). Effect of mixed *mutans streptococci* colonization on caries development. *Oral Microbiology and Immunology*, 21 (1), 47–52. doi: 10.1111/j.1399-302X.2005.00253.x.

Shibata, Y., Ozaki, K., Seki, M., Kawato, T., Tanaka, H., Nakano, Y., & Yamashita, Y. (2003). Analysis of loci required for determination of serotype antigenicity in *Streptococcus mutans* and its clinical utilization. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(9), 4107–4112. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.9.4107-4112.2003>

Simón-Soro, A., Belda-Ferre, P., Cabrera-Rubio, R., Alcaraz, L.D., Mira, A. (2013). A tissue-dependent hypothesis of dental caries. *Caries Research*, 47(6), 591-600. doi: 10.1159/000351663.

Swedan, S.F., Heba, M., Obeidat, Muhamad, Ali., K., Shakhathreh. (2018). Molecular typing and detection of collagen binding genes among *Streptococcus mutans* isolated from diabetic and non-diabetic individuals from Northern Jordan. *Jordan Journal of Biological Sciences*, 11(3), 293 - 300.

Switalski, L.M., Butcher, W.G., Caufield, P.C., Lantz, M.S. (1993). Collagen mediates adhesion of *Streptococcus mutans* to human dentin. *Infection and immunity*, 61, 4119 – 4125. doi: 10.1128/iai.61.10.4119-4125.1993.

Takahashi, N., Nyvad, B. (2008). Caries ecology revisited: microbial dynamics and the caries process. *Caries Research*, 42(6), 409-18. doi: 10.1159/000159604. Epub 2008 Oct 3. PMID: 18832827.

Tinanoff, N., Baez, R.J., Diaz Guillory, C., Donly, K.J., Feldens, C.A., McGrath, C., Phantumvanit, P., Pitts, N.B., Seow, W.K., Sharkov, N., Songpaisan, Y., Twetman, S. (2019). Early childhood caries epidemiology, etiology, risk assessment, societal burden, management, education, and policy: Global perspective. *International Journal of Paediatric Dentistry*, 29, 238-248. <https://doi.org/10.1111/ipd.12484>

Yano, A., Kaneko, N., Ida, H., Yamaguchi, T., & Hanada, N. (2002). Real-time PCR for quantification of *Streptococcus mutans*. *FEMS Microbiology Letters*, 217, 23–30. doi: 10.1111/j.1574-6968.2002.tb11451.x.

World Health Organization. (2022). Global oral health status report: towards universal health coverage for oral health by 2030. *Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO*.

Wilson, K. (2001). Preparation of genomic DNA from bacteria. *Current Protocols in Molecular Biology*. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb0204s56>

Tabela 1 Relação das sequências dos *primers* utilizados nas reações de PCR para identificação de sorotipos de *S. mutans* e dos genes de proteínas de ligação ao colágeno (*cnm/cbm*).

Nomes	<i>Primers</i>	Sequências (5' - 3')	Tamanho do fragmento (pb)	Referências
Sorotipo <i>c</i>	SC-F	5'- CGG AGT GCT TTT TAC AAG TGC TGG -3'	727	Shibata et al. (2003)
	SC-R	5'- AAC CAC GGC CAG CAA ACC CTT TAT -3'		
Sorotipo <i>e</i>	SE-F	5'- CCT GCT TTT CAA GTA CCT TTC GCC -3'	517	Shibata et al. (2003)
	SE-R	5'- CTG CTT GCC AAG CCC TAC TAG AAA -3'		
Sorotipo <i>f</i>	SF-F	5'- CCC ACA ATT GGC TTC AAG AGG AGA -3'	316	Shibata et al. (2003)
	SF-R	5'- TGC GAA ACC ATA AGC ATA GCG AGG -3'		
Sorotipo <i>k</i>	CEFK-F	5'- ATT CCC GCC GTT GGA CCA TTC C - 3'	294	Nakano et al. (2004b)
	K-R	5'- CCA ATG TGA TTC ATC CCA TCA C -3'		
<i>Cnm</i>	<i>cnm</i> -DF	5'- TGG AGG TTC AGG GCA AGT ATG TTG GTG ATT -3'	579	Nomura et al. (2012)
	<i>cnm</i> -DR	5'- GTC TTT TGA TCA GGA TTG TCA ACT TTA GTC -3'		
<i>Cbm</i>	<i>cbm</i> -EF	5'- AGC TGA AGT TAG TGT TGT AAA ACC TGC TTC -3'	393	Nomura et al. (2012)
	<i>cbm</i> -ER	5'- TAG GAT CAT CAA CCT TAG TCA AGT ACA CGA -3'		

S. mutans: *Streptococcus mutans*; pb: pares de bases

Tabela 2 Cepas padrão de identificação utilizadas no presente estudo para identificação de sorotipos de *S. mutans*.

Cepas	Sorotipo	Gene	Referência
<i>S. mutans</i> UA159	<i>c</i>	<i>cnm⁻/cbm⁻</i>	University of Alabama.
<i>S. mutans</i> NN2002*	<i>e</i>	<i>cnm⁻/cbm⁻</i>	Nakano et al., 2004a
<i>S. mutans</i> OMZ-175*	<i>f</i>	<i>cnm⁺/cbm⁻</i>	B. Guggenheim
<i>S. mutans</i> YT1*	<i>k</i>	<i>cnm⁻/cbm⁺</i>	Nakano et al., 2004a

*Cepas doadas pelo Dr. Kazuhiko Nakano (Universidade de Osaka, Japão)

Tabela 3 Prevalência de *S. mutans*, dos sorotipos *c*, *e*, *f*, e *k* de *S. mutans* e de genes de proteínas de ligação ao colágeno *cnm/cbm* em amostras de biofilme e de dentina cariada em crianças pré-escolares.

Grupos	<i>S. mutans</i>+ (número de amostras positivas/total)**	Sorotipo <i>c</i> (número de amostras positivas/total de amostras <i>S. mutans</i> +)	Sorotipo <i>e</i> (número de amostras positivas/total de amostras <i>S. mutans</i> +)	Sorotipo <i>f</i> (número de amostras positivas/total de amostras <i>S. mutans</i> +)	Sorotipo <i>k</i> (número de amostras positivas/total de amostras <i>S. mutans</i> +)	Gene <i>cnm</i>+ (número de amostras positivas/total de amostras <i>S. mutans</i> +)	Gene <i>cbm</i>+ (número de amostras positivas/total de amostras <i>S. mutans</i> +)
BLC* (n=19)	3/19 (15,8%)	2/3 (66,6%)	1/3 (33,3%)	0/3 (0%)	0/3 (0%)	0/3 (0%)	0/3 (0%)
BLE* (n=16)	7/16 (43,8%)	6/7 (85,2%)	0/7 (0%)	0/7 (0%)	1/7 (14,3%)	0/7 (0%)	0/7 (0%)
BLD* (n=34)	30/34 (88,2%)	25/30 (83,3%)	5/30 (16,6%)	4/30 (13,3%)	4/30 (13,3%)	0/30 (0%)	3/30 (10%)
DCA* (n=28)	28/28 (100%)	16/28 (57,14%)	0/28 (0%)	13/28 (46,4%)	9/28 (32,14%)	0/28 (0%)	15/28 (53,57%)
DCI* (n=10)	10/10 (100%)	5/10 (50%)	0/10 (0%)	5/10 (50%)	6/10 (60%)	0/10 (0%)	6/10 (60%)

* BLC - biofilme de crianças livres de cárie; BLE - biofilme de crianças com somente lesões em esmalte; BLD - biofilme de crianças com lesões dentinárias; DCA- dentina cariada de lesões ativas cavitadas; DCI - dentina cariada de lesões inativas cavitadas

** Detecção de *S. mutans* foi realizada por qPCR em estudos prévios (Neves et al., 2017; Neves et al., 2018).

Tabela 4 Prevalência geral dos sorotipos *c*, *e*, *f*, e *k* de *S. mutans*, de múltiplos sorotipos e de genes de proteínas de ligação ao colágeno *cnm/cbm* em amostras de biofilme e de dentina cariada em crianças pré-escolares. Os dados de frequência relativa (%) estão expressos em relação aos grupos estudados e, em relação ao total de amostras do estudo como mostrado na última coluna (n=107).

Variáveis	Grupos					Total N=107 (100%)
	BLC (N=19) n(%)	BLE (N=16) n(%)	BLD (N=34) n(%)	DC (N=38 samples) n(%)		
				DCA N=28	DCI N=10	
Distribuição dos sorotipos						
Sorotipo <i>c</i>	2 (10,52%)	6 (37,5%)	25(73,52%)	16(57,14%)	5 (50%)	54 (50,46%)
Sorotipo <i>e</i>	1 (5,26%)	0	5 (14,7%)	0	0	6 (5,6%)
Sorotipo <i>f</i>	0	0	4 (11,76%)	13 (46,4%)	5 (50%)	22(20,56%)
Sorotipo <i>k</i>	0	1 (6,25%)	4 (11,76%)	9 (32,14%)	6 (60%)	20 (18,69%)
<i>c + f</i>	0	0	0	1 (3,57%)	0	1 (0,93%)
<i>c + e</i>	0	0	3 (8,82%)	0	0	3 (2,80%)
<i>c + k</i>	0	0	2 (5,88%)	4 (14,28%)	3 (30%)	9 (8,41%)
<i>f + e</i>	0	0	0	0	0	0
<i>f + k</i>	0	0	1 (2,94%)	4(14,28%)	3 (30%)	8 (7,47%)
<i>c + e + f</i>	0	0	0	0	0	0
<i>c + f + k</i>	0	0	1 (2,94%)	1 (3,57%)	0	2 (1,86%)
<i>e + f + k</i>	0	0	0	0	0	0
<i>c + e + k</i>	0	0	0	0	0	0
<i>c + f + e + k</i>	0	0	0	0	0	0
Genes						
<i>cnm</i>	0	0	0	0	0	0
<i>cbm</i>	0	0	3 (8,82%)	15(53,57%)	6 (60%)	24 (22,42%)

Tabela 5 Comparação entre os grupos de biofilme de crianças brasileiras livres de cárie (BLC), biofilme de crianças com lesões em esmalte (BLE) e biofilme de crianças com lesões de cárie em dentina (BLD) em relação aos sorotipos e gene *cbm* de *S. mutans*.

	Sorotipo c	P-valor	Bruto OR (95% IC)
BLC (n=19) N (Ocorrência; 95% IC)	2 (10,53; -4,67 – 25,72)	<0,001*	1
BLE (n=16) N (Ocorrência; 95% IC)	6 (37,50; 10,86 – 64,14)		5,10 (0,86 – 30,27) p=0,073
BLD (n=34) N (Ocorrência; 95% IC)	25 (73,53; 57,90 – 89,15)		23,61 (4,53 – 123,12) p<0,001
	Apenas o sorotipo c foi identificado	P-valor	Bruto OR (95% IC)
BLC (n=19) N (Ocorrência; 95% IC)	2 (10,53; -4,67 – 25,72)	0,005*	1
BLE (n=16) N (Ocorrência; 95% IC)	6 (37,50; 10,86 – 64,14)		5,10 (0,86 – 30,27) p=0,073
BLD (n=34) N (Ocorrência; 95% IC)	19 (55,88; 38,30 – 73,47)		10,77 (2,14 – 54,08) p=0,04
	Sorotipo e	P-valor	Bruto OR (95% IC)
BLC (n=19) N (Ocorrência; 95% IC)	1 (5,26; -5,76 – 16,32)	0,187*	Não estimado
BLE (n=16) N (Ocorrência; 95% IC)	0 (0,00; 0,00 – 0,00)		
BLD (n=34) N (Ocorrência; 95% IC)	5 (14,71; 2,16 – 27,25)		
	Apenas o sorotipo e foi identificado	P-valor	Bruto OR (95% IC)
BLC (n=19) N (Ocorrência; 95% IC)	1 (5,26; -5,79 – 16,32)	0,619*	Não estimado
BLE (n=16) N (Ocorrência; 95% IC)	0 (0,00; 0,00 – 0,00)		
BLD (n=34) N (Ocorrência; 95% IC)	2 (5,88; -2,45 – 14,22)		
	Sorotipo f	P-valor	Bruto OR (95% IC)
BLC (n=19) N (Ocorrência; 95% IC)	0 (0,00; 0,00 – 0,00)	0,112*	Não estimado
BLE (n=16) N (Ocorrência; 95% IC)	0 (0,00; 0,00 – 0,00)		
BLD (n=34) N (Ocorrência; 95% IC)	4 (11,76; 0,35 – 23,18)		
	Apenas o sorotipo f foi identificado	P-valor	Bruto OR (95% IC)
BLC (n=19) N (Ocorrência; 95% IC)	0 (0,00; 0,00 – 0,00)	0,346*	Não estimado
BLE (n=16) N (Ocorrência; 95% IC)	0 (0,00; 0,00 – 0,00)		
BLD (n=34) N (Ocorrência; 95% IC)	2 (5,88; -2,45 – 14,22)		
	Sorotipo k	P-valor	Bruto OR (95% IC)
BLC (n=19) N (Ocorrência; 95% IC)	0 (0,00; 0,00 – 0,00)	0,281*	Não estimado
BLE (n=16) N (Ocorrência; 95% IC)	1 (6,25; -7,07 – 19,57)		
BLD (n=34) N (Ocorrência; 95% IC)	4 (11,76; 0,35 – 23,18)		
	Apenas o sorotipo k foi identificado	P-valor	Bruto OR (95% IC)
BLC (n=19) N (Ocorrência; 95% IC)	0 (0,00; 0,00 – 0,00)	0,186*	Não estimado
BLE (n=16) N (Ocorrência; 95% IC)	1 (6,25; -7,07 – 19,57)		
BLD (n=34) N (Ocorrência; 95% IC)	0 (0,00; 0,00 – 0,00)		
	Sorotipos c + e	P-valor	Bruto OR (95% IC)
BLC (n=19) N (Ocorrência; 95% IC)	0 (0,00; 0,00 – 0,00)	0,199*	Não estimado
BLE (n=16) N (Ocorrência; 95% IC)	0 (0,00; 0,00 – 0,00)		
BLD (n=34) N (Ocorrência; 95% IC)	3 (8,82; -1,22 – 18,87)		
	Sorotipos c + f	P-valor	Bruto OR (95% IC)
BLC (n=19) N (Ocorrência; 95% IC)	0 (0,00; 0,00 – 0,00)	0,593*	Não estimado
BLE (n=16) N (Ocorrência; 95% IC)	0 (0,00; 0,00 – 0,00)		
BLD (n=34) N (Ocorrência; 95% IC)	1 (2,94; -3,04 – 8,93)		
	Sorotipos c + k	P-valor	Bruto OR (95% IC)
BLC (n=19) N (Ocorrência; 95% IC)	0 (0,00; 0,00 – 0,00)	0,199*	Não estimado
BLE (n=16) N (Ocorrência; 95% IC)	0 (0,00; 0,00 – 0,00)		
BLD (n=34) N (Ocorrência; 95% IC)	3 (8,82; -1,22 – 18,87)		
	Sorotipos f + k	P-valor	Bruto OR (95% IC)
BLC (n=19) N (Ocorrência; 95% IC)	0 (0,00; 0,00 – 0,00)	0,346*	Não estimado
BLE (n=16) N (Ocorrência; 95% IC)	0 (0,00; 0,00 – 0,00)		

BLD (n=34) N (Ocorrência; 95% IC)	2 (5,88; -2,45 – 14,22)		
	Sorotipos <i>c + f + k</i>	P-valor	Bruto OR (95% IC)
BLC (n=19) N (Ocorrência; 95% IC)	0 (0,00; 0,00 – 0,00)	0,593*	Não estimado
BLE (n=16) N (Ocorrência; 95% IC)	0 (0,00; 0,00 – 0,00)		
BLD (n=34) N (Ocorrência; 95% IC)	1 (2,94; -3,04 – 8,93)		
	Nenhum dos sorotipos (<i>c, e, f</i> ou <i>k</i>)	P-valor	Bruto OR (95% IC)
BLC (n=19) N (Ocorrência; 95% IC)	16 (84,21; 66,15 – 102,27)	<0,001*	1
BLE (n=16) N (Ocorrência; 95% IC)	9 (56,25; 28,95 – 83,55)		0,24 (0,50 – 1,17) p=0,078
BLD (n=34) N (Ocorrência; 95% IC)	4 (11,76; 0,35 – 23,18)		0,03 (0,005 – 0,126) p<0,001
	Gene <i>cbm</i>	P-valor	Bruto OR (95% IC)
BLC (n=19) N (Ocorrência; 95% IC)	0 (0,00; 0,00 – 0,00)	0,199*	Não estimado
BLE (n=16) N (Ocorrência; 95% IC)	0 (0,00; 0,00 – 0,00)		
BLD (n=34) N (Ocorrência; 95% IC)	3 (8,82; -1,22 – 18,87)		
Legenda: * Qui-quadrado; IC95%: intervalo de confiança de 95%; : RC: Razão de chances. Números em negrito significam significância estatística (p<0,05).			

Tabela 6 Análise em relação à presença de sorotipos de *S. mutans* e do gene *cbm* em amostras de biofilme e severidade de cárie na primeira infância (ceod/ ceos) das crianças avaliadas neste estudo.

		ceod	P-valor	ceos	P-valor
Sorotipo <i>c</i>	Presente (n=33)	4,18±2,71 (4,00; 2,00 – 6,00)	<0,001*	12,21±8,74 (11,00; 5,50 – 16,50)	<0,001*
	Ausente (n=36)	2,03±2,82 (1,00; 0,00 – 3,75)		4,69±8,32 (1,00; 0,00 – 5,75)	
Apenas o sorotipo <i>c</i> foi identificado	Presente (n=27)	3,89±2,76 (3,00; 2,00 – 6,00)	0,020*	10,93±8,81 (10,00; 5,00 – 16,00)	0,006*
	Ausente (n=42)	2,52±2,98 (1,00; 0,00 – 5,00)		6,60±9,26 (1,50; 0,00 – 13,25)	
Sorotipo <i>e</i>	Presente (n=6)	3,83±2,93 (3,50; 2,25 – 5,25)	0,472*	13,50±7,87 (15,00; 8,25 – 18,00)	0,095*
	Ausente (n=63)	2,98±2,97 (2,00; 0,00 – 5,00)		7,79±9,29 (5,00; 0,00 – 12,00)	
Apenas o sorotipo <i>e</i> foi identificado	Presente (n=3)	2,33±2,08 (3,00; 0,00 – NE)	0,771*	10,33±8,96 (15,00; 0,00 – NE)	0,625*
	Ausente (n=66)	3,09±3,00 (2,50; 0,00 – 5,00)		8,20±9,34 (5,00; 0,00 – 13,50)	
Sorotipo <i>f</i>	Presente (n=4)	6,75±3,95 (7,50; 2,75 – 10,00)	0,041*	22,25±12,50 (18,00; 13,25 – 35,50)	0,010*
	Ausente (n=65)	2,83±2,77 (2,00; 0,00 – 5,00)		7,43±8,43 (5,00; 0,00 – 12,00)	
Apenas o sorotipo <i>f</i> foi identificado	Presente (n=2)	6,00±5,66 (6,00; 2,00 – NE)	0,341*	18,00±5,66 (18,00; 14,00 – NE)	0,113*
	Ausente (n=67)	2,97±2,87 (3,00; 0,00 – 5,00)		8,00±9,22 (5,00; 0,00 – 13,00)	
Sorotipo <i>k</i>	Presente (n=5)	6,60±2,07 (6,00; 5,00 – 8,50)	0,004*	20,80±13,03 (19,00; 9,50 – 33,00)	0,008*
	Ausente (n=64)	2,78±2,84 (2,00; 0,00 – 4,00)		7,31±8,28 (5,00; 0,00 – 12,00)	
Apenas o sorotipo <i>k</i> foi identificado	Presente (n=1)	6,00±6,00 (6,00; 6,00 – 6,00)	0,348*	6,00±6,00 (6,00; 6,00 – 6,00)	0,928*
	Ausente (n=68)	3,02±2,95 (2,50; 0,00 – 5,00)		8,32±9,33 (5,00; 0,00 – 14,00)	
Sorotipos <i>c + e</i>	Presente (n=3)	5,33±3,21 (4,00; 3,00 – NE)	0,191*	16,67±6,66 (15,00; 11,00 – NE)	0,076*
	Ausente (n=66)	2,95±2,93 (2,00; 0,00 – 5,00)		7,91±9,22 (5,00; 0,00 – 13,25)	
Sorotipos <i>c + f</i>	Presente (n=1)	5,00±NE (5,00; 5,00 – 5,00)	0,493*	13,00±NE (13,00; 13,00 – 13,00)	0,551*
	Ausente (n=68)	3,03±2,97 (2,50; 0,00 – 5,00)		8,22±9,32 (5,00; 0,00 – 14,00)	
Sorotipos <i>c + k</i>	Presente (n=3)	5,67±1,15 (5,00; 5,00 – NE)	0,070*	19,33±6,51 (19,00; 13,00 – NE)	0,024*
	Ausente (n=66)	2,94±2,96 (2,00; 0,00 – 5,00)		7,79±9,09 (5,00; 0,00 – 12,50)	
Sorotipos <i>f + k</i>	Presente (n=2)	7,50±3,53 (7,50; 5,00 – NE)	0,077*	26,50±19,09 (26,50; 13,00 – NE)	0,077*
	Ausente (n=67)	2,93±2,86 (2,00; 0,00 – 5,00)		7,75±8,52 (5,00; 0,00 – 14,00)	
Sorotipos <i>c+f+k</i>	Presente (n=1)	5,00±NE (5,00; 5,00 – 5,00)	0,493*	13,00±NE (13,00; 13,00 – 13,00)	0,551*
	Ausente (n=68)	3,03±2,97 (2,50; 0,00 – 5,00)		8,22±9,32 (5,00; 0,00 – 14,00)	
Nenhum dos sorotipos (<i>c, e, f</i> ou <i>k</i>)	Pelo menos um (n=40)	4,33±2,90 (4,00; 2,00 – 6,00)	<0,001*	12,90±9,48 (12,00; 6,00 – 16,75)	<0,001*
	Nenhum sorotipo (n=29)	1,31±2,00 (0,00; 0,00 – 2,00)		1,93±3,33 (0,00; 0,00 – 3,50)	
Gene <i>cbm</i>	Presente (n=3)	5,67±4,04 (5,00; 2,00 – NE)	0,181*	22,33±15,31 (14,00; 13,00 – NE)	0,043*
	Ausente (n=66)	2,94±2,88 (2,50; 0,00 – 5,00)		7,65±8,55 (5,00; 0,00 – 12,50)	
qPCR <i>S. mutans</i>	Presente (n=42)	4,29±2,91 (4,00; 2,00 – 6,00)	<0,001*	12,50±9,46 (11,50; 6,00 – 15,25)	<0,001*
	Ausente (n=27)	1,15±1,81 (0,00; 0,00 – 1,00)		1,74±3,21 (0,00; 0,00 – 3,00)	

Legenda: * Teste de Mann-Whitney; NE: não estimado devido ao baixo número de casos. Os dados são expressos em média ± desvio padrão (mediana; intervalo interquartilico).

- Na análise dos índices de cárie, os escores de cárie ICDAS 2 e 3 foram contados juntos como uma medida de cárie de esmalte. A média total de superfícies cariadas com cárie de esmalte e/ou dentina foi calculada para os grupos BLE e BLD. Esses valores foram calculados a partir dos dados obtidos pelos critérios do ICDAS, empregando diferentes limiares: grupo BLE – lesões de cárie em esmalte (escores 2 e 3 para o ICDAS consideradas como cárie em esmalte). Para o grupo BLD, os códigos ICDAS 2 a 6 foram considerados para o cálculo das superfícies cariadas.

Tabela 7 Análise em relação à presença de um ou mais sorotipos de *S. mutans* em amostras de biofilme e severidade de cárie na primeira infância (ceod/ ceos) das crianças avaliadas neste estudo.

		ceod	P-valor	ceos	P-valor
Quantos sorotipos	Nenhum (n=29; 42,0%)	1,31±2,00 (0,00; 0,00 – 2,00)	<0,001*	1,93±3,33 (0,00; 0,00 – 3,50)	<0,001*
	Somente 1 (n=33; 47,8%)	3,94±2,85 (3,00; 2,00 – 6,00)	<0,001#&	11,15±8,54 (10,00; 5,00 – 16,00)	<0,001#&
	≥ 2 (n=7; 10,1%)	6,14±2,61 (5,00; 4,00 – 9,00)	0,053\$	21,14±9,99 (19,00; 13,00 – 26,00)	0,012\$

Legenda: Dados expressos em média±desvio padrão (mediana; intervalo interquartilico). Os valores de P-valor em negrito significam significância estatística. *Teste de Kruskal-Wallis (significância estabelecida como $p < 0,05$); Teste de #Mann-Whitney para comparação entre nenhum x apenas 1 sorotipo (significância estabelecida como $p < 0,017$); teste de & Mann-Whitney para comparação entre sorotipo nenhum vs. ≥ 2 (significância estabelecida como $p < 0,017$); \$ Teste de Mann-Whitney para a comparação entre apenas 1 sorotipo vs. ≥ 2 sorotipos (significância estabelecida como $p < 0,017$).

Tabela 8 Comparação entre os grupos de dentina cariada (DC) e de biofilme de lesões dentinárias (BLD) em crianças pré-escolares quanto à detecção de sorotipos e do gene *cbm* de *S. mutans*.

	Sorotipo <i>c</i>	P-valor	Bruto OR (95% IC)
BLD (n=34) N (Ocorrência; 95%IC)	25 (73,5)	0,142*	1
DC (n=38) N (Ocorrência; 95% IC)	21 (55,3)		0,45 (0,16 – 1,20) p=0,110
	Apenas o sorotipo <i>c</i> foi identificado	P- valor	Bruto OR (95%IC)
BLD (n=34) N (Ocorrência; 95% IC)	19 (55,9)	0,038*	1
DC (n=38) N (Ocorrência; 95% IC)	12 (31,6)		0,36 (0,14 – 0,95) p=0,040
	Sorotipo <i>e</i>	P- valor	Bruto OR (95%IC)
BLD (n=34) N (Ocorrência; 95% IC)	5 (14,7)	0,014#	Não estimado
DC (n=38) N (Ocorrência; 95% IC)	0 (0,0)		
	Apenas o sorotipo <i>e</i> foi identificado	P- valor	Bruto OR (95%IC)
BLD (n=34) N (Ocorrência; 95% IC)	2 (5,9)	0,219#	Não estimado
DC (n=38) N (Ocorrência; 95% IC)	0 (0,0)		
	Sorotipo <i>f</i>	P- valor	Bruto OR (95%IC)
BLD (n=34) N (Ocorrência; 95% IC)	4 (11,8)	0,001*	1
DC (n=38) N (Ocorrência; 95% IC)	18 (47,4)		6,75 (1,99 – 22,92) p=0,002
	Apenas o sorotipo <i>f</i> foi identificado	P- valor	Bruto OR (95%IC)
BLD (n=34) N (Ocorrência; 95% IC)	2 (5,9)	0,036*	1
DC (n=38) N (Ocorrência; 95% IC)	9 (23,7)		4,97 (0,99 – 24,90) p=0,051
	Sorotipo <i>k</i>	P- valor	Bruto OR (95%IC)
BLD (n=34) N (Ocorrência; 95% IC)	4 (11,8)	0,008*	1
DC (n=38) N (Ocorrência; 95% IC)	15 (39,5)		4,89 (1,43 – 16,73) p=0,011
	Sorotipo <i>c + e</i>	P- valor	Bruto OR (95%IC)
BLD (n=34) N (Ocorrência; 95% IC)	3 (8,8)	0,100#	Não estimado
DC (n=38) N (Ocorrência; 95% IC)	0 (0,00)		
	Sorotipos <i>c + f</i>	P- valor	Bruto OR (95%IC)
BLD (n=34) N (Ocorrência; 95% IC)	1 (2,9)	1,000#	1
DC (n=38) N (Ocorrência; 95% IC)	2 (5,3)		1,83 (0,16 – 21,17) p=0,627
	Sorotipos <i>c + k</i>	P- valor	Bruto OR (95%IC)
BLD (n=34) N (Ocorrência; 95% IC)	3 (8,8)	0,150*	1
DC (n=38) N (Ocorrência; 95% IC)	8 (21,1)		2,76 (0,67 – 11,39) p=0,161
	Sorotipos <i>f + k</i>	P- valor	Bruto OR (95%IC)
BLD (n=34) N (Ocorrência; 95% IC)	2 (5,9)	0,090#	1
Dentin (n=38) N (Ocorrência; 95% IC)	8 (21,1)		4,27 (0,84 – 21,72) p=0,081
	Sorotipos <i>c + f + k</i>	P-valor	Bruto OR (95%IC)
BLD (n=34) N (Ocorrência; 95% IC)	1 (2,9)	1,000#	1
DC (n=38) N (Ocorrência; 95% IC)	1 (2,6)		0,89 (0,05 – 14,83) p=0,936
	Nenhum dos sorotipos (<i>c, e, f ou k</i>)	P-valor	Bruto OR (95%IC)
BLD (n=34) N (Ocorrência; 95% IC)	4 (11,8)	0,182#	1
DC (n=38) N (Ocorrência; 95% IC)	1 (2,6)		0,20 (0,02 – 1,91) p=0,163
	Gene <i>cbm</i>	P- valor	Bruto OR (95%IC)
BLD (n=34) N (Ocorrência; 95% IC)	3 (8,8)	<0,001*	1
DC (n=38) N (Ocorrência; 95% IC)	21 (55,3)		12,77 (3,32 – 49,07) p<0,001

Legenda: * Teste Qui-quadrado; #teste exato de Fisher; 95%IC: 95% intervalo de confiança; OR: Razão de chance.

Tabela 9 Relação entre presença do gene de proteínas de ligação ao colágeno *cbm* e a presença de múltiplos sorotipos de *S. mutans* em amostras de biofilme e de dentina cariada em crianças pré-escolares.

	Gene <i>cbm</i>		P-valor	Bruto OR (95%IC)
	Presente n (%)	Ausente n (%)		
Um único sorotipo	13 (54,2)	41 (77,4)	0,039*	1
Dois ou mais sorotipos	11 (45,8)	12 (22,6)		289 (1,03 – 8,09) p=0,043

Legenda: * Teste Qui-quadrado

Material Suplementar

Tabela Suplementar 1. Análise entre as amostras de dentina cariada ativa e inativa em crianças pré-escolares quanto à detecção de sorotipos e do gene *cbm* de *S. mutans*.

	Sorotipo c	P-valor	Bruto OR (95% IC)
Ativa (n=28) N (Ocorrência; 95%IC)	16 (57,14; 37,60 – 76,68)	0,727#	1
Inativa (n=10) N (Ocorrência; 95%IC)	5 (50,00; 12,30 – 87,70)		0,75 (0,18 – 3,19) p=0,697
	Only Serotype c was identified	P-value	Bruto OR (95% IC)
Ativa (n=28) N (Ocorrência; 95%IC)	10 (35,71; 16,79 – 54,64)	0,453#	1
Inativa (n=10) N (Ocorrência; 95%IC)	2 (20,00; -10,16 – 50,16)		0,45 (0,08 – 2,54) p=0,366
	Sorotipo f	P-value	Bruto OR (95% IC)
Ativa (n=28) N (Ocorrência; 95% IC)	13 (46,43; 26,74 – 66,12)	1,000#	1
Inativa (n=10) N (Ocorrência; 95% IC)	5 (50,00; 12,30 – 87,70)		1,15 (0,27 – 4,90) p=0,846
	Only Serotype f was identified	P-value	Bruto OR (95% IC)
Ativa (n=28) N (Ocorrência; 95%IC)	7 (25,00; 7,90 – 42,10)	1,000#	1
Inativa (n=10) N (Ocorrência; 95% IC)	2 (20,00; -10,16 – 50,16)		0,75 (0,13 – 4,40) p=0,750
	Sorotipo k	P-valor	Bruto OR (95% IC)
Ativa (n=28) N (Ocorrência; 95% IC)	9 (32,14; 13,70 – 50,58)	0,150#	1
Inativa (n=10) N (Ocorrência; 95% IC)	6 (60,00; 23,06 – 96,94)		3,17 (0,71 – 14,10) p=0,130
	Sorotipo c + f	P-valor	Bruto OR (95% IC)
Ativa (n=28) N (Ocorrência; 95% IC)	2 (7,14; -3,03 – 17,31)	1,000#	Não estimado
Inativa (n=10) N (Ocorrência; 95% IC)	0 (0,00; 0,00 – 0,00)		
	Sorotipo c + k	P-valor	Bruto OR (95% IC)
Ativa (n=28) N (Ocorrência; 95% IC)	5 (17,86; 2,73 – 32,98)	0,411#	1
Inativa (n=10) N (Ocorrência; 95% IC)	3 (30,00; -4,56 – 64,56)		1,97 (0,37 – 10,40) p=0,424
	Sorotipo f + k	P-valor	Bruto OR (95% IC)
Ativa (n=28) N (Ocorrência; 95% IC)	5 (17,86; 2,73 – 32,98)	0,411#	1
Inativa (n=10) N (Occurence; 95% IC)	3 (30,00; -4,56 – 64,56)		1,97 (0,37 – 10,40) p=0,424
	Sorotipo c + f + k	P-valor	Bruto OR (95% IC)
Ativa (n=28) N (Ocorrência; 95% IC)	1 (3,57; -3,76; 10,90)	1,000#	Não estimado
Inativa (n=10) N (Occurence; 95% IC)	0 (0,00; 0,00 – 0,00)		
	Nenhum dos sorotipos (c, e, f ou k)	P-valor	Bruto OR (95% IC)
Ativa (n=28) N (Ocorrência; 95% IC)	1 (3,57; -3,76; 10,90)	1,000#	Não estimado
Inativa (n=10) N (Ocorrência; 95% IC)	0 (0,00; 0,00 – 0,00)		
	Gene <i>cbm</i>	P-valor	Bruto OR (95% IC)
Ativa (n=28) N (Ocorrência; 95% IC)	15 (53,57; 33,88 – 73,26)	1,000#	1
Inativa (n=10) N (Ocorrência; 95% IC)	6 (60,00; 23,06 – 96,94)		1,30 (0,30 – 5,64) p=0,726

Legenda: #Teste exato de Fisher; 95%IC: 95% intervalo de confiança; OR: Razão de chances.

Tabela Suplementar 2. Distribuição dos sorotipos de *S. mutans* nas amostras positivas para o gene *cbm* (n=24)

Gene *cbm*

Único sorotipo		Múltiplos sorotipos		
Sorotipo <i>c</i>	Sorotipo <i>f</i>	Sorotipo <i>f e k</i>	Sorotipo <i>c, f e k</i>	Sorotipo <i>c e k</i>
(3/24; 12,5%)	(10/24; 41,66%)	(8/24; 33,33%)	(2/24; 8,33%)	(1/24; 4,16%)

3 CONCLUSÃO

Este estudo demonstrou que a detecção dos sorotipos *c*, *f* ou *k* e, de múltiplos sorotipos de *S. mutans* está associada com amostras de biofilme de crianças com maior severidade de cárie. Além disso, o gene *cbm* foi identificado nas amostras de dentina cariada e de biofilme de crianças com lesões dentinárias. Em biofilme, o gene *cbm* está relacionado com crianças com maior experiência de cárie. Os achados desse estudo sugerem que sorotipos de *S. mutans* e o gene *cbm* podem apresentar um papel particularmente relevante em lesões de cárie dentinária de crianças com CPI. Desse modo, tais achados indicam o possível papel do *S. mutans* na progressão de cárie em dentina.

REFERÊNCIAS

- AAS, J. A. *et al.* Bacteria of dental caries in primary and permanent teeth in children and young adults. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n.4, p.1407–1417, 2008.
- ABRANCHES, J. *et al.* The collagen-binding protein *Cnm* is required for *Streptococcus mutans* adherence to and intracellular invasion of human coronary artery endothelial cells. **Infection and Immunity**, v.79, n.6, p. 2277–2284, 2011.
- ALALUUSUA, S.; RENKONEN, O. *Streptococcus mutans* establishment and dental caries experience in children from 2 to 4 years old. **European Journal of Oral Sciences**, v.91, p. 453-457, 1983.
- AVILÉS-REYES, A. *et al.* Collagen-binding proteins of *Streptococcus mutans* and related streptococci. **Molecular Oral Microbiology**, v.32, n.2, p. 89-106, 2017.
- BABAEKHO, L., GHANE, M., EZATZADE, F., & EFTEKHARI TOROGHI, S. *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* distribution in the saliva and plaque of Iranian population: Higher prevalence of *S. mutans* serotypes *f* and *k*. **International Journal of Dental Hygiene**, v. 19, n.2, p. 193–200, 2021.
- BABAEKHO, L.; MEHRIZI, A.A.; GHANE, M. *Streptococcus mutans*, sugar consumption, and oral hygiene: Which one has more effect on decayed, missing, and filled teeth (DMFT) score in Iranian adults? **Dental Research Journal**, v.17, n.2, p.134-141, 2020.
- BECKER, M. R. *et al.* Molecular analysis of bacterial species associated with childhood caries. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 3, p. 1001–1009, 2002.
- BEIGHTON, D. *et al.* A multi-country comparison of caries-associated microflora in demographically diverse children. **Community Dental Health**, v. 21, n. 1 SUPPL., p. 96–101, 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.
- CAUFIELD, P. W.; CUTTER, G. R.; DASANAYAKE, A. P. Initial Acquisition of Mutans Streptococci by Infants: Evidence for a Discrete Window of Infectivity. **Journal of Dental Research**, v. 72, n. 1, p. 37–45, 1993.
- CARLETTO-KÖRBER, F.P.; GONZÁLEZ-ITTIG, R.E.; JIMENEZ, M.G.; CORNEJO, L.S. Serotype diversity of *Streptococcus mutans* and caries activity in children in Argentina. **European Journal of Paediatric Dentistry**, v.16, p. 177-80, 2015.
- DASHPER, S.G. *et al.* Temporal development of the oral microbiome and prediction of early childhood caries. **Scientific Reports**, v. 9, n.1, p. 19732, 2019.

- ELYASSI M.; BABAEKHOUS L., GHANE, G. *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* contributions in dental caries in Iranian and Afghan children: A report from serotype distribution and novel STs, **Archives of Oral Biology**, v. 139, n.3, p. 105431, 2022.
- FAKHRUDDIN, K.S.; NGO, H.C.; SAMARANAYAKE, L.P. Cariogenic microbiome and microbiota of the early primary dentition: A contemporary overview. **Oral Diseases**, v. 25, n.4, p. 982-995, 2019.
- FELDENS, C. A. *et al.* Early feeding practices and severe early childhood caries in four-year-old children from southern Brazil: A birth cohort study. **Caries Research**, v. 44, n. 5, p. 445–452, 2010.
- GARCIA, B.A. *et al.* Association of *Candida albicans* and Cbp⁺ *Streptococcus mutans* with early childhood caries recurrence. **Scientific Reports**, v. 11, n.1, 2021.
- GRONROOS, L. *et al.* Chlorhexidine susceptibilities of mutans streptococcal serotypes and ribotypes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39, n. 4, p. 894–898, 1995.
- GROSS, E.L. *et al.* Beyond *Streptococcus mutans*: dental caries onset linked to multiple species by 16S rRNA community analysis. **PLoS One**, v. 7, n.10, 2012.
- HAJISHENGALLIS, E. *et al.* Advances in the microbial etiology and pathogenesis of early childhood caries. **Molecular Oral Microbiology**, v. 32, n.1, p. 24-34, 2017.
- JENKINSON, H. F.; LAMONT, R. J. Oral microbial communities in sickness and in health **Trends in Microbiology**, v. 13, n.12, p.589-95, 2005.
- LAMBA, G. S. *et al.* Association of *Streptococcus mutans* collagen binding genes with severe childhood caries. **Clinical Oral Investigations**, v. 24, n. 10, p. 3467-3475, 2020.
- LAPIRATTANAKUL, J. *et al.* Detection of serotype k *Streptococcus mutans* in Thai subjects. **Oral Microbiology Immunology**, v.24, n.5, p. 431-433, 2009.
- LAPIRATTANAKUL, J. *et al.* Multilocus sequence typing analysis of *Streptococcus mutans* strains with the *cnm* gene encoding collagen-binding adhesin. **Journal Medical Microbiology**, v. 60, p.1677-1684, 2011.
- LEMOS, J.A; BURNE, R.A. A model of efficiency: stress tolerance by *Streptococcus mutans*. **Microbiology (Reading)**, v. 154, p. 3247-3255, 2008.
- LEMOS, J.A. *et al.* The Biology of *Streptococcus mutans*. **Microbiology Spectrum** , v. 7, n.1, 2019.
- LIMA AR, HERRERA DR, FRANCISCO PA, PEREIRA AC, LEMOS J, ABRANCHES J, GOMES BPPA. Detection of *Streptococcus mutans* in symptomatic and asymptomatic infected root canals. **Clinical Oral Investigations**, v. 25, n.6, p. 3535-3542, 2021.
- LINZER; R. Immunochemical aspects of serotype carbohydrate antigens of *Streptococcus mutans*. **Molecular microbiology and immunology of Streptococcus mutans**, p. 29-38, 1986.

- MATSUMOTO-NAKANO, M. Role of *Streptococcus mutans* surface proteins for biofilm formation. **Japanese Dental Science Review**, v. 54, n.1, p. 22–29, 2018.
- MILLER, J.H. *et al.* The collagen binding protein Cnm contributes to oral colonization and cariogenicity of *Streptococcus mutans* OMZ175. **Infection and Immunity**, v.83, n.5, p. 2001-10, 2015.
- MISAKI, T. *et al.* Presence of *Streptococcus mutans* strains harbouring the *cnm* gene correlates with dental caries status and IgA nephropathy conditions. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 1–9, 2016.
- MOMENI, S. S. *et al.* *Streptococcus mutans* serotypes and collagen-binding proteins Cnm/Cbm in children with caries analysed by PCR. **Molecular Oral Microbiology**, v. 34, n. 2, p. 64–73, 2019.
- NAKANO, K. *et al.* Demonstration of *Streptococcus mutans* with a Cell Wall Polysaccharide Specific to a New Serotype, k, in the Human Oral Cavity. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 1, p. 198–202, 2004a.
- NAKANO, K. *et al.* Development of a PCR method for rapid identification of new *Streptococcus mutans* Serotype k strains. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 42, n. 11, p. 4925-4930, 2004b.
- NAKANO, K. *et al.* Detection of cariogenic *Streptococcus mutans* in extirpated heart valve and atheromatous plaque specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 9, p. 3313-3317, 2006.
- NAKANO, K. *et al.* Serotype distribution of *Streptococcus mutans* a pathogen of dental caries in cardiovascular specimens from Japanese patients. **Journal of Medical Microbiology**, v. 56, n. 4, p. 551–556, 2007.
- NAKANO, K.; OOSHIMA, T. Serotype classification of *Streptococcus mutans* and its detection outside the oral cavity. **Future Microbiology**, v.4, n.7, p. 891-902, 2009.
- NAKANO, K., *et al.* Roles of oral bacteria in cardiovascular diseases--from molecular mechanisms to clinical cases: Cell-surface structures of novel serotype k *Streptococcus mutans* strains and their correlation to virulence. **Journal of Pharmacological Sciences**, v.113, n.2, p. 120-5, 2010.
- NEMOTO, H. *et al.* Molecular characterization of *Streptococcus mutans* strains isolated from the heart valve of an infective endocarditis patient. **Journal of Medical Microbiology**, v. 57, n. 7, p. 891–895, 2008.
- NG, M. W.; CHASE, I. Early Childhood Caries: Risk-Based Disease Prevention and Management. **Dental Clinics of North America**, v.57, n.1, p.1-16, 2013.
- NOMURA, R. *et al.* Molecular and clinical analyses of the gene encoding the collagen-binding adhesin of *Streptococcus mutans*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 58, n. 4, p. 469-475, 2009.
- NOMURA, R., NAKANO, K., NAKA, S., NEMOTO, H., MASUDA, K., LAPIRATTANAKUL, J., OOSHIMA, T. Identification and characterization of a collagen-

binding protein, Cbm, in *Streptococcus mutans*. **Molecular Oral Microbiology**, v. 27, n. 4, p. 308–323, 2012.

PANNU P, GAMBHIR R, SUJLANA A. Correlation between the salivary *Streptococcus mutans* levels and dental caries experience in adult population of Chandigarh, India. **European Journal of Dentistry**, Apr; v.7, n.2, p.191-195, 2013

PARISOTTO, T. M. *et al.* Early childhood caries and mutans streptococci: a systematic review. **Oral health & preventive dentistry**, v. 8, n. 1, p. 59–70, 2010.

PERES, M. A. *et al.* Oral diseases: a global public health challenge. **Lancet**, v. 394, p. 249-260, 2019.

PITTS, N.; BAEZ, R.; DIAZ-GUALLORY, C. *et al.* Early Childhood Caries: IAPD Bangkok Declaration. **International Journal of Paediatric Dentistry**, 2019.

PITTS, N. B. *et al.* Dental caries. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, 2017.

PRITCHARD, D.G. *et al.* Biochemical aspects of serotype carbohydrate antigens of *Streptococcus mutans*. In: Hamada S, Michalek SM, Kiyono H, Menaker L, McGhee JR, eds. **Molecular Microbiology and Immunobiology of Streptococcus mutans**. Amsterdã, Holanda: Elsevier Science Publishing BV (Divisão Biomédica); p. 39-49, 1986.

RAO, A. P., & AUSTIN, R. D. Serotype specific polymerase chain reaction identifies a higher prevalence of *Streptococcus mutans* serotype *k* and *e* in a random group of children with dental caries from the Southern region of India. **Contemporary clinical dentistry**, 5(3), 296, 2014.

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

SATO, Y. *et al.* *Streptococcus mutans* strains harboring collagen-binding adhesin. **Journal of Dental Research**, v. 83, n. 7, p. 534-539, 2004.

SHANMUGAM, K. T. *et al.* Dental caries vaccine- A possible option? **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, 2013.

SHIBATA, Y. *et al.* Analysis of loci required for determination of serotype antigenicity in *Streptococcus mutans* and its clinical utilization. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 9, p. 4107-4112, 2003.

SIRIANI, L. K. **Influência do gene *cnm* de *Streptococcus mutans* na formação de biofilme e na interação do microrganismo às células endoteliais**. São Paulo: Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da Universidade de São Paulo, 2012.

TAKAHASHI, N.; NYVAD, B. The role of bacteria in the caries process: ecological perspectives. **Journal of Dental Research**, v. 90, n. 3, p. 294-303, 2011.

TAKAHASHI, N.; NYVAD, B. Ecological Hypothesis of Dentin and Root Caries. **Caries Research**, v. 50, n.4, p. 422-31, 2016.

TINANOFF, N. *et al.* Early childhood caries epidemiology, a etiology, risk assessment, societal burden, management, education, and policy: Global perspective. **International Journal of Paediatric Dentistry**, v. 29, n.3, p. 238-248, 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global oral health status report: towards universal health coverage for oral health by 2030. **Licence**: CC BY-NC-SA 3.0 IGO, 2022.

ANEXO A - PROTOCOLO COMEPE/UFC N°158/11, Ceará, Brasil

Universidade Federal do Ceará
Comitê de Ética em Pesquisa

Of. N° 221/11

Fortaleza, 29 de agosto de 2011

Protocolo COMEPE n° 158/ 11

Pesquisador responsável: Beatriz Gonçalves Neves

Título do Projeto: "Determinação de indicadores de risco relacionados a diferentes estágios da cárie precoce na infância"

Levamos ao conhecimento de V.S^a. que o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará – COMEPE, dentro das normas que regulamentam a pesquisa em seres humanos, do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde, Resolução n° 196 de 10 de outubro de 1996 e complementares, aprovou o protocolo e o TCLE do projeto supracitado na reunião do dia 18 de agosto de 2011.

Outrossim, informamos, que o pesquisador deverá se comprometer a enviar o relatório final do referido projeto.

Atenciosamente,

Assinatura manuscrita em tinta preta, aparentemente de Fernando A. Costa Freitas.

Dr. Fernando A. Costa Freitas
Coordenador do Comitê
de Ética em Pesquisa

ANEXO B – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

UFC - UNIVERSIDADE
FEDERAL DO CEARÁ /



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: O PAPEL DE SOROTIPOS E DE GENES DE PROTEÍNAS DE LIGAÇÃO AO COLÁGENO *cnm* E *cbm* DE STREPTOCOCCUS MUTANS NA CÁRIE DENTÁRIA

Pesquisador: Lidiany Karla Azevedo Rodrigues

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 52162221.0.0000.5054

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.111.675

Apresentação do Projeto:

Streptococcus mutans, um dos principais microrganismos relacionados à cárie dentária, possui quatro sorotipos conhecidos (c, e, f e k), com base na composição química dos polissacarídeos de superfície celular. A presença de múltiplos sorotipos e cepas com proteínas de ligação ao colágeno (*cnm* e *cbm*) tem sido associada a doenças sistêmicas. No entanto, é escassa a avaliação da distribuição de diferentes sorotipos de *S. mutans* e sua associação com cárie na primeira infância (CPI). O presente projeto irá investigar através da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) a prevalência dos sorotipos (c, e, f e k) e dos genes de proteínas de ligação ao colágeno, *cnm* e *cbm*, de *Streptococcus mutans* em amostras de DNA previamente extraído de biofilme dentário e de dentina cariada de crianças com cárie na primeira infância (CPI) em diferentes níveis de severidade (cárie em esmalte e cárie em dentina), comparando-a com aquela encontrada em biofilme de crianças livres de cárie. As amostras foram coletadas previamente de crianças com faixa etária entre 1 a 5 anos e 11 meses de idade. (COMPEPE/UFC N°158/11). As amostras serão divididas de acordo com os grupos: biofilme de crianças livres de cárie; biofilme de crianças cárie ativas com lesões de esmalte; biofilme de crianças com lesões cavitadas em dentina e amostras de dentina cariada coletadas de lesões dentinárias de crianças com CPI. O DNA extraído e armazenado das amostras de biofilme e de dentina cariada será analisado para identificação de *S. mutans* pela técnica da PCR com primers de identificação de diferentes sorotipos (c, e, f e k) de *S. mutans*, além de primers de genes de

Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1000

Bairro: Rodolfo Teófilo

UF: CE

Município: FORTALEZA

CEP: 60.430-275

Telefone: (85)3366-8344

E-mail: comepe@ufc.br

Continuação do Parecer: 5.111.675

proteínas de ligação ao colágeno, *cnm* e *cbm*. Os dados obtidos serão analisados por teste t de Student ou teste de Mann-Whitney. Com a presente pesquisa pretende-se obter uma melhor compreensão do papel de diferentes sorotipos de *S. mutans* e genes de proteínas de ligação ao colágeno na severidade da cárie em crianças com CPI.

Objetivo da Pesquisa:

Investigar através da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) a prevalência dos sorotipos (c, e, f e k) e dos genes de proteínas de ligação ao colágeno, *cnm* e *cbm*, de *Streptococcus mutans* em amostras de DNA previamente extraído de biofilme dentário e de dentina cariada de crianças com cárie na primeira infância (CPI) em diferentes níveis de severidade (cárie em esmalte e cárie em dentina), comparando-a com aquela encontrada em biofilme de crianças livres de cárie.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

-Riscos:

Os riscos da pesquisa podem ser referentes à perda do sigilo, porém os Pesquisadores se comprometem como forma para minimizar estes riscos, os microtubos são identificados por meio de códigos para garantir o anonimato das amostras. As amostras de DNA extraído de biofilme dentário e de dentina cariada estão armazenadas em microtubos de centrífuga e identificadas numericamente quanto ao tipo de amostra.

-Benefícios:

O conhecimento da prevalência dos sorotipos de *S. mutans* e sua possível relação com a progressão de cárie dentária poderá beneficiar a população, pois poderá ajudar a estabelecer estratégias para identificar o risco de pacientes para o desenvolvimento da doença cárie, contribuindo com a prevenção e tratamento da cárie na primeira infância.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de estudo será observacional e transversal. A prevalência dos sorotipos de *S. mutans* e dos genes *cnm* e *cbm*, que codificam proteínas de ligação ao colágeno, será determinada a partir de amostras de DNA previamente extraído de biofilme dentário e de dentina cariada de crianças com cárie na primeira infância (CPI) em diferentes níveis de severidade (cárie em esmalte e cárie em dentina), comparando-a com aquela encontrada em biofilme de crianças livres de cárie. As amostras foram coletadas previamente de crianças com faixa etária entre 1 a 5 anos e 11 meses de idade (COMEPE/UFC N°158/11). As amostras serão divididas de acordo com os grupos: (a) amostras DNA – biofilme – livre de cárie: biofilme dentário de crianças livres de cárie (n=20); (b) amostras DNA- biofilme – cárie em esmalte:

Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1000

Bairro: Rodolfo Teófilo

CEP: 60.430-275

UF: CE

Município: FORTALEZA

Telefone: (85)3366-8344

E-mail: comepe@ufc.br

Continuação do Parecer: 5.111.675

biofilme dentário de crianças com CPI com somente lesões de cárie em esmalte (n=17); (c) amostras DNA- biofilme- cárie em dentina: biofilme dentário de crianças com CPI com lesões dentinárias (n=38); (d) amostras DNA – cárie em dentina: dentina cariada de lesões dentinárias cavitadas de crianças com CPI (n=56). O DNA extraído e armazenado das amostras de biofilme e de dentina cariada será analisado para identificação de *S. mutans* pela técnica da PCR com primers de identificação de diferentes sorotipos (c, e, f e k) de *S. mutans*, além de primers de genes de proteínas de ligação ao colágeno, *cnm* e *cbm*. A análise laboratorial será realizada para identificação de sorotipos de *Streptococcus mutans* e de genes de ligação ao colágeno *cnm/cbm* em biofilme e em dentina cariada através da Reação de Cadeia da Polimerase (PCR). Os procedimentos laboratoriais serão realizados no Laboratório de Pesquisa do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Ceará (UFC).

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

- Projeto: versão anexada em 14/09/2021
- Cronograma: término em junho de 2022
- Declaração de Fiel depositário
- Declaração dos pesquisadores
- Termo de compromisso para utilização dados
- Solicitação de dispensa TCLE
- Orçamento

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Todas as solicitações foram atendidas.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1823691.pdf	28/10/2021 09:39:01		Aceito
Outros	TERMO_DE_COMPROMISSO_PARA_	28/10/2021	Lidiany Karla	Aceito

Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1000

Bairro: Rodolfo Teófilo

CEP: 60.430-275

UF: CE

Município: FORTALEZA

Telefone: (85)3366-8344

E-mail: comepe@ufc.br

Continuação do Parecer: 5.111.675

Outros	ILIZACAO_DE_DADOS.docx	09:38:31	Azevedo Rodrigues	Aceito
Outros	DECLARACAO_DE_FIEL_DEPOSITARIO.pdf	28/10/2021 09:34:35	Lidiany Karla Azevedo Rodrigues	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	CEP_projeto.docx	14/09/2021 18:29:45	Lidiany Karla Azevedo Rodrigues	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	DISPENSA_DE_TCLE.docx	14/09/2021 18:23:41	Lidiany Karla Azevedo Rodrigues	Aceito
Outros	CARTA_CEP.docx	14/09/2021 18:22:24	Lidiany Karla Azevedo Rodrigues	Aceito
Declaração de Pesquisadores	DECLARACAO_DOS_PESQUISADORES_ENVOLVIDOS_NA_PESQUISA.docx	13/09/2021 20:45:25	Lidiany Karla Azevedo Rodrigues	Aceito
Outros	parecer_anterior.pdf	12/09/2021 23:24:40	Lidiany Karla Azevedo Rodrigues	Aceito
Folha de Rosto	folhaDeRosto.pdf	12/09/2021 23:20:20	Lidiany Karla Azevedo Rodrigues	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA.docx	12/09/2021 23:18:31	Lidiany Karla Azevedo Rodrigues	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	autorizacao_instituicao.pdf	12/09/2021 22:49:10	Lidiany Karla Azevedo Rodrigues	Aceito
Orçamento	DECLARACAO_DE_ORCAMENTO_FINANCEIRO.docx	09/09/2021 23:51:59	Lidiany Karla Azevedo Rodrigues	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

FORTALEZA, 18 de Novembro de 2021

Assinado por:
FERNANDO ANTONIO FROTA BEZERRA
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1000

Bairro: Rodolfo Teófilo

CEP: 60.430-275

UF: CE

Município: FORTALEZA

Telefone: (85)3366-8344

E-mail: comepe@ufc.br

ANEXO C – INSTRUÇÕES PARA AUTORES DO PERIÓDICO ARCHIVES OF ORAL BIOLOGY

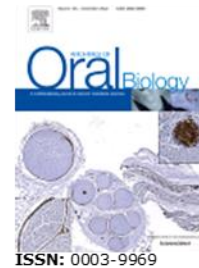


ARCHIVES OF ORAL BIOLOGY
A Multidisciplinary Journal of Oral & Craniofacial Sciences

AUTHOR INFORMATION PACK

TABLE OF CONTENTS

•	Description	p.1
•	Audience	p.1
•	Impact Factor	p.1
•	Abstracting and Indexing	p.2
•	Editorial Board	p.3
•	Guide for Authors	p.4



DESCRIPTION

Archives of Oral Biology is an international journal which aims to publish papers of the highest scientific quality in the oral and craniofacial sciences including:
Developmental biology Cell and molecular biology Molecular genetics Immunology Pathogenesis Microbiology Biology of dental caries and periodontal disease Forensic dentistry Neuroscience Salivary biology Mastication and swallowing Comparative anatomy Paeleodontology *Archives of Oral Biology* will also publish expert reviews and articles concerned with advancement in relevant methodologies. The journal will only consider clinical papers where they make a significant contribution to the understanding of a disease process. Journal Metrics

AUDIENCE

Oral biologists, physiologists, anatomists, pathologists.

IMPACT FACTOR

2021: 2.640 © Clarivate Analytics Journal Citation Reports 2022

ABSTRACTING AND INDEXING

Elsevier BIOBASE
 Nutrition Research Newsletter
 Nutrition Abstracts and Reviews Series
 PharmacoEconomics and Outcomes News
 Pig News and Information
 Reactions Weekly
 Review of Medical and Veterinary Entomology
 Science Citation Index
 SIIC Data Bases
 Soils and Fertilizers
 Sugar Industry Abstracts
 Tropical Diseases Bulletin
 Veterinary Bulletin
 Vitis Viticulture and Enology Abstracts
 Biological Abstracts
 Animal Breeding Abstracts
 BIOSIS Previews
 Current Awareness in Biological Sciences
 Abstracts in Anthropology
 Abstracts on Hygiene and Communicable Diseases
 Dairy Science Abstracts
 GeoRef
 Index Veterinarius
 Inpharma Weekly
 Medical and Surgical Dermatology
 Abstracts of Mycology
 AgBiotech News and Information
 Maize Abstracts Online
 Postharvest News and Information
 Review of Agricultural Entomology
 Small Animals
 Soybean Abstracts (Online Edition)
 Speleological Abstracts
 Agris
 Aquatic Sciences and Fisheries Abstracts
 Arts and Humanities Citation Index
 CABI Information
 Cancerlit
 Gale Database of Publications & Broadcast Media
 Global Health
 Inside Conferences
 ISI Science Citation Index
 Pascal Francis
 RTECS (Registry of Toxic Effects of Chemical Substances)
 Web of Science
 SPORTDiscus
 TOXFILE
 UnCover
 Zoological Record
 BIOSIS Toxicology
 CSA Life Sciences Abstracts
 Research Alert
 BIOSIS Citation Index
 Elsevier BIOBASE
 Chemical Abstracts
 Current Contents - Life Sciences
 Current Contents
 Current Contents
 Current Contents
 PubMed/Medline

EDITORIAL BOARD

Editors-in-Chief

S.W. Cadden, University of Dundee, DD1 4HN, Dundee, United Kingdom

F. T. Lundy, Queen's University Belfast, BT7 1NN, Belfast, United Kingdom

Associate Editors

G.N. Belibasakis, Karolinska Institute, Stockholm, Sweden

P.M. Castelo, Federal University of Sao Paulo, Institute of Environmental, Chemical and Pharmaceutical Sciences, Diadema, Brazil

D. Grenier, Laval University, Québec, Quebec, Canada

M.Q. Wang, Air Force Medical University, Xian, China

Editorial Board

O. Andrukhov, Wien, Austria

V. Arana-Chavez, SAO PAULO, Brazil

Z. Bian, Wuhan, China

G. H. Carpenter, London, United Kingdom

J-h Chen, Xian, China

K. Cogo-Müller, SAO PAULO, Brazil

X. Duan, Xian, China

M.B.D. Gaviao, CAMPINAS, Brazil

H. van der Glas, Utrecht, Netherlands

S. Herring, Seattle, United States of America

Y. Jin, Xian, China

C. P. McArthur, Kansas City, United States of America

M. Mei, Dunedin, New Zealand

G. Murray, Sydney, Australia

J. V. Ro, Baltimore, United States of America

C. Robinson, Leeds, United Kingdom

L. P. Samaranayake, Hong Kong, Hong Kong

B.J. Sessle, Toronto, Canada

P.T. Sharpe, London, United Kingdom

A.J. Smith, Birmingham, United Kingdom

D Steinberg, Jerusalem, Israel

H. Suda, Bunkyo-Ku, Japan

K. Tanne, Higashiroshima, Japan

L. Walsh, Brisbane, Australia

Editor-In-Chief Emeritus

B. Proctor, London, United Kingdom

GUIDE FOR AUTHORS

Editors-in-Chief:

Professor S W Cadden, Dundee, Scotland
Dr Fionnuala T. Lundy, Northern Ireland, UK

Archives of Oral Biology is an international journal which aims to publish papers of the highest scientific quality reporting new knowledge from the orofacial region including:

- developmental biology
- cell and molecular biology
- molecular genetics
- immunology
- pathogenesis
- microbiology
- biology of dental caries and periodontal disease
- forensic dentistry
- neuroscience
- salivary biology
- mastication and swallowing
- comparative anatomy
- paleodontology

Archives of Oral Biology will also publish expert reviews and articles concerned with advancement in relevant methodologies. The journal will consider clinical papers only where they make a significant contribution to the understanding of a disease process.

These guidelines generally follow the [Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals](#)

Types of Contribution

Original papers and review articles are welcomed. There will be no differentiation on the basis of length into full or short communications. Editorial commentaries will also be considered but only by invitation. All submissions will be refereed.

Page charges

This journal has no page charges.

Submission checklist

You should use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check all relevant sections in this Guide for Authors for more details.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded:

Manuscript:

- Include keywords
- All figures (include relevant captions)
- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
- Indicate clearly if color should be used for any figures in print

Graphical Abstracts (where applicable)

Highlights (where applicable)

Supplemental files (where applicable)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa

- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)
- Relevant declarations of interest have been made
- Declarations of authors' contributions have been made if there are four or more authors
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

For further information, visit our [Support Center](#)

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

Please see our information on [Ethics in publishing](#).

Studies in humans and animals

If the work involves the use of human subjects, the author should ensure that the work described has been carried out in accordance with [The Code of Ethics of the World Medical Association](#) (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans. The manuscript should be in line with the [Recommendations for the Conduct, Reporting, Editing and Publication of Scholarly Work in Medical Journals](#) and aim for the inclusion of representative human populations (sex, age and ethnicity) as per those recommendations. The terms [sex and gender](#) should be used correctly.

Authors should include a statement in the manuscript that informed consent was obtained for experimentation with human subjects. The privacy rights of human subjects must always be observed.

All animal experiments should comply with the [ARRIVE guidelines](#) and should be carried out in accordance with the U.K. Animals (Scientific Procedures) Act, 1986 and associated guidelines, [EU Directive 2010/63/EU for animal experiments](#), or the National Research Council's [Guide for the Care and Use of Laboratory Animals](#) and the authors should clearly indicate in the manuscript that such guidelines have been followed. The sex of animals must be indicated, and where appropriate, the influence (or association) of sex on the results of the study.

Declaration of interest

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential competing interests include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. Authors must disclose any interests in two places: 1. A summary declaration of interest statement in the title page file (if double anonymized) or the manuscript file (if single anonymized). If there are no interests to declare then please state this: 'Declarations of interest: none'. 2. Detailed disclosures as part of a separate Declaration of Interest form, which forms part of the journal's official records. It is important for potential interests to be declared in both places and that the information matches. [More information](#).

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see 'Multiple, redundant or concurrent publication' section of our ethics policy for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically, without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article is likely to be checked by the originality detection service CrossCheck.

Preprints

Please note that [preprints](#) can be shared anywhere at any time, in line with Elsevier's [sharing policy](#). Sharing your preprints e.g. on a preprint server will not count as prior publication (see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' for more information).

Use of inclusive language

Inclusive language acknowledges diversity, conveys respect to all people, is sensitive to differences, and promotes equal opportunities. Content should make no assumptions about the beliefs or commitments of any reader; contain nothing which might imply that one individual is superior to

another on the grounds of age, gender, race, ethnicity, culture, sexual orientation, disability or health condition; and use inclusive language throughout. Authors should ensure that writing is free from bias, stereotypes, slang, reference to dominant culture and/or cultural assumptions. We advise to seek gender neutrality by using plural nouns ("clinicians, patients/clients") as default/wherever possible to avoid using "he, she," or "he/she." We recommend avoiding the use of descriptors that refer to personal attributes such as age, gender, race, ethnicity, culture, sexual orientation, disability or health condition unless they are relevant and valid. When coding terminology is used, we recommend to avoid offensive or exclusionary terms such as "master", "slave", "blacklist" and "whitelist". We suggest using alternatives that are more appropriate and (self-) explanatory such as "primary", "secondary", "blocklist" and "allowlist". These guidelines are meant as a point of reference to help identify appropriate language but are by no means exhaustive or definitive.

Author contributions

All authors should have made substantial contributions to all of the following: (1) the conception and design of the study, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data, (2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content, (3) final approval of the version to be submitted. If any individual contributed to a paper but did not meet all three of these criteria, they should be mentioned in an Acknowledgements section but must not be listed as an author (see Acknowledgements section below).

For transparency, and to show that they met the above criteria, authors should submit an author statement file outlining their individual contributions to the paper using the relevant CRediT roles: Conceptualization; Data curation; Formal analysis; Funding acquisition; Investigation; Methodology; Project administration; Resources; Software; Supervision; Validation; Visualization; Roles/Writing - original draft; Writing - review and editing. Authorship statements should be formatted with the names of authors first and CRediT role(s) following. More details and an example. [More details and an example.](#)

Changes to Authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors before submitting their manuscript and to provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only before the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the corresponding author: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors after the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Article transfer service

This journal uses the Elsevier Article Transfer Service to find the best home for your manuscript. This means that if an editor feels your manuscript is more suitable for an alternative journal, you might be asked to consider transferring the manuscript to such a journal. The recommendation might be provided by a Journal Editor, a dedicated [Scientific Managing Editor](#), a tool assisted recommendation, or a combination. If you agree, your manuscript will be transferred, though you will have the opportunity to make changes to the manuscript before the submission is complete. Please note that your manuscript will be independently reviewed by the new journal. [More information.](#)

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see [more information](#) on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. [Permission](#) of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If

excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has [preprinted forms](#) for use by authors in these cases.

For gold open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'License Agreement' ([more information](#)). Permitted third party reuse of gold open access articles is determined by the author's choice of [user license](#).

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. [More information](#).

Elsevier supports responsible sharing

Find out how you can [share your research](#) published in Elsevier journals.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement, it is recommended to state this.

Open access

Please visit our [Open Access page](#) for more information.

Elsevier Researcher Academy

[Researcher Academy](#) is a free e-learning platform designed to support early and mid-career researchers throughout their research journey. The "Learn" environment at Researcher Academy offers several interactive modules, webinars, downloadable guides and resources to guide you through the process of writing for research and going through peer review. Feel free to use these free resources to improve your submission and navigate the publication process with ease.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the [English Language Editing service](#) available from Elsevier's Author Services.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

PREPARATION

Queries

For questions about the editorial process (including the status of manuscripts under review) or for technical support on submissions, please visit our [Support Center](#).

Peer review

This journal operates a single anonymized review process. All contributions will be initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then typically sent to a minimum of two independent expert reviewers to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final. Editors are not involved in decisions about papers which they have written themselves or have been written by family members or colleagues or which relate to products or services in which the editor has an interest. Any such submission is subject to all of the journal's usual procedures, with peer review handled independently of the relevant editor and their research groups. [More information on types of peer review](#).

REVISED SUBMISSIONS

When submitting the revised manuscript, please make sure that you upload the final version of the paper with the changes highlighted. Please remove the old version(s) of the manuscript before submitting the revised version.

Use of word processing software

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To minimize unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Article structure

Manuscript Structure

Follow this order when typing manuscripts: Title, Authors, Affiliations, Abstract, Keywords, Main text (Introduction, Materials & Methods, Results, Discussion for an original paper), Acknowledgments, Appendix, References, Tables and then Figure Captions. Do not import the Figures or Tables into your text. The corresponding author should be identified with an asterisk and footnote. All other footnotes (except for table footnotes) should be identified with superscript Arabic numbers.

Introduction

This should be a succinct statement of the problem investigated within the context of a brief review of the relevant literature. Literature directly relevant to any inferences or argument presented in the Discussion should in general be reserved for that section. The introduction may conclude with the reason for doing the work but should not state what was done nor the findings.

Materials and Methods

Enough detail must be given here so that another worker can repeat the procedures exactly. Where the materials and methods were exactly as in a previous paper, it is not necessary to repeat all the details but sufficient information must be given for the reader to comprehend what was done without having to consult the earlier work.

Authors are requested to make plain that the conditions of animal and human experimentation are as outlined in the "Ethics" and "Studies on Animals" sections above

Results or Findings

These should be given clearly and concisely. Care should be taken to avoid drawing inferences that belong to the Discussion. Data may be presented in various forms such as histograms or tables but, in view of pressure on space, presentation of the same data in more than one form is unacceptable.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is occasionally appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion section.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.

• **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

• **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**

• **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

As titles frequently stand alone in indexes, bibliographic journals etc., and indexing of papers is, to an increasing extent, becoming computerized from key words in the titles, it is important that titles should be as concise and informative as possible. Thus the animal species to which the observations refer should always be given and it is desirable to indicate the type of method on which the observations are based, e.g. chemical, bacteriological, electron-microscopic, histochemical, etc. A "running title" of not more than 40 letters and spaces must also be supplied. A keyword index must be supplied for each paper.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal as they help increase the discoverability of your article via search engines. They consist of a short collection of bullet points that capture the novel results of your research as well as new methods that were used during the study (if any). Please have a look at the examples here: [example Highlights](#).

Highlights should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point).

Structured abstract

The paper should be prefaced by an abstract aimed at giving the entire paper in miniature. Abstracts should be no longer than 250 words and should be structured as per the guidelines published in the Journal of the American Medical Association (JAMA 1995; 273: 27-34). In brief, the abstract should be divided into the following sections: (1) Objective; (2) Design - if clinical, to include setting, selection of patients, details on the intervention, outcome measures, etc.; if laboratory research, to include details on methods; (3) Results; (4) Conclusions.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using British spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

As Archives of Oral Biology is a journal with a multidisciplinary readership, abbreviations, except those universally understood such as mm, g, min. u.v., w/v and those listed below, should be avoided if possible. Examples of abbreviations which may be used without definition are: ADP, AMP, ATP, DNA, RNA, EDTA, EMG, tris.

Other abbreviations used to improve legibility should be listed as a footnote on the title page as well as being defined in both the abstract and the main text on first usage. Chemical symbols may be used for elements, groups and simple compounds, but excessive use should be avoided. Abbreviations other than the above should not be used in titles and even these should be avoided if possible.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.) but who did not meet all the criteria for authorship (see Authorship section above).

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, it is recommended to include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Bacterial nomenclature

Organisms should be referred to by their scientific names according to the binomial system. When first mentioned the name should be spelt in full and in italics. Afterwards the genus should be abbreviated to its initial letter, e.g. '*S. aureus*' not 'Staph. aureus'. If abbreviation is likely to cause confusion or render the intended meaning unclear, the names of microbes should be spelt in full. Only those names which were included in the Approved List of Bacterial Names, Int J Syst Bacteriol 1980; 30: 225-420 and those which have been validly published in the Int J Syst Bacteriol since 1 January 1980 have standing in nomenclature. If there is good reason to use a name that does not have standing in nomenclature, the names should be enclosed in quotation marks and an appropriate statement concerning the nomenclatural status of the name should be made in the text (for an example see Int J Syst Bacteriol 1980; 30: 547-556). When the genus alone is used as a noun or adjective, use lower case Roman not italic, e.g. 'organisms were staphylococci' and 'streptococcal infection'. If the genus is specifically referred to use italics e.g. 'organisms of the genus *Staphylococcus*'. For genus in plural, use lower case roman e.g. 'salmonellae'; plurals may be anglicized e.g. 'salmonellas'. For trivial names, use lower case Roman e.g. 'meningococcus'

Artwork

Image manipulation

Whilst it is accepted that authors sometimes need to manipulate images for clarity, manipulation for purposes of deception or fraud will be seen as scientific ethical abuse and will be dealt with accordingly. For graphical images, this journal is applying the following policy: no specific feature within an image may be enhanced, obscured, moved, removed, or introduced. Adjustments of brightness, contrast, or color balance are acceptable if and as long as they do not obscure or eliminate any information present in the original. Nonlinear adjustments (e.g. changes to gamma settings) must be disclosed in the figure legend.

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.
- Ensure that color images are accessible to all, including those with impaired color vision.

A detailed [guide on electronic artwork](#) is available.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables should be placed on separate page(s) towards the end of the manuscript (see Manuscript Structure, above). Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

Preprint references

Where a preprint has subsequently become available as a peer-reviewed publication, the formal publication should be used as the reference. If there are preprints that are central to your work or that cover crucial developments in the topic, but are not yet formally published, these may be referenced. Preprints should be clearly marked as such, for example by including the word preprint, or the name of the preprint server, as part of the reference. The preprint DOI should also be provided.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support [Citation Style Language styles](#), such as [Mendeley](#). Using citation plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide. If you use reference management software, please ensure that you remove all field codes before submitting the electronic manuscript. [More information on how to remove field codes from different reference management software.](#)

Reference style

Text: Citations in the text should follow the referencing style used by the American Psychological Association. You are referred to the Publication Manual of the American Psychological Association, Seventh Edition, ISBN 978-1-4338-3215-4, copies of which may be [ordered online](#).

List: references should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J. A. J., & Lupton, R. A. (2010). The art of writing a scientific article. *Journal of Scientific Communications*, 163, 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.sc.2010.00372>.

Reference to a journal publication with an article number:

Van der Geer, J., Hanraads, J. A. J., & Lupton, R. A. (2018). The art of writing a scientific article. *Heliyon*, 19, Article e00205. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00205>.

Reference to a book:

Strunk, W., Jr., & White, E. B. (2000). *The elements of style* (4th ed.). Longman (Chapter 4).

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G. R., & Adams, L. B. (2009). How to prepare an electronic version of your article. In B. S. Jones, & R. Z. Smith (Eds.), *Introduction to the electronic age* (pp. 281–304). E-Publishing Inc.

Reference to a website:

Powertech Systems. (2015). *Lithium-ion vs lead-acid cost analysis*. Retrieved from <http://www.powertechsystems.eu/home/tech-comer/lithium-ion-vs-lead-acid-cost-analysis/>.

Accessed January 6, 2016

Reference to a dataset:

[dataset] Oguro, M., Imahiro, S., Saito, S., & Nakashizuka, T. (2015). *Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions*. Mendeley Data, v1. <https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Reference to a conference paper or poster presentation:

Engle, E.K., Cash, T.F., & Jarry, J.L. (2009, November). *The Body Image Behaviours Inventory-3: Development and validation of the Body Image Compulsive Actions and Body Image Avoidance Scales*. Poster session presentation at the meeting of the Association for Behavioural and Cognitive Therapies, New York, NY.

Reference to software:

Coon, E., Berndt, M., Jan, A., Svyatsky, D., Atchley, A., Kikinon, E., Harp, D., Manzini, G., Shelef, E., Lipnikov, K., Garimella, R., Xu, C., Moulton, D., Karra, S., Painter, S., Jafarov, E., & Molins, S. (2020, March 25). *Advanced Terrestrial Simulator (ATS) v0.88 (Version 0.88)*. Zenodo. <https://doi.org/10.5281/zenodo.3727209>.

Data visualization

Include interactive data visualizations in your publication and let your readers interact and engage more closely with your research. Follow the instructions [here](#) to find out about available data visualization options and how to include them with your article.

Research data

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the [research data](#) page.

Data linking

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article.

When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the [database linking page](#). For [supported data repositories](#) a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

Mendeley Data

This journal supports Mendeley Data, enabling you to deposit any research data (including raw and processed data, video, code, software, algorithms, protocols, and methods) associated with your manuscript in a free-to-use, open access repository. During the submission process, after uploading your manuscript, you will have the opportunity to upload your relevant datasets directly to *Mendeley Data*. The datasets will be listed and directly accessible to readers next to your published article online.

For more information, visit the [Mendeley Data for journals page](#).

Research Elements

This journal enables you to publish research objects related to your original research – such as data, methods, protocols, software and hardware – as an additional paper in Research Elements.

Research Elements is a suite of peer-reviewed, open access journals which make your research objects findable, accessible and reusable. Articles place research objects into context by providing detailed descriptions of objects and their application, and linking to the associated original research articles. Research Elements articles can be prepared by you, or by one of your collaborators.

During submission, you will be alerted to the opportunity to prepare and submit a Research Elements article.

More information can be found on the [Research Elements page](#).

Data statement

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission. This may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you will have the opportunity to indicate why during the submission process, for example by stating that the research data is confidential. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the [Data Statement page](#).

AFTER ACCEPTANCE

Online proof correction

To ensure a fast publication process of the article, we kindly ask authors to provide us with their proof corrections within two days. Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author will, at no cost, receive a customized [Share Link](#) providing 50 days free access to the final published version of the article on [ScienceDirect](#). The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's [Author Services](#). Corresponding authors who have published their article gold open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.