

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
Faculdade de Ciências de Saúde
Programa de Pós-Graduação em Odontologia



Dissertação de Mestrado

Estudo do papel de *Streptococcus mutans* em biofilmes de superfícies radiculares
com o uso de técnicas Ômicas

Patrícia Fernanda Silva Bittencourt

Brasília, 13 de fevereiro de 2020

Patrícia Fernanda Silva Bittencourt

Estudo do papel de *Streptococcus mutans* em biofilmes de superfícies radiculares com o uso de técnicas Ômicas

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientadora: Nailê Damé Teixeira

Coorientadora: Thuy Do

Brasília, 2020

Patrícia Fernanda Silva Bittencourt

Estudo do papel de *Streptococcus mutans* em biofilmes de superfícies radiculares com o uso de técnicas Ômicas

Dissertação aprovada, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Odontologia, Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Data da defesa: 13 de fevereiro de 2020

Banca examinadora:

Profa. Dra. Nailê Damé Teixeira (Orientadora)

Profa. Dra. Ana Carolina Acevedo-Poppe (Membro titular)

Profa. Dra. Clarissa Cavalcanti Fatturi Parolo (Membro titular)

Profa. Dra. Loise Pedrosa Salles (Suplente)

Dedico este trabalho em primeiro lugar a Deus, Dono de toda ciência, sabedoria e poder. À minha família, em especial à minha querida filha Giovanna, por completar minha existência e encher meu coração de amor e alegria. Aos meus amados pais, Sônia e Raimundo, que me agraciaram com o dom da vida e que proporcionaram a minha educação e formação. Ao meu marido e amigo Rodrigo, por todo amor, cumplicidade e incentivo. Aos meus amigos, que me incentivaram todos os dias e sempre acreditaram em mim. À minha querida orientadora, Profa. Dra. Nailê Damé Teixeira, por toda contribuição e ensinamentos compartilhados e pela parceria na execução deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, Aquele que é o meu maior Mestre, por encher a minha vida do seu amor, do seu perdão e da sua paz.

Aos meus pais, que se dedicaram, abdicaram de seu tempo e de muitos projetos pessoais para que eu tivesse a oportunidade de estudar e de ter uma boa formação profissional e pessoal. Vocês educaram-me com amor e eu devo tudo que sou a vocês. Sinto orgulho de mim e do lugar no qual eu cheguei porque sei que vocês vieram segurando as minhas mãos.

À minha filha, Giovanna, meu maior tesouro, por ser essa voz que me faz continuar, a ajuda que não me deixa cair e a luz que me permite acreditar.

Ao meu marido, Rodrigo, por todo amor, paciência, compreensão, companheirismo e apoio nas horas mais difíceis e por me fazer acreditar que sou capaz.

Ao meu primo, Felipe. O seu carinho foi fundamental durante meu mestrado, obrigada pela amizade e ajuda.

Aos meus familiares, por estarem sempre presentes, incentivando-me e apoiando-me nessa jornada.

À Profa. Dra. Nailê Damé Teixeira, pela excelente orientação, disponibilidade e paciência e por acreditar e confiar em meu trabalho. Obrigada por caminhar ao meu lado na realização desse sonho e por ter me proporcionado experiências que contribuíram para o meu crescimento profissional e pessoal.

À minha coorientadora, Profa. Dra. Thuy Do, por toda sua dedicação, disponibilidade e ensinamentos, que tornaram possíveis a realização deste trabalho. Obrigada por compartilhar momentos especiais, os quais sempre me lembrarei com carinho.

À equipe da Profa. Dra. Marisa Maltz (Universidade Federal do Rio Grande do Sul), que realizou os procedimentos clínicos e laboratoriais do artigo 2 desta dissertação.

À Universidade de Brasília e à Faculdade de Ciências da Saúde, que abriram portas para que este sonho se tornasse realidade.

Ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia e à Secretaria do Curso de Pós-Graduação pela colaboração, auxiliando-me nos procedimentos acadêmicos formais.

À Profa. Dra. Soraya Coelho Leal e toda equipe da coordenação do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, pela atenção e disponibilidade.

Às Prof. Dra. Ana Carolina Acevedo-Poppe e Profa. Dra. Clarissa Cavalcanti Fatturi Parolo por aceitaram o convite para compor a banca examinadora da dissertação.

À Profa. Dra. Loise Pedrosa Salles pelo aceite do convite em ser suplente da banca examinadora.

À Profa. Dra. Heliana Dantas Mestrinho pelos ensinamentos, profissionalismo, e por ter me ensinado a paixão pela pesquisa.

À Profa. Dra. Débora Ferreira Carneiro pela amizade, apoio e carinho concedidos em todos os momentos da minha caminhada.

Aos meus colegas de trabalho, por me ajudarem a caminhar rumo ao meu sucesso.

Aos amigos que tive a oportunidade de conhecer ao longo do mestrado, pela amizade, risos, ajuda e convivência.

Aos amigos que a vida me presenteou, pelas palavras de incentivo, por torcerem sempre por mim e vibrarem com cada conquista.

À CAPES, pelo financiamento ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

A todos que colaboraram direta ou indiretamente para que eu pudesse vencer mais essa etapa. Meus sinceros agradecimentos.

Divido com vocês a conquista deste grande sonho,
Ser mestre!

*Feliz aquele que transfere o que sabe e
aprende o que ensina.*

Cora Coralina

RESUMO

Durante décadas, *Streptococcus mutans* tem sido considerado o principal agente etiológico de cárie dentária. Anteriormente associado somente ao desenvolvimento de lesões em esmalte, *S. mutans* chegou a ser considerado marcador biológico de cárie radicular. A maioria dos estudos para novas estratégias terapêuticas vinha sendo direcionada contra esse microrganismo. No entanto, estudos recentes baseados em DNA e RNA de lesões cáries descobriram um ecossistema extraordinariamente diverso, onde *S. mutans* representa apenas uma pequena fração da comunidade bacteriana. Esse fato apoia o conceito de que consórcios formados por múltiplos microrganismos agem coletivamente para desenvolver a doença cárie. Assim, ao invés de terapias antimicrobianas, mais especificamente anti-*S. mutans*, acredita-se que estratégias focadas em modificações ambientais da microbiota oral sejam eficazes em restaurar o equilíbrio ecológico da comunidade microbiana. Embora os resultados de estudos baseados em tecnologias Ômicas tenham sido bastante informativos, pouco se sabe como centenas de espécies microbianas habitam e interagem funcionalmente em biofilmes orais para causar doenças ou manter a homeostase. Além disso, tendo em vista o pouco conhecimento sobre a fisiologia e o metabolismo de *S. mutans* em seu habitat natural nas superfícies radiculares, o objetivo deste trabalho foi discutir o conhecimento atual de como as técnicas Ômicas estão contribuindo para o entendimento do microbioma oral em saúde e doença cárie e fazer uma análise descritiva sobre o papel do *S. mutans* em biofilmes de superfícies radiculares com o uso de técnicas Ômicas. Foram realizadas uma revisão crítica da literatura pela qual foi descrito a atual contribuição das tecnologias Ômicas para o entendimento da doença cárie mediante análise e interpretação da produção científica existente, e uma análise descritiva, a partir de dados secundários, da caracterização da expressão gênica de *S. mutans* em biofilmes de superfícies radiculares. Dados das tecnologias Ômicas mostraram que o entendimento da cárie dentária não é compatível com etiologia da doença ser provinda de uma única espécie e que o papel do microbioma oral na manutenção dos processos biológicos ainda é limitado na literatura. A expressão gênica de *S. mutans* em biofilmes de superfícies radiculares de saúde foi mínima, porém apresentou-se em alto número em amostras de doença. Uma visão geral dos genes de virulência mais prevalentes em biofilmes de cárie radicular demonstrou alta expressão dos genes *spaP*, *glgA*, *fruA*, *ciaH*, *comF*, *comD*, *gapC*, *pulA*, *SMU_872*, *hrcA*, *ccpA*, *arcC* e *argR* e tem suas funções relacionadas à adesão, à formação de biofilme, à acidogenicidade, à aciduricidade, ao *quorum-sensing*, ao transporte de açúcares e à tolerância ao estresse. As funções moleculares e os processos biológicos de sobrevivência dos genes mais abundantes foram semelhantes em ambos os grupos. *S. mutans* tem um papel importante no desenvolvimento de cárie radicular. Abordagens Ômicas têm permitido uma imagem mais completa da composição, potencial funcional e atividade do microbioma oral, no entanto, novos biomarcadores de cárie não foram descobertos nem foram desenvolvidos testes que poderiam ser eficazes para avaliar o risco de cárie nos estágios pré-clínicos da doença.

PALAVRAS-CHAVE: RNA-Seq; *Streptococcus mutans*; Cárie Radicular; Transcriptoma.

ABSTRACT

For decades, *Streptococcus mutans* has been considered the main causative agent of dental caries and most diagnostic and therapeutic strategies have been targeted toward this microorganism. Previously associated only with the development of enamel lesions, *S. mutans* was once considered a biological marker for root caries. Most studies for developing new therapeutic strategies have been targeted toward this microorganism. However, recent DNA- and RNA-based studies from carious lesions have uncovered an extraordinarily diverse ecosystem where *S. mutans* accounts only a tiny fraction of the bacterial community. This fact supports the concept that consortia formed by multiple microorganisms act collectively to develop dental caries. Thus, instead of antimicrobial therapies, strategies focused on environmental modifications of the oral microbiota are believed to be effective in restoring the ecological balance of the microbial community. Although findings from OMICS research have been greatly informative, little is known about how hundreds of microbial species coinhabit and functionally interact in oral biofilms to cause disease or to maintain homeostasis. In addition, in view of the lack of knowledge about *S. mutans* physiology and metabolism in its natural habitat on root surfaces, the aim of this work was to discuss the current knowledge of how OMICS technologies are contributing to the understanding of oral microbiome in health and caries disease and to undertake a descriptive analysis about the role of *S. mutans* in root surface biofilms using OMICS techniques. A critical literature review was performed describing the current contribution of OMICS technologies to the understanding of dental caries through analysis and interpretation of existing scientific production, and a descriptive analysis, based on secondary data, of the characterization of gene expression of *S. mutans* in root surface biofilms. Data from OMICS technologies have shown that the understanding of dental caries is not compatible with a single-species etiology of the disease and that the role of the oral microbiome in the maintenance of biological processes is still limited in the literature. The gene expression of *S. mutans* in sound root surfaces biofilms was minimal, but high in root caries samples. An overview of the most prevalent virulence genes in RC biofilms demonstrated more expression of *spaP*, *glgA*, *fruA*, *ciaH*, *comF*, *comD*, *gapC*, *pulA*, *SMU_872*, *hrcA*, *ccpA*, *arcC*, and *argR* genes, and revealed that they have their functions related to adhesion, biofilm formation, acidogenicity, aciduricity, quorum-sensing, sugar transport, and stress tolerance. Molecular functions and biological survival processes of the most abundant genes were similar in both groups. *S. mutans* has an important role in the development of root caries. OMICS approaches have allowed a more complete picture of the composition, functional potential and activity of the oral microbiome, however new caries biomarkers have not been discovered nor have tests been developed that could be effective for assessing the risk of caries in the preclinical stages of the disease.

KEYWORDS: RNA-Seq; *Streptococcus mutans*; Root Caries; Transcriptome.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO 1

Figura 1 - Representação esquemática de tecnologias Ômicas, seus correspondentes objetivos de análise e métodos de avaliação [94].....43

CAPÍTULO 2

Table 1 – Overview of regulons genes and two-component systems, their respective functions (on RegPrecise website, available in https://regprecise.lbl.gov/RegPrecise/genome.jsp?genome_id=37) on *S. mutans* UA159 and its average expression on Sound Root surfaces (SRS) and Root Caries (RC) samples (Averages from the RME normalization).....77

Table 2 – Supplementary Table 1. List of genes not overexpressed in Root Caries (RC; n=9) when compared to Sound Root Surfaces (SRS; n=4), by applying the DESeq2 algorithm, and the cutoff of adjusted p value at 10^{-3} . NA=Not calculated....87

Table 3 – Supplementary Table 2. Relative median expression (RME) and percentiles (25th-75th) of the top 12 most expressed genes from SRS (n=4) and RC (n=9) groups. RME was calculated from the median values of non-normalized read counts using DE-Seq algorithm (RME).....92

Figure 1.78

Figure 2.79

Figure 3.80

Figure 4.82

Figure 5.86

Figure 6 – Supplementary Figure 1A.....93

Figure 7 – Supplementary Figure 1B.....94

Figure 8 – Supplementary Figure 2.95

Figure 9 – Supplementary Figure 3.96

Figure 10 – Supplementary Figure 4.97

Figure 11 – Supplementary Figure 5.....98

CAPÍTULO 3

Table 1 – A summary of some “OMICS” studies that have been performed..... 113

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABC	ATP-binding cassette
<i>A. gerencseriae</i>	<i>Actinomyces gerencseriae</i>
<i>A. israeli</i>	<i>Actinomyces israeli</i>
<i>A. naeslundii</i>	<i>Actinomyces naeslundii</i>
<i>A. viscosus</i>	<i>Actinomyces viscosus</i>
ADS	Arginine Deiminase System
AgDI	Agmatine Deiminase
AgDS	Agmatina Deiminase
AgI/II	Antígenos I e II
AI	Autoindutor
AP endonuclease	Enzima envolvida na reparação de sítios apurínicos/ apirimidínicos
ATP	Adenosina Trifosfato
ATR	Acid Tolerance Response
Cas9	CRISPR Associated Protein 9
CCR	Caborn Catabolite Repression
CLC Bio, Qiagen	CLC Genomics Workbench 7.5.1 Software
Clp	Protease Dependente de ATP
CO ₂	Dióxido de Carbono
CSP	Peptídeo Estimulador de Competência
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
DE-Seq	R Package to Analyse Count Data From High-throughput Sequencing Assays
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DnaK	Cellular Chaperone System
Edna	DNA Extracelular
ECM	Extracellular Matrix
EHNA	Esteato-hepatite Não Alcoólica
FASTQ	Formato de Arquivo em Bioinformática
F ₀ F ₁ Atpase	Membrane-bound ATP Synthases
Ftf	Frutosiltransferase
FtsH	Protease Dependente de ATP
GABA	Gamma-aminobutyric Acid
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase
Gbp	Glucan-binding Protein
GbpA/B/C/D	Glucan-binding Proteins A/B/C/D
GO	Gene Ontology
GroEL	Cellular Chaperone System
Gtfs	Glucosiltransferases
GtfsB/C/D	Glucosiltransferases B/C/D
HK	Histidina-quinase

HOMD	Human Oral Microbiome Database
HPr	Phosphorylated Histidine-containing Protein
HrcA	Heat-inducible Transcription Repressor
HSP	Heat Shock Proteins
HtpX	Heat Shock Membrane Bound Zinc Metalloprotease
HtrA	Serine Protease High Temperature Requirement A
IgA	Imunoglobulina A
Ila/b	Proteínas Inespecíficas de Transferência de Energia
Ilc	Enzima Transmembrânica
IPS	Intracellular Polysaccharide
MeSH	Medical Subject Heading
MLF	Fermentação Malolática
mRNAs	RNA mensageiros
MSM	Multiple Sugar Metabolism
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NGS	Next-generation Sequencing
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PEC	Polissacarídeos Extracelulares
PEP:PTS System	Phosphoenolpyruvate-phosphotransferase Transport System
pH	Potencial Hidrogeniônico
PIC	Polissacarídeos Intracelulares
pKa	Constante de Dissociação Ácida
PTS	Phosphotransferase System
QS	Quorum Sensing
RC	Root caries
RgpF	Serina Protease
RNA	Ácido Ribonucleico
rRNA	RNA Ribossomal
RNAi	RNA de Interferência
RNA-Seq	RNA-Sequencing
RME	Relative Median Expression
R package	Collections of R Functions, Data and Compiled Code in a Well-defined Format
RR	Regulador de Resposta
SDC	Sinal de Dois Componentes
SRS	Sound Root Surfaces
TCS	Two Component System
16S rRNA	RNA ribossomal 16S
Spp	Species
<i>S. anginosus</i>	<i>Streptococcus anginosus</i>
<i>S. bucalis</i>	<i>Streptococcus bucalis</i>
<i>S. gordonii</i>	<i>Streptococcus gordonii</i>
<i>S. mitis</i>	<i>Streptococcus mitis</i>
<i>S. mutans</i>	<i>Streptococcus mutans</i>

S. oralis

S. salivarius

S. sanguinis

S. sobrinus

Streptococcus oralis

Streptococcus salivarius

Streptococcus sanguinis

Streptococcus sobrinus

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO, REVISÃO DE LITERATURA E OBJETIVOS	16
1.1 INTRODUÇÃO	16
1.2 REVISÃO DE LITERATURA	17
1.2.1 Por que Estudar Cárie Radicular?	17
1.2.2 Microbiologia da Superfície Radicular	19
1.2.3 <i>Streptococcus mutans</i> em Superfície Radicular	23
1.2.3.1 O <i>Streptococcus mutans</i>	25
1.2.3.2 Heterogeneidade Genética e Fenotípica de <i>Streptococcus mutans</i>	26
1.2.3.3 Fatores de Virulência de <i>Streptococcus mutans</i>	27
1.2.3.3.1 Adesão à Superfície Dentária e Formação de Biofilme	27
1.2.3.3.2 Acidogenicidade	29
1.2.3.3.3 Aciduricidade.....	31
1.2.3.3.4 Proteases	34
1.2.3.3.5 Produção de Mutacinas.....	34
1.2.3.3.5 Via de Transdução de Sinal	35
1.2.3.3.5.1 Sistema de Transdução de Sinal de Dois Componentes	35
1.2.3.3.5.2 Quorum Sensing.....	36
1.2.4 Microbioma Oral e Hospedeiro, um Superorganismo.....	38
1.2.5 Abordagens Ômicas para o Estudo de Cárie Dentária.....	39
1.3.1 Objetivo Geral	44
1.3.2 Objetivos Específicos	44
1.4 REFERÊNCIAS	45
CAPÍTULO 2 – TARGET ANALYSIS OF <i>STREPTOCOCCUS MUTANS</i> ON THE METATRANSCRIPTOME OF BIOFILMS FROM ROOT SURFACES	58
2.1 INTRODUCTION	59
2.2 MATERIALS AND METHODS.....	60
2.2.1 Study Design and Samples Origin.....	60
2.2.2 Selection of Genomes in Databases and Bioinformatics	60
2.3 RESULTS.....	62
2.3.1 Gene Expression of Putative Virulence Genes.....	62
2.3.2 Transcriptional Regulators Genes	64
2.3.3 GO Terms Analyses	65

2.4 DISCUSSION	65
2.5 REFERENCES	71
CAPÍTULO 3 – UNDERSTANDING THE ETIOLOGY OF DENTAL CARIES THROUGH OMICS: ADVANCES IN THE LAST DECADE OR CHALLENGES FOR THE NEXT AGE	99
3.1 INTRODUCTION	99
3.1.1 The Evolution of the Hypotheses Explaining the Role of Plaque Bacteria in the Etiology of Dental Caries	101
3.1.2 Introduction Into the Diverse Nature of Microbial Composition in Caries Process	102
3.1.3 “OMICS” Era. What Prospects for Change Have Been Achieved?	104
3.2 CONCLUSIONS	108
3.3 REFERENCES	109
CAPÍTULO 4 – DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES DA DISSERTAÇÃO	116
4.1 DISCUSSÃO GERAL	116
4.2 CONCLUSÕES	117
CAPÍTULO 5 – PRESS RELEASE	120

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO, REVISÃO DE LITERATURA E OBJETIVOS

1.1 INTRODUÇÃO

A cárie dentária é considerada a doença mais prevalente no mundo, afetando 80% a 90% da população mundial [1]. Na década de 1920, *Streptococcus mutans* foi isolado de lesões de cárie e passou a ser considerado o principal agente etiológico da cárie dentária [2]. Por apresentar fatores de virulência como adesão às estruturas dentárias, formação de biofilme, aciduricidade e acidogenicidade [3], diversas estratégias diagnósticas, preventivas e terapêuticas foram direcionadas contra esse microrganismo [4, 5]. Microbiologistas, até então, atribuíram ao microbioma uma percepção dualista de bem e mal, visando a detecção e a destruição de microrganismos específicos [6].

No entanto, estudos mais recentes baseados em DNA e RNA de microrganismos coletados em biofilmes de lesões cariosas descobriram um ecossistema extraordinariamente diverso, onde *S. mutans* representa menos de 1% da comunidade bacteriana [7, 8]. Além disso, tem sido relatado que já foram identificadas na cavidade bucal cerca de 700 espécies microbianas, das quais mais de 30% nunca foram cultivadas em laboratório, representando um nicho com uma elevada complexidade ecológica [9]. Estudos do microbioma oral indicam que os biofilmes existem em equilíbrio com a saúde do hospedeiro, no entanto, perturbações ambientais podem alterar a composição e as atividades metabólicas da microbiota, levando a um aumento nas proporções de bactérias acidúricas e acidogênicas, o que favorecerá o desenvolvimento da doença cárie [10].

Avanços em métodos moleculares têm permitido uma caracterização mais completa dessa microbiota tão diversificada [9], indicando que a microbiota de cada lesão é única, tornando, assim, difícil estabelecer uma relação de microrganismos específicos com saúde ou doença [11]. A diversidade e a abundância dos microrganismos característicos de cada habitat variam até mesmo entre indivíduos saudáveis. Espécies bacterianas conhecidas pelo seu potencial de desenvolver a doença cárie têm sido frequentemente encontradas nesses indivíduos, embora em níveis inferiores quando comparado a sujeitos doentes [12].

Estratégias focadas na modificação do ambiente com o objetivo de restaurar o equilíbrio ecológico da comunidade microbiana vêm sendo desenvolvidas. Novos *Streptococos* orais, muitas vezes não cultiváveis, foram identificados e sua caracterização fenotípica revelou possíveis candidatos à terapia probiótica [13, 14]. Embora os resultados de estudos baseados em tecnologias Ômicas tenham sido bastante informativos, os dados gerados ainda precisam ser cuidadosamente testados pela construção de modelos de estudo novos e bem projetados, de modo que essa nova tecnologia possa incentivar a descoberta de novos biomarcadores de cárie e o desenvolvimento de diagnósticos e terapias da próxima geração para o controle de cárie [15].

Portanto, essa dissertação teve como objetivo revisar criticamente as contribuições atuais que a aplicação das tecnologias Ômicas forneceu para o entendimento da etiologia da cárie dentária e desenvolver, a partir de dados secundários, uma análise descritiva da caracterização da expressão gênica de *S. mutans* em biofilmes de superfícies radiculares, a fim de melhor compreender suas funções e atividades metabólicas sobre essas superfícies.

1.2 REVISÃO DE LITERATURA

1.2.1 Por que Estudar Cárie Radicular?

A transição demográfica é um fenômeno mundial, decorrente de um declínio nas taxas de natalidade e aumento na expectativa de vida devido a melhorias nos cuidados de saúde [16]. De acordo com um relatório das Nações Unidas, divulgado em junho de 2019, a população mundial deve aumentar em 2 bilhões de pessoas nos próximos 30 anos, de 7,7 bilhões, atualmente, para 9,7 bilhões, em 2050 [17]. Essa realidade desafia o planejamento de futuras políticas sociais e de saúde, principalmente porque os padrões de doenças, provavelmente, mudarão simultaneamente. Apesar da ainda alta prevalência de perda dentária entre os idosos [18], tal aumento na expectativa de vida e a melhoria das condições de saúde bucal devem elevar o número de adultos e idosos dentados [19, 20] e, conseqüentemente, maior exposição às doenças periodontais e à cárie radicular.

Nos últimos anos, mais atenção tem sido prestada ao controle de cárie radicular [21], doença que afeta entre mais de um terço da população geriátrica mundial [22]. Estudos demonstram que a prevalência de cárie radicular entre os idosos varia de 10% no Canadá [23] a 71% nos Estados Unidos [24]. No Japão, uma pesquisa demonstrou que a condição periodontal e a xerostomia autorrelatada estavam associadas à presença de cárie radicular em idosos [25]. Logo depois, pesquisadores da Grécia encontraram, como fatores associados, o nível educacional, a condição socioeconômica e o sexo [26]. Recentemente, a pesquisa nacional de saúde bucal realizada no país mais populoso do mundo, a China, relatou que 62% dos adultos com idades entre 65 e 74 anos desenvolveram cárie radicular [27]. Esses estudos demonstram a complexidade que envolve o controle desse agravo.

Nas últimas décadas, uma série de levantamentos epidemiológicos descreve a saúde bucal de idosos no Brasil [28-30]. Dentre outros agravos, a experiência de cárie coronária com enfoque para a perda dentária e o edentulismo foram investigados nas faixas etárias de 35 a 44 anos e acima dos 64 anos. Esses levantamentos revelaram que as condições bucais são melhores na região Sudeste do país do que na maioria das outras regiões brasileiras. São registradas nessa região a menor porcentagem de perda dentária e a maior proporção de dentes restaurados entre os adultos no país. Além disso, houve uma considerável diminuição do componente perdido na faixa etária de 35 a 44 anos, de 11,6, em 2003, para 6,7, em 2010, o que demonstra a manutenção de maior número de dentes na população adulta da região Sudeste do país [30].

Tanto em adultos quanto em idosos, a recessão gengival ocorre de maneira frequente, sendo condição necessária para a ocorrência da desmineralização da superfície radicular [31, 32]. No momento que raízes dentárias ficam expostas ao ambiente oral, tornam-se extremamente suscetíveis à cárie, visto que a superfície radicular é menos resistente ao ataque ácido quando comparada ao esmalte [33, 34]. O processo de cárie ocorre de formas distintas entre as estruturas dentárias coronária e radicular, uma vez que existem diferenças bioquímicas entre elas. As superfícies radiculares, compostas por dentina e cemento, são mais vulneráveis aos desafios cariogênicos, pois apresentam menor teor mineral e maior teor orgânico quando comparada ao esmalte. Enquanto o esmalte dentário é composto quase que inteiramente por hidroxiapatita, cerca de 30% da dentina e do cemento radicular são

compostos por material orgânico, principalmente colágeno [35-37]. Essas diferenças bioquímicas são refletidas nos padrões de cárie. Enquanto a invasão bacteriana do esmalte ocorre principalmente após a quebra do tecido, as superfícies radiculares são invadidas por bactérias já em um estágio inicial da doença [38, 39]. A alta quantidade de material orgânico nesses tecidos sugere que a degradação proteica está envolvida na formação de cárie. Dessa forma, o desenvolvimento da cárie em tecidos duros radiculares ocorre em dois estágios, sendo o primeiro caracterizado por dissolução mineral e o segundo por degradação da matriz orgânica da superfície radicular [37]. O colágeno desmineralizado serve como nicho para as bactérias colonizadoras [37], as quais produzem ácidos que desmineralizam a dentina [39-41].

Além das diferenças de composição tecidual, a degradação dos componentes inorgânicos e orgânicos da superfície radicular é influenciada pelas atividades metabólicas do biofilme cariogênico com disponibilidade e composição diferentes de saliva, bem como presença do fluido crevicular gengival. Ambos os fluidos contêm uma gama diversificada de proteínas e glicoproteínas que fornecem componentes para a película adquirida e atuam como fontes de nutrientes ao biofilme, desempenhando um papel fundamental na saúde e na doença [42].

Sendo assim, de acordo com o exposto, observa-se que com o rápido envelhecimento da população mundial, a cárie radicular tende a ser um agravo importante de saúde pública. Portanto, a fim de compreender a base fundamental da doença, o conhecimento sobre a estrutura da comunidade microbiana radicular, suas relações simbióticas e antagônicas, bem como as funções metabólicas dos microbiomas em estado de saúde é fundamental para a comparação com os microbiomas em estado de doença, permitindo a compreensão das mudanças que levam ao aparecimento e desenvolvimento dessa patologia, para, assim, serem desenvolvidas novas estratégias de tratamento no futuro [43].

1.2.2 Microbiologia da Superfície Radicular

Os microrganismos presentes no microbioma desempenham um importante papel na saúde dos seres humanos, podendo contribuir no desenvolvimento do sistema imunológico e promover resistência a microrganismos patogênicos. Por outro lado, também constituem um reservatório de bactérias que possuem potencial patogênico capaz de degradar os tecidos do hospedeiro [44]. Os primeiros estudos

da microbiota associada à cárie dentária seguiam a hipótese da placa específica, pela qual acreditavam que apenas um número limitado entre toda a comunidade bacteriana seria responsável pela produção de ácido e, portanto, eram considerados os causadores da doença ou odontopatógenos [2, 45-47]. Estudos *in situ* baseados na hipótese da placa específica demonstraram que tanto a superfície radicular quanto o esmalte são primeiramente colonizados por espécies bacterianas Gram-positivas semelhantes [48], como *S. sanguinis*, *S. oralis*, *S. mitis* e *Actinomyces spp.* [42, 49-51].

Outras investigações sobre a etiologia microbiana da cárie radicular realizadas na década de 1960 com experimentos realizados em animais demonstraram que certas espécies de *Actinomyces*, principalmente *A. viscosus* e *A. naeslundii*, eram capazes de induzir a doença em roedores [52-54]. Pouco depois, novas pesquisas sugeriram que, além de *Actinomyces*, as bactérias envolvidas com a cárie radicular incluíam Estreptococos, Enterococos, Estafilococos, Neisseria, espécies de *Lactobacillus*, *Arthrobacter* [55] e *Rothia denticariosa* [56]. *S. mutans*, anteriormente associado somente ao desenvolvimento de lesões em esmalte, chegou a ser considerado marcador biológico de cárie radicular [57]. Estudos que relacionam o *S. mutans* e o *Lactobacillus* à cárie radicular demonstraram haver quantidades significativamente maiores destes dois microrganismos na placa dentária de pacientes que apresentavam cárie de raiz quando comparados a indivíduos portadores de doença periodontal que não apresentavam lesões de cárie de radicular [58]. Outras associações reportadas entre microbiota e cárie radicular sugeriram que o *S. mutans* desempenhava um importante papel na progressão da lesão [59]. Porém, em estágios mais avançados da cárie, outras espécies, como *Prevotella* e *Bifidobacterium*, foram relatadas como mais prevalentes [52, 60, 61]. A própria *Candida albicans* chegou a ser detectada em lesões de cárie radicular [61, 62].

No entanto, após o aumento de relatos sobre a ocorrência da doença na aparente ausência desses patógenos, ficou claro que a ação em conjunto de uma comunidade polimicrobiana pode ser necessária para desencadear a disbiose [42], conforme proposto inicialmente pela hipótese de placa não específica [63]. Como nenhuma das hipóteses anteriores parecia estar completamente correta, Marsh propôs a hipótese da placa ecológica que combinava aspectos de ambas as teorias [64]. A hipótese da placa ecológica enfatizou a especificidade funcional da doença

exibida por um enriquecimento de espécies específicas, com propriedades relevantes, em resposta a uma mudança nas condições ambientais. Por exemplo, a acidificação do ambiente seleciona certas espécies com capacidade de sobreviver em pH baixo e produzir quantidades elevadas de ácidos orgânicos, podendo, assim, acarretar em mudança da condição de saúde para um estado de doença [65]. A alta diversidade de ecossistemas taxonômicos e funcionais, quando em equilíbrio, pode compensar rapidamente essas alterações. Dessa forma, o biofilme resiste a leves flutuações de fatores externos, como pela produção de álcalis. Sendo assim, a resiliência da comunidade mantém a homeostase entre todas as espécies bacterianas, porém quando a perturbação é forte o suficiente, esse equilíbrio pode ser rompido [66]. A hipótese da placa ecológica de Marsh [64] foi posteriormente estendida por Takahashi e Nyvad [67, 68] e inclui as manifestações clínicas das lesões de cárie, bem como o processo detalhado pelo qual o biofilme se adapta ao ácido e seleciona as espécies acidúricas.

Essa hipótese ecológica concentra-se, principalmente, nos fenômenos que ocorrem na cárie de esmalte. Os fatores ecológicos na dentina e no cimento têm sido pouco abordados, possivelmente devido à complexa composição estrutural desses tecidos [37]. Embora a cárie dentária seja considerada uma doença dependente da oscilação do pH, ainda não estão esclarecidas quais são as alterações na comunidade microbiana à medida que a doença entra em diferentes tecidos dentários. Com base em observações metagenômicas, Simón-Soro e colaboradores propuseram uma nova hipótese na qual a doença pode ser dividida em dois estágios diferentes, sendo o primeiro pelas lesões de esmalte e o segundo pelas lesões de dentina [8]. Para as lesões de esmalte, a causa seria pela presença de uma comunidade acidogênica, em que adesão, produção de ácido por fermentação complexa de carboidratos e resistência ao estresse ácido são características necessárias para sua sobrevivência. Com relação à superfície radicular, uma vez exposta, o cimento torna-se vulnerável à abrasão física e fica suscetível à desmineralização, com frequente exposição da dentina subjacente [42]. Dessa forma, de acordo com Simón-Soro e colaboradores [8], uma vez que o biofilme atinge a dentina, a resistência ao ácido não é tão crítica, pois as superfícies radiculares contêm menor conteúdo mineral para ser dissolvido quando comparado ao esmalte, e as proteínas dentinárias estão prontamente disponíveis [8].

Outras características relevantes para o biofilme se desenvolver nessas condições estão relacionadas à resistência ao estresse osmótico, à capacidade de degradar proteínas, à adesão ao colágeno, à fibronectina e à glicanos humanos [8]. Essas diferenças bioquímicas entre as diferentes estruturas são refletidas no padrão de cárie [38, 39]. A adesão de microrganismos ocorrerá através de uma série de interações complexas entre adesinas bacterianas e seus receptores correspondentes encontrados na película adquirida [37, 69]. Uma vez aderidas, muitas das bactérias pertencentes à comunidade microbiana em superfícies radiculares clinicamente saudáveis são capazes de produzir ácido a partir de carboidratos alimentares e de acidificar o pH ambiental para abaixo de 5,5 [51, 70, 71]. Ao mesmo tempo, organismos-chave, como os membros do grupo de estreptococos não-mutans e *Actinomyces spp.* equilibram a produção de ácidos através de processos metabólicos dentro do biofilme [67]. Alguns estreptococos não-mutans são capazes de utilizar proteínas encontradas na saliva e no fluido crevicular gengival como fonte de energia, além de possuírem o sistema de arginina deiminase que lhes permite utilizar a arginina sozinha ou a arginina contida nas proteínas. Essa via proteolítica específica produz amônia e dióxido de carbono, liberando uma molécula de ATP, podendo contribuir para a neutralização do pH ambiental na placa [72]. As atividades metabólicas dessas bactérias resultam em um pH oscilante no biofilme da superfície radicular e, desde que os processos metabólicos estejam controlados, a progressão da doença cárie pode ser interrompida, mesmo durante o estágio de cavitação.

A maioria dos *S. mutans*, por não possuírem esse sistema de vias, são menos competitivos e pouco abundantes em biofilmes de superfícies de esmalte e raiz clinicamente saudáveis. Em contrapartida, são equipados com várias outras vias especializadas no metabolismo do açúcar [42]. Caso essas condições ácidas geradas por esse metabolismo do açúcar não forem revertidas, as espécies não-mutans podem ser progressivamente substituídas por espécies acidúricas ainda mais fortes, como cepas de *Actinomyces* mais capazes de diminuir o pH ambiental [51, 70], *S. mutans*, *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* cujas atividades metabólicas diminuem ainda mais o pH do ambiente e facilitam a progressão da lesão [51, 70, 73-76]. Outras associações entre diferentes ambientes e presença de bactérias encontraram que as espécies acidúricas predominantes nas lesões de cárie radicular eram *A. israeli* e *Lactobacillus* para o pH 4.8 e 5.2 e *A. naeslundii* para o

pH 7.0, enquanto que em biofilme de superfícies radiculares sob condições de saúde de indivíduos que apresentavam lesões de cárie radicular, a bactéria predominante era *A. gerencseriae* para o pH 4.8 e 5.2 e *S. salivarius* para o pH 7.0. Em superfícies radiculares sob condições de saúde de indivíduos que não apresentavam lesões de cárie radicular, as bactérias mais encontradas foram *S. anginosus* para o pH 4.8 e *S. bucalis* para o pH 5.2 e 7.0. *S. mutans* foi pouco isolado, demonstrando a diversidade microbiológica existente de um isolado para o outro [75].

Novas abordagens moleculares para a investigação da placa dentária sobre a cárie radicular levaram a vários estudos independentes de cultura. Foi demonstrado que, além de *S. mutans*, *Lactobacillus spp.* e *Actinomyces*, espécies de *Atopobium*, *Olsenella*, *Pseudoramibacter*, *Propionibacterium*, *Seimonas* também foram detectadas em lesões de cárie radicular [77]. Por outro lado, as espécies encontradas mais prevalentes em amostras de saúde foram *Delftia acidovorans*, *Bacteroidetes spp.*, *Lachnospiraceae spp.* e *Prevotella intermedia* [78]. Essa grande diversidade microbiológica demonstra que a cavidade oral apresenta uma infinidade de bactérias distribuídas sobre diversas superfícies. Mais de 700 espécies microbianas, das quais mais de 30% não foram cultivadas, já foram identificadas [9]. No entanto, apesar do modelo predominante de etiologia da cárie ter sido alterado de hipótese de placa específica para hipótese de placa ecológica, a controvérsia continua em relação ao papel desempenhado pelo *S. mutans* para com o desenvolvimento de cárie radicular.

1.2.3 *Streptococcus mutans* em Superfície Radicular

Em meados da década de 1980, o *S. mutans*, antes associado somente ao desenvolvimento de lesões em esmalte, passou a ser marcador biológico de cárie radicular [57]. Este microrganismo é amplamente conhecido como um causador da cárie, devido a sua participação na formação de biofilme, sua aciduricidade e acidogenicidade [3]. Historicamente, a maioria dos estudos baseados em cultivo microbiano laboratorial demonstrou uma forte relação entre espécies de *S. mutans* e cárie radicular, mostrando maiores frequências de isolamento em superfícies radiculares cariadas do que em biofilmes de superfícies radiculares híginas [57, 60, 73, 79]. Também foi sugerido que essas espécies desempenham um importante papel na progressão da cárie radicular [57, 59, 80]. Estudos transversais da

microbiota de lesões radiculares [60, 81, 82] tendem a mostrar essa mesma associação [57, 59, 80] e o achado consistente é uma maior proporção de *S. mutans* em lesões ativas [83], embora ter sido relatado que o *S. mutans* constitua apenas uma pequena proporção da microbiota de lesões de cárie radicular [81].

Portanto, apesar dos estudos demonstrarem uma forte relação entre espécies de *S. mutans* e superfícies radiculares cariadas, não há evidência confiável de que eles iniciam ou causam a progressão de lesões radiculares, por conta própria ou em conjunto com outras bactérias. Estudos relatam que a presença de *S. mutans* não foi necessária, ou essencial, para a produção de ácido em superfícies radiculares expostas e nem a taxa de produção de ácido foi aumentada significativamente, na placa dentária, pela presença desses organismos [71]. Sendo assim, ficou claro após o aumento dos relatos da ocorrência da doença na aparente ausência de patógenos reconhecidos, que há uma ação conjunta de uma comunidade polimicrobiana para promover doença [42].

O surgimento de abordagens moleculares para a investigação da placa dentária levou a vários estudos independentes de cultivo sobre a cárie radicular. Após demonstrado que a presença de *S. mutans* constava em apenas 50% das amostras de lesões dentinárias [77], o papel de *S. mutans* no desenvolvimento da cárie radicular [57, 80] continuou sendo questionado, contradizendo estudos de cultivo anteriores que o consideravam como principal agente etiológico da cárie radicular [74]. O seu papel no processo de cárie de raiz continuou sendo controverso. Além dos fatores de virulência já conhecidos, um estudo baseado na técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) e hibridização de DNA relatou que a cepa *S. mutans* UA159 não estaria associada à degradação da matriz colágena em lesões cavitadas de cárie por não ter sido identificado o gene *cnm*, responsável por codificar a proteína de ligação ao colágeno, em seus isolados clínicos [84]. Todavia, estudos baseados na expressão gênica arriscaram sugerir que a atividade de protease colagenolítica bacteriana pode também ser um importante fator de virulência de *S. mutans* em cárie radicular [85, 86]. Estudos sugerem ainda que, durante a progressão da cárie, as colagenases do próprio hospedeiro estão associadas à degradação da matriz de colágeno [37, 87-93], atuando como uma resposta dos tecidos ao desafio cariogênico.

Posto isto, pesquisas que objetivam trazer à microbiologia dentária uma etiologia específica para a doença cárie não parecem ser promissoras, em virtude da

cárie não estar associada apenas à produção de ácido de uma única espécie bacteriana, pois outros microrganismos também têm a capacidade de aderir, produzir ácido por fermentação complexa de carboidratos e resistir ao estresse ácido, resultando em desmineralização dentária [94]. No entanto, pelo verdadeiro papel dos microrganismos ligados à cárie radicular não está bem estabelecido e pela espécie *S. mutans* ter sido frequentemente relacionada ao desenvolvimento de cárie, o entendimento das principais funções que o *S. mutans* desempenha para colonizar a superfície dentária e se tornar uma espécie numericamente significativa no biofilme dentário é necessário.

1.2.3.1 O *Streptococcus mutans*

O *Streptococcus mutans* foi isolado, em 1924, por J. Clarke [45], que inicialmente o chamou de estreptococos mutantes, por suas células serem de forma ovalada e diferirem dos outros estreptococos já conhecidos [95]. Estudos taxonômicos revelaram que o *S. mutans* é um microrganismo pertencente ao filo firmicutes, em formato de coco, Gram-positivo, anaeróbio facultativo e catalase-negativo [96]. A maioria das cepas isoladas é α -hemolítica ou não-hemolítica e podem ser encontradas em quatro sorotipos: c, e, f e k [96, 97]. A classificação sorológica de *S. mutans* baseia-se na estrutura do polissacarídeo ramnose-glicose 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 [98].

O habitat natural de *S. mutans* é a cavidade oral humana, mais especificamente, o biofilme formado sobre as superfícies dos dentes [96]. Em meados da década de 1960, o *S. mutans* ganhou ampla atenção na comunidade científica e estudos clínicos e laboratoriais em animais o descreveram como um importante agente etiológico na cárie dentária [2, 46, 99]. Desde então, a pesquisa se concentrou na patogênese deste organismo, identificando vários fatores de virulência associados ao seu potencial cariogênico [99-101], os quais residem em três atributos principais: 1) a capacidade de sintetizar grandes quantidades de polímeros extracelulares de glucano a partir de sacarose, que auxiliam na colonização de superfícies duras e no desenvolvimento da matriz polimérica extracelular *in situ*; 2) a capacidade de transportar e metabolizar uma ampla gama

de carboidratos em ácidos orgânicos (acidogenicidade); e 3) a capacidade de prosperar sob condições de estresse ambiental, particularmente baixo pH (aciduricidade) [10].

Embora diversos microrganismos façam parte do biofilme cariogênico, o *S. mutans* continua sendo o microrganismo mais estudado relacionado ao assunto [102], pois o *S. mutans* é importante na alteração do ambiente local, formando um meio rico em polissacarídeos extracelulares (PEC) e um baixo pH, criando, assim, um ambiente nicho favorável para o desenvolvimento de outras espécies acidogênicas e acidúricas [103]. Além disso, pesquisas recentes descrevem o *S. mutans* como agravador de endocardite bacteriana subaguda, uma inflamação potencialmente fatal das válvulas cardíacas, esteato-hepatite não alcoólica (EHNA), colite ulcerativa [104], enquanto um subconjunto de cepas tem sido associado a outras patologias extra orais, como nefropatia por IgA [105] e aterosclerose [106].

1.2.3.2 Heterogeneidade Genética e Fenotípica de *Streptococcus mutans*

Embora abordagens bioquímicas e genéticas para dissecar a biologia de *S. mutans* sejam aplicadas há pelo menos quatro décadas, a publicação da sequência completa do genoma da cepa de *S. mutans* UA159 [3] forneceu informações mais completas sobre sua adaptação de sobrevivência no ambiente oral, defesa contra fatores do hospedeiro e uso de produtos genéticos que mantêm seu nicho contra concorrentes microbianos. Portanto, hoje, o *S. mutans* é uma das bactérias Gram-positivas mais bem caracterizadas. Com o passar do tempo, o custo das tecnologias de sequenciamento de alto rendimento diminuiu, possibilitando o sequenciamento dos genomas de dezenas de cepas de *S. mutans*, os quais estão disponíveis em bancos de dados públicos, como o *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/?term=streptococcus+mutans) [103]. Esse influxo de sequências genômicas levou a um aumento de estudos genômicos comparativos focados em *S. mutans* [107-110]. Um dos primeiros estudos, baseado na sequência do genoma de 57 isolados clínicos de *S. mutans* geograficamente diversos, concluiu que o pan-genoma (conjunto de genes essenciais e dispensáveis) de *S. mutans* contém aproximadamente 3.296 genes possíveis, enquanto cerca de 1.490 genes são comuns a todas as cepas [111]. Deste modo, em qualquer isolado

de *S. mutans*, determinados genes podem ser distintos de qualquer outra cepa, provavelmente influenciando sobre o potencial de virulência [103].

Em um estudo que avaliou a caracterização fenotípica de cepas de *S. mutans* [112] foi encontrada uma grande variação nos fenótipos diretamente relacionados à virulência, incluindo a capacidade de formar biofilme na presença de sacarose e a capacidade de tolerar baixo pH e estresse oxidativo, sugerindo que nem todas as cepas de *S. mutans* são igualmente virulentas e fornecendo uma explicação racional para o motivo pelo qual as tentativas de correlacionar o transporte de certos genótipos de *S. mutans* com a incidência de cárie dentária se mostraram tão difíceis [107, 113].

1.2.3.3 Fatores de Virulência de *Streptococcus mutans*

Para o desenvolvimento da cárie dentária, um conjunto de fatores de virulência é necessário para que o *S. mutans* torne capaz de colonizar e de aumentar em proporção na placa dental cariogênica, produzindo e tolerando grandes quantidades de ácidos, os quais promovem a desmineralização dos tecidos dentários. As principais propriedades de virulência associadas a *S. mutans* são: adesão à superfície dentária, formação de biofilme, acidogenicidade, aciduricidade, já citados anteriormente, além dos menos estudados, dentre atividades de proteases, produção de mutacinas e via de transdução de sinal (sistema de transdução de sinal de dois componentes e quorum sensing). Cada uma dessas propriedades trabalha coordenadamente para alterar a ecologia da placa dental [103] e muitos desses fatores de virulência podem estar associados ao desenvolvimento da cárie radicular [42]. As subseções a seguir descreverão cada um desses fatores de virulência.

1.2.3.3.1 Adesão à Superfície Dentária e Formação de Biofilme

A adesão de *S. mutans* às superfícies dentárias constitui o passo inicial da colonização e subsequente formação de biofilme. Sua adesão na placa dentária pode ser mediada por meios independentes de sacarose e sacarose-dependentes. A adesão independente da sacarose aos componentes salivares presentes na película adquirida pode iniciar o processo de fixação, mas a adesão dependente da sacarose

parece ser a principal responsável pelo estabelecimento da colonização na superfície dentária [114]. *S. mutans* produzem e secretam enzimas denominadas glucosiltransferases (Gtfs), as quais hidrolisam a sacarose em glicose e frutose e polimerizam as moléculas de glicose liberadas, formando PEC denominados glucanos. A ação das Gtfs na síntese de glucanos é o principal mecanismo por trás da adesão dependente da sacarose e está intimamente relacionado ao consumo de sacarose [115].

Diversos tipos de glucano são produzidos, os quais variam na solubilidade em água, dependendo do tipo e da proporção das ligações entre as moléculas de glicose, as quais podem ser do tipo α -(1-3) ou do tipo α -(1-6). Os glucanos insolúveis em água são aqueles onde prevalecem as ligações do tipo α -(1-3) e são considerados os mais importantes na formação de uma matriz extracelular insolúvel, essencial para o acúmulo de *S. mutans* no biofilme dentário [116]. Já os glucanos solúveis em água parecem funcionar como um reservatório extracelular de açúcares, sendo hidrolisado por outras exoenzimas, denominadas dextranases [117]. As glucosiltransferases (GtfB, GtfC e GtfD), que sintetizam o glucano a partir de açúcares da dieta, são codificadas pelos genes *gtfB*, *gtfC* e *gtfD*. A GtfB catalisa a síntese de glucanos ricos em ligações do tipo α -(1-3), também chamados de mutanos. A GtfC catalisa a síntese de glucanos com os dois tipos de ligações, α -(1-3) e α (1-6). Por fim, a GtfD catalisa a síntese de glucanos com ligações α -(1-6), também chamados de dextranos [118]. As glucosiltransferases B e C são as mais relevantes quando relacionadas a formação de micro-colônias e polissacarídeos [119].

A síntese de frutanos também ocorre extracelularmente a partir da ligação de moléculas de frutose liberadas pela hidrólise da sacarose. Os frutanos são sintetizados pela enzima frutosiltransferase (Ftf), a qual é codificada pelo gene *sacB* [118]. Embora demonstre-se que o frutano possa contribuir para a formação de biofilme ao interagir com o glucano [120], os frutanos são solúveis em água e, portanto, seu papel na formação da matriz extracelular de PEC é limitado. Acredita-se que o principal papel dos frutanos na virulência de *S. mutans* seja o fato de atuarem como reservatórios extracelulares de substratos, durante os períodos de escassez de nutrientes. Assim, exoenzimas sintetizadas por *S. mutans* denominadas frutanases, codificadas pelo gene *fruA*, hidrolisam estes polissacarídeos, para que

os monossacarídeos de frutose sejam transportados para o interior das células e metabolizados [121].

Outra importante proteína neste processo de adesão chama-se proteína ligante de glucano (Gbp, de *glucan-binding protein*), a qual pode contribuir para o crescimento do biofilme de *S. mutans* e, portanto, para a sua virulência. O *S. mutans* produz pelos menos quatro tipos distintos de Gbps, sendo elas GbpA, GbpB, GbpC e GbpD, codificadas respectivamente pelos genes *gbpA*, *gbpB*, *gbpC* e *gbpD*. Por serem proteínas extracelulares, normalmente associadas à parede celular de *S. mutans*, acredita-se que as Gbps sejam importantes para o acúmulo de *S. mutans* na presença de sacarose, pois formam uma estrutura que liga as superfícies celulares destes microrganismos à matriz extracelular de glucanos sintetizada pelas exoenzimas Gtfs [122]. A participação de cada um dos tipos de Gbps na virulência é variável, sendo GbpB a mais associada à virulência de *S. mutans* [123].

Além dos polímeros de açúcar, o DNA extracelular (eDNA) também exerce uma função muito importante no desenvolvimento do biofilme e acredita-se que esteja envolvido no fornecimento de substratos para as células adjacentes, na integridade e na manutenção da estrutura tridimensional de biofilmes e na troca de material genético [124]. O eDNA gerado a partir de células lisadas de uma subpopulação da comunidade demonstrou desempenhar um importante papel na manutenção de biofilmes maduros de *S. mutans* [125].

Já a adesão independente de sacarose envolve proteínas de superfície da família de adesinas *spaP*, também chamadas de antígenos I e II (Agl/II) ou de P1, as quais se ligam a componentes da película salivar, como por exemplo às aglutininas salivares, e a outras bactérias da placa [126]. Além disso, também demonstram a capacidade de ligar ao colágeno e de invadir os túbulos dentinários das superfícies radiculares [127].

1.2.3.3.2 Acidogenicidade

A acidogenicidade consiste na capacidade de produção de ácidos a partir da fermentação de carboidratos. A espécie *S. mutans* é capaz de metabolizar a maior variedade de carboidratos entre todas as espécies de bactérias Gram-positivas sequenciadas até o momento e apresenta diversos maquinários enzimáticos capazes de transportar diferentes açúcares para o interior da célula. A fermentação

de carboidratos por *S. mutans* é a sua principal fonte de produção de energia. Uma via glicolítica completa foi encontrada na cepa *S. mutans* UA159, levando à produção de piruvato, que é então reduzido, quando em excesso, a vários produtos de fermentação, sendo eles ácido láctico, formato, acetato e etanol [3]. Em condições de excesso de carboidratos, o ácido láctico é o produto final glicolítico predominante. Formato, acetato e etanol são produzidos principalmente sob condições de limitação de carboidratos [128]. Devido ao seu baixo valor de pKa, constante de dissociação ácida, o ácido láctico é capaz de desmineralizar a estrutura dentária de forma mais eficaz quando comparado a outros subprodutos glicolíticos [129]. As enzimas responsáveis pelo metabolismo do piruvato incluem piruvato desidrogenase, piruvato formato-liase, fosfoacetilase, acetato quinase, lactato desidrogenase, álcool desidrogenase e acetoína desidrogenase [3].

Os estreptococos são incapazes de realizar o metabolismo respiratório aeróbio [130], portanto, os genes necessários para a cadeia aeróbica de transporte de elétrons não são presentes. Foram encontrados em seu genoma genes para transporte e metabolismo de glicose, frutose, sacarose, lactose, galactose, manose, celobiose, β -glucosídeos, trealose, maltose/maltodextrose, rafinose, ribulose, melibiose, isomaltossacarídeos, amido e, possivelmente, sorbose. Entre os agrupamentos de genes identificados, o gene estrutural da pululanase, *pulA* (SMU.1535-1541) é o responsável pela síntese e degradação do amido. Além dos açúcares, *S. mutans* é capaz de converter vários açúcares álcoois em intermediários glicolíticos, e os genes para o metabolismo do sorbitol e manitol também estão presentes. Uma recente análise de bibliotecas metatranscriptômicas já existentes demonstrou o uso potencial de sorbitol por *S. mutans* como uma fonte adicional de carbono em cárie dentária [131].

O *S. mutans* apresenta pelo menos 14 sistemas de transporte fosfotransferases (PTS, de *phosphotransferase system*) específicos para diferentes açúcares. Os sistemas PTS consistem de duas proteínas inespecíficas (IIa e IIb) de transferência de energia, uma enzima I (SMU.675), uma proteína estável ao calor (HPr, de *heat-stable protein*; SMU.674) e uma enzima II, a qual é uma permease específica para o açúcar a ser transportado (IIc). Essa cepa também possui proteínas putativas de efluxo de carboidratos para o transporte ativo de intermediários de açúcar que precisam ser excretados. Apesar da maioria dos açúcares ser transportada pelos sistemas PTS, *S. mutans* apresenta cinco sistemas

de transporte do tipo ABC (*ATP-binding cassette*) [3], incluindo-se o sistema de metabolismo de múltiplos açúcares (MSM, de *multiple sugar metabolism*) [132]. Os mecanismos de transporte de tais compostos dependem do tamanho das cadeias orgânicas de polissacarídeos, dos tipos de unidades que as compõem e do tipo de ligações entre elas [132]. Durante o sistema de transporte do tipo ABC, o substrato é transportado para o citoplasma através do canal da proteína transportadora, sendo necessária a energia gerada pela hidrólise de ATP (Adenosina trifosfato) [3].

Devido às drásticas variações nas concentrações de nutrientes disponíveis, as bactérias da placa dental precisam se adaptar para enfrentarem esta condição de estresse. Caso haja excesso de açúcar disponível, além de produzir ácidos orgânicos e matriz, esse microrganismo é capaz de sintetizar também polissacarídeos intracelulares (PIC), que são polímeros do tipo glicogênio-amilopectina com dois tipos de ligações de glicose, α -(1-4) e α (1-6), os quais funcionam como uma reserva de carboidratos e diminuem o estresse osmótico, tornando-o ainda mais acidogênico, pois assim ele é capaz de produzir ácidos até em períodos em que não há disponibilidade de substrato pela dieta. A síntese das reservas intracelulares de armazenamento de glicogênio envolve pelo menos três enzimas: glicogênio sintase, glicose-1-fosfato pirofosforilase e enzima ramificada. Os genes que as codificam são comumente encontrados em um operon *glg* [133].

A velocidade de produção de ácido pelo *S. mutans*, quando testada em um pH na faixa de 7,0 a 5,0, excede a de outros estreptococos orais na maioria dos casos [134], podendo variar de um isolado para outro [103]. Dessa forma, acredita-se que após a ingestão de carboidratos fermentáveis, a acidogenicidade de *S. mutans* leva a alterações ecológicas na microbiota da placa, que incluem uma elevação na proporção de *S. mutans* e outras espécies acidogênicas e acidúricas e induzem a queda do pH e a virulência do biofilme. Como resultado, a recuperação para um pH neutro será prolongada, favorecendo a desmineralização da estrutura dentária [2].

1.2.3.3 Aciduricidade

A acidificação do biofilme pelos produtos finais do metabolismo inibe o crescimento de muitas espécies bacterianas concorrentes, favorecendo o crescimento de *S. mutans* devido à sua aciduricidade [135]. A capacidade deste

microrganismo de suportar ambientes ácidos vem da resposta à tolerância ácida (ATR, de *acid tolerance response*), que é definida como a capacidade de se adaptar ao estresse ácido por exposição prévia a um pH baixo, resultando na indução de expressão de determinados genes de virulência, que aumentam a sobrevivência em um pH baixo.

O *S. mutans* emprega vários mecanismos para lidar com condições de baixo pH. Enquanto alguns desses mecanismos de tolerância a ácidos são constitutivos, outros são induzíveis em resposta a um pH subletal de aproximadamente 5,5, que prepara as bactérias para sobrevivência a pH mais baixo, até mesmo 3,0 [129]. Uma das principais defesas do *S. mutans* contra o ácido é a sua própria membrana plasmática, pois pela ativação do gene *fabM*, seu perfil de ácidos graxos altera-se para incorporar mais ácidos graxos monoinsaturados, resultando em menor permeabilidade da membrana a prótons [136]. Quando o ambiente torna-se ácido, essa barreira permite que os organismos mantenham um citoplasma mais neutro em relação ao espaço extracelular.

Embora os estreptococos não mantenham um pH intracelular fixo, o *S. mutans* procura manter um pH intracelular aproximadamente uma unidade de pH mais alta que a do ambiente extracelular, para evitar danos ao seu DNA e às enzimas sensíveis ao ácido.

A função de tolerância ácida de *S. mutans* é também baseada na importante presença de uma bomba translocadora de prótons H⁺, denominada F₀F₁ ATPase, estável em ácido e ligada à membrana celular. Tal via funciona para manter o pH intracelular por volta de 7,5 [137]. Todos os genes que codificam os componentes dessa F₀F₁ ATPase estão presentes em seu genoma [3]. Além desse mecanismo, a alcalinização do citoplasma ocorre através da geração de moléculas básicas para neutralizar prótons [10].

Alguns estreptococos orais usam a via da arginina deiminase para sobreviver a uma diminuição do pH ambiental. Porém, embora a enzima arginina deiminase não tenha sido encontrada no genoma do *S. mutans*, foram identificadas outras enzimas dessa via, incluindo a ornitina carbamoiltransferase e a carbamato quinase, indicando que o *S. mutans* pode utilizar aminoácido, possivelmente a agmatina, para a conversão de prótons H⁺ em aminas [3].

O sistema agmatina deiminase (AgDS) converte agmatina em amônia, dióxido de carbono (CO₂), putrescina e ATP. Embora o AgDS não pareça ter um impacto

considerável sobre a alcalinização ambiental, a amônia gerada internamente parece contribuir para neutralização do pH citoplasmático, enquanto o ATP gerado pode ser usado para alimentar a bomba translocadora de prótons H⁺ [138]. A fermentação malolática (MLF) converte o L-malato em L-lactato e em CO₂. O produto de CO₂ pode então ser usado para a neutralização citoplasmática por conversão em bicarbonato, via anidrase carbônica. Em *S. mutans*, a transcrição dos genes *mle*, que codificam a enzima malolática, são induzíveis por ácido, e a atividade MLF foi considerada ideal a um pH extracelular de 4,0 [139]. Além disso, o malato mostrou poder contribuir para a aciduricidade de *S. mutans*, pois também foi associado à regeneração de ATP [140].

O *S. mutans* também codifica um maquinário induzível por ácido para reparar o DNA e as proteínas degradadas danificadas por condições ácidas [141]. Mecanismos de tolerância a ácidos induzíveis são usados para preservar as macromoléculas da célula contra o ataque ácido. As ligações glicosídicas de desoxirribonucleotídeos são instáveis sob condições ácidas, portanto o acúmulo de ácido dentro da célula pode causar perda de purinas e pirimidinas do DNA, o que resulta na formação de um sítio apurínico ou apirimidínico. Este evento ocorre devido à protonação da base nitrogenada e subsequente clivagem da ligação glicosil [142]. Os sítios apurínicos ou apirimidínicos serão reconhecidos e reparados por enzimas denominadas AP endonucleases [143].

Chaperonas moleculares também são aumentadas em resposta a condições ácidas para evitar o acúmulo e a agregação de proteínas com configurações inapropriadas ao desempenho de suas tarefas, que podem resultar em toxicidade. Em *S. mutans*, em resposta a condições ácidas, são produzidas importantes proteínas associadas ao estresse celular, conhecidas como proteínas de choque térmico – HSP (do inglês *Heat Shock Proteins*). Essas proteínas pertencem a uma classe de chaperonas moleculares, as quais são proteínas responsáveis pelo correto dobramento de outras proteínas sintetizadas e pela prevenção da agregação proteica. São altamente conservadas, sugerindo uma grande importância evolutiva. Entre elas estão os sistemas DnaK e GroEL [144].

Todos os processos de tolerância a ácidos acima mencionados trabalham juntos para preservar a integridade da célula de *S. mutans*. Além do ácido, outras mudanças ambientais podem desencadear uma variedade de respostas adaptativas

nesse organismo e a expressão de vários genes é afetada após a exposição ao estresse oxidativo, osmótico, térmico ou de fome [3].

1.2.3.3.4 *Proteases*

As proteases de *S. mutans* podem contribuir para a virulência e o que se sabe é que estão envolvidas na quebra das proteínas do hospedeiro para nutrição bacteriana e na degradação direta das proteínas estruturais do hospedeiro. Em geral, a cepa UA159 possui inúmeras proteases, incluindo as proteases Clp e FtsH dependentes de ATP, e possui pelo menos 15 peptidases, indicando que é capaz de usar os peptídeos gerados por essas proteases, bem como os de outras bactérias no biofilme [3]. Através da análise de sequência do genoma de *S. mutans*, várias proteases potencialmente envolvidas no processamento da superfície também foram identificadas. Dentre elas, encontra-se a serina protease HtrA, a qual ajuda os organismos a sobreviverem a estresses ambientais, como temperatura elevada, estresse oxidativo e osmótico, através da degradação de proteínas que perderam parcial ou totalmente sua funcionalidade na célula, garantindo assim a homeostase celular [145]. Também foi identificada uma protease homóloga à protease HtpX de *Streptococcus gordonii* [146].

Além disso, foram identificadas três proteases dependentes de Zn (SMU.160, SMU.1438 e SMU.1784), duas proteases relacionadas à colagenase (SMU.759 e SMU.761), uma serina protease RgpF e uma protease de membrana (SMU.235) [3]. Em *S. mutans*, acredita-se que as proteases desempenham um importante papel no desenvolvimento da cárie dentinária ou radicular.

1.2.3.3.5 *Produção de Mutacinas*

Devido ao grande número de espécies microbianas diferentes na cavidade oral [147], o *S. mutans* sofre uma grande concorrência para uma colonização bem sucedida e formação de biofilme na superfície dentária. Esse processo é auxiliado pelos pequenos peptídeos catiônicos sintetizados no ribossomo da célula do *S. mutans*, chamados mutacinas [148]. Foram identificados cinco tipos principais de mutacinas, as quais são codificadas pelos genes estruturais *mutAI* [149], *mutAII* [150], *mutAIII* [151], *mutAIV* [152], *smbA* e *smbB* [153] e são geralmente divididas

em duas categorias principais, lantibióticos e não-lantibióticos. Ambas categorias foram identificadas em *S. mutans* [154]. As mutacinas tipo I, II, III e Smb, representantes da classe dos lantibióticos, apresentam potencial para serem utilizados em terapias antibióticas devido ao seu amplo espectro de ação contra patógenos Gram-positivos [155]. A representante da classe dos não-lantibióticos é a mutacina tipo IV, a qual atua inibindo o crescimento dos colonizadores primários da superfície dentária favorecendo, desta forma, a instalação de *S. mutans* [152].

Estudos sugerem que o sistema de detecção de quorum sensing mediado por peptídeo estimulador de competência (CSP) está envolvido na produção de mutacina IV, mutacina não-lantibiótico V codificada por SMU.1914, a qual foi recentemente identificada [156], bem como o lantibiótico Smb [153]. Outro achado significativo demonstrou que condições aeróbias estimularam o sistema de competência e a expressão da bacteriocina mutacina IV de *S. mutans* [157].

A cepa *S. mutans* UA159 codifica pelo menos seis outros pequenos peptídeos com um alto grau de similaridade com mutacinas, e esses genes também mostraram ser regulados por CSP [154]. As mutacinas, também chamadas de bacteriocinas, são capazes de inibir o crescimento de diversos microrganismos comensais competidores como *S. sanguinis*, *S. mitis*, *S. gordonii*, *S. oralis*, *S. sobrinus* e até mesmo outras cepas da espécie *S. mutans*. Apresentam importante vantagem ecológica no processo de colonização por *S. mutans*, mantendo-se estáveis na microbiota bucal do hospedeiro e favorecendo a transmissão intrafamiliar.

Estudos sobre a transmissão de cepas de *S. mutans* das mães para os filhos sugerem que as cepas de *S. mutans* das mães com maior número de mutacinas produzidas são as mais frequentemente transmitidas para os filhos, quando comparadas a outras cepas da cavidade oral das mães com menor produção e diversidade de mutacinas [158].

1.2.3.3.5 Via de Transdução de Sinal

1.2.3.3.5.1 Sistema de Transdução de Sinal de Dois Componentes

O sistema de transdução de sinal de dois componentes (SDC) desempenha um importante papel na adaptação de transcriptomas bacterianos em resposta aos estímulos do ambiente [159]. A composição de um típico sistema de dois

componentes inclui um receptor de membrana, normalmente uma histidina-quinase (HK), e uma proteína reguladora intracelular denominada regulador de resposta (RR). A ativação da porção externa do receptor de membrana ocorre por um estímulo ambiental específico, sofrendo fosforilação na sua porção intracelular [160]. O grupo fosfato é então transferido para um regulador de resposta intracelular, o qual sofre modificação da sua conformação para se ligar às sequências reguladoras dos genes alvo, o que pode induzir ou reprimir a transcrição dos mesmos. Os genes que codificam os componentes destes sistemas são geralmente organizados em operons, mas muitas HK ou RR são designados “órfãos” quando codificados por genes isolados, sem seu respectivo par. O genoma da cepa de *S. mutans* UA159 contém pelo menos 14 SDC completos [138] e um regulador de resposta órfão, CovR, cujo receptor de membrana cognato (CovS) não foi identificado em nenhuma cepa desta espécie [161]. Entre esses, ComDE, LevRS, VicRK e o regulador de resposta órfão, CovR, demonstraram coordenar a expressão de vários fatores de virulência. Foi sugerido que o sistema LevRS gerencia o metabolismo de carboidratos, como frutose e manose [162], enquanto que o sistema ComDE está envolvido na regulação da produção de bacteriocina e competência. O SDC VicRK regula respostas ao ácido e ao estresse oxidativo e, também, à competência [103]. Além disso, o SDC VicRK parece regular de forma antagônica fatores de virulência associados à formação de biofilmes. Estes incluem os sistemas VicKR e CovR. O SDC VicKR induz a expressão dos genes *gtfB/C/D* e *gpbB* [163, 164], enquanto CovR reprime estes mesmos genes de virulência [165]. Em *S. mutans*, a maioria dos sinais detectados pelos receptores de membrana HKs dos 14 SDC permanece praticamente indefinida. Portanto, são necessários estudos adicionais sobre esses sistemas para aumentar nossa compreensão de como o *S. mutans* detecta e responde às mudanças ambientais. Provavelmente, o SDC melhor caracterizado seja o sistema de indução da competência, quorum sensing, presente em muitas espécies de estreptococos e que foi sugerido estar associado ao controle do desenvolvimento da competência genética em *S. mutans*.

1.2.3.3.5.2 Quorum Sensing

Sabe-se que muitas bactérias regulam suas atividades cooperativas e processos fisiológicos através de um mecanismo chamado quorum sensing (QS), no

qual as células bacterianas comunicam-se liberando, detectando e respondendo a pequenas moléculas de sinal difusíveis. O *S. mutans* também utiliza este mecanismo, sendo capaz de avaliar as condições do ambiente e adaptar tanto sua fisiologia quanto seu comportamento. Em função dessa mudança, esse mecanismo de adaptabilidade é essencial na sobrevivência e persistência desse organismo [166].

Os genes que constituem este sistema de comunicação intercelular envolvem a produção e a translocação de pequenos peptídeos que, ao atingir concentrações ótimas no meio extracelular, ativam o receptor de membrana histidina-quinase, transmitindo um sinal intracelular que ativa a expressão de diversos genes envolvidos na captação de DNA extracelular, e também aqueles envolvidos na capacidade de responderem aos estímulos de pressão osmótica, diminuição de pH e outras condições de estresse [167].

Em células de *S. mutans* esse sistema é controlado por dois genes, *comCDE* e *comAB*. Os genes *comC*, *comD* e *comE* codificam o peptídeo indutor de competência CSP que se liga à membrana histidina-quinase ComD e resulta na autofosforilação e na ativação do regulador de resposta cognato ComE, que modifica e ativa o *sigX*, induzindo sua transcrição de modo a ativar a expressão de um conjunto específico de genes envolvidos na resposta adaptativa necessária, como para regular a produção de bacteriocina, a genética competência, a tolerância ao ácido e a formação de biofilme [168]. Já a densidade celular, a disponibilidade de nutrientes e outras condições ambientais induzem a expressão do gene *comC* que irá codificar o precursor do peptídeo estimulador de competência (CSP). Assim, após a clivagem do pró-peptídeo CSP no interior da célula, o transportador ABC específico pelo qual o pró-peptídeo CSP será transportado para o meio extracelular será codificado pelos genes *comA* e *comB*. Ao atingir um certo limite, o CSP maduro será reconhecido pelo sistema *comDE* de dois componentes, acionando a cascata de fosforilação [103].

A cepa de *S. mutans* UA159 possui pelo menos mais dois SDCs de quorum sensing. O primeiro caracterizado por LuxS, codificado pelo gene *luxS*, envolve o autoindutor AI-2, uma molécula envolvida na sinalização célula-célula e apontada por ser responsável pela comunicação entre espécies [3]. O segundo, CiaHR, caracterizado por poder contribuir para a formação de biofilme, tolerância a ácidos e entrada em competência, possivelmente interagindo com o CSP [169]. Dessa forma,

a análise da frequência de genes envolvidos no sistema *quorum sensing*, que regulam a competência natural em *S. mutans*, e de genes responsáveis pela transformação em resposta aos estímulos ambientais, é importante para o entendimento da biologia e a evolução das populações desta espécie.

1.2.4 Microbioma Oral e Hospedeiro, um Superorganismo

Embora o *S. mutans* apresente diversos fatores de virulência que proporcionam vantagens competitivas a esta espécie dentro do biofilme, sua interação com o restante da microbiota é essencial para o entendimento do processo cariioso. Dados fornecem evidências de que outros táxons estão presentes de maneira numerosa e exibem importantes propriedades fisiológicas no processo de cárie [75]. Além disso, a chave para uma compreensão mais completa da base fundamental da doença cárie vai além do estudo da taxonomia bacteriana, pois, apesar da diferença na composição microbiana, o fenótipo das bactérias deve permanecer razoavelmente conservado, sendo em homeostase ou em disbiose. Baseando-se na teoria ecológica da cárie [64], já citada anteriormente, o biofilme como um todo estaria envolvido no processo de cárie, como um superorganismo. Dessa forma, a cárie dentária não é desenvolvida apenas por uma espécie bacteriana [67], embora vários estudos tenham proposto que *S. mutans* seria o agente causador [2]. Enquanto outras bactérias também são provindas de potencial acidúrico e acidogênico em quantidades suficientes para causar a desmineralização da estrutura dentária [7], por outro lado, o próprio *S. mutans* foi isolado em alguns indivíduos saudáveis [170].

No ano de 2000, o termo microbioma foi definido como a comunidade ecológica de microrganismos comensal, simbiótica e patogênica que compartilham o nosso corpo e que funcionam como um determinante da saúde e da doença. Desde então, esforços consideráveis foram feitos para compreender o papel do microbioma sob diferentes condições, com foco na caracterização da composição microbiana sob condições de saúde e doença [44]. Microbiologistas, então, atribuíram ao microbioma uma percepção dualista de bem e mal, visando a detecção e a destruição de microrganismos específicos [6]. Essas interpretações errôneas da doença conduziram estratégias focadas, principalmente, em apenas um dos participantes na etiologia da cárie [5]. Assim, para cada pessoa, o microbioma é

específico, podendo variar com a alteração dos fatores que o determinam [171]. O microbioma oral e o hospedeiro, juntos, compõem um superorganismo capaz de viver de maneira ideal. Nesse contexto, estratégias apropriadas para tratamentos individualizados devem ser projetadas com a finalidade de moldar a homeostase dentro do superorganismo, de forma a permitir que o organismo viva com seus microrganismos uma relação de equilíbrio dinâmico [172]. Com a pretensão de poder contribuir para o entendimento detalhado das funções dinâmicas do metabolismo que a microbiota oral desempenha na saúde e na doença em seu hospedeiro, tecnologias Ômicas de alto rendimento vêm sendo desenvolvidas.

1.2.5 Abordagens Ômicas para o Estudo de Cárie Dentária

Nas últimas décadas, novas técnicas Ômicas de alto rendimento, estudando moléculas informativas como DNA, RNA, proteínas e metabólitos, vem sendo aplicadas em amostras orais com a tentativa de esclarecer aspectos críticos da cárie dentária com relação ao entendimento da disbiose [173]. Estudos metagenômicos começaram a se expandir após o sequenciamento do genoma humano, iniciado no final da década de 80 e finalizado 14 anos depois [174].

Uma das técnicas Ômicas, a metagenômica, consiste na análise de comunidades microbianas diretamente através de seu conteúdo total de DNA, recuperado diretamente das amostras, sem um passo de cultivo ou amplificação de parte do genoma através de PCR [175]. Um estudo metagenômico é aplicado na cavidade oral humana para uma imagem menos tendenciosa dos membros que habitam a placa dentária, em condições de saúde e de doença. Em um desses estudos foi sugerido que amostras de indivíduos com cárie não são dominadas por *S. mutans*, mas são uma comunidade complexa formada por dezenas de espécies bacterianas [176]. Também foi proposto que o uso de cepas bacterianas comensais pode atuar como probióticos na prevenção de lesões de cárie [13, 176]. Essa metodologia revelou o potencial genético do conteúdo total de DNA da comunidade microbiana, entretanto, é necessária uma abordagem mais abrangente para estudar a atividade microbiana no microbioma oral.

A análise metatranscriptômica vem revelando a composição taxonômica e as funções ativas de uma comunidade complexa microbiana. Nesse contexto, a metatranscriptômica caracteriza os perfis de expressão gênica de toda a

comunidade microbiana, baseado no conjunto de transcrições que são sintetizados sob diversas condições ambientais [44]. Estudos anteriores mostraram que perfis metagenômicos e metatranscriptômicos de uma mesma amostra diferem em sua composição filogenética [177]. Como consequência, os membros da comunidade que estão presentes no metagenoma em baixos números podem ser críticos para a continuação das atividades metabólicas essenciais para a sobrevivência da comunidade microbiana [44].

Para uma melhor compreensão da dinâmica da expressão gênica de qualquer microbioma, é necessário caracterizar o comportamento do transcriptoma em condições de saúde. No entanto, poucos estudos metatranscriptômicos foram realizados com esse objetivo e demonstraram que alguns indivíduos praticamente não apresentaram alterações na comunidade bacteriana ativa após a ingestão de alimentos, sugerindo que sua microbiota não é afetada pela ingestão de alimentos, reduzindo potencialmente o risco de pH ácido e promovendo a saúde dental. Os autores também mostraram que genes mais especializados são expressos no biofilme maduro. Entre eles, os genes envolvidos na competência, na detecção de quorum sensing, e funcionalmente relacionado à produção de mutacina e à captação de DNA foram superexpressos, indicando um nível mais complexo de interações no biofilme maduro do que em estágios iniciais da formação de biofilme [177].

Outro estudo metatranscriptômico, que estudou comunidades bacterianas ativas de lesões de cárie, revelou que lesões não cavitadas em esmalte, lesões cavitadas com dentina exposta e lesões ocultas em dentina, apresentavam diferentes comunidades ativas. Entre os achados significativos deste trabalho, com relação a proporção de diferentes espécies estreptocócicas ativas, *S. sanguinis* demonstrou atividade nos três tipos de lesões, enquanto *S. mutans* apresentou-se ativo apenas em lesões não cavitadas em esmalte e em lesões cavitadas com dentina exposta, indicando uma associação de *S. mutans* com lesões expostas [178]. A proporção de *S. mutans* encontrada em todas amostras foi dramaticamente baixa, variando de 0,73% em lesões de esmalte a 0,48% em dentina exposta e 0,02% em lesões ocultas de dentina, dados esses que confirmam que essa espécie é minoria e questiona sua importância como principal agente etiológico da cárie dentária.

Após a análise metatranscriptômica, o conjunto de genes transcritos em um conjunto de mRNAs (RNA mensageiros) será traduzido em proteínas, as quais irão

desempenhar uma função específica na célula. Dessa forma, os dados metaproteômicos servirão para fornecer uma imagem mais clara da ecologia microbiana, dinâmica e atividade na cavidade oral, bem como a interação da atividade bacteriana com a resposta imune do hospedeiro. Como vantagem adicional dos dados metaproteômicos, não apenas as proteínas microbianas são detectadas, mas também as do hospedeiro. Esses componentes humanos presentes na placa dentária, incluindo imunoglobulinas, peptídeos antimicrobianos ou proteínas salivares aderentes ao dente, terão um papel vital na modulação e na adesão bacterianas [179]. O primeiro estudo metaproteômico do biofilme oral permitiu quantificar peptídeos individuais em indivíduos saudáveis e portadores de cárie. Indivíduos saudáveis apresentavam quantidade significativamente mais alta do sistema arginina deiminase, implicado no tamponamento do pH. Outras proteínas encontradas em níveis significativamente mais altos em indivíduos saudáveis estavam envolvidas no metabolismo do ferro e na resposta imune. Os autores propuseram que a validação futura desses biomarcadores em estudos de maior tamanho amostral possa servir para desenvolver testes de diagnóstico de risco de cárie que poderiam ser usados na prevenção de cáries [173].

O último passo na hierarquia biológica é a análise do metaboloma. Metabolômica é a identificação e a quantificação completa e sistemática de todo o conjunto de metabólitos presentes dentro e ao redor das células em crescimento sob condições fisiológicas definidas. É uma das abordagens mais poderosas para pesquisas sobre metabolismo [94]. Recentemente, foi desenvolvida uma investigação metabolômica da placa supra gengival em resposta ao uso de cremes dentais com arginina sem flúor e cremes dentais com fluoreto de sódio [180]. As lesões de esmalte demonstraram ser significativamente mais propensas a se tornarem inativas em comparação às lesões de dentina, mas nenhuma diferença foi encontrada quando o tratamento com arginina foi comparado ao do fluoreto. Diferenças entre os perfis metabólicos da placa tratada com arginina e com fluoreto foram encontradas. Arginina afetou significativamente as concentrações de 16 metabólitos, incluindo fenetilamina, agmatina e glucosamina-6-fosfato, enquanto que o fluoreto afetou as concentrações de 9 metabólitos, incluindo fenetilamina, N-metil-glutamato e agmatina.

A metaproteômica juntamente com a metabolômica são provavelmente as técnicas que descrevem mais de perto a atividade funcional da comunidade em um

determinado momento [181]. Recentemente, foi sugerido que os seres humanos são um híbrido humano-microbiota, onde os microrganismos hospedeiros e simbióticos funcionam juntos e se influenciam, o chamado superorganismo [172]. Com esse conceito, a abordagem metabolômica pode abrir uma nova era na pesquisa da microbiota simbiótica, incluindo o biofilme oral.

As tecnologias Ômicas vêm reforçando sua pretensão de poder contribuir para o entendimento detalhado das funções dinâmicas do metabolismo da microbiota oral. Pesquisadores vêm aplicando pesquisas pós-genômicas sobre mecanismos genéticos, bioquímicos e fisiológicos da microbiota com o intuito de comparar as funções do biofilme patogênico em resposta a estresses nutricionais, químicos e físicos contra o metagenoma de indivíduos saudáveis [182]. No entanto, mesmo com o atual avanço tecnológico, pesquisadores ainda não são capazes de responder às particularidades de doenças complexas, como a cárie dentária, o que resulta em diferenças consideráveis de opinião em relação à importância e às contribuições relativas de diferentes microrganismos.

Com o intuito de compreender as diferentes abordagens “Ômicas” que vêm sendo utilizadas para estudar comunidades microbianas orais, a Figura 1 demonstra a representação esquemática dessas avançadas técnicas. O DNA pode ser extraído de uma amostra oral para estudar as funções codificadas pelo conteúdo total de genes da comunidade, ou seja, o metagenoma. Caso o RNA seja extraído e sequenciado, as sequências obtidas, isto é, o metatranscriptoma, representarão o padrão global de genes expressos na porção ativa das populações bacterianas. A produção total de proteínas e metabólitos da comunidade será obtida através da análise do metaproteoma e do metaboloma. Caso a abordagem metagenômica forneça informações sobre o repertório genético total dos micróbios, as abordagens metatranscriptômica, metaproteômica e metabolômica fornecerão informações sobre os organismos e as funções ativas no momento da amostragem.

OMICS APPROACHES TO STUDY ORAL MICROBIAL COMMUNITIES

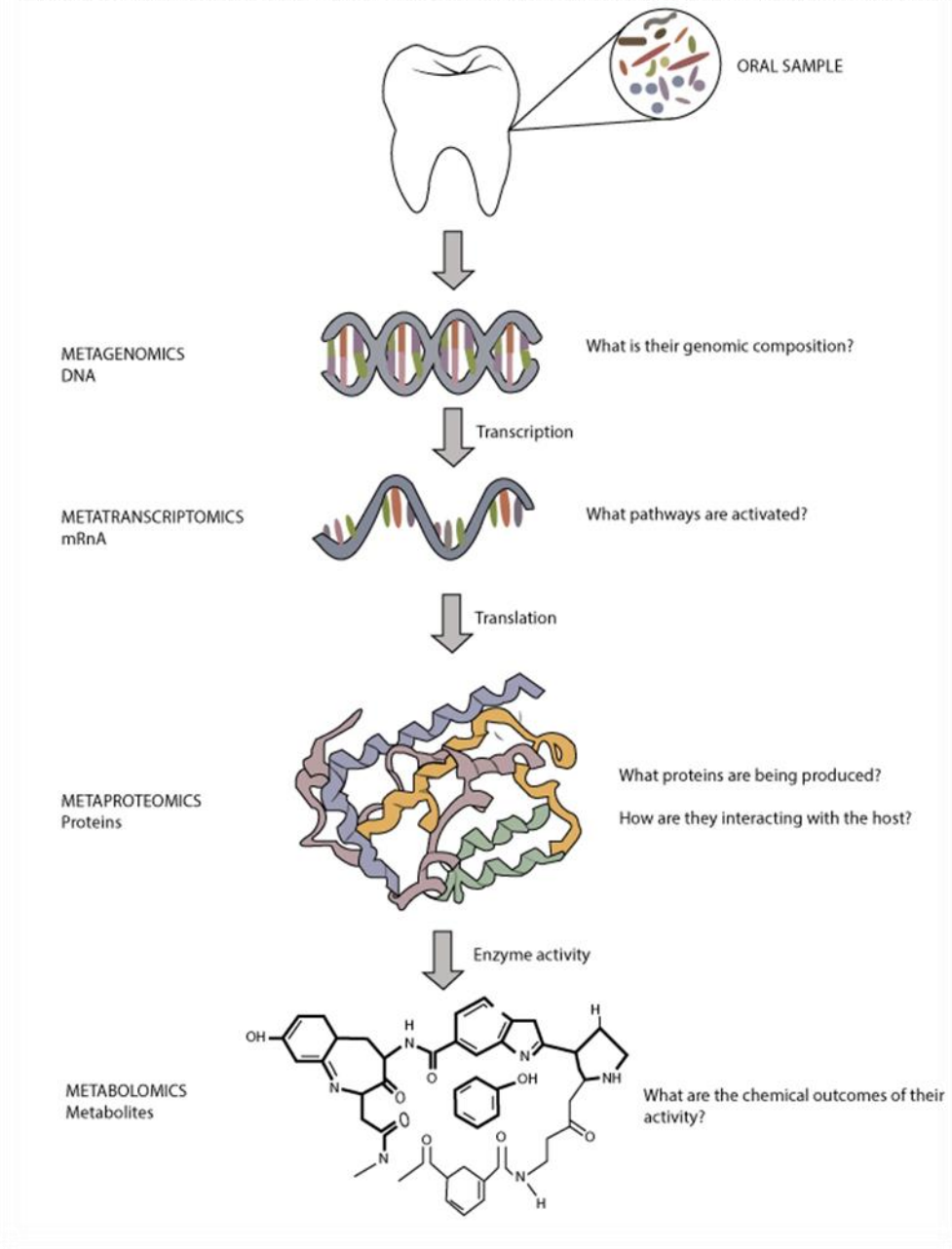


Figura 1 - Representação esquemática de tecnologias Ômicas, seus correspondentes objetivos de análise e métodos de avaliação [94].

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo Geral

Estudar o papel do *Streptococcus mutans* em biofilmes de superfícies radiculares com o uso de técnicas Ômicas.

1.3.2 Objetivos Específicos

- 1) Discutir o conhecimento sobre como as técnicas Ômicas estão contribuindo para o entendimento do microbioma oral em saúde e doença cárie (ARTIGO 1).
- 2) Estudar o entendimento do papel do *S. mutans* na doença cárie após o uso de técnicas Ômicas (ARTIGO 1).
- 3) Discutir as limitações das evidências científicas dos estudos atuais das técnicas Ômicas para a identificação de possíveis biomarcadores para avaliação de risco de cárie (ARTIGO 1).
- 4) Fazer uma análise descritiva sobre o papel do *S. mutans* em cárie radicular baseada nos fatores de virulência sugeridos por Argimón (2011), genes reguladores de transcrição e sistemas de transdução de sinal de dois componentes (ARTIGO 2).

1.4 REFERÊNCIAS

1. Petersen PE. Challenges to improvement of oral health in the 21st century--the approach of the WHO Global Oral Health Programme. *Int Dent J.* 2004;54(6 Suppl 1):329-43.
2. Loesche WJ. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol Rev.* 1986;50(4):353-80.
3. Ajdic D, McShan WM, McLaughlin RE, Savic G, Chang J, Carson MB, et al. Genome sequence of *Streptococcus mutans* UA159, a cariogenic dental pathogen. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(22):14434-9.
4. Kt S, Kmk M, N B, Jimson S, R S. Dental caries vaccine - a possible option? *J Clin Diagn Res.* 2013;7(6):1250-3.
5. Zhang S. Dental caries and vaccination strategy against the major cariogenic pathogen, *Streptococcus mutans*. *Curr Pharm Biotechnol.* 2013;14(11):960-6.
6. Vance RE, Isberg RR, Portnoy DA. Patterns of pathogenesis: discrimination of pathogenic and nonpathogenic microbes by the innate immune system. *Cell Host Microbe.* 2009;6(1):10-21.
7. Gross EL, Beall CJ, Kutsch SR, Firestone ND, Leys EJ, Griffen AL. Beyond *Streptococcus mutans*: dental caries onset linked to multiple species by 16S rRNA community analysis. *PLoS One.* 2012;7(10):e47722.
8. Simon-Soro A, Belda-Ferre P, Cabrera-Rubio R, Alcaraz LD, Mira A. A tissue-dependent hypothesis of dental caries. *Caries Res.* 2013;47(6):591-600.
9. Human Oral Microbiome Database (HOMD). 2018. Available at: <http://www.homd.org>. Accessed January, 2020.
10. Lemos JA, Burne RA. A model of efficiency: stress tolerance by *Streptococcus mutans*. *Microbiology.* 2008;154(Pt 11):3247-55.
11. Simón-Soro A, Tomás I, Cabrera-Rubio R, Catalan MD, Nyvad B, Mira A. Microbial geography of the oral cavity. *J Dent Res.* 2013;92(7):616-21.
12. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature.* 2012;486(7402):207-14.
13. Camelo-Castillo A, Benitez-Paez A, Belda-Ferre P, Cabrera-Rubio R, Mira A. *Streptococcus dentisani* sp. nov., a novel member of the mitis group. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2014;64(Pt 1):60-5.
14. Huang X, Palmer SR, Ahn SJ, Richards VP, Williams ML, Nascimento MM, et al. A Highly Arginolytic *Streptococcus* Species That Potently Antagonizes *Streptococcus mutans*. *Appl Environ Microbiol.* 2016;82(7):2187-201.

15. Nascimento MM, Zaura E, Mira A, Takahashi N, Ten Cate JM. Second Era of OMICS in Caries Research: Moving Past the Phase of Disillusionment. *J Dent Res.* 2017;96(7):733-40.
16. Christensen K, Doblhammer G, Rau R, Vaupel JW. Ageing populations: the challenges ahead. *Lancet.* 2009;374(9696):1196-208.
17. Nations U. World Population Prospects 2019: Highlights. 2019. p. <https://www.un.org/development/desa/publications/world-population-prospects-2019-highlights.html>
18. Kassebaum NJ, Bernabe E, Dahiya M, Bhandari B, Murray CJ, Marcenes W. Global Burden of Severe Tooth Loss: A Systematic Review and Meta-analysis. *J Dent Res.* 2014;93(7 Suppl):20s-8s.
19. Petersen PE, Yamamoto T. Improving the oral health of older people: the approach of the WHO Global Oral Health Programme. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2005;33(2):81-92.
20. Rihs LB, de Sousa Mda L, Wada RS. Root caries in areas with and without fluoridated water at the Southeast region of Sao Paulo State, Brazil. *J Appl Oral Sci.* 2008;16(1):70-4.
21. Gluzman R, Katz RV, Frey BJ, McGowan R. Prevention of root caries: a literature review of primary and secondary preventive agents. *Spec Care Dentist.* 2013;33(3):133-40.
22. Griffin SO, Griffin PM, Swann JL, Zlobin N. Estimating rates of new root caries in older adults. *J Dent Res.* 2004;83(8):634-8.
23. Locker D, Leake JL. Coronal and root decay experience in older adults in Ontario, Canada. *J Public Health Dent.* 1993;53(3):158-64.
24. Kim JK, Baker LA, Seirawan H, Crimmins EM. Prevalence of oral health problems in U.S. adults, NHANES 1999-2004: exploring differences by age, education, and race/ethnicity. *Spec Care Dentist.* 2012;32(6):234-41.
25. Sugihara N, Maki Y, Okawa Y, Hosaka M, Matsukubo T, Takaesu Y. Factors associated with root surface caries in elderly. *Bull Tokyo Dent Coll.* 2010;51(1):23-30.
26. Mamai-Homata E, Topitsoglou V, Oulis C, Margaritis V, Polychronopoulou A. Risk indicators of coronal and root caries in Greek middle aged adults and senior citizens. *BMC Public Health.* 2012;12:484.
27. Gao YB, Hu T, Zhou XD, Shao R, Cheng R, Wang GS, et al. How Root Caries Differs between Middle-aged People and the Elderly: Findings from the 4th National Oral Health Survey of China. *Chin J Dent Res.* 2018;21(3):221-9.
28. Ministério da Saúde, Secretaria Nacional de Programas Especiais de Saúde, Divisão Nacional de Saúde Bucal. Levantamento epidemiológico em saúde bucal: Brasil, zona urbana, 1986. Brasília: Ministério da Saúde; 1988. 137 p.

29. Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica, Coordenação Nacional de Saúde Bucal. Projeto SB Brasil 2003: Condições de saúde bucal da população brasileira 2002-2003: Resultados principais. Brasília: Ministério da Saúde; 2004. 52 p.
30. Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Projeto SB Brasil 2010: Pesquisa Nacional de Saúde Bucal: Resultados principais. Brasília: Ministério da Saúde; 2012. 118 p.
31. Du M, Jiang H, Tai B, Zhou Y, Wu B, Bian Z. Root caries patterns and risk factors of middle-aged and elderly people in China. *Community Dent Oral Epidemiol*. 2009;37(3):260-6.
32. Nicolau B, Srisilapanan P, Marcenes W. Number of teeth and risk of root caries. *Gerodontology*. 2000;17(2):91-6.
33. Hoppenbrouwers PM, Driessens FC, Borggreven JM. The vulnerability of unexposed human dental roots to demineralization. *J Dent Res*. 1986;65(7):955-8.
34. Dame-Teixeira N, Parolo CCF, Maltz M. Specificities of Caries on Root Surface. *Monogr Oral Sci*. 2017;26:15-25.
35. Abou Neel EA, Aljabo A, Strange A, Ibrahim S, Coathup M, Young AM, et al. Demineralization-remineralization dynamics in teeth and bone. *Int J Nanomedicine*. 2016;11:4743-63.
36. Bosshardt DD, Selvig KA. Dental cementum: the dynamic tissue covering of the root. *Periodontol 2000*. 1997;13:41-75.
37. Takahashi N, Nyvad B. Ecological Hypothesis of Dentin and Root Caries. *Caries Res*. 2016;50(4):422-31.
38. Schupbach P, Guggenheim B, Lutz F. Human root caries: histopathology of initial lesions in cementum and dentin. *J Oral Pathol Med*. 1989;18(3):146-56.
39. Nyvad B, Fejerskov O. An ultrastructural study of bacterial invasion and tissue breakdown in human experimental root-surface caries. *J Dent Res*. 1990;69(5):1118-25.
40. Kawasaki K, Featherstone JD. Effects of collagenase on root demineralization. *J Dent Res*. 1997;76(1):588-95.
41. Frank RM, Steuer P, Hemmerle J. Ultrastructural study on human root caries. *Caries Res*. 1989;23(4):209-17.
42. Do T, Dame-Teixeira N, Naginyte M, Marsh PD. Root Surface Biofilms and Caries. *Monogr Oral Sci*. 2017;26:26-34.
43. Zhang J, Sardana D, Wong MCM, Leung KCM, Lo ECM. Factors Associated with Dental Root Caries: A Systematic Review. *JDR Clin Trans Res*. 2019:2380084419849045.

44. Solbiati J, Frias-Lopez J. Metatranscriptome of the Oral Microbiome in Health and Disease. *J Dent Res.* 2018;97(5):492-500.
45. Clarke J. On the bacterial factor in the aetiology of dental caries. *Br J Exp Pathol.* 1924;5:151-7
46. Fitzgerald RJ, Keyes PH. Demonstration of the etiologic role of streptococci in experimental caries in the hamster. *J Am Dent Assoc.* 1960;61:9-19.
47. Ooshima T, Sobue S, Hamada S, Kotani S. Susceptibility of rats, hamsters, and mice to carious infection by *Streptococcus mutans* serotype c and d organisms. *J Dent Res.* 1981;60(4):855-9.
48. Nyvad B, Kilian M. Microbiology of the early colonization of human enamel and root surfaces in vivo. *Scand J Dent Res.* 1987;95(5):369-80.
49. Emilson CG, Klock B, Sanford CB. Microbial flora associated with presence of root surface caries in periodontally treated patients. *Scand J Dent Res.* 1988;96(1):40-9.
50. Van Houte J, Jordan HV, Laraway R, Kent R, Soparkar PM, DePaola PF. Association of the microbial flora of dental plaque and saliva with human root-surface caries. *J Dent Res.* 1990;69(8):1463-8.
51. Van Houte J, Lopman J, Kent R. The predominant cultivable flora of sound and carious human root surfaces. *J Dent Res.* 1994;73(11):1727-34.
52. Jordan HV, Hammond BF. Filamentous bacteria isolated from human root surface caries. *Arch Oral Biol.* 1972;17(9):1333-42.
53. Jordan HV, Keyes PH. Aerobic, Gram-Positive, Filamentous Bacteria as Etiologic Agents of Experimental Periodontal Disease in Hamsters. *Arch Oral Biol.* 1964;9:401-14.
54. Jordan HV, Zipkin I, Fitzgerald RJ, Berger ND. Effect of Lathyrogenic Agents on Dental Caries in the Rat. *J Dent Res.* 1964;43:3-10.
55. Sumney DL, Jordan HV. Characterization of bacteria isolated from human root surface carious lesions. *J Dent Res.* 1974;53(2):343-51.
56. Syed SA, Loesche WJ, Pape HL, Jr., Grenier E. Predominant cultivable flora isolated from human root surface caries plaque. *Infect Immun.* 1975;11(4):727-31.
57. Ellen RP, Banting DW, Fillery ED. *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus* detection in the assessment of dental root surface caries risk. *J Dent Res.* 1985;64(10):1245-9.
58. Raval N, Birkhed D. Factors associated with active and inactive root caries in patients with periodontal disease. *Caries Res.* 1991;25(5):377-84.
59. Fure S, Zickert I. Root surface caries and associated factors. *Scand J Dent Res.* 1990;98(5):391-400.

60. Bowden GH, Ekstrand J, McNaughton B, Challacombe SJ. Association of selected bacteria with the lesions of root surface caries. *Oral Microbiol Immunol*. 1990;5(6):346-51.
61. Shen S, Samaranayake LP, Yip HK, Dyson JE. Bacterial and yeast flora of root surface caries in elderly, ethnic Chinese. *Oral Dis*. 2002;8(4):207-17.
62. Zaremba ML, Stokowska W, Klimiuk A, Daniluk T, Rozkiewicz D, Cylwik-Rokicka D, et al. Microorganisms in root carious lesions in adults. *Adv Med Sci*. 2006;51 Suppl 1:237-40.
63. Theilade E. The non-specific theory in microbial etiology of inflammatory periodontal diseases. *J Clin Periodontol*. 1986;13(10):905-11.
64. Marsh PD. Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. *Adv Dent Res*. 1994;8(2):263-71.
65. Marsh PD. Microbiologic aspects of dental plaque and dental caries. *Dent Clin North Am*. 1999;43(4):599-614, v-vi.
66. Marsh PD. Are dental diseases examples of ecological catastrophes? *Microbiology*. 2003;149(Pt 2):279-94.
67. Takahashi N, Nyvad B. Caries ecology revisited: microbial dynamics and the caries process. *Caries Res*. 2008;42(6):409-18.
68. Takahashi N, Nyvad B. The role of bacteria in the caries process: ecological perspectives. *J Dent Res*. 2011;90(3):294-303.
69. Nyvad B. Microbial colonization of human tooth surfaces. *APMIS Suppl*. 1993;32:1-45.
70. Van Houte J, Lopman J, Kent R. The final pH of bacteria comprising the predominant flora on sound and carious human root and enamel surfaces. *J Dent Res*. 1996;75(4):1008-14.
71. Aamdal-Scheie A, Luan WM, Dahlen G, Fejerskov O. Plaque pH and microflora of dental plaque on sound and carious root surfaces. *J Dent Res*. 1996;75(11):1901-8.
72. Marsh PD, Do T, Beighton D, Devine DA. Influence of saliva on the oral microbiota. *Periodontol 2000*. 2016;70(1):80-92.
73. Nyvad B, Kilian M. Microflora associated with experimental root surface caries in humans. *Infect Immun*. 1990;58(6):1628-33.
74. Schupbach P, Osterwalder V, Guggenheim B. Human root caries: microbiota of a limited number of root caries lesions. *Caries Res*. 1996;30(1):52-64.
75. Brailsford SR, Shah B, Simons D, Gilbert S, Clark D, Ines I, et al. The predominant aciduric microflora of root-carious lesions. *J Dent Res*. 2001;80(9):1828-33.

76. Mantzourani M, Fenlon M, Beighton D. Association between Bifidobacteriaceae and the clinical severity of root caries lesions. *Oral Microbiol Immunol.* 2009;24(1):32-7.
77. Preza D, Olsen I, Aas JA, Willumsen T, Grinde B, Paster BJ. Bacterial profiles of root caries in elderly patients. *J Clin Microbiol.* 2008;46(6):2015-21.
78. Chen L, Qin B, Du M, Zhong H, Xu Q, Li Y, et al. Extensive description and comparison of human supra-gingival microbiome in root caries and health. *PLoS One.* 2015;10(2):e0117064.
79. Beighton D, Lynch E. Comparison of selected microflora of plaque and underlying carious dentine associated with primary root caries lesions. *Caries Res.* 1995;29(2):154-8.
80. Ellen RP, Banting DW, Fillery ED. Longitudinal microbiological investigation of a hospitalized population of older adults with a high root surface caries risk. *J Dent Res.* 1985;64(12):1377-81.
81. Bowden GH. Microbiology of root surface caries in humans. *J Dent Res.* 1990;69(5):1205-10.
82. Beighton D, Lynch E, Heath MR. A microbiological study of primary root-caries lesions with different treatment needs. *J Dent Res.* 1993;72(3):623-9.
83. Keltjens HM, Schaeken MJ, van der Hoeven JS, Hendriks JC. Microflora of plaque from sound and carious root surfaces. *Caries Res.* 1987;21(3):193-9.
84. Argimón S, Caufield PW. Distribution of putative virulence genes in *Streptococcus mutans* strains does not correlate with caries experience. *J Clin Microbiol.* 2011;49(3):984-92.
85. Damé-Teixeira N, Parolo C, Maltz M, Rup A, Devine D, Do T. Gene expression of bacterial collagenolytic proteases in root caries. *Journal of Oral Microbiology.* 2018;10:1424475.
86. Moyer ZD, Zeng L, Burne RA. Modification of gene expression and virulence traits in *Streptococcus mutans* in response to carbohydrate availability. *Appl Environ Microbiol.* 2014;80(3):972-85.
87. Boushell LW, Kaku M, Mochida Y, Yamauchi M. Distribution and relative activity of matrix metalloproteinase-2 in human coronal dentin. *International journal of oral science.* 2011;3(4):192-9.
88. Buzalaf MA, Charone S, Tjaderhane L. Role of host-derived proteinases in dentine caries and erosion. *Caries Res.* 2015;49 Suppl 1:30-7.
89. Mazzoni A, Pashley DH, Tay FR, Gobbi P, Orsini G, Ruggeri A, Jr., et al. Immunohistochemical identification of MMP-2 and MMP-9 in human dentin: correlative FEI-SEM/TEM analysis. *Journal of biomedical materials research Part A.* 2009;88(3):697-703.

90. Shimada Y, Ichinose S, Sadr A, Burrow MF, Tagami J. Localization of matrix metalloproteinases (MMPs-2, 8, 9 and 20) in normal and carious dentine. *Australian dental journal*. 2009;54(4):347-54.
91. Sulkala M, Larmas M, Sorsa T, Salo T, Tjaderhane L. The localization of matrix metalloproteinase-20 (MMP-20, enamelysin) in mature human teeth. *J Dent Res*. 2002;81(9):603-7.
92. Tjaderhane L, Buzalaf MA, Carrilho M, Chaussain C. Matrix metalloproteinases and other matrix proteinases in relation to cariology: the era of 'dentin degradomics'. *Caries Res*. 2015;49(3):193-208.
93. Toledano M, Nieto-Aguilar R, Osorio R, Campos A, Osorio E, Tay FR, et al. Differential expression of matrix metalloproteinase-2 in human coronal and radicular sound and carious dentine. *Journal of dentistry*. 2010;38(8):635-40.
94. Nyvad B, Crielaard W, Mira A, Takahashi N, Beighton D. Dental caries from a molecular microbiological perspective. *Caries Res*. 2013;47(2):89-102.
95. Lemos JA, Quivey RG, Jr., Koo H, Abranches J. *Streptococcus mutans*: a new Gram-positive paradigm? *Microbiology*. 2013;159(Pt 3):436-45.
96. Hamada S, Slade HD. Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiol Rev*. 1980;44(2):331-84.
97. Sztajer H, Szafranski SP, Tomasch J, Reck M, Nimtz M, Rohde M, et al. Cross-feeding and interkingdom communication in dual-species biofilms of *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*. *Isme j*. 2014;8(11):2256-71.
98. Nakano K, Ooshima T. Serotype classification of *Streptococcus mutans* and its detection outside the oral cavity. *Future Microbiol*. 2009;4(7):891-902.
99. Fitzgerald RJ, Adams BO, Sandham HJ, Abhyankar S. Cariogenicity of a lactate dehydrogenase-deficient mutant of *Streptococcus mutans* serotype c in gnotobiotic rats. *Infect Immun*. 1989;57(3):823-6.
100. Hillman JD, Chen A, Snoep JL. Genetic and physiological analysis of the lethal effect of L-(+)-lactate dehydrogenase deficiency in *Streptococcus mutans*: complementation by alcohol dehydrogenase from *Zymomonas mobilis*. *Infect Immun*. 1996;64(10):4319-23.
101. Johnson CP, Gross SM, Hillman JD. Cariogenic potential in vitro in man and in vivo in the rat of lactate dehydrogenase mutants of *Streptococcus mutans*. *Arch Oral Biol*. 1980;25(11-12):707-13.
102. Wassel MO, Khattab MA. Antibacterial activity against *Streptococcus mutans* and inhibition of bacterial induced enamel demineralization of propolis, miswak, and chitosan nanoparticles based dental varnishes. *J Adv Res*. 2017;8(4):387-92.
103. Lemos JA, Palmer SR, Zeng L, Wen ZT, Kajfasz JK, Freires IA, et al. The Biology of *Streptococcus mutans*. *Microbiol Spectr*. 2019;7(1).

104. Liu Y, Xu Y, Song Q, Wang F, Sun L, Liu L, et al. Anti-biofilm Activities from *Bergenia crassifolia* Leaves against *Streptococcus mutans*. *Front Microbiol.* 2017;8:1738.
105. Misaki T, Naka S, Hatakeyama R, Fukunaga A, Nomura R, Isozaki T, et al. Presence of *Streptococcus mutans* strains harbouring the *cnm* gene correlates with dental caries status and IgA nephropathy conditions. *Sci Rep.* 2016;6:36455.
106. Fernandes CP, Oliveira FA, Silva PG, Alves AP, Mota MR, Montenegro RC, et al. Molecular analysis of oral bacteria in dental biofilm and atherosclerotic plaques of patients with vascular disease. *Int J Cardiol.* 2014;174(3):710-2.
107. Argimon S, Konganti K, Chen H, Alekseyenko AV, Brown S, Caufield PW. Comparative genomics of oral isolates of *Streptococcus mutans* by in silico genome subtraction does not reveal accessory DNA associated with severe early childhood caries. *Infect Genet Evol.* 2014;21:269-78.
108. Liu L, Hao T, Xie Z, Horsman GP, Chen Y. Genome mining unveils widespread natural product biosynthetic capacity in human oral microbe *Streptococcus mutans*. *Sci Rep.* 2016;6:37479.
109. Maruyama F, Kobata M, Kurokawa K, Nishida K, Sakurai A, Nakano K, et al. Comparative genomic analyses of *Streptococcus mutans* provide insights into chromosomal shuffling and species-specific content. *BMC Genomics.* 2009;10:358.
110. Meng P, Lu C, Zhang Q, Lin J, Chen F. Exploring the Genomic Diversity and Cariogenic Differences of *Streptococcus mutans* Strains Through Pan-Genome and Comparative Genome Analysis. *Curr Microbiol.* 2017;74(10):1200-9.
111. Cornejo OE, Lefebure T, Bitar PD, Lang P, Richards VP, Eilertson K, et al. Evolutionary and population genomics of the cavity causing bacteria *Streptococcus mutans*. *Mol Biol Evol.* 2013;30(4):881-93.
112. Palmer SR, Miller JH, Abranches J, Zeng L, Lefebure T, Richards VP, et al. Phenotypic heterogeneity of genomically-diverse isolates of *Streptococcus mutans*. *PLoS One.* 2013;8(4):e61358.
113. Phattarataratip E, Olson B, Broffitt B, Qian F, Brogden KA, Drake DR, et al. *Streptococcus mutans* strains recovered from caries-active or caries-free individuals differ in sensitivity to host antimicrobial peptides. *Mol Oral Microbiol.* 2011;26(3):187-99.
114. Banas JA. Virulence properties of *Streptococcus mutans*. *Front Biosci.* 2004;9:1267-77.
115. Bowen WH, Koo H. Biology of *Streptococcus mutans*-derived glucosyltransferases: role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms. *Caries Res.* 2011;45(1):69-86.
116. Guo L, Hu W, He X, Lux R, McLean J, Shi W. Investigating acid production by *Streptococcus mutans* with a surface-displayed pH-sensitive green fluorescent protein. *PLoS One.* 2013;8(2):e57182.

117. Klahan P, Okuyama M, Jinnai K, Ma M, Kikuchi A, Kumagai Y, et al. Engineered dextranase from *Streptococcus mutans* enhances the production of longer isomaltooligosaccharides. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2018;82(9):1480-7.
118. Nagasawa R, Sato T, Senpuku H. Raffinose Induces Biofilm Formation by *Streptococcus mutans* in Low Concentrations of Sucrose by Increasing Production of Extracellular DNA and Fructan. *Appl Environ Microbiol*. 2017;83(15).
119. Ren Z, Cui T, Zeng J, Chen L, Zhang W, Xu X, et al. Molecule Targeting Glucosyltransferase Inhibits *Streptococcus mutans* Biofilm Formation and Virulence. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016;60(1):126-35.
120. Rozen R, Steinberg D, Bachrach G. *Streptococcus mutans* fructosyltransferase interactions with glucans. *FEMS Microbiol Lett*. 2004;232(1):39-43.
121. Wexler DL, Penders JE, Bowen WH, Burne RA. Characteristics and cariogenicity of a fructanase-defective *Streptococcus mutans* strain. *Infect Immun*. 1992;60(9):3673-81.
122. Banas JA, Vickerman MM. Glucan-binding proteins of the oral streptococci. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2003;14(2):89-99.
123. Nogueira RD, Alves AC, Napimoga MH, Smith DJ, Mattos-Graner RO. Characterization of salivary immunoglobulin A responses in children heavily exposed to the oral bacterium *Streptococcus mutans*: influence of specific antigen recognition in infection. *Infect Immun*. 2005;73(9):5675-84.
124. Wu J, Xi C. Evaluation of different methods for extracting extracellular DNA from the biofilm matrix. *Appl Environ Microbiol*. 2009;75(16):5390-5.
125. Perry JA, Cvitkovitch DG, Levesque CM. Cell death in *Streptococcus mutans* biofilms: a link between CSP and extracellular DNA. *FEMS Microbiol Lett*. 2009;299(2):261-6.
126. Petersen FC, Assev S, van der Mei HC, Busscher HJ, Scheie AA. Functional variation of the antigen I/II surface protein in *Streptococcus mutans* and *Streptococcus intermedius*. *Infect Immun*. 2002;70(1):249-56.
127. Love RM, McMillan MD, Jenkinson HF. Invasion of dentinal tubules by oral streptococci is associated with collagen recognition mediated by the antigen I/II family of polypeptides. *Infect Immun*. 1997;65(12):5157-64.
128. Carlsson J, Griffith CJ. Fermentation products and bacterial yields in glucose-limited and nitrogen-limited cultures of streptococci. *Arch Oral Biol*. 1974;19(12):1105-9.
129. Matsui R, Cvitkovitch D. Acid tolerance mechanisms utilized by *Streptococcus mutans*. *Future Microbiol*. 2010;5(3):403-17.
130. Poolman B. Energy transduction in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Rev*. 1993;12(1-3):125-47.

131. May A, Brandt BW, El-Kebir M, Klau GW, Zaura E, Crielaard W, et al. metaModules identifies key functional subnetworks in microbiome-related disease. *Bioinformatics*. 2016;32(11):1678-85.
132. Russell RR, Aduse-Opoku J, Sutcliffe IC, Tao L, Ferretti JJ. A binding protein-dependent transport system in *Streptococcus mutans* responsible for multiple sugar metabolism. *J Biol Chem*. 1992;267(7):4631-7.
133. Busuioc M, Mackiewicz K, Buttaro BA, Piggot PJ. Role of intracellular polysaccharide in persistence of *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol*. 2009;191(23):7315-22.
134. Soet JJ, Nyvad B, Kilian M. Strain-related acid production by oral streptococci. *Caries Res*. 2000;34(6):486-90.
135. Burne RA. Oral streptococci... products of their environment. *J Dent Res*. 1998;77(3):445-52.
136. Fozo EM, Quivey RG, Jr. Shifts in the membrane fatty acid profile of *Streptococcus mutans* enhance survival in acidic environments. *Appl Environ Microbiol*. 2004;70(2):929-36.
137. Bender GR, Sutton SV, Marquis RE. Acid tolerance, proton permeabilities, and membrane ATPases of oral streptococci. *Infect Immun*. 1986;53(2):331-8.
138. Liu Y, Burne RA. Multiple two-component systems of *Streptococcus mutans* regulate agmatine deiminase gene expression and stress tolerance. *J Bacteriol*. 2009;191(23):7363-6.
139. Lemme A, Sztajer H, Wagner-Dobler I. Characterization of *mleR*, a positive regulator of malolactic fermentation and part of the acid tolerance response in *Streptococcus mutans*. *BMC Microbiol*. 2010;10:58.
- 140.b Sheng J, Marquis RE. Malolactic fermentation by *Streptococcus mutans*. *FEMS Microbiol Lett*. 2007;272(2):196-201.
141. Baker JL, Faustoferri RC, Quivey RG, Jr. Acid-adaptive mechanisms of *Streptococcus mutans*-the more we know, the more we don't. *Mol Oral Microbiol*. 2017;32(2):107-17.
142. Lindahl T, Nyberg B. Rate of depurination of native deoxyribonucleic acid. *Biochemistry*. 1972;11(19):3610-8.
143. Sancar A. DNA excision repair. *Annu Rev Biochem*. 1996;65:43-81.
144. Jayaraman GC, Penders JE, Burne RA. Transcriptional analysis of the *Streptococcus mutans* *hrcA*, *grpE* and *dnaK* genes and regulation of expression in response to heat shock and environmental acidification. *Mol Microbiol*. 1997;25(2):329-41.
145. Diaz-Torres ML, Russell RR. HtrA protease and processing of extracellular proteins of *Streptococcus mutans*. *FEMS Microbiol Lett*. 2001;204(1):23-8.

146. Vickerman MM, Mather NM, Minick PE, Edwards CA. Initial characterization of the *Streptococcus gordonii* htpX gene. *Oral Microbiol Immunol.* 2002;17(1):22-31.
147. Aas JA, Griffen AL, Dardis SR, Lee AM, Olsen I, Dewhirst FE, et al. Bacteria of dental caries in primary and permanent teeth in children and young adults. *J Clin Microbiol.* 2008;46(4):1407-17.
148. Hamada S, Ooshima T. Production and properties of bacteriocins (mutacins) from *Streptococcus mutans*. *Arch Oral Biol.* 1975;20(10):641-8.
149. Qi F, Chen P, Caufield PW. Purification and biochemical characterization of mutacin I from the group I strain of *Streptococcus mutans*, CH43, and genetic analysis of mutacin I biosynthesis genes. *Appl Environ Microbiol.* 2000;66(8):3221-9.
150. Novak J, Caufield PW, Miller EJ. Isolation and biochemical characterization of a novel lantibiotic mutacin from *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol.* 1994;176(14):4316-20.
151. Qi F, Chen P, Caufield PW. Purification of mutacin III from group III *Streptococcus mutans* UA787 and genetic analyses of mutacin III biosynthesis genes. *Appl Environ Microbiol.* 1999;65(9):3880-7.
152. Qi F, Chen P, Caufield PW. The group I strain of *Streptococcus mutans*, UA140, produces both the lantibiotic mutacin I and a nonlantibiotic bacteriocin, mutacin IV. *Appl Environ Microbiol.* 2001;67(1):15-21.
153. Yonezawa H, Kuramitsu HK. Genetic analysis of a unique bacteriocin, Smb, produced by *Streptococcus mutans* GS5. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(2):541-8.
154. Hossain MS, Biswas I. An extracellular protease, SepM, generates functional competence-stimulating peptide in *Streptococcus mutans* UA159. *J Bacteriol.* 2012;194(21):5886-96.
155. Parrot M, Caufield PW, Lavoie MC. Preliminary characterization of four bacteriocins from *Streptococcus mutans*. *Can J Microbiol.* 1990;36(2):123-30.
156. Hale JD, Ting YT, Jack RW, Tagg JR, Heng NC. Bacteriocin (mutacin) production by *Streptococcus mutans* genome sequence reference strain UA159: elucidation of the antimicrobial repertoire by genetic dissection. *Appl Environ Microbiol.* 2005;71(11):7613-7.
157. Kreth J, Zhang Y, Herzberg MC. Streptococcal antagonism in oral biofilms: *Streptococcus sanguinis* and *Streptococcus gordonii* interference with *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol.* 2008;190(13):4632-40.
158. Gronroos L, Saarela M, Matto J, Tanner-Salo U, Vuorela A, Alaluusua S. Mutacin production by *Streptococcus mutans* may promote transmission of bacteria from mother to child. *Infect Immun.* 1998;66(6):2595-600.

159. Lamy MC, Zouine M, Fert J, Vergassola M, Couve E, Pellegrini E, et al. CovS/CovR of group B streptococcus: a two-component global regulatory system involved in virulence. *Mol Microbiol.* 2004;54(5):1250-68.
160. Dalton TL, Hobb RI, Scott JR. Analysis of the role of CovR and CovS in the dissemination of *Streptococcus pyogenes* in invasive skin disease. *Microb Pathog.* 2006;40(5):221-7.
161. Chong P, Drake L, Biswas I. Modulation of covR expression in *Streptococcus mutans* UA159. *J Bacteriol.* 2008;190(13):4478-88.
162. Conrads G, de Soet JJ, Song L, Henne K, Sztajer H, Wagner-Dobler I, et al. Comparing the cariogenic species *Streptococcus sobrinus* and *S. mutans* on whole genome level. *J Oral Microbiol.* 2014;6:26189.
163. Senadheera MD, Guggenheim B, Spatafora GA, Huang YC, Choi J, Hung DC, et al. A VicRK signal transduction system in *Streptococcus mutans* affects gtfBCD, gbpB, and ftf expression, biofilm formation, and genetic competence development. *J Bacteriol.* 2005;187(12):4064-76.
164. Senadheera MD, Lee AW, Hung DC, Spatafora GA, Goodman SD, Cvitkovitch DG. The *Streptococcus mutans* vicX gene product modulates gtfB/C expression, biofilm formation, genetic competence, and oxidative stress tolerance. *J Bacteriol.* 2007;189(4):1451-8.
165. Biswas I, Drake L, Biswas S. Regulation of gbpC expression in *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol.* 2007;189(18):6521-31.
166. Zhang K, Ou M, Wang W, Ling J. Effects of quorum sensing on cell viability in *Streptococcus mutans* biofilm formation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;379(4):933-8.
167. Kievit TR, Iglewski BH. Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships. *Infect Immun.* 2000;68(9):4839-49.
168. Li YH, Tang N, Aspiras MB, Lau PC, Lee JH, Ellen RP, et al. A quorum-sensing signaling system essential for genetic competence in *Streptococcus mutans* is involved in biofilm formation. *J Bacteriol.* 2002;184(10):2699-708.
169. Ahn SJ, Wen ZT, Burne RA. Multilevel control of competence development and stress tolerance in *Streptococcus mutans* UA159. *Infect Immun.* 2006;74(3):1631-42.
170. Thenisch NL, Bachmann LM, Imfeld T, Leisebach Minder T, Steurer J. Are *mutans streptococci* detected in preschool children a reliable predictive factor for dental caries risk? A systematic review. *Caries Res.* 2006;40(5):366-74.
171. Cho I, Blaser MJ. The human microbiome: at the interface of health and disease. *Nat Rev Genet.* 2012;13(4):260-70.
172. Eberl G. A new vision of immunity: homeostasis of the superorganism. *Mucosal Immunol.* 2010;3(5):450-60.

173. Belda-Ferre P, Williamson J, Simon-Soro A, Artacho A, Jensen ON, Mira A. The human oral metaproteome reveals potential biomarkers for caries disease. *Proteomics*. 2015;15(20):3497-507.
174. Venter JC, Adams MD, Sutton GG, Kerlavage AR, Smith HO, Hunkapiller M. Shotgun sequencing of the human genome. *Science*. 1998;280(5369):1540-2.
175. Mullany P, Hunter S, Allan E. Metagenomics of dental biofilms. *Adv Appl Microbiol* 2008;64:125-36.
176. Belda-Ferre P, Alcaraz LD, Cabrera-Rubio R, Romero H, Simon-Soro A, Pignatelli M, et al. The oral metagenome in health and disease. *Isme j*. 2012;6(1):46-56.
177. Benitez-Paez A, Belda-Ferre P, Simon-Soro A, Mira A. Microbiota diversity and gene expression dynamics in human oral biofilms. *BMC Genomics*. 2014;15:311.
178. Simon-Soro A, Guillen-Navarro M, Mira A. Metatranscriptomics reveals overall active bacterial composition in caries lesions. *J Oral Microbiol*. 2014;6:25443.
179. Leone CW, Oppenheim FG. Physical and chemical aspects of saliva as indicators of risk for dental caries in humans. *J Dent Educ*. 2001;65(10):1054-62.
180. Nascimento MM, Alvarez AJ, Huang X, Browngardt C, Jenkins R, Sinhoreti MC, et al. Metabolic Profile of Supragingival Plaque Exposed to Arginine and Fluoride. *J Dent Res*. 2019;98(11):1245-52.
181. Singh OV. Proteomics and metabolomics: the molecular make-up of toxic aromatic pollutant bioremediation. *Proteomics*. 2006;6(20):5481-92.
182. Belda-Ferre P, Cabrera-Rubio R, Moya A, Mira A. Mining virulence genes using metagenomics. *PLoS One*. 2011;6(10):e24975.
183. Kassebaum NJ, Bernabé E, Dahiya M, Bhandari B, Murray CJ, Marcenes W. Global burden of untreated caries: a systematic review and metaregression. *J Dent Res*. 2015;94(5):650-8.
184. Alcaraz LD, Belda-Ferre P, Cabrera-Rubio R, Romero H, Simon-Soro A, Pignatelli M, et al. Identifying a healthy oral microbiome through metagenomics. *Clin Microbiol Infect*. 2012;18 Suppl 4:54-7.
185. Krol J. Posttranscriptional Control of Gene Expression and Role of Small RNAs in *Streptococcus mutans*. *Advances in Microbiology*; 2018, 138-160.
186. Shields RC, Walker AR, Underhill SAM, Burne RA. Repurposing the *Streptococcus mutans* CRISPR-Cas9 System to Understand Essential Gene Function. *bioRxiv*; 2019.

CAPÍTULO 2 – TARGET ANALYSIS OF *STREPTOCOCCUS MUTANS* ON THE METATRANSCRIPTOME OF BIOFILMS FROM ROOT SURFACES

Abstract

Objective: This study evaluated the gene expression of *S. mutans* on biofilms associated with sound and caries root surfaces in clinical samples. **Methods:** This is a descriptive analysis of gene data associated with *S. mutans* species originated from Dame-Teixeira et al. (2016), in which a metatranscriptomic analysis was performed to compare root caries (RC) and sound root surfaces (SRS) biofilms. The relative mean expression (RME) level for *S. mutans* was calculated for each group. The median of the relative expression values, obtained from the library size estimation carried out within the R package DESeq, was then calculated for each gene. The proportion of each gene within the total *S. mutans* transcriptome in each sample was calculated. Analysis of the expression of the putative virulence genes was plotted and qualitatively compared. The total number of mapped reads was compared between conditions using the Mann-Whitney U test ($p=0.005$). **Results:** *S. mutans* was essentially inactive in most SRS biofilms samples (only four out of 10 presented putative presence of *S. mutans*) while its activity was high in all RC samples (Mann-Whitney U-test; $p=0.005$). Putative virulence genes related to adhesion (*spaP*; $0.74\% \pm 0.34\%$), acidogenicity (*glgA*; $0.54\% \pm 0.42\%$), (*fruA*; $0.24\% \pm 0.13\%$), quorum sensing (*ciaH*; $0.06\% \pm 0.02\%$), (*comF*; $0.03\% \pm 0.03\%$), (*comD*; $0.05\% \pm 0.01\%$), other putative virulence genes (*gapC*; $0.75\% \pm 0.47\%$), sugar transporters (SMU_872; $0.17\% \pm 0.04\%$), synthesis and degradation of starch (*pulA*; $0.19\% \pm 0.03\%$), stress conditions (*hrcA* regulon; $0.18\% \pm 0.13\%$) were highly expressed within *S. mutans* genome in RC, confirming its virulence not only in coronal caries, but also in RC. Regulatory mechanism of carbohydrates utilization (*ccpA* regulon; $0.07\% \pm 0.03\%$), agmatine deiminase system (*arcC* regulon; $0.01\% \pm 0.01\%$) and arginine deiminase system (*argR* regulon; $0.02\% \pm 0.01\%$) were also highly expressed in RC. The biological processes for survival were similar in both groups. **Conclusions:** *S. mutans* gene expression level was high in RC group and essentially absent in the SRS group suggesting that even if *S. mutans* cells are present in those biofilms in health, those seems to be metabolically inactive. However, when a minimal gene expression is found, biological processes for survival are similar between sound and caries root surfaces.

KEYWORDS: *Streptococcus mutans*; Gene Expression; Root Caries; RNA-Seq; Differential Expression; Transcriptome.

2.1 INTRODUCTION

The oral cavity is colonized by a wide variety of microbial species. The composition of oral microbiota is unique for each site, despite the constant transfer of microorganisms between those sites [1]. The local environment plays a key role in determining the species that may colonize and become members of the oral microbiota at each site [2]. The majority of the microbiota that inhabit the oral cavity are commensal and essential to keep the oral ecosystem in balance by establishing a symbiotic relationship between the host and the oral microbiome [3]. This equilibrium in the relationship can breakdown and lead to the development of disease due to dysbiosis, which is a consequence of biofilm composition modification due to environmental changes [2].

Over the years, a number of species with relevant characteristics for the caries process, such as *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus*, *Actinomyces* [4, 5], *Bifidobacterium* and *Scardovia wiggsiae* [6] have been studied. Although bacterial characteristics associated with cariogenicity are not exclusive to *S. mutans*, there is a large volume of published studies describing a higher number of this species in root caries compared to sound root surface [7-11]. Besides the presence of stagnation area, nutrient supply, oxygen concentration, acid stress, presence of competing bacteria and inhibiting substances that are environmental factors affecting biofilm bacteria in coronal caries lesions [12], in root surface lesions an additional factor may influence the biofilm: the vicinity to the gingival fluid that may contain damaging substances to microbial cells as human defenses cells. This extra nutrient could lead to a different microbial metabolism in root caries.

A previous study [13] demonstrated the complex genetic machinery of *S. mutans* allowing a better understanding of the functions related to caries initiation and caries progression, especially those related to adhesion (Gtf; Gbp), nutrient transport (PTS system, ABC transporters) and stress (*clp*). These results are from studies that use isolated and cultured strains in artificial microenvironments. Thus, simplistic studies models using a single or a few pathogens or studies using isolated and cultured strains do not reflect the complexity of the real microbial environment in the mouth. It is already known that single microbial species removed from its natural environment might not necessarily display the same characteristics under laboratory conditions as it does within its ecological niche. However, little is known about the

physiology and metabolism of this microorganism in its natural habitat on root surfaces.

The new era of molecular biology has facilitated analyzes of the microbiome. Recently, next generation sequencing methodologies present significant opportunities to understand the metabolic processes of biofilms associated with caries. The metatranscriptome analysis allows the investigation of a massive number of genes, however, specific aspects of how some species collaborate to the root caries progression would be unmanageable by showing the results of the metatranscriptome as a whole. This highly sensitive technique uses next-generation sequencing platforms that can be aligned to bacterial genomes, enabling transcriptomic analysis of individual species without the need for species-specific protocols, as is necessary with the micro-array approach [14]. Hence, the aim of this study was to evaluate the gene expression of *S. mutans* strains on the metatranscriptome of biofilms associated with sound and caries root surfaces.

2.2 MATERIALS AND METHODS

2.2.1 Study Design and Samples Origin

This is a descriptive analysis of secondary data originate from the project “metatranscriptome of root caries” [15, 16], in which a metatranscriptomic analysis was performed to compare root caries (RC; n=9 libraries) and sound root surfaces (SRS; n=10 libraries) biofilms. The present study observed interactions of *S. mutans* within the whole metabolism of biofilms from both groups. All information regarding the sampling is available in the original research.

2.2.2 Selection of Genomes in Databases and Bioinformatics

RNA-Seq sequencing data are available from the National Center for Biotechnology Information (NCBI) Sequence Read Archive, under the accession numbers SRS779973 and SRS796739. FASTQ files were obtained for each sample, and imported into the CLC Genomics Workbench 7.5.1 software (CLC Bio, Qiagen). Genomes of oral bacteria, including *S. mutans* UA159, and their associated information were downloaded from the DNA Data Bank of Japan, NCBI, the Broad

Institute and Human Oral Microbiome Database (HOMD) and mapped against the sort reads sequences.

A count table was generated containing the read count for all oral bacterial genes. The total number of mapped reads (raw reads) was compared between conditions using the Mann-Whitney U test (RStudio for Mac, base package; significance level of 5%).

To consider the putative presence of the organism in the sample, it was calculated the sum of reads divided by the total number of genes of *S. mutans* UA159 genome (1,960 genes) for each sample and considered samples with ≥ 1960 reads, or 1 read per gene, as valid [16].

The raw read counts for all oral bacterial genomes were then normalized using two methods to obtain the relative mean expression (RME). For the first one, the number of sequence reads that have been assigned to each gene as the read count data was normalized by determining the effective library size of each sample, using the *estimateSizeFactor* and *counts accessor* functions within the R package DESeq (referred in the text as “RME”) [17]. This normalized RME was then extracted and plotted using the R package Plotly and qualitatively compared regarding the gene ontology (GO) terms analysis.

For the second normalization, a proportion of each gene within the total transcriptome of *S. mutans*, represented in percentages, in each library with putative presence of *S. mutans* was calculated by dividing the number of reads of the gene by the total number of reads of *S. mutans* for each sample (referred in the text as “proportion”). Putative virulence genes and transcriptional regulators genes were qualitatively analyzed using those proportions.

Statistical analysis for inferring differential gene expression between sample groups with putative presence of *S. mutans* (n=4 SRS; n=9 RC) was also carried out using the R package DESeq2 [17]. The cut-off for designating a gene as being differentially expressed was a change in transcript levels of at least 2-log fold change (negative values=up-regulated in RC and down-regulated in SRS, positive values=down-regulated in RC and up-regulated in SRS) and Benjamini-Hochberg (BH) adjusted P-value (padj) of less than 10^{-3} .

An evaluation of putative virulence-related genes based on the classification of Argimon & Caufield, (2011) [18] was performed. In addition, transcriptional regulators genes and bacterial transduction two component systems (TCS) were

also presented here (available in https://regprecise.lbl.gov/RegPrecise/genome.jsp?genome_id=37).

2.3 RESULTS

Gene expression of *S. mutans* UA159 on the metatranscriptome of biofilms associated with root surfaces were evaluated in this study, comprising a total expression of the 1,960 genes present in this genome analyzed. The total number of reads per sample with putative presence of *S. mutans* activity ranged from SRS=2,295-267,907 (median 12,629 reads) and RC=82,763-3,985,169 (median 1,308,793 reads) (Mann-Whitney test; $p=0.005$), indicating that *S. mutans* are metabolically active in RC, but little in SRS biofilms. The differential expression analysis confirmed the discrepancy: from 1,960 analyzed genes, only 194 were not overexpressed in RC when compared to SRS. The complete list of the genes not overexpressed in RC can be found in supplementary Table 1.

Plotting representation of non-normalized read counts (A) and normalized read counts (B) is shown in Figure 1A/B. Two RC libraries were originated from a center in England (RC_D and RC_E), while all others were originated from a center in Brazil. However, in terms of microbial function, there seems to be no difference between geographic regions, since RC_D (UK) and RC_F (Brazil) libraries were similar in terms of *S. mutans* expression.

2.3.1 Gene Expression of Putative Virulence Genes

It was observed some relevant findings based on the classification of Argimon & Caufield, (2011) [18] regarding putative virulence-related genes. Figure 2 and Figure 3A illustrate heatmaps with an overview of putative virulence factors for *S. mutans*. In this work, the shading matrices demonstrated by heatmaps used the Viridis color scale sequence to represent from low to high values of gene expression, when hues progress in a single direction from purple to yellow. Other functional categories are shown in Supplementary Figures 1 A/B, 2, 3, 4 and 5.

The heatmap representing the genes related to adhesion and to biofilm formation (Figure 2A) shows that the *spaP* (Antigen I/II) gene (mean and standard deviation of the proportion in RC=0.74%±0.34%) was highly expressed in the RC

samples. RC_F was the sample with the highest expression in those functions (0.97% of total *S. mutans* expression) (Figure 2A). Figure 4A represents a schematic diagram of components from host ligand proteins exhibiting possible adhesion sites for *S. mutans spaP* surface protein as well as interspecies adhesion in RC, showing a possible link of *spaP* expression with adherence of *S. mutans* to saliva glycoproteins, extracellular matrix proteins and host matrix proteins, as well as to other bacterial species, such as *Fusobacterium nucleatum*, contributing to biofilm formation in root surfaces.

The heatmap related to acidogenicity (Figure 2B) shows that the *glgA* (glycogen synthase) (mean and standard deviation of the proportion in RC=0.54%±0.42%) and *fruA* (fructanase enzyme) (0.24%±0.13%) were the highest expressed genes in the RC samples. RC_F and RC_D were the samples with the highest *glgA* expression (0.40% and 0.63%, respectively), while RC_7 exhibited the highest expression of *fruA* (0.25%) (Figure 2B). The glycogen and fructose metabolism pathways can be consulted in Supplementary Figure 1 A/B.

The heatmap related to quorum-sensing genes (Figure 2C) shows that the *ciaH* (putative histidine kinase sensor) (0.06%±0.02%), *comF* (putative competence protein) (0.03%±0.03%) and *comD* (competence putative histidine kinase) (0.05%±0.01%) were the most expressed genes in the RC samples, respectively. The *comC* competence gene was the least expressed gene, but still overexpressed in RC when compared to SRS (7.3 log₂ fold change). Heatmap from Figure 2C reported that nearly all selected quorum-sensing genes were highlighted in RC_7 (0.09%, 0.08% and 0.07% expressions of *ciaH*, *comF* and *comD* genes, respectively). Supplementary Figure 2 describes a schematic diagram of the quorum sensing system and its regulated genes in *S. mutans*.

Among all other putative virulence genes, the heatmap (Figure 2D) shows that the *gapC* (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase protein) (0.75%±0.47%) was the highest expressed gene in RC_F (0.80%) and RC_D (1.32%) samples, while *pulA* (putative pullulanase protein) (0.19%±0.03%) was expressed in RC_7 (0.18%) and RC_F (0.24%) (Figure 2D). The protein function of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) involved in glycolysis can be consulted in Supplementary Figure 3. The schematic diagram of putative pullulanase protein involved in starch hydrolyzing activity is shown in Figure 4 B. Identification of *pulA* overexpression in RC group indicates that starch is hydrolyzed by enzymatic activity of *pulA* to

maltodextrins and other oligosaccharides which are further degraded by entering into glycolysis process with consequent root surface demineralization.

The heatmap related to sugar transporters (Figure 3A) shows that the PTS system fructose-specific transporter subunit IIABC (SMU_872) was the highest expressed active sugar transporter system gene among all RC samples ($0.17\% \pm 0.04\%$) with higher expression in RC_7 (0.13%) and RC_F (0.18%) samples (Figure 3A). Fructose transport in *S. mutans*, including the inducible fructose permease protein SMU_872, is displayed in Figure 3 B, showing that SMU_872 promotes catalysis of the phosphoenolpyruvate-dependent fructose transport. After internalizing fructose, the conversion of this carbohydrate into organic acids will contribute to the development of root caries.

2.3.2 Transcriptional Regulators Genes

Among all RC samples, some expressed transcriptional regulators genes *hrcA* (Heat-inducible transcription repressor) ($0.18\% \pm 0.13\%$), *ccpA* (Catabolite control protein A) ($0.07\% \pm 0.03\%$), *arcC* (Carbamate kinase) ($0.01\% \pm 0.01\%$), *argR* (Arginine repressor) ($0.02\% \pm 0.01\%$) and bacterial transduction two component systems (TCS) ComD ($0.05\% \pm 0.01\%$), ComE ($0.02\% \pm 0.01\%$), LevS ($0.06\% \pm 0.05\%$), and LevR ($0.02\% \pm 0.01\%$) reported high expression (Table 1).

Regarding heat-shock response, Supplementary Figure 4 shows a schematic representation of *hrcA* gene mechanisms of transcriptional regulation in *S. mutans*, during normal and heat-shock temperatures. Supplementary Figure 5 shows the working model for gene regulation transcriptional by *ccpA* in *S. mutans* (carbohydrate availability response). Regarding to acid tolerance, Figure 4C/D shows, respectively, the agmatine deiminase (AgDI) pathway, including the involvement of *arcC*, and the mechanisms of ArgR in arginine-mediated transcriptional regulation in *S. mutans*. Figure 4C shows the metabolism of agmatine enabling *S. mutans* to survive under harsh acidic environments. The carbamate kinase enzymes, ArcC and AguC, catalyse the transfer of the high-energy phosphate in carbamoyl phosphate to ADP, yielding ammonia, ATP, CO₂ and H₂O. Figure 4D shows that, during the addition of arginine, ArgR indicates higher affinity for arg operons, which may enhances repression of the arginine biosynthesis pathway. Accordingly, in the absence of arginine, the transcription and expression of arginine

deiminase catabolic enzyme ArcA, is now repressed, preventing arginine degradation through ADI and AgDI pathways. The other genes from operon arcABC were also expressed in RC, but in lower proportion (*arcA* was not found in this genome characterization).

2.3.3 GO Terms Analyses

The top 20 most expressed genes from RC (A) and SRS (B) groups were annotated as GO terms and shown in Figure 5 A/B. Largest circles represent the merging of six GO terms within the biological process or molecular function category. The findings showed that molecular functions and biological processes of the most abundant genes seem similar between the SRS (when *S. mutans* is active) and RC groups, including carbohydrate utilization, biofilm formation and intraspecies interaction between organisms. Supplementary Table 2 shows the 12 genes within those top 20 that were similar between groups.

2.4 DISCUSSION

Considering the physiology and metabolism of *S. mutans* in its natural habitat, the aim of this study was to evaluate its gene expression on the metatranscriptome of biofilms associated with sound and carious root surfaces. The present analysis focused on describing *S. mutans* functional output when it is influenced by microbial interactions. Findings suggest a metabolic inactivation of this bacterium in the vast majority of SRS biofilms while its activity was practically unanimous in all RC samples. Almost all genes were overexpressed in RC when compared to SRS in the putative presence of *S. mutans*. This means that *S. mutans* easily exploit root caries niche but not the sound one, and that they are able to colonize and proliferate on root surfaces in a cariogenic environment.

Putative cariogenic functions, widely known for coronal caries, presented higher expression for RC samples. Although *S. mutans* cells can be found in SRS surfaces [10], it seems by evaluating the present findings that no virulence gene had a significant expression (Figure 5 A/B). It suggests that *S. mutans* presence would be only for survival and in a transient manner in SRS. Differently, the original research could observe that *Actinomyces* spp. had high gene expression in both SRS and RC

[15]. Within SRS group, the library with the highest relative median gene expression (SRS_20) was from a smoking patient, suggesting that microbiota of smoking patients may favor the survival of *S. mutans* (Figure 1 A/B). Overall, biofilms from SRS were collected from larger surface areas compared to the lesions, which could affect the analyses; however, normalizations steps were applied, and results showed consistently high levels of gene expression in all *S. mutans* strains in all RC samples group, even in the pooling samples (Figure 1 A/B).

The present study found a very high expression level of *spaP* genes, which suggests a different type of adhesion of *S. mutans* in RC when compared to coronal caries lesion (Figure 2A). This means that *S. mutans* use a different adhesion function than in coronal caries, where the functions of glycosyltransferases and glucan-binding proteins domain is expected [19]. The *gtfA*, for example, was one of the genes not differentially expressed in RC. *SpaP* protein, also designated as antigen I/II, Pac and P1 [20-22], has been correlated with sucrose-independent initial adhesion of *S. mutans* to host ligand proteins, including saliva glycoproteins [13, 21, 23, 24], extracellular matrix (ECM) proteins [25], host matrix proteins including type I collagen [26], fibronectin, laminin, or keratin as well as serum components such as fibrinogen [25, 27-32]. Recently, it was demonstrated that SpaP performs a novel function, such as adhesin in interspecies adherence [33]. As adhesin-mediated bacterial interspecies interactions are important elements in oral biofilm formation, in this study we could determine a disease association of a biofilm community between *S. mutans* and *Fusobacterium nucleatum* (Figure 4A). This attachment appears to involve species-dependent adhesin interactions.

Early studies suggest an important role for *spaP* in the establishment and progression of dental caries suggesting a decrease of *S. mutans* cariogenicity, in a gnotobiotic rat model, when there was a lack of *spaP* [20]. We observed that *spaP* overexpression in RC surfaces is affected by *S. mutans* binding activity on this vulnerable higher organic content structure, saliva proteins and gingival crevicular fluid under low pH conditions during caries progression. Authors who first looked at the collagen-binding aspect of SpaP have shown that Ag I/II polypeptides are necessary for invasion of root dentine by *S. mutans* and also contribute to the development of root caries and endodontic infections because this bacteria penetrate deep into dentinal tubules which contain collagen type I fibrils [34]. This finding related to adhesion and biofilm formation support the fact that dentine invasion

involved a programmed growth response of *S. mutans* to collagen and indicates that targeting the activities of these polypeptides may be relevant for controlling root caries.

The results obtained from the acidogenicity show highly *glgA* expression enzymes required for the biosynthesis of bacterial intracellular polysaccharide (IPS) in RC (Figure 2B). It has been reported, previously, that inactivation of the *glgA* gene severely impaired the persistence of bacteria grown in batch culture with excess glucose, preventing formation of IPS by *S. mutans* as they inferred that *glgA* is the structural gene for *S. mutans* IPS synthase [35]. This study corroborates with this finding by showing that *glgA* gene expression results in a higher IPS biosynthesis prolonging the production of organic acids (Supplementary Figure 1A).

In this study, *fruA* (fructanase), which is an important exoenzyme related to acidogenicity that contributes significantly to the virulence of *S. mutans*, exhibited a high expression in one of the RC samples (Figure 2B). It has been reported that *S. mutans* utilize the fructan through the action of the fructanase enzyme encoded by *fruA* [36, 37] contributing to the extent and duration of the acid challenge to the tooth surface (Supplementary Figure 1B). However, the inactivation of the *fruA* gene in the parental strain did not affect the survival of strain UA159 having no significant effects on glucosyltransferase or fructosyltransferase activity [37], besides that, the accumulation of IPS was not impaired [35]. The present results suggest that, even with no unanimous expression of *fruA* in the RC samples, the production of IPS remains metabolic active among most RC samples, as it is possible that some other enzyme can also degrade fructan.

S. mutans can adapt to the stressful conditions to which the cariogenic biofilm is exposed by becoming genetically competent, a physiologic state using secreted peptides triggered by cell-cell communication (Supplementary Figure 2), known as quorum sensing [38]. The quorum-sensing signal is a competence stimulating peptide (CSP), which is encoded by a CSP precursor (*comC*). The heatmap results showed that *comC* was the least expressed competence gene (Figure 2C) corroborating with previous studies, which suggested that *comC* is not absolutely required for genetic transformation of UA159 [39]. A putative late competence protein *comF* (SMU.498), which is involved in *S. mutans* DNA uptake [40], was highly expressed at RC_7 sample (Figure 2C). At the molecular level, *comF* functions represent activities related to ATP binding, DNA binding and hydrolase activity. A

recent study that used RNA-Seq found transcripts of the *comF* gene of *S. mutans*, in the periodontal community [41]. These findings probably happened as a result of inappropriate biofilm control on root exposed surfaces and periodontal pockets, which led the microbiota to adapt to the new conditions by changing the response of *S. mutans* competence proteins to cariogenic challenges.

This study has shown that the *S. mutans* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*gapC*) was the highest expressed gene in RC_F and RC_D samples among all other selected putative virulence genes (Figure 2D). GAPDH, which is an important enzyme involved in the glycolytic pathway (Supplementary Figure 3), has been also characterized as an anchorless adhesin that binds to host proteins of the human extracellular matrix (ECM) enhancing the virulence and modulating the host immune system [42].

Until today, PEP:PTS 14 enzyme II complexes have been identified in isolates of *S. mutans* by being able to internalize a variety of carbohydrates [43-45]. In this transcriptional study, the SMU_872 (EIIABC), characterized as a constitutive fructose PTS [46], was found to be highly expressed in two RC samples (Figure 3A) suggesting that fructose metabolism is critical to the growth of *S. mutans* in root surfaces biofilms. Although sugar transport by *S. mutans* have been extensively studied, this is the first study in which transcriptional analysis of all sugar transporters of this organism was performed revealing that SMU_872 (EIIABC) was the most active PEP:PTS system on carious root surfaces (Figure 3B).

The present study also gives some contribution for the understanding between starch and RC. Among other selected putative virulence genes, expression of pullulanase gene (*puIA*), which is responsible for the synthesis and degradation of starch, was found among RC biofilms samples (Figure 2D). Previous publications have suggested that starch increases the cariogenic potential of sucrose leading to a root dentine demineralization [47-51] expressing significantly higher levels of *gtfB* mRNA and less *gtfD* mRNA than those formed in sucrose [49]. After starch hydrolysis, maltose, maltodextrins and other oligosaccharides can be catabolized in acids by *S. mutans* contributing to the development and virulence of *S. mutans* biofilms (Figure 4B) [50, 52]. Recent findings also have shown a greater demineralization on root dentine provoked by a biofilm with a starch and sucrose combination, supporting the hypothesis that this combination is more cariogenic than sucrose alone [53]. Epidemiological data has indicated that sugar-consuming people

suffer from enamel and root caries, whereas people that consume starches, but little sugar, only suffer from root caries [54-58]. Contrasting with these findings, results from a recent study demonstrated that starch alone did not provoke a fall in pH in the culture medium [53]. The role of this species development suggests that RC develops under less stringent conditions of plaque acidity than does enamel caries, as it was previously revealed by Hoppenbrouwers et al. [59]. Important to point out, based on the present findings, that food starches maybe possess significant cariogenic potential to root surfaces. As elderly food choice may be influenced by factors such as the ease of preparation and the ease with which a food may be chewed, elderly individuals may alter their diet pattern from complex to simple carbohydrates, by eating soft, minced or even liquid foods, increasing the root caries risk [60].

To profile the dynamic transcriptomic responses of *S. mutans* on root surfaces, we analyzed the carious root surface biofilm target genes to figure out how the metabolic pathway genes are regulated by the corresponding transcription factors. From this, the regulon information of some differentially expressed transcriptional regulators was obtained as well as some signal transduction systems that coordinate the expression of various virulence factors of *S. mutans*. In our study, it was observed an increased expression of the *hrcA* regulon genes in RC samples (Table 1). The repressor protein, *hrcA*, has been previously determined to have critical functions in regulating *S. mutans* expression in response to heat shock under acid environments (Supplementary Figure 4) [61]. Other interesting finding related to the expressed regulatory genes, is that the results of the present study revealed a high level expression of the catabolite control protein A, *ccpA*, in RC samples (Table 1). This finding supports the hypothesis that, besides the major operative carbon catabolite repression (CCR) mechanisms, known as the PEP:PTS, the *ccpA* also regulates transcription in *S. mutans* in response to carbohydrate availability (Supplementary Figure 5) [62].

In this study we also aimed to further investigate the acid tolerance of *S. mutans*, as is one of the major virulence traits of this microorganism. It has been demonstrated previously that the presence of a membrane-bound, acid-stable, proton-translocating F₀F₁ ATPase can maintain the intracellular pH at 7.5 enabling *S. mutans* to maintain its niche [43]. In addition to this mechanism, the *arcC* gene, which encodes a carbamate kinase enzyme of the agmatine deiminase system

(AgDS), was found to be expressed in our study among RC samples (Table 1), suggesting that the catabolism of agmatine is providing competitive fitness for *S. mutans* via the production of ammonia and ATP to increase the cytoplasmic pH, contributing to the acid tolerance and consequently affecting the ecology of root surfaces biofilms (Figure 4C). An additional mechanism that can be employed by *S. mutans* to maintain an alkaline cytoplasm is the encoding of at least two carbonic anhydrases, which can use the CO₂ generated by the AgDS to form bicarbonate, another alkaline molecule [43].

Although the enzyme arginine deiminase was not found in the genome of *S. mutans* UA159 [43], interestingly, our results showed that *argR* gene, which is an arginine repressor, were also found to be expressed in the RC group (Table 1). Previous prokaryotic studies reported that *argR* is involved in arginine transport and, in the presence of arginine, *argR* proteins regulate their target genes leading to repression of arginine biosynthetic genes and activation of arginine catabolic genes (Figure 4D) [63]. As an essential function for acid resistance, *argR* also has been shown to act as a positive regulator of *arcABC* operon expression in many bacteria species [63]. This study corroborates with these findings by supporting the hypothesis that *argR* proteins contribute to the survival of the bacterium at lethal pH values.

Regarding to *S. mutans* TCS, the ComDE, LevRS and VicRK bacterial transduction systems seem to have an important expression level in the RC group (Table 1). Bacterial adaptation to changing environmental conditions is often accomplished by TCS, which modulate gene expression in response to diverse changes/stresses in the environment [64]. Previous studies have indicated that the LevRS system manages carbohydrate metabolism, such as fructose and mannose [65], while the ComDE system is involved in regulating bacteriocin production and competence. The VicRK system have been shown to regulate responses to acid, oxidative stress, competence [66] and to induce the expression of genes associated with biofilm formation [67, 68]. In *S. mutans*, most of the TCS remain virtually undefined. Therefore, further studies are needed to increase our understanding of how *S. mutans* detects and responds to environmental changes on root surfaces.

It is important to mention some important limitations in this study. The low number of random reads within some SRS could indicate the potential for false positives (i.e. type I error). As we do not have validation experiments to prove that *S.*

mutans was present in SRS samples, to overcome this limitation, we considered an arbitrary cutoff to consider the putative presence of *S. mutans* in each sample and a very low cutoff of p value for considering a significant differential expression. Also, data from NGS technologies may typically generate short sequences that could have error rates when mapped against known genomes.

In conclusion, a significantly higher expression of almost all transcriptome of *S. mutans* in RC when compared to SRS was observed. Although *S. mutans* could be found in sound surfaces, we suggest that *S. mutans* presence would be only for survival and in a transient manner in these healthy sites. Furthermore, genes involved in sucrose-independent initial adhesion of *S. mutans* and the metabolism of carbohydrates, such as fructose and starch, can be involved in root caries development.

2.5 REFERENCES

1. Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol.* 2005;43(11):5721-32.
2. Marsh PD. In Sickness and in Health-What Does the Oral Microbiome Mean to Us? An Ecological Perspective. *Adv Dent Res.* 2018;29(1):60-5.
3. Belda-Ferre P, Alcaraz LD, Cabrera-Rubio R, Romero H, Simon-Soro A, Pignatelli M, et al. The oral metagenome in health and disease. *Isme j.* 2012;6(1):46-56.
4. Emilson CG, Ravald N, Birkhed D. Effects of a 12-month prophylactic programme on selected oral bacterial populations on root surfaces with active and inactive carious lesions. *Caries Res.* 1993;27(3):195-200.
5. Nyvad B, Kilian M. Microflora associated with experimental root surface caries in humans. *Infect Immun.* 1990;58(6):1628-33.
6. Mantzourani M, Fenlon M, Beighton D. Association between Bifidobacteriaceae and the clinical severity of root caries lesions. *Oral Microbiol Immunol.* 2009;24(1):32-7.
7. Keltjens H, et al. Epidemiology of root surface caries in patients treated for periodontal diseases. *Community Dent Oral Epidemiol,* 1988. 16(3): p. 171-4.
8. Preza D, et al. Bacterial profiles of root caries in elderly patients. *J Clin Microbiol,* 2008. 46(6): p. 2015-21.
9. Van Houte J, et al. Association of the microbial flora of dental plaque and saliva with human root-surface caries. *J Dent Res,* 1990. 69(8): p. 1463-8.

10. Bowden GH, et al. Association of selected bacteria with the lesions of root surface caries. *Oral Microbiol Immunol*, 1990. 5(6): p. 346-51.
11. Beighton D, Lynch E, Heath MR. A microbiological study of primary root-caries lesions with different treatment needs. *J Dent Res*, 1993. 72(3): p. 623-9.
12. Bowden GH, Hamilton IR. Survival of oral bacteria. *Crit Rev Oral Biol Med*, 1998. 9(1): p. 54-85.
13. Banas JA. Virulence properties of *S. mutans*. *Front Biosci*. 2004;9:1267-77.
14. Do T, Sheehy EC, Mulli T, Hughes F, Beighton D. Transcriptomic analysis of three *Veillonella* spp. present in carious dentine and in the saliva of caries-free individuals. *Front Cell Infect Microbiol*. 2015.
15. Dame-Teixeira N, Parolo CCF, Maltz M, Tugnait A, Devine D, Thuy Do. *Actinomyces* spp. gene expression in root caries lesions. *Journal of Oral Microbiology* 2016; 8:32383; 1-13.
16. Ev LD. *Candida albicans* e cárie radicular: análise do transcriptoma. Porto Alegre. Dissertação [Mestrado em Clínica Odontológica] - Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2016.
17. Love M, Anders S, Huber W. Differential analysis of count data – the DESeq2 package. *bioRxiv*; 2014.
18. Argimón S, Caufield PW. Distribution of Putative Virulence Genes in *Streptococcus mutans* Strains Does Not Correlate with Caries Experience. *Journal Of Clinical Microbiology* 2011;49(3):984–992.
19. Banas JA, Vickerman MM. glucan-binding proteins of the oral streptococci. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2003;14(2):89-99.
20. Crowley, P.J., et al., Virulence of a spaP mutant of *Streptococcus mutans* in a gnotobiotic rat model. *Infect Immun*, 1999. 67(3): p. 1201-6.
21. Lee SF, et al. Construction and characterization of isogenic mutants of *Streptococcus mutans* deficient in major surface protein antigen P1 (I/II). *Infect Immun*, 1989. 57(11): p. 3306-13.
22. Forester H, Hunter N, Knox KW. Characteristics of a high molecular weight extracellular protein of *Streptococcus mutans*. *J Gen Microbiol*, 1983. 129(9): p. 2779-88.
23. Okahashi N, et al. Molecular characterization of a surface protein antigen gene from serotype c *Streptococcus mutans*, implicated in dental caries. *Mol Microbiol*, 1989. 3(5): p. 673-8.
24. Demuth DR, et al. Comparison of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguis* receptors for human salivary agglutinin. *Microb Pathog*, 1990. 9(3): p. 199-211.

25. Kelemen L, et al. Streptococcal antigen I/II binds to extracellular proteins through intermolecular beta-sheets. *FEBS Lett*, 2004. 566(1-3): p. 190-4.
26. Heddle C, et al. Host collagen signal induces antigen I/II adhesin and invasion gene expression in oral *Streptococcus gordonii*. *Mol Microbiol*, 2003. 50(2): p. 597-607.
27. Beg AM, et al. Binding of *Streptococcus mutans* to extracellular matrix molecules and fibrinogen. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002. 298(1): p. 75-9.
28. Busscher HJ, et al. *Streptococcus mutans* and *Streptococcus intermedius* adhesion to fibronectin films are oppositely influenced by ionic strength. *Langmuir*, 2008. 24(19): p. 10968-73.
29. Kishimoto E, Hay DI, Gibbons RJ. A human salivary protein which promotes adhesion of *Streptococcus mutans* serotype c strains to hydroxyapatite. *Infect Immun*, 1989. 57(12): p. 3702-7.
30. Petersen FC, et al. Functional variation of the antigen I/II surface protein in *Streptococcus mutans* and *Streptococcus intermedius*. *Infect Immun*, 2002. 70(1): p. 249-56.
31. Sciotti MA, et al. The N-terminal half part of the oral streptococcal antigen I/II contains two distinct binding domains. *FEMS Microbiol Lett*, 1997. 153(2): p. 439-45.
32. Soell M, et al. Molecular force probe measurement of antigen I/II-matrix protein interactions. *Eur J Oral Sci*, 2010. 118(6): p. 590-5.
33. Guo L, et al. *Streptococcus mutans* SpaP binds to RadD of *Fusobacterium nucleatum* ssp. *polymorphum*. *Mol Oral Microbiol*, 2017. 32(5): p. 355-364.
34. Love RM, McMillan MD, Jenkinson HF. Invasion of dentinal tubules by oral streptococci is associated with collagen recognition mediated by the antigen I/II family of polypeptides. *Infect Immun*, 1997. 65(12): p. 5157-64.
35. Busuioc M, et al. Role of intracellular polysaccharide in persistence of *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol*, 2009. 191(23): p. 7315-22.
36. Schachtele CF, Loken AE, Schmitt MK. Use of specifically labeled sucrose for comparison of extracellular glucan and fructan metabolism by oral streptococci. *Infect Immun*, 1972. 5(2): p. 263-6.
37. Wexler DL, et al. Characteristics and cariogenicity of a fructanase-defective *Streptococcus mutans* strain. *Infect Immun*, 1992. 60(9): p. 3673-81.
38. Shields RC, O'Brien G, Maricic N, Kesterson A, Grace M, Hagen SJ, et al. Genome-Wide Screens Reveal New Gene Products That Influence Genetic Competence in *S. mutans*. *J Bacteriol*. 2018;200(2).
39. Ahn SJ, Wen ZT, Burne RA. Multilevel control of competence development and stress tolerance in *S. mutans* UA159. *Infect Immun*. 2006;74(3):1631-42.

40. Guo LH, et al. Identification of genetic differences between two clinical isolates of *Streptococcus mutans* by suppression subtractive hybridization. *Oral Microbiol Immunol*, 2006. 21(6): p. 372-80.
41. Szafransk SP, et al. Quorum sensing of *Streptococcus mutans* is activated by *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and by the periodontal microbiome. *BMC Genomics*, 2017. 18(1): p. 238.
42. Dumke R, Hausner M, Jacobs E. Role of *Mycoplasma pneumoniae* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) in mediating interactions with the human extracellular matrix. *Microbiology*, 2011. 157(Pt 8): p. 2328-38.
43. Ajdic D, et al. Genome sequence of *Streptococcus mutans* UA159, a cariogenic dental pathogen. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. 99(22): p. 14434-9.
44. Zeng L, et al. A galactose-specific sugar: phosphotransferase permease is prevalent in the non-core genome of *Streptococcus mutans*. *Mol Oral Microbiol*, 2013. 28(4): p. 292-301.
45. Zeng L, et al. Coordinated Regulation of the EII(Man) and fruRKI Operons of *Streptococcus mutans* by Global and Fructose-Specific Pathways. *Appl Environ Microbiol*, 2017. 83(21).
46. Gauthier L, Mayrand D, Vadeboncoeur C. Isolation of a novel protein involved in the transport of fructose by an inducible phosphoenolpyruvate fructose phosphotransferase system in *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol*, 1984. 160(2): p. 755-63.
47. Ribeiro CC, et al. Effect of starch on the cariogenic potential of sucrose. *Br J Nutr*, 2005. 94(1): p. 44-50.
48. Aires CP, et al. Effect of starch and sucrose on dental biofilm formation and on root dentine demineralization. *Caries Res*, 2008. 42(5): p. 380-6.
49. Duarte S, et al. Influences of starch and sucrose on *Streptococcus mutans* biofilms. *Oral Microbiol Immunol*, 2008. 23(3): p. 206-12.
50. Klein MI, et al. Structural and molecular basis of the role of starch and sucrose in *Streptococcus mutans* biofilm development. *Appl Environ Microbiol*, 2009. 75(3): p. 837-41.
51. Botelho JN, et al. Enamel and dentine demineralization by a combination of starch and sucrose in a biofilm - caries model. *Braz Oral Res*, 2016. 30(1).
52. Clarkson BH, et al. In vitro caries-like lesion production by *Streptococcus mutans* and *Actinomyces viscosus* using sucrose and starch. *J Dent Res*, 1987. 66(3): p. 795-8.
53. Souza SE, et al. Starch Combined with Sucrose Provokes Greater Root Dentine Demineralization than Sucrose Alone. *Caries Res*, 2018. 52(4): p. 323-330.

54. Schamschula RG, Keyes PH, Hornabrook RW. Root surface caries in Lufa, New Guinea. 1. Clinical observations. *J Am Dent Assoc*, 1972. 85(3): p. 603-8.
55. Schamschula RG, et al. Prevalence and interrelationships of root surface caries on Lufa, Papua New Guinea. *Community Dent Oral Epidemiol*, 1974. 2(6): p. 295-304.
56. Banting DW, Courtright PN. Distribution and natural history of carious lesions on the roots of teeth. *Dent J*, 1975. 41(1): p. 45-9.
57. Burt BA. Relative consumption of sucrose and other sugars: has it been a factor in reduced caries experience? *Caries Res*, 1993. 27 Suppl 1: p. 56-63.
58. Lingstrom P, van Houte J, Kashket S. Food starches and dental caries. *Crit Rev Oral Biol Med*, 2000. 11(3): p. 366-80.
59. Hoppenbrouwers PM, Driessens FC, Borggreven JM. The vulnerability of unexposed human dental roots to demineralization. *J Dent Res*. 1986;65(7):955-8.
60. Gati D, Vieira AR. Elderly at greater risk for root caries: A look at the multifactorial risks with emphasis on genetics susceptibility. *International Journal of Dentistry*, 2011.
61. Jayaraman GC, Penders JE, Burne RA. Transcriptional analysis of the *Streptococcus mutans* *hrcA*, *grpE* and *dnaK* genes and regulation of expression in response to heat shock and environmental acidification. *Mol Microbiol*, 1997. 25(2): p. 329-41.
62. Zeng L, et al. Gene regulation by CcpA and catabolite repression explored by RNA-Seq in *Streptococcus mutans*. *PLoS One*, 2013. 8(3): p. e60465.
63. Cheng C, et al. *Listeria monocytogenes* 10403S Arginine Repressor ArgR Finely Tunes Arginine Metabolism Regulation under Acidic Conditions. *Front Microbiol*, 2017. 8: p. 145.
64. Liu Y, Burne RA. Multiple two-component systems of *Streptococcus mutans* regulate agmatine deiminase gene expression and stress tolerance. *J Bacteriol*. 2009;191(23):7363-6.
65. Conrads G, Soet JJ, Song L, Henne K, Sztajer H, Wagner-Dobler I, et al. Comparing the cariogenic species *Streptococcus sobrinus* and *S. mutans* on whole genome level. *J Oral Microbiol*. 2014;6:26189.
66. Lemos JA, Palmer SR, Zeng L, Wen ZT, Kajfasz JK, Freires IA, et al. The Biology of *Streptococcus mutans*. *Microbiol Spectr*. 2019;7(1).
67. Senadheera MD, Guggenheim B, Spatafora GA, Huang YC, Choi J, Hung DC, et al. A VicRK signal transduction system in *Streptococcus mutans* affects *gtfBCD*, *gpbB*, and *ftf* expression, biofilm formation, and genetic competence development. *J Bacteriol*. 2005;187(12):4064-76.

68. Senadheera MD, Lee AW, Hung DC, Spatafora GA, Goodman SD, Cvitkovitch DG. The *Streptococcus mutans* vicX gene product modulates gtfB/C expression, biofilm formation, genetic competence, and oxidative stress tolerance. *J Bacteriol.* 2007;189(4):1451-8.

Table 1 — Overview of regulons genes and two-component systems, their respective functions (on RegPrecise website, available in https://regprecise.lbl.gov/RegPrecise/genome.jsp?genome_id=37) on *S. mutans* UA159 and its average expression on Sound Root surfaces (SRS) and Root Caries (RC) samples (Averages from the RME normalization).

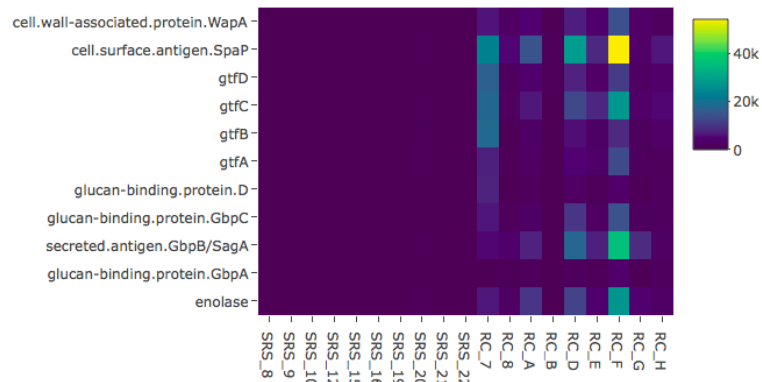
Gene ID/TCS	Gene	Function	Average SRS	Average RC
ArcC	Carbamate kinase	Carbamate kinase activity	0.60	251.22
ArgR	Arginine	Arginine biosynthesis; Arginine degradation	3.30	330.33
BirA	Biotin	Biotin biosynthesis	2.00	618.33
CcpA	Fructose-1,6-bisphosphate; HPr, phosphocarrier protein	Global catabolite repression	46.30	1209.89
CelR	CelB, cellobiose-specific PTS component EIIB; HPr, phosphocarrier protein	Cellobiose utilization	131.50	831.44
ComD	Putative histidine kinase of the competence regulon	kinase Activity	6.40	843.56
ComE	Putative response regulator of the competence regulon	DNA binding	3.10	381.44
CtsR	Heat shock	Heat shock response	1.90	345.33
GalR	Galactose	Galactose utilization	14.40	455.00
GlnR	Phosphorylated NtrB, signal histidine kinase	Nitrogen assimilation	11.40	385.67
HrcA	Heat shock	Heat shock response	39.90	3003.56
LacR	D-galactose-6-phosphate	Lactose utilization; Galactose utilization	1.70	585.67
MalR	Maltose	Maltose utilization; Maltodextrin utilization	4.70	656.67
MleR	L-malate	Malate utilization	2.60	119.22
PurR	5-phosphoribosyl 1- pyrophosphate	Purine metabolismo	5.80	426.00
Rex	NADH	Energy metabolismo	48.80	2925.00
ScrR	Sucrose-6-phosphate	Sucrose utilization	25.40	906.00
SMU_1964c (LevR)	Putative response regulator	DNA binding	2	257
SMU_1965c (LevS)	Putative histidine kinase	phosphorelay sensor kinase activity; protein dimerization activity	2	952
SMU_640c	Putative transcriptional regulator	catalytic activity; DNA- binding transcription; factor activity; pyridoxal phosphate binding	3.50	600.11
TreR	Trehalose-6-phosphate	Trehalose utilization	1.50	211.89

Figure 1.

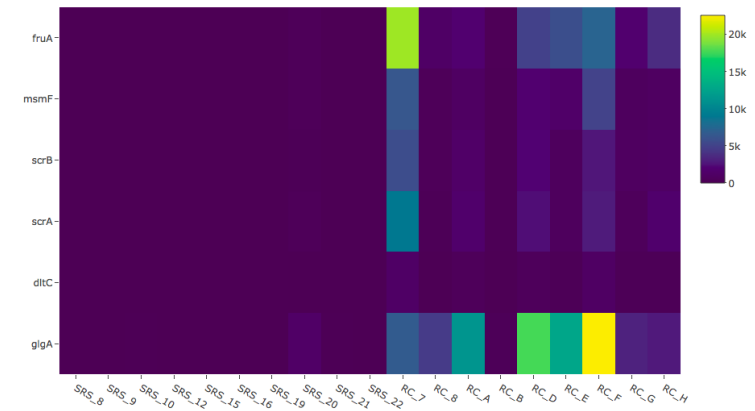


Figure 1 A/B. Bar graphs depicting the relative median expression (RME; log₁₀) of *S. mutans* genes in the Sound Root Surfaces (SRS; n=9) and Root Caries (RC; n=10) samples. RME was calculated from the median values of raw read counts (A) and normalized read counts using DE-Seq algorithm (RME) (B) for comparison. The number of sequence reads that have been assigned to each *S. mutans* gene are plotted on the y-axis. The biofilm and carious dentin samples are shown in groups on the x-axis. (blue = total reads per SRS samples; red = total reads per RC samples). Visual representation of distinctive transcriptome profiles from *S. mutans* between SRS and RC biofilms were projected and clustered separately, indicating that *S. mutans* are metabolically active in caries, but not in SRS biofilms.

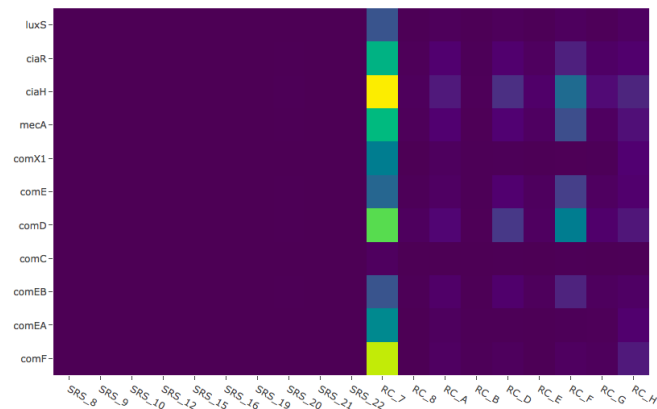
Figure 2.



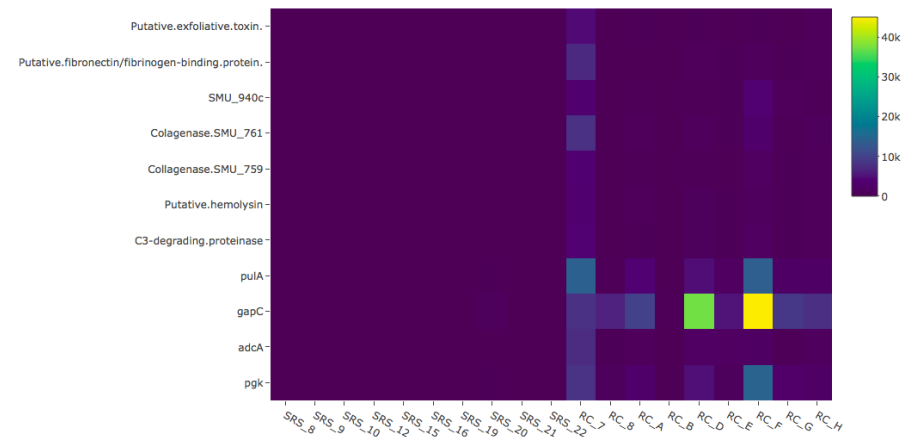
(a)



(b)



(c)



(d)

Figure 2A/B/C/D. Heatmaps constructed using the normalized data by DE-Seq algorithm (RME), based on the gene expression of *S. mutans* genes, illustrating an overview of putative virulence factors for *S. mutans* among Root Caries (RC) samples and Sound Root Surfaces (SRS) samples (based on Argimon et al classification). The mean expression values are displayed by the coloured gradient scale. A = Adhesion-related genes. B = Acidogenicity-related genes. C = Quorum-sensing related genes. D = Other putative virulence genes.

Figure 3.

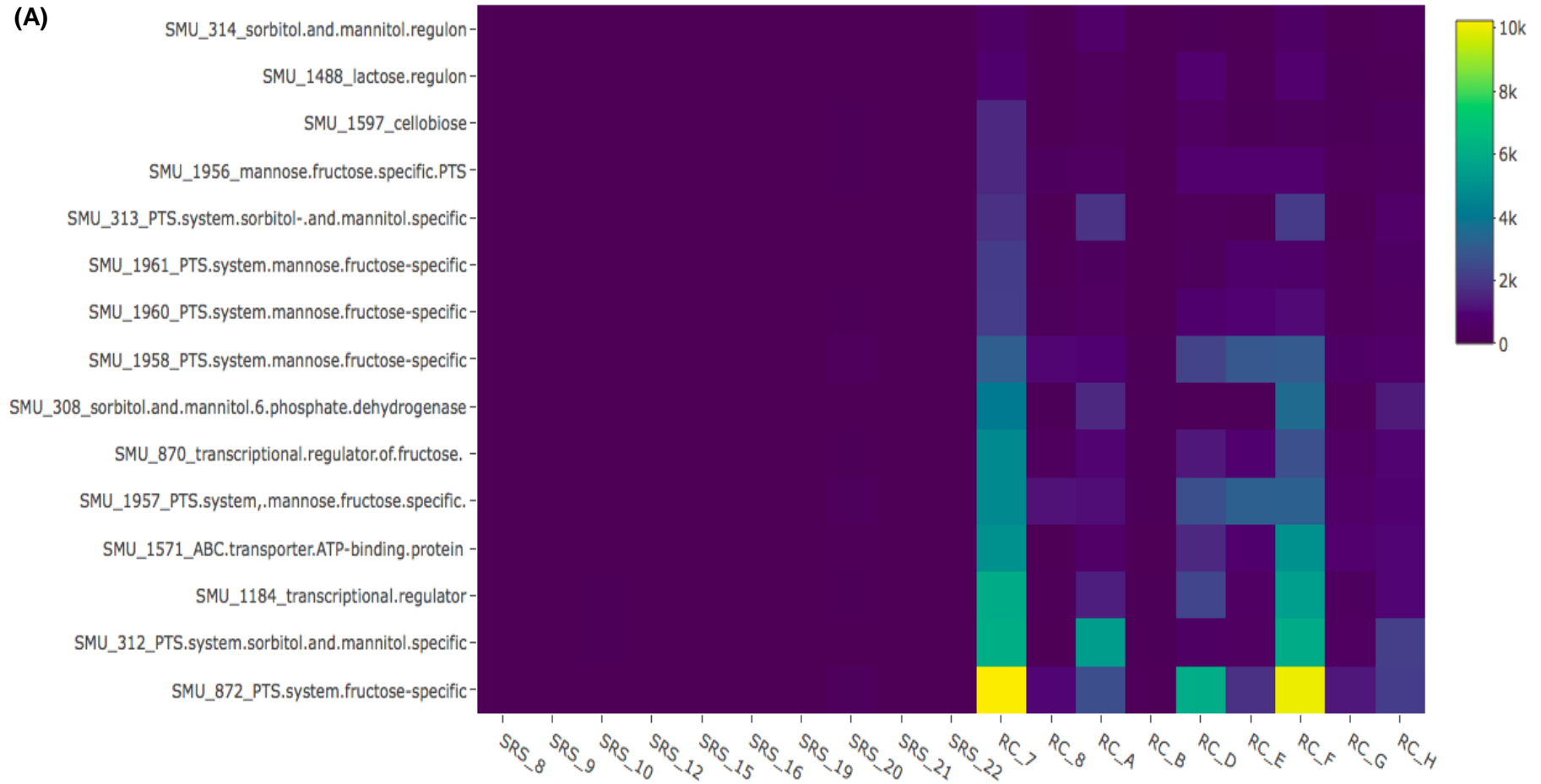


Figure 3A. Heatmap constructed using the normalized data by DEseq algorithm (RME), illustrating an overview of expressed sugar transport system operons in *S. mutans* among Root Caries (RC) samples and Sound Root Surfaces (SRS) samples (based on Argimon et al classification). The mean expression values are displayed by the coloured gradient scale.

Figure 3.

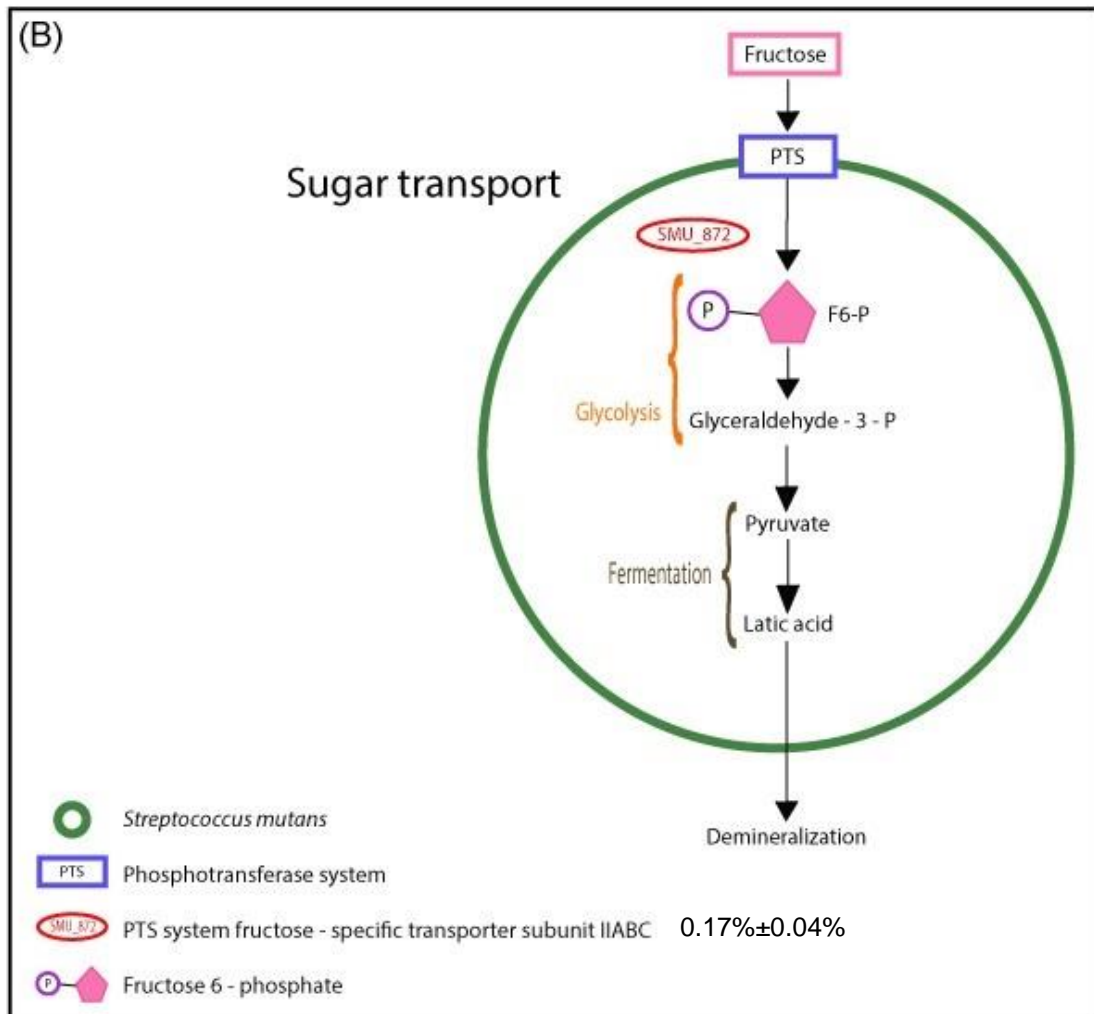


Figure 3B. Characterization of SMU_872 gene function related to sugar PTS system transport on *S. mutans* at Root Caries (RC) biofilms. Fructose (represented in pink rectangle) transport in *S. mutans* is mediated by a phosphoenolpyruvate fructose phosphotransferase system (represented in blue rectangle). The inducible fructose permease protein, SMU_872 (represented in red oval), promotes catalysis of the phosphoenolpyruvate-dependent fructose transport, which is controlled by phosphoryl transfer-driven transport across a membrane. After internalizing fructose, the transformation of this carbohydrate into organic acids will contribute to the development of root caries (mean and standard deviation of the proportion normalization of SMU_872 gene within the total transcriptome of *S. mutans* for RC libraries).

Figure 4.

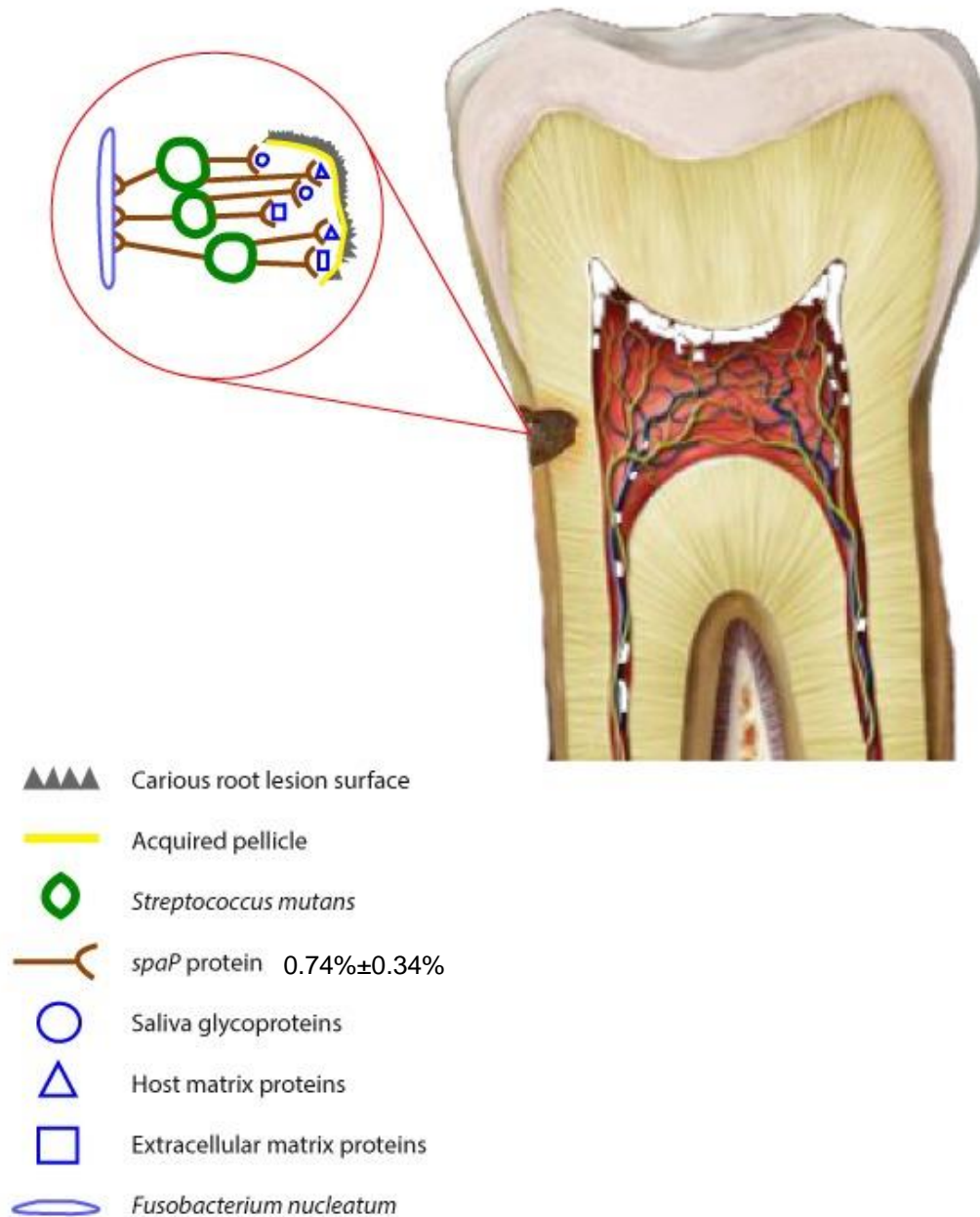
(A) *spaP*

Figure 4A. Characterization of putative cariogenic *spaP* gene function related to adhesion and biofilm formation on *S. mutans* at Root Caries (RC) biofilms. Initial process being the formation of acquired pellicle (represented in yellow) rich in salivary glycoproteins, mucin and other components on the tooth surface followed by the interaction and adhesion of *S. mutans* (represented in green). Components from host ligand proteins are included in the pellicle, which also displays possible adhesion sites for *S. mutans spaP* surface protein (represented in brown) under low pH conditions during root caries progression. *S. mutans* also appears to perform a novel adhesin function in interspecies adherence, such as *fusobacterium nucleatum* (represented in blue), contributing to oral biofilm formation (mean and standard deviation of the proportion of *spaP* gene within the total transcriptome of *S. mutans* for RC libraries).

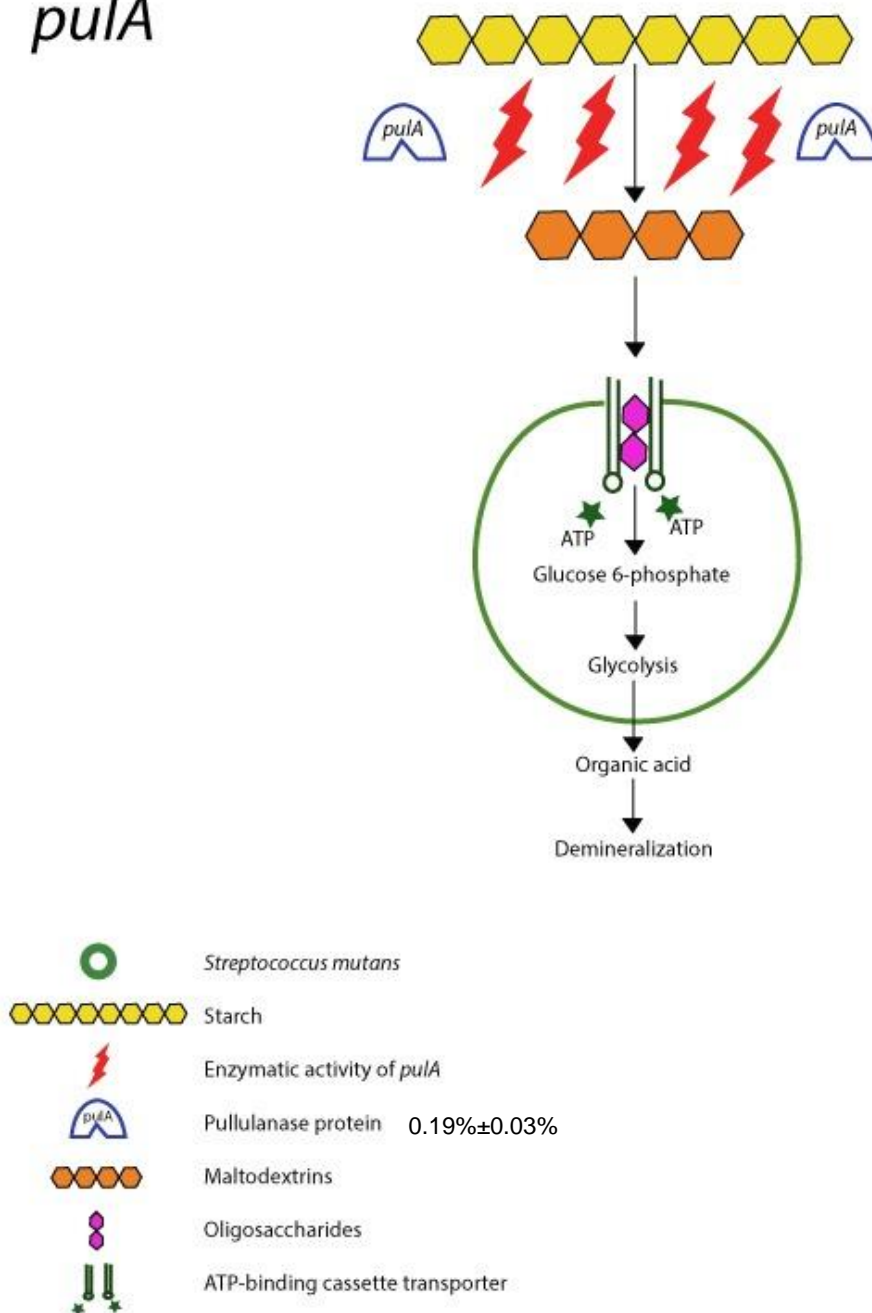
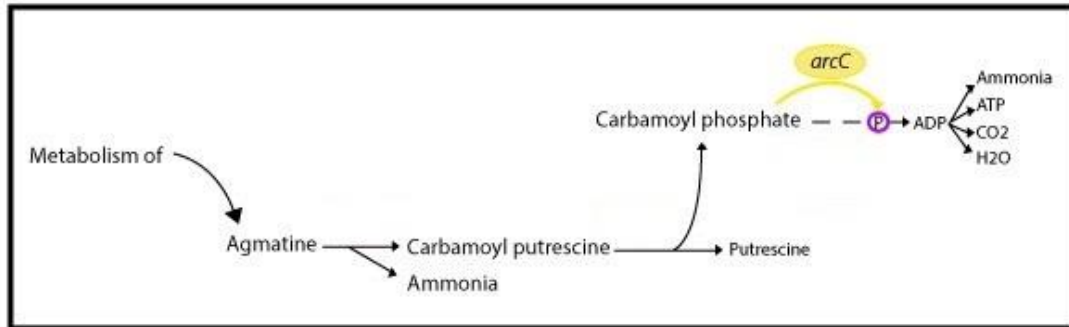
(B) *pullA*

Figure 4B. Characterization of putative cariogenic *pullA* gene function related to starch metabolism on *S. mutans* at Root Caries (RC) biofilms. The putative pullulanase protein involved in *S. mutans* starch hydrolyzing activity is shown in blue with its gene name, *pullA*. Starch is hydrolyzed by enzymatic activity of *pullA*, represented by red rays, to maltodextrins (represented in orange) and other oligosaccharides (represented in pink). The resulting oligosaccharides are transported into the cytoplasm by a translocation complex, ATP-binding cassette transporter. Further degradation of the carbohydrate leads to glucose 6-phosphate, which can enter glycolysis resulting in organic acid production with consequent root surface demineralization (mean and standard deviation of the proportion of *pullA* gene within the total transcriptome of *S. mutans* for RC libraries).

(C) **arcC**



arcC Gene that encodes carbamate kinase enzyme 0.01%±0.01%

Figure 4C. Characterization of putative cariogenic *arcC* gene function related to arginine and agmatine metabolic process on *S. mutans* at Root Caries (RC) biofilms. Agmatine metabolism enables *S. mutans* to survive under harsh acidic environments. In *S. mutans*, agmatine is metabolized by the AgDI pathway, which starts when agmatine enters the cell. Then, intracellular agmatine is converted to carbamoylputrescine and ammonia. The next step is the phosphorolysis of carbamoyl putrescine, producing carbamoyl phosphate and putrescine. Finally, carbamate kinase enzyme *arcC* catalyses the transfer of the high-energy phosphate in carbamoyl phosphate to ADP, yielding ammonia, ATP, CO₂ and H₂O. The AgDI pathway augments acid tolerance in *S. mutans* by neutralizing the cytoplasm, and the ATP generated can be used for growth and maintenance (mean and standard deviation of the proportion of *arcC* gene within the total transcriptome of *S. mutans* for RC libraries).

Figure 4.

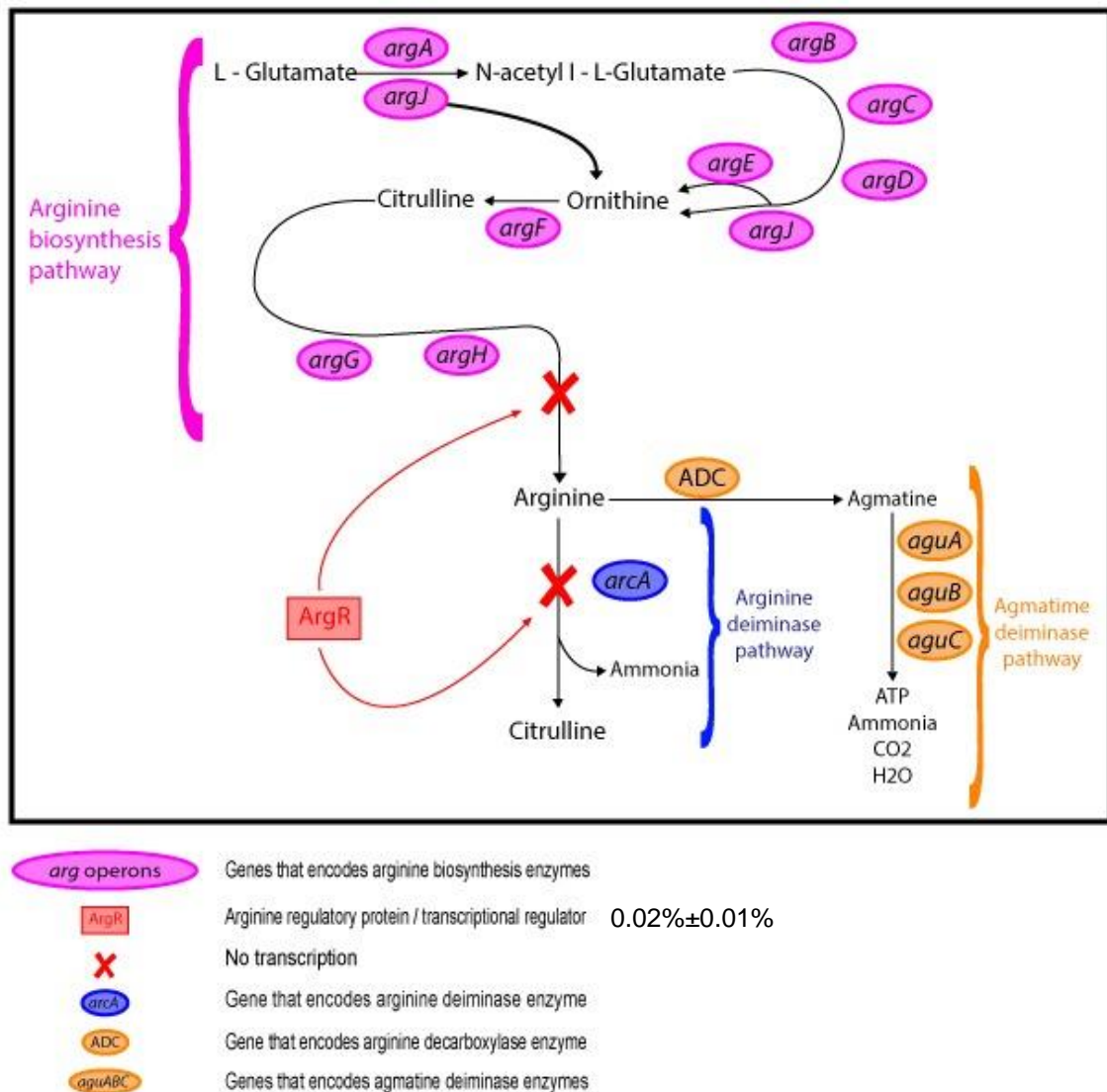
(D) *argR*

Figure 4D. Characterization of putative cariogenic *argR* gene function related to arginine biosynthesis repression on *S. mutans* at Root Caries (RC) biofilms. During the addition of arginine, ArgR probably shows higher affinity for *arg* operons (represented in pink oval), which may enhance repression of the arginine biosynthesis pathway (highlighted in pink). Accordingly, in the absence of arginine, the transcription and expression of arginine deiminase catabolic enzyme, *arcA*, is now repressed, preventing arginine degradation through ADI and AgDI pathways (highlighted in blue and orange, respectively). Therefore, *S. mutans* ArgR may have an important role in repression of arginine biosynthetic operon, providing competitive advantages to this species within the biofilm (mean and standard deviation of the proportion of *argR* gene within the total transcriptome of *S. mutans* for RC libraries).

Figure 5.

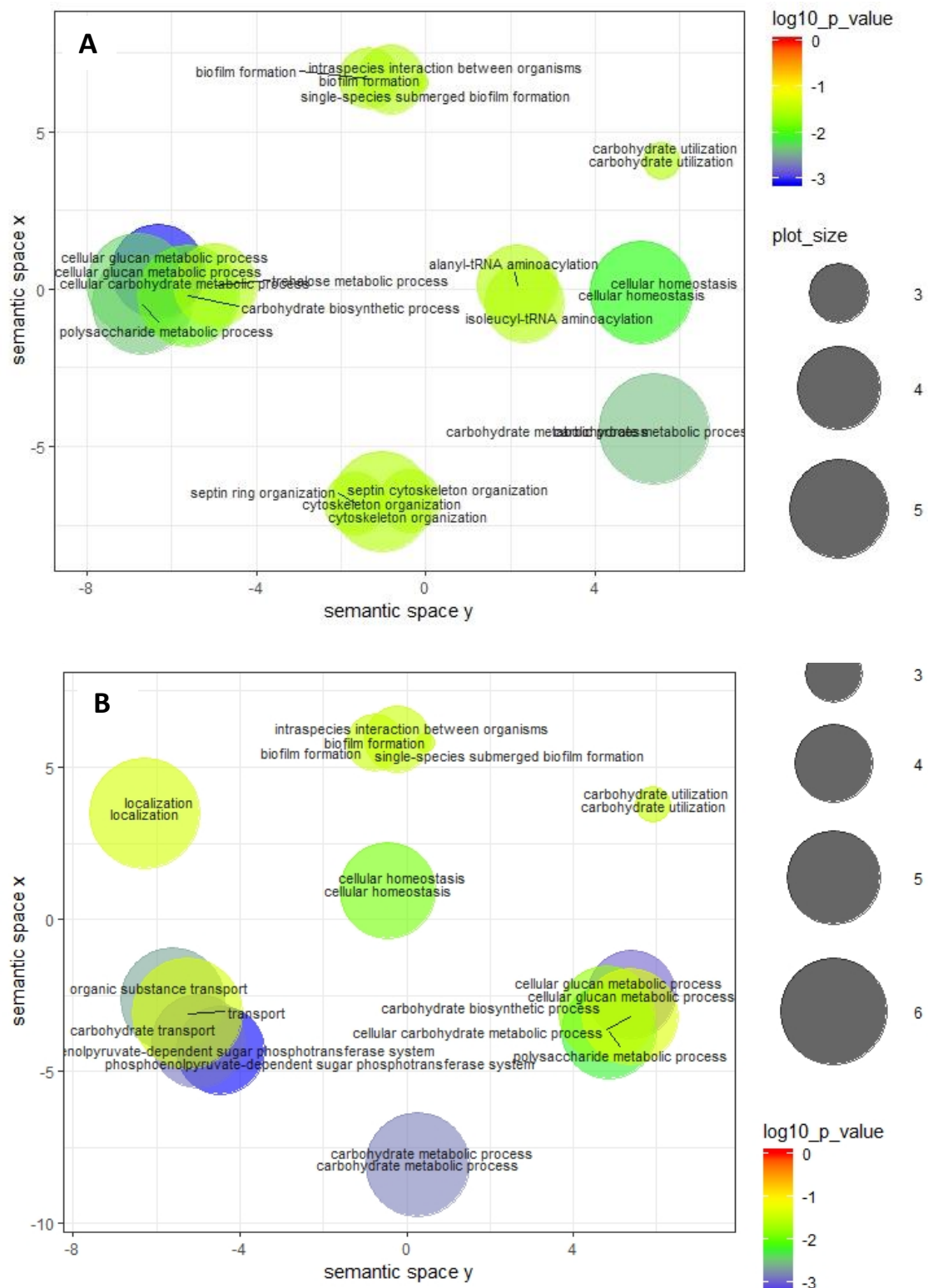


Figure 5A/B. Gene ontology (GO) terms for biological functions of the most abundant genes in Root Caries (A) and Sound Root Surfaces (B). Gene expression levels were compared between SRS and RC (RME). The top 20 most expressed genes from each group were annotated as gene ontology (GO) terms. The GO term enrichment analysis is shown, where the largest circles represent the merging of 6 GO terms within the biological process or molecular function category. The findings showed that molecular functions and biological processes of the most abundant genes appear very similar between the SRS (when active) and RC groups.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Table 2 – Supplementary Table 1. List of genes not overexpressed in Root Caries (RC; n=9) when compared to Sound Root Surfaces (SRS; n=4), by applying the DESeq2 algorithm, and the cutoff of adjusted p value at 10^{-3} . NA=Not calculated.

Gene accession number	Base Mean	log2 Fold Change	Adjusted p-value
SMU_1604c_NC_004350	59.61	-6.11	0.01
ascB_NC_004350	664.27	-4.83	0.01
SMU_642_NC_004350	204.84	-4.49	0.01
SMU_1505c_NC_004350	9.56	-4.92	0.01
SMU_1571_NC_004350	830.32	-4.73	0.01
SMU_2003a_NC_004350	92.40	-4.33	0.01
SMU_1818c_NC_004350	5.34	-5.37	0.01
galE_8_NC_004350	1055.24	-4.17	0.01
galT_3_NC_004350	1130.49	-4.26	0.01
SMU_42_NC_004350	34.32	-4.52	0.01
SMU_1356c_NC_004350	38.51	-5.59	0.01
SMU_279_NC_004350	5.41	-4.61	0.01
SMU_1763c_NC_004350	14.78	-7.57	0.01
scnF_NC_004350	84.10	-4.94	0.01
scrA_2_NC_004350	1014.80	-4.07	0.01
SMU_92c_NC_004350	4.12	-5.65	0.01
SMU_1804c_NC_004350	13.42	-4.79	0.01
SMU_609_NC_004350	4406.29	-3.86	0.02
SMU_1345c_NC_004350	73.63	-6.17	0.02
SMU_378_NC_004350	7.71	-6.60	0.02
fic_3_NC_004350	12.28	-7.30	0.02
SMU_1000_NC_004350	6.21	-5.58	0.02
SMU_1958c_NC_004350	889.10	-4.01	0.02
SMU_1163c_NC_004350	753.72	-4.11	0.02
SMU_1349_NC_004350	10.29	-5.68	0.02
SMU_1344c_NC_004350	34.79	-6.02	0.02
SMU_1374_NC_004350	7.01	-4.06	0.02
SMU_513_NC_004350	13.20	-5.62	0.02
SMU_1956c_NC_004350	300.92	-4.39	0.02
SMU_2094c_NC_004350	41.67	-3.99	0.02
SMU_1899_NC_004350	3.46	-5.51	0.02
SMU_1957_NC_004350	1062.24	-4.10	0.02
SMU_1902c_NC_004350	6.99	-4.60	0.02
SMU_1257c_NC_004350	19.03	-7.94	0.02
copZ_2_NC_004350	393.20	-4.97	0.02
SMU_1765c_NC_004350	7.48	-6.58	0.02
copA_5_NC_004350	5434.09	-4.35	0.02

SMU_1903c_NC_004350	4.20	-5.78	0.02
SMU_1817c_NC_004350	5.43	-6.13	0.02
SMU_1231c_NC_004350	17.60	-5.12	0.02
SMU_176_NC_004350	4.31	-5.05	0.02
SMU_1024c_NC_004350	8.14	-6.71	0.02
SMU_923_NC_004350	1078.30	-4.08	0.02
SMU_1255c_NC_004350	5.59	-5.46	0.02
bacT_NC_004350	26.52	-5.69	0.02
SMU_1256c_NC_004350	20.29	-6.04	0.03
SMU_1353_NC_004350	4.39	-5.07	0.03
SMU_512c_NC_004350	12.55	-5.81	0.03
msmE_2_NC_004350	1193.06	-3.98	0.03
SMU_1768c_NC_004350	6.14	-6.29	0.03
xis_NC_004350	3.25	-4.64	0.03
SMU_1776c_NC_004350	5.94	-5.55	0.03
msmF_2_NC_004350	1002.18	-3.94	0.03
SMU_276c_NC_004350	2.33	-4.92	0.03
SMU_451_NC_004350	6.88	-4.93	0.03
SMU_175_NC_004350	6.47	-6.39	0.03
copY_NC_004350	505.04	-4.27	0.03
SMU_379_NC_004350	3.52	-5.42	0.03
SMU_431_NC_004350	298.16	-3.61	0.03
SMU_1159c_NC_004350	9.59	-4.95	0.03
SMU_750c_NC_004350	3.98	-4.94	0.04
SMU_223c_NC_004350	5.75	-6.18	0.04
SMU_1373c_NC_004350	6.52	-5.63	0.04
SMU_643_NC_004350	829.29	-3.97	0.04
SMU_1402c_NC_004350	54.00	-3.49	0.04
SMU_1360c_NC_004350	8.56	-4.80	0.04
SMU_1365c_NC_004350	9.73	-6.96	0.04
SMU_1405c_NC_004350	572.34	-3.72	0.04
SMU_1762c_NC_004350	8.06	-6.70	0.04
SMU_432_NC_004350	309.48	-3.71	0.04
SMU_1150_NC_004350	305.72	-3.25	0.04
SMU_1399_NC_004350	14.21	-2.82	0.04
SMU_1404c_NC_004350	116.56	-3.30	0.05
SMU_290_NC_004350	1268.02	-3.50	0.05
SMU_1154c_NC_004350	14.35	-6.01	0.05
SMU_684_NC_004350	6.89	-6.48	0.05
SMU_685_NC_004350	5.99	-6.27	0.05
malX_2_NC_004350	1383.96	-3.37	0.05
SMU_1155_NC_004350	13.08	-5.88	0.05
SMU_1262c_NC_004350	35.70	-4.90	0.05
SMU_191c_NC_004350	2.80	-5.16	0.05
msmK_3_NC_004350	1838.42	-3.30	0.05
gtfA_2_NC_004350	2171.59	-3.31	0.06

SMU_1896c_NC_004350	21.90	-3.76	0.06
SMU_1403c_NC_004350	38.21	-3.24	0.06
tnr5_NC_004350	32.65	-2.88	0.06
sacB_NC_004350	3464.84	-2.96	0.06
dexB_2_NC_004350	2322.67	-3.29	0.06
hsdM_5_NC_004350	22.31	-3.90	0.07
msmG_2_NC_004350	952.70	-3.39	0.07
hsdS_2_NC_004350	36.64	-4.79	0.07
SMU_153_NC_004350	2.16	-3.95	0.07
SMU_1156c_NC_004350	10.95	-4.74	0.07
SMU_1888_NC_004350	4.79	-3.21	0.07
SMU_1056_NC_004350	2.73	-5.09	0.07
SMU_1026_NC_004350	8.03	-4.29	0.07
SMU_1149_NC_004350	252.85	-3.00	0.08
SMU_1148_NC_004350	242.68	-2.74	0.08
SMU_1358_NC_004350	4.88	-5.24	0.08
SMU_1357_NC_004350	19.30	-5.07	0.09
SMU_1767c_NC_004350	3.29	-5.37	0.09
SMU_93c_NC_004350	1.98	-4.55	0.09
bglB2_NC_004350	144.43	-3.51	0.09
SMU_94c_NC_004350	2.07	-4.65	0.10
SMU_1752c_NC_004350	3.05	-5.25	0.10
SMU_238c_NC_004350	476.45	-3.16	0.10
ptcC_2_NC_004350	435.14	-3.46	0.11
SMU_41_NC_004350	3.78	-4.87	0.11
SMU_1764c_NC_004350	39.69	-3.77	0.12
bglB1_NC_004350	233.48	-2.82	0.12
SMU_52_NC_004350	117.68	-2.55	0.14
SMU_1259_NC_004350	2.98	-5.25	0.15
SMU_1359_NC_004350	1.96	-4.56	0.15
SMU_1205c_NC_004350	13.17	-3.55	0.15
SMU_1576c_NC_004350	75.60	-4.32	0.16
SMU_1775c_NC_004350	2.87	-4.48	0.17
SMU_1766c_NC_004350	2.54	-4.99	0.17
SMU_237c_NC_004350	1501.94	-2.63	0.17
SMU_1577c_NC_004350	81.89	-4.03	0.20
SMU_236c_NC_004350	772.25	-2.60	0.21
SMU_207c_NC_004350	1.79	-4.54	0.21
SMU_53_NC_004350	27.35	-2.73	0.22
SMU_1310_NC_004350	1.62	-4.40	0.22
SMU_1597c_NC_004350	156.43	-2.89	0.24
SMU_896_NC_004350	7.81	-3.07	0.25
SMU_895_NC_004350	4.73	-2.93	0.26
SMU_727_NC_004350	166.57	-2.33	0.28
SMU_1575c_NC_004350	7.32	-3.14	0.29
celR_NC_004350	681.51	-2.29	0.30

ptcB_1_NC_004350	83.70	-2.13	0.33
SMU_1029_NC_004350	2.04	-2.22	0.38
ptcA_1_NC_004350	77.90	-2.02	0.40
SMU_728_NC_004350	338.49	-1.62	0.49
bgIP_NC_004350	813.45	-1.44	0.52
SMU_58_NC_004350	31.82	-1.44	0.63
SMU_55_NC_004350	1.84	-0.11	0.97
purF_9_NC_004350	296.96	-4.12	NA
SMU_56_NC_004350	0.60	-3.14	NA
SMU_107_NC_004350	1.08	-3.73	NA
SMU_117c_NC_004350	139.14	-4.91	NA
adh_3_NC_004350	708.10	-4.92	NA
dinF_2_NC_004350	770.49	-4.44	NA
SMU_193c_NC_004350	0.00	NA	NA
SMU_194c_NC_004350	0.00	NA	NA
SMU_195c_NC_004350	0.18	-1.74	NA
SMU_196c_NC_004350	0.64	-3.19	NA
SMU_197c_NC_004350	1.35	-4.05	NA
SMU_198c_NC_004350	0.27	-2.19	NA
SMU_199c_NC_004350	0.00	NA	NA
SMU_200c_NC_004350	0.27	-2.19	NA
SMU_201c_NC_004350	0.09	-1.35	NA
SMU_202c_NC_004350	0.18	-1.74	NA
SMU_204c_NC_004350	0.73	-3.34	NA
SMU_205c_NC_004350	0.37	-2.58	NA
SMU_206c_NC_004350	0.00	0.00	NA
SMU_208c_NC_004350	0.00	0.00	NA
SMU_209c_NC_004350	1.16	-3.89	NA
SMU_210c_NC_004350	0.74	-2.19	NA
SMU_211c_NC_004350	0.46	-2.82	NA
SMU_212c_NC_004350	0.00	NA	NA
SMU_213c_NC_004350	0.00	NA	NA
SMU_214c_NC_004350	0.27	-2.19	NA
SMU_215c_NC_004350	0.00	NA	NA
SMU_216c_NC_004350	0.90	-2.76	NA
SMU_217c_NC_004350	1.07	-3.76	NA
SMU_218_NC_004350	0.34	-1.74	NA
SMU_219_NC_004350	0.00	NA	NA
SMU_220c_NC_004350	0.81	-3.45	NA
SMU_436c_NC_004350	0.00	NA	NA
SMU_565c_NC_004350	0.00	NA	NA
SMU_566c_NC_004350	0.00	NA	NA
SMU_681_NC_004350	0.55	-3.03	NA
SMU_687c_NC_004350	0.05	-1.35	NA
SMU_766_NC_004350	0.00	NA	NA
SMU_767_NC_004350	0.17	-1.98	NA

SMU_846_NC_004350	0.00	NA	NA
SMU_893_NC_004350	0.06	-1.35	NA
SMU_897_NC_004350	114.99	-3.19	NA
SMU_1030_NC_004350	1.23	-3.85	NA
SMU_1157c_NC_004350	49.22	-3.79	NA
SMU_1347c_NC_004350	0.00	NA	NA
SMU_1348c_NC_004350	0.00	NA	NA
SMU_1366c_NC_004350	0.00	NA	NA
SMU_1368_NC_004350	0.89	-2.92	NA
SMU_1369_NC_004350	1.04	-3.69	NA
SMU_1379_NC_004350	0.00	NA	NA
SMU_1407c_NC_004350	0.00	NA	NA
SMU_1408c_NC_004350	0.00	NA	NA
SMU_1462c_NC_004350	63.97	-3.80	NA
bgl_NC_004350	121.48	-2.78	NA
SMU_1750c_NC_004350	0.23	-2.17	NA
SMU_1808c_NC_004350	0.31	-2.44	NA
SMU_1893c_NC_004350	0.00	NA	NA
SMU_1894c_NC_004350	0.00	NA	NA

Table 3 – Supplementary Table 2. Relative median expression (RME) and percentiles (25th-75th) of the top 12 most expressed genes from SRS (n=4) and RC (n=9) groups. RME was calculated from the median values of non-normalized read counts using DE-Seq algorithm (RME).

Gene ID	Median SRS (25th-75th)	Median RC (25th-75th)
adhE_3	1366.50(683.25-2049.75)	55537.00(27768.50-83305.50)
clp	2048.50(1024.25-3072.75)	110423.50(55211.75-165635.25)
clpE_4	1719.00(859.50-2578.50)	48389.00(24194.50-72583.50)
dnaK_90	2012.50(1006.25-3018.75)	99963.00(49981.50-149944.50)
gapC	1381.50(690.75-2072.25)	53500.50(26750.25-80250.25)
glgA_8	1462.50(731.25-2193.75)	34572.50(17286.25-51858.25)
pfl_3	2484.00(1242.00-3726.00)	186319.00(93159.50-279478.50)
pgm_5	1610.00(805.00-2415.00)	28596.00(14298.00-42894.00)
phsG	2233.50(1116.75-3350.25)	62718.00(31359.00-94077.00)
rpoC_8	1298.00(649.00-2947.00)	45022.00(22511.00-67533.00)
SMU_675	1495.00(747.50-2242.50)	38903.50(19451.75-58355.75)
SMU_714	1184.50(592.25-2776.75)	33665.00(16832.50-50497.50)

Figure 6 – Supplementary Figure 1A.

(A)

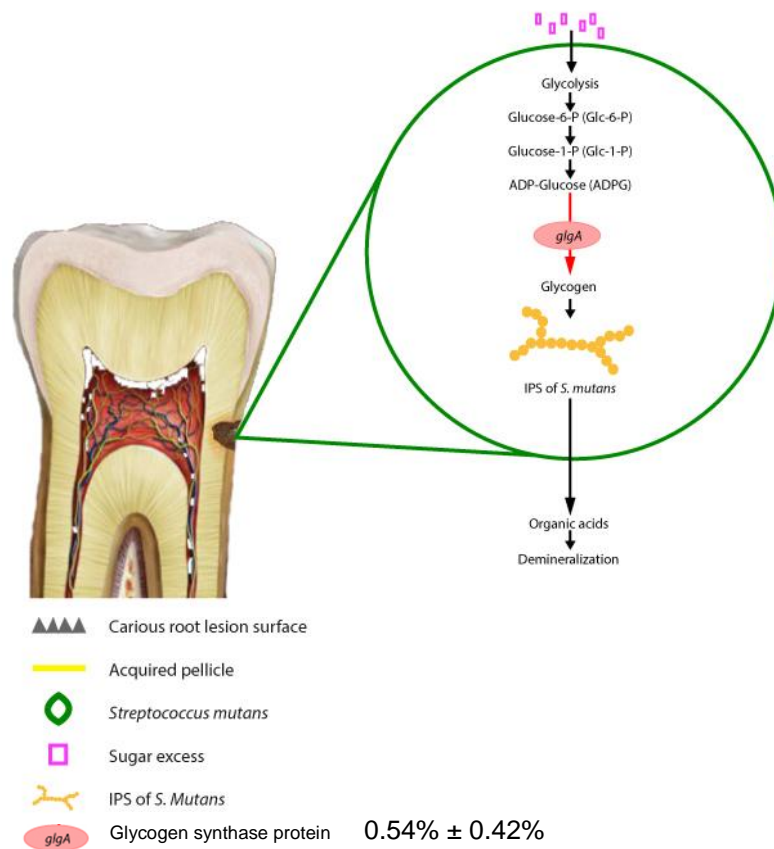


Figure 6. Characterization of *glgA* gene function related to acidogenicity on *S. mutans* at Root Caries (RC) biofilms. The pathway of glycogen metabolism in *S. mutans* is represented in green circle. When *S. mutans* are grown in excess sugar (represented in pink squares), a variety of carbohydrates are internalized and fermented by glycolysis pathway, initially, converting glucose-6-phosphate into glucose-1-phosphate, which serves as a substrate for ADP-glucose synthesis. Then, *glgA* (represented in red oval) catalyzes the transfer of glucosyl moieties from ADP-glucose to the elongating chain of alpha-1,4-glucan, thus starting the biosynthesis of bacterial intracellular polysaccharide (IPS) (represented in yellow circles) with production of organic acids and leading to a root dentine demineralization (mean and standard deviation of the proportion of *glgA* gene within the total transcriptome of *S. mutans* for RC libraries).

Figure 7 – Supplementary Figure 1B.

(B)

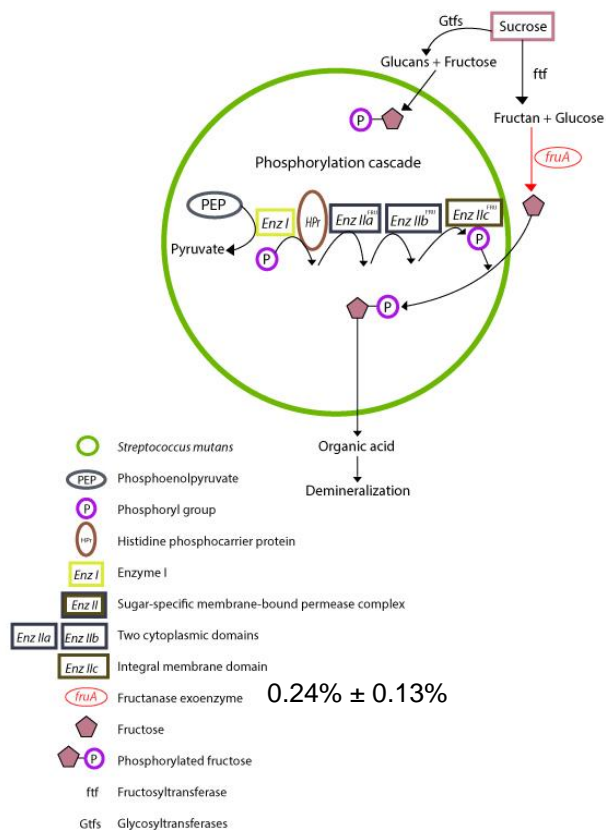


Figure 6B. Characterization of *fruA* genes functions related to acidogenicity on *S. mutans* at Root Caries (RC) biofilms. The purpose of *S. mutans* (represented in green circle) phosphotransferase system is the specific uptake of sugars into the cells. *S. mutans* utilize the fructan through the action of the fructanase enzyme encoded by *fruA*. In phosphoenolpyruvate-sugar phosphotransferase system (PTS), phosphorylation and uptake of fructan carbohydrate are coupled. A PTS is composed of two non-specific energy-coupling systems, designated Enzyme I (Enz I) (represented in yellow rectangle) and heat-resistant histidine phosphocarrier protein (HPr) (represented in brown oval), and a sugar-specific, membrane-bound permease complex, called Enzyme II (Enz II) (represented in dark blue). Enz II itself consists of three subunits: Enz IIa and Enz IIb are located in the cytoplasm whereas Enz IIc (represented in dark green rectangle) is located in the membrane. The PTS uses phosphoenolpyruvate as phosphate donor to phosphorylate fructan carbohydrate via a phosphoryl-transfer system involving Enz I, HPr and Enz II. Fructan then activates a specific fructose PTS (Enz II Fru), which internalizes this carbohydrate, resulting in organic acid production with consequent root surface demineralization (mean and standard deviation of the proportion of *fruA* gene within the total transcriptome of *S. mutans* for RC libraries).

Figure 8 – Supplementary Figure 2.

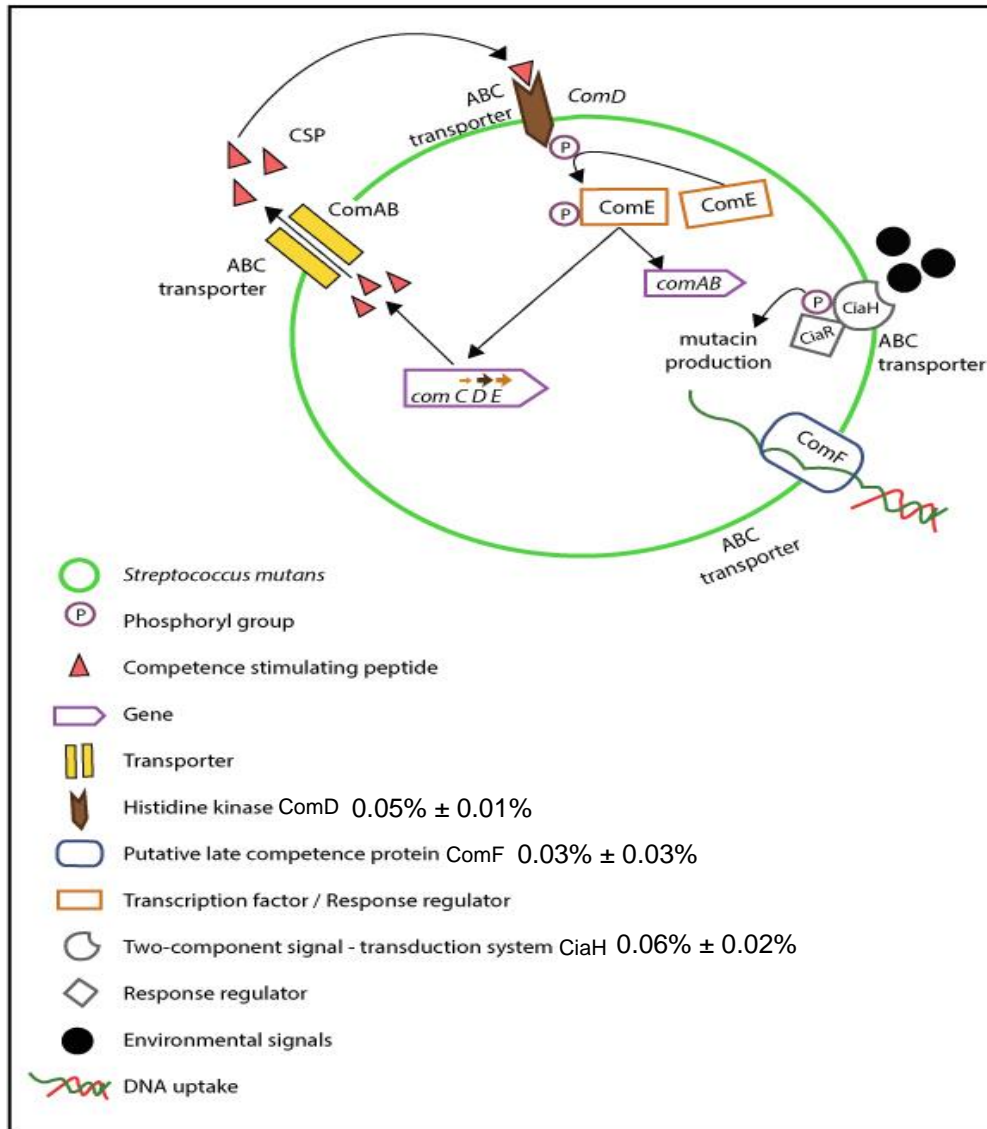


Figure 7. Characterization of *comD*, *ciaH* and *comF* genes functions related to quorum sensing regulation of competence on *S. mutans* at Root Caries (RC) biofilms. Genes in the operon, *comAB*, (represented in pink) encode an ATP-binding cassette transporter (ComA) and an accessory ComB protein that are involved in the processing and export of the competence stimulating peptide (CSP), represented in orange triangles. The loci *comC* (represented in pink) respectively encode the precursor to the CSP, a histidine kinase ComD (represented in brown) that acts as a CSP receptor, and a response regulator ComE (represented in orange rectangle) that activates both *comAB* and *comCDE* operons. CSP interacts with the ComD receptor protein of the neighboring cells and activates its cognate response regulator, ComE, which activates downstream genes, triggering the signaling cascade for bacteriocin production and other cell density-dependent activities. CiaH (represented in gray), a putative histidine kinase sensor, and CiaR (represented in gray square), a putative response regulator of *S. mutans*, comprise a two-component signal transduction system (TCS) involved in regulating various virulent factors through environmental signal that triggers the CiaRH response. ComF (represented in blue), a putative late competence protein, is involved in *S. mutans* DNA uptake (mean and standard deviation of the proportion of *comD*, *ciaH* and *comF* genes within the total transcriptome of *S. mutans* for RC libraries).

Figure 9 – Supplementary Figure 3.

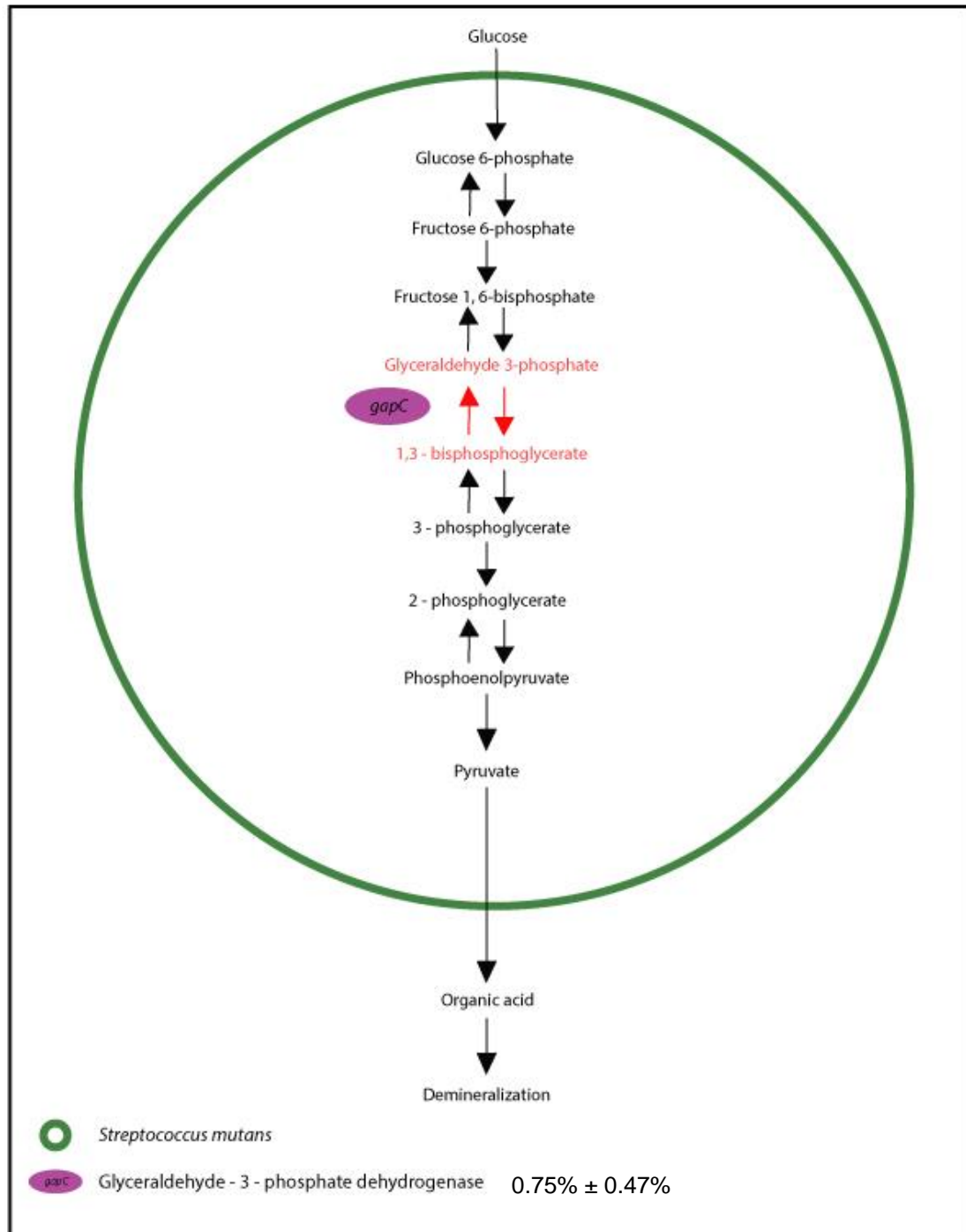


Figure 8. Characterization of *gapC* function related to glucose metabolic process on *S. mutans* at Root Caries (RC) biofilms. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) is an enzyme involved in *S. mutans* glycolysis. The glycolytic pathway is a metabolic pathway through which GAPDH (represented in pink oval) is the key glycolytic enzyme that catalyzes the oxidation and phosphorylation of glyceraldehyde-3-phosphate to an energy-rich intermediate, 1,3-bisphosphoglycerate, resulting in acid biosynthesis with consequent root surface demineralization (mean and standard deviation of the proportion of *gapC* gene within the total transcriptome of *S. mutans* for RC libraries).

Figure 10 – Supplementary Figure 4.

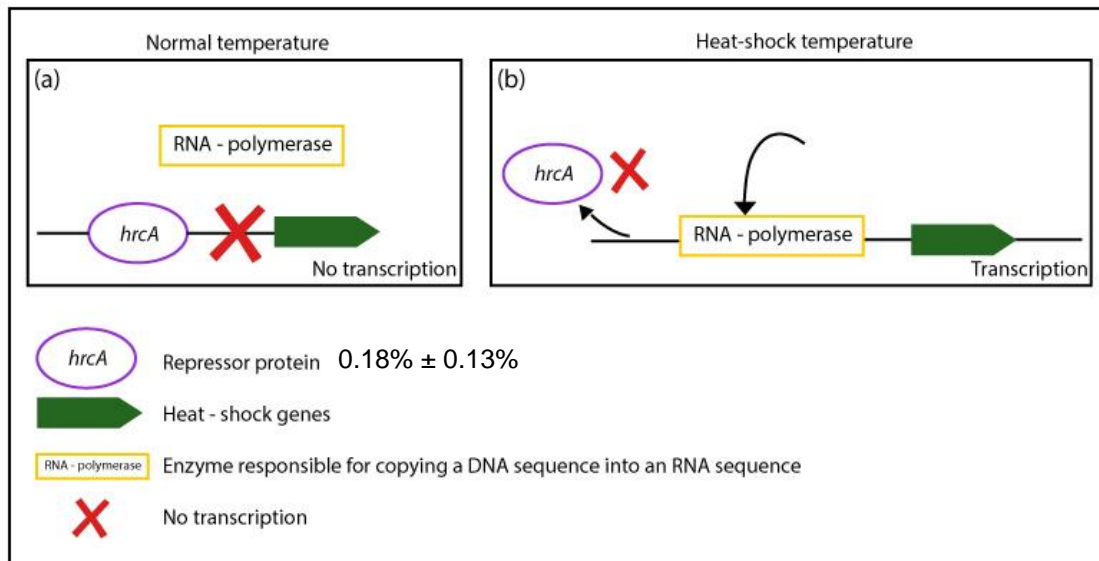


Figure 9. Characterization of *hrcA* function related to heat-inducible transcriptional repression on *S. mutans* at Root Caries (RC) biofilms. Negative mechanisms of *hrcA* gene transcriptional regulation in *S. mutans* is based on *hrcA* repressor proteins, represented in purple oval, that keep transcription of heat-shock genes repressed (red x) during normal growth conditions (a). An important role of *hrcA* repressor proteins for *S. mutans* survival under low-pH conditions happens upon heat-shock, when they detach from heat-shock genes promoters, whose transcription is operated by the RNA polymerase, enzyme responsible for copying a DNA sequence into an RNA sequence represented by yellow rectangle. Bent arrow indicates the transcription start site (mean and standard deviation of the proportion of *hrcA* gene within the total transcriptome of *S. mutans* for RC libraries).

Figure 11 – Supplementary Figure 5.

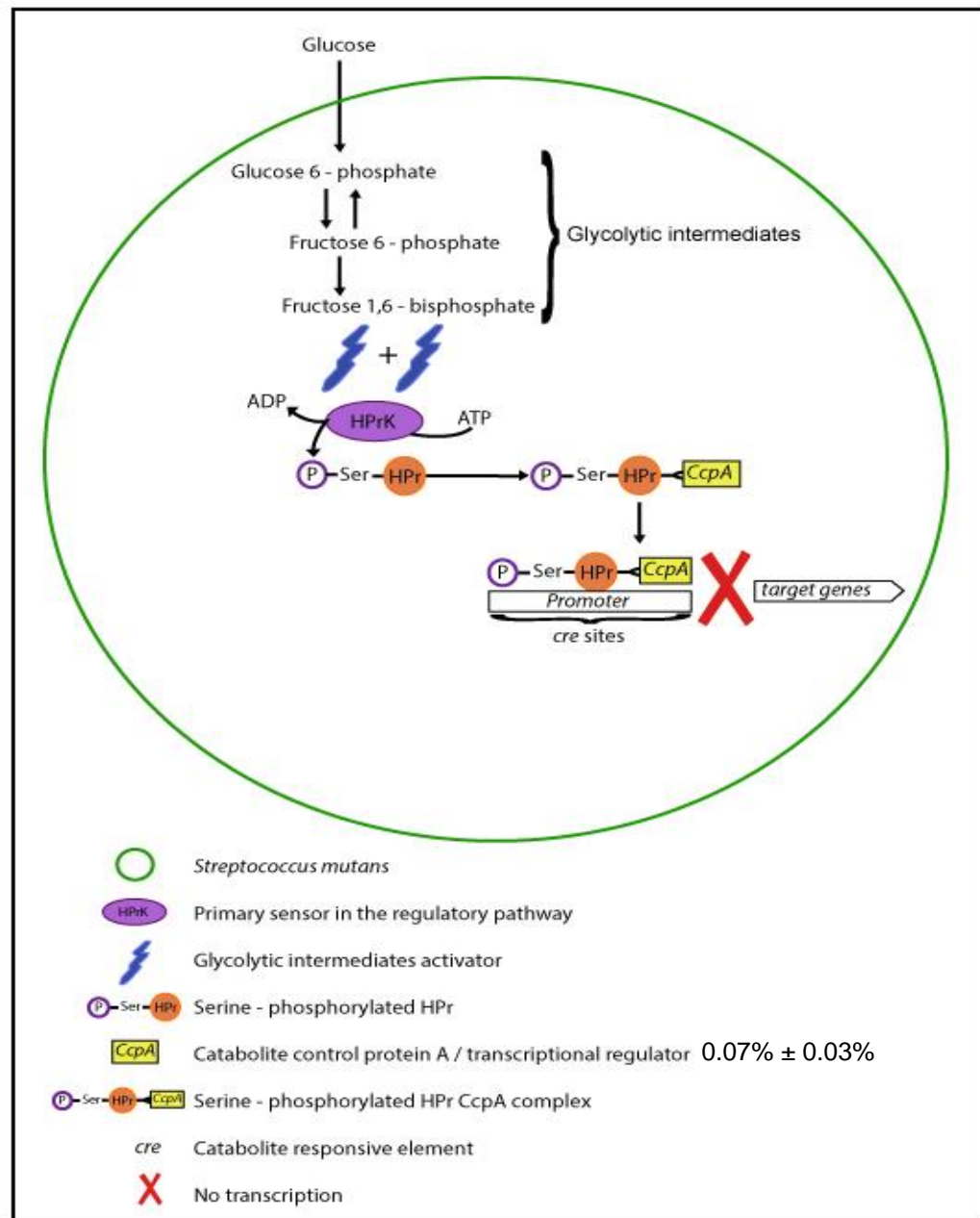


Figure 10. Characterization of *ccpA* function related to catabolite control regulation on *S. mutans* at Root Caries (RC) biofilms. In *S. mutans*, when preferred carbohydrate sources are present, represented by glucose, as sensed through the accumulation of glycolytic intermediates, a protein kinase HprK (primary sensor in the regulatory pathway, represented in purple oval) is activated (glycolytic intermediates activator, represented in blue rays) that can phosphorylate the general sugar:phosphotransferase system (PTS) protein HPr at serine α - amino acid. Serine-phosphorylated HPr (P-Ser-HPr) functions as a co-factor for the binding of CcpA (catabolite control protein A, represented in yellow) to conserved catabolite responsive elements (*cre*) found near the start sites of target genes to activate or repress gene expression. Thus, CcpA directly modulates the pathogenic potential of *S. mutans* through global control of gene expression (mean and standard deviation of the proportion of *ccpA* gene within the total transcriptome of *S. mutans* for RC libraries).

CAPÍTULO 3 – UNDERSTANDING THE ETIOLOGY OF DENTAL CARIES THROUGH OMICS: ADVANCES IN THE LAST DECADE OR CHALLENGES FOR THE NEXT AGE

Abstract

For decades, researchers sought an understanding of the causes of dental caries. Aetiological concepts have evolved over the years to the current paradigms that emphasize a mixed bacteria-ecological approach as being responsible for the development of the lesion. Limitations of the traditional approaches to the microbiological analysis and difficulties due to the long-term and complex origin of the disease have led the focus to erroneous directions of treatments and preventive measures. The introduction of the molecular techniques has revolutionized the understanding of microbial-related diseases, assisting to design this new paradigm of dental caries. With the advent of “OMICS” approaches, various biological units have been accessed, such as genes, gene expression, proteins, and metabolites contents within the complex dental biofilms. Although findings from “OMICS” researches are substantially rich, there are still problems related to studies design, data quality, integration, and reproducibility, which impair the discovery of unknown biological units. Advanced bioinformatics expertise for reliable interpretation of data is required. In 2017, it was proposed that we are moving past the phase of disillusionment, as “OMICS” is leading to paradigm shifts in oral microbiology and Cariology. However, what has changed in these three last years? Do we really understand the caries “OMICS” results? Do we advance in this field? Has the application of “OMICS” provided new insights into the etiology of dental caries? If yes, why are we still testing drugs/prebiotics/probiotics against unispecies or dual-species biofilms? Thus, the discovery of novel caries biomarkers and the development of tests, which could be efficient for caries-risk assessment at pre-clinical stages of the disease, still need to be addressed. This review explores the limitations of current knowledge about the etiology of dental caries and the confounding factors that make it difficult to reach a consensus by the use of OMICS.

KEYWORDS: Dental caries; *Streptococcus mutans*; Metagenomics; Metatranscriptomics; Metaproteomics; Metabolomics.

3.1 INTRODUCTION

Dental caries, despite its long history in humans, is still one of the most prevalent human diseases in the world, affecting 80-90% of human's beings. The biology of its development has shown to be far more complex than anyone might have thought [1]. The understanding of dental caries etiopathogeny changed in the last decades, when the development of plaque-mediated disease may be viewed as a breakdown of the homeostatic mechanisms that typically maintain a beneficial

relationship between the resident oral microbiota and the host [2]. Connected with the new concept of caries, the function of the microbiota during dysbiosis is linked with dietary nutrients available, hygiene habits of the individual, genetics, gender, smoking, among others, which play a key role in the tendency to develop the disease [3]. Therefore, the knowledge on how colonization occurs, how oral microbiome coevolves with the host, and how oral microorganisms interact with each other may be a key factor to understand diseases etiology and progression.

In the last decade, high-throughput techniques have added new dimensions to the knowledge of host-microbial interactions, by analyzing informative molecules such as DNA, RNA, proteins, and metabolites from the whole biofilm [4]. Improvement in sequencing technologies emerged with the promise of revolutionizing the field, by defining putative microbial biomarkers for caries. It would be a broadly applicable and successful means of translating molecular and genomic data into clinical practice. In 2017, it was proposed that we are moving past the phase of disillusionment, characterized by the apparent initial errors and failures of the new technology, as “OMICS” is leading to paradigm shifts in oral microbiology and Cariology [5]. However, there is a clear need to integrate the massive amount of data being generated so far as to fully understand the interplay of the different oral microorganisms with the function of their metabolic mechanisms in dental health and caries. Data generated from the “OMICS” studies has still to be carefully tested by the construction of new, well-designed and reproducible studies models so that the new technology can survive the phase of trough of disillusionment to enter the slope of enlightenment, and encourage the development of next-generation diagnostics and therapies for caries control [5].

Hence, this review aims to critically discuss the current knowledge of the oral microbiome in health and dental caries-associated biofilms, some of the challenges to acquiring a detailed understanding of the microbial contributions to dental caries, the role for the *Streptococcus mutans* in caries development after “OMICS” era, and limitations of the high-throughput “OMICS” techniques for the identification of potential biomarkers for caries risk assessment.

3.1.1 The Evolution of the Hypotheses Explaining the Role of Plaque Bacteria in the Etiology of Dental Caries

Since ancient times, dental caries has been present in the human dentition [6]. Surprisingly, no efficient strategies to eliminate this disease have been developed, despite its impact on human health and quality of life. Therefore, an improved knowledge of how healthy plaque develops into pathological plaque is essential if dental caries prevalence reduction.

In the nineteenth century, the “Non-Specific Plaque Hypothesis” emerged with the idea that the accumulation of dental plaque was responsible for dental caries, without any discrimination between the taxonomy and levels of virulence of each bacterium found there. Afterward, in the twentieth century, species-specific culture-based techniques allowed analysis that opened the hunt for odontopathogen, as dental caries was considered an infectious disease at the “Specific Plaque Hypothesis”, with specific bacteria – *S. mutans* – being considered the arch-criminal [7].

Numerous studies employing a variety of subject groups supported correlations between levels of *S. mutans* and all types of dental caries [8, 9]. What has increased the spotlight over this microorganism is that it's excelling at the rate of acid production, the low pH it survives, and the capacity to synthesize extracellular glucans [10]. However, not everyone was convinced. Studies from carious lesions have revealed an impressive diverse ecosystem, where *S. mutans* accounted for only a small fraction of the bacterial community [11, 12]. Besides, *S. mutans* sometimes have not been detected at decayed sites and, conversely, have been well-represented on sound enamel [10]. This hypothesis has also been led researches to study the use of antibiotics against *S. mutans*, seeking out for a cure [7, 8, 13, 14]. However, results from clinical studies were not promising [13, 14]. It was noticed that antibiotics reduced the abundance of cariogenic bacteria, but failed to eliminate them, therefore, as soon as the treatment was stopped its abundance increased [13, 14].

Shortly after, the “Non-Specific Plaque Hypothesis” was updated [15] and was enriched by taking into account differences in virulence among bacteria, suggesting a joint action of a polymicrobial community. Subsequently, the “Ecological Plaque Hypothesis” [16] proposed that disease is the result of an imbalance in the microbiota

triggered by an ecological stress that enrich certain microorganisms. This theory was later expanded after the authors reconsidered the caries process from a microbiological, biochemical, ecological, and clinical perspective [17].

As a consequence, some researchers felt that greater emphasis on the contributions of the microbiome as a whole would lead to more effective means of caries control [10]. Hence, that focus shifted to a search of the ecological balance within the entirety of the plaque microbiome [16-18]. Acceptance of such principles may explain the transition of the oral microbiota from having a commensal to a pathogenic correlation to the host, and also open up new opportunities for the control of homeostasis. Despite their great relevance, all hypotheses fall short of combining actual microbial and host behavior that led to the maintenance of health or the shift to disease. An all-encompassing hypothesis is only possible when sufficient knowledge is obtained between the complex relationships of the oral microbiome and its host's physiology and health [19].

Over time, it became clear that there was a discrepancy between the number of microorganisms in a sample that could be grown by conventional culture approaches [20]. It is estimated that 57% of the resident oral bacteriome are officially named, 13% unnamed but cultivated and 30% are known only as uncultivated phylotypes [21]. Furthermore, there is a "missing part of the puzzle", as kingdoms other than Bacteria (Eukarya, Archaea, Viruses) are found in dental biofilms but little is known regarding their contribution to dental caries [22]. There was a need to apply new approaches and research lines to better understand the microbial dynamics and provide a more realistic picture of the complex interactions that contribute to the compositional and functional stability of the oral ecosystem.

3.1.2 Introduction Into the Diverse Nature of Microbial Composition in Caries Process

The introduction of molecular approaches has expanded the knowledge of the richness of resident oral microbiota. A wealth of studies based on amplification, cloning, and sequencing of the 16S rRNA gene have identified approximately 700 species in the oral cavity [23], most of them are considered commensals. Curiously, in healthy individuals species regarded as pathogens are frequently found, although at lower levels than in subjects with caries. In carious lesions, however, the number

decreases dramatically to 100–200 species-level phylotypes [24]. The first report revealing the high diversity of oral microbial communities was published in 2008 [25] and succeeded by the first core oral microbiome report [26]. Aas and collaborators, after obtaining over 1200 clones of the 16SrRNA gene from dental plaque and carious lesions at different stages of the disease, showed that *S. mutans* could not be PCR-amplified in a significant proportion of samples. Also, other bacteria such as *Atopobium*, *Prevotella*, and *Propionibacterium* were associated with dental caries [27]. Other studies have also revealed new unknown taxa and associated them with caries pathogenesis. *Scardovia wiggisiae* was considered a new etiological agent of childhood caries [28, 29]. This fact adds to the scientific knowledge of the ecology of acidogenic organisms in dental caries other than *S. mutans*.

It is worth pointing out that these molecular methods resulted in highly cited publications with long lists of bacterial species and conclusions obtained from the analysis of a few oral samples, leading to a miscellaneous body of evidence [5]. Furthermore, the 16S rRNA sequencing is too limited. Therefore, in recent years, with increased next-generation sequencing (NGS) technologies, it was possible to elucidate the “dark matter” of the microbiome by identifying them with more accuracy and determining their role and impact on health and disease. Interestingly, DNA-based studies have shown that *S. mutans* accounts only for 0.1% of the bacterial community in dental plaque and 0.7-1.6% in carious lesions [11, 12], while *Veillonella* was most common genus within dentin caries samples [30]. This fact confirms the varying nature of microbial composition in the caries process. It is important to mention that the diversity of the oral microbiota is even more varied than is apparent from 16S rRNA sequencing data. However, It has to be kept in mind that these DNA-based studies may quantify dead, transient, or inactive microorganisms that do not contribute to the disease [4].

Efforts should be directed toward associating the composition with the function of the oral microbiota, and relevant questions may be answered by elucidating what the microbes are doing rather than focusing on who is performing those actions [31]. It's expected that microbiome analysis and other “OMICS” approaches coupled with phenotypic characterization of newly identified species may support the identification of new microbial biomarkers for caries. Biomarkers are capable of providing informations as a body fluid about the physiologic state of the body. Reliable and

reproducible biomarker can be called as a molecular signature and hence can be used in risk assessment, diagnosis, prognosis, and monitoring of disease [32].

3.1.3 “OMICS” Era. What Prospects for Change Have Been Achieved?

A variety of high-throughput experimental approaches combined with increased computational power and more advanced bioinformatics technology have been used to provide a more holistic view of the oral ecology and lead to unraveling of mechanisms that govern change from health to disease [19]. But the question is: are these techniques providing meaningful data and do they provide increased knowledge about caries? [4]. In the context of interpreting bioinformatic data, it is relevant to consider that the availability of tools and affordability of generating genomic information have led to a false sense of simplicity, when the truth is that a vast knowledge of microbial ecology, microbial metabolism, and biostatistics capacity is still required [5].

Efforts to reveal the link between genetic potential and functionality of microbial communities make possible to disclose sequences from uncultivated microorganisms. The use of “OMICS” techniques has revealed the high complexity of the oral microbiome [12, 30], metatranscriptome [33, 34], metaproteome [35, 36], and metabolome [37]. Data collected from these “OMICS” approaches are providing the foundation to better recognize the tremendous number of microbial species that cohabit and functionally interact in oral biofilms to cause disease or to maintain homeostasis with their human host [34].

What is known so far? (Table 1) “OMICS” studies have underpinned that the presence of bacteria does not necessarily indicate metabolic activity, supporting the idea that the prevalence of bacteria revealed by metagenome analysis may not correlate well with the patterns of the active microbial community revealed by metatranscriptome analysis of the same oral sample [5]. In the same way, mRNA profiles do not necessarily correlate with actual protein translation which means that a bacterium may produce mRNA, which do not always get read into amino acids [47]. For example, while *Actinomyces*, *Corynebacterium* and *Neisseria* were the three most abundant taxa based on the RNA-Seq data, *Veillonella*, *Streptococcus* and *Leptotrichia* were the most prevalent in total DNA metagenome of the same sample [33]. This fact underlines the importance of knowing microbiome composition as well

as activity. This same research obtained other interesting results after studying the active portion of the bacterial community on the surface of teeth before and after a meal [33]. Findings have shown that some healthy individuals exhibited practically no changes in the active bacterial population after food ingestion, which suggests that their microbiota is not affected by food ingestion, thereby potentially reducing the risk of acidic pH and promoting dental health. The authors also showed that more specialized genes are expressed in the mature biofilm. Among them, genes involved in competence, quorum sensing, mutacin production, and DNA uptake were overexpressed indicating a more complex level of interactions in mature biofilm than at earlier stages of biofilm formation. As some individuals showed virtually no changes in the active bacterial population after food intake, it was suggested the presence of a microbial community that could be associated with oral health.

Supporting those observations, other metatranscriptomic analysis studied patterns of community gene expression in a multispecies biofilm model composed of species found in healthy oral biofilms and the same biofilm with periodontopathogens [48]. The results showed that in the absence of pathogens, only sets of proteins related to transport and secondary metabolism were upregulated, while in the presence of pathogens, proteins related to growth and division as well as a large portion of transcription factors were upregulated, probably due to increased levels of stress. These results highlight the significance of studying microbial activity in health, in addition to disease, which can probably indicate valuable functions responsible for oral health.

Metatranscriptomics studies have also revealed overall active bacterial composition in caries lesions [49]. This work showed that non-cavitated, open dentin, or enamel-dentin carious lesions presented different active communities. Among the significant findings of this work, *S. sanguinis* was the most active species in all three kinds of lesions, while *S. mutans* was active only in noncavitated and open dentin lesions, indicating an association of *S. mutans* with open lesions rather than unexposed. This finding agrees with the idea that oxygen availability is a crucial factor in the interspecies competition between *S. mutans* and *S. sanguinis* in the oral biofilm [50].

Studies have also begun to elucidate some aspects related to root caries. For example, *Actinomyces* spp., bacteria extensively implicated as a prime suspect in root caries, revealed similar levels of gene expression in both sound and carious root

biofilms [42]. This finding suggests that these bacteria can be commensal in root surface sites but may be cariogenic due to survival mechanisms that allow them to exist in acid environments.

It is important to highlight that the interaction between cells comprising oral microbial communities has revealed a complex yet organized microbial architecture. As adhesin-mediated bacterial interspecies interactions are important elements in oral biofilm formation, interactions between *Fusobacterium* species and *S. mutans* have previously been described [51]. Recently, *Corynebacterium* has also been shown to serve as anchor sites for many microbes [52] and novel antiplaque strategies have been proposed directed toward bridging bacteria in biofilms [53]. It is important to mention that the biogeography of a microbial community reveals a spatial organization critical to understanding the physiology, ecology and functional meaning of the community. Thus, studies involving other kingdoms, such as archaea, fungi, protozoa, and viroses [22], should provide a more realistic picture of the complex physical interactions between species that contribute to the supra-gingival plaque architecture.

It is also relevant to consider that the role of bacteria in the demineralization stage of caries development is well known. However, little is understood of its function in the degradation phase of the collagenolytic matrix. Metagenome analyses have detected, in samples of carious dentin, high expression levels of collagenases and other proteases, such as serine-proteases, glycoproteases, carboxy-terminal proteases, and metalloproteases [12]. Among the collagenase DNA sequences from carious dentin samples, significant matches were obtained from annotated collagenases from *Prevotella* species, *Bacteroides*, *Campylobacter*, *Capnocytophaga*, *Treponema* and others. These findings suggest that the microbial encoded proteolytic enzymes, associated with human metalloproteases activity, may play a significant role in dentin protein degradation and future RNA-based metatranscriptomic research should be performed to confirm if these microorganisms are in fact able to degrade dentin proteins.

Metaproteome analyzes have also begun to elucidate some aspects related to the differences between human and bacterial protein profiles from patients with oral disease compared to healthy individuals. Overexpression of human protein profiles related to the complement system and inflammation seemed to correlate with oral disease status, while bacterial proteome profiles and functional annotation were very

similar in health and disease [36]. These findings suggest that human proteins may hold the potential to be used as future biomarkers of oral disease status.

The knowledge of the bacterial metabolic pathways involved in caries was also expanded. The metabolism of dietary carbohydrates by dental plaque has been known as the driving force of the caries process. However, amino acid metabolism in dental plaque is still unclear. The former can be degraded to acids mainly, while the latter can be degraded to different metabolites, including ammonia, acids and amines. Contrary to dietary carbohydrates, amino acids are continuously supplied by saliva and gingival crevicular fluid, and they serve as metabolic substrates for the growth of dental plaque [37].

Over the past decade, metabolome analysis on the central carbon metabolism in supragingival plaque has been investigated [54, 46] and, a recent study showed the contribution of major pathways for amino acid metabolism to the pH homeostasis processes in oral biofilm [37]. Metabolome profile revealed that, in resting supragingival plaque, glutamate may be the main source of ammonia production, as well as arginine, and probably contributes to pH-homeostasis and counteraction to acid-induced demineralization in supragingival plaque. Various other metabolites related to amino acid metabolism, such as citrulline, ornithine, putrescine, γ -aminobutyric acid (GABA), and β -alanine, were also detected [37] supporting that the arginine deiminase system (ADS) functions to convert arginine to citrulline and ornithine may be contributing to acid neutralization.

Endogenous nutrients, such as host saliva proteins and gingival crevicular fluid, serve as source of nutrients for proteolytic species that promote raising pH within the gingival crevices as a result of the degradation of proteins and the production of ammonia, making the ideal environment for periopathogens to thrive and drive further their selection [55].

Recently, the ecobiological heterogeneity of the salivary ecosystem and the relationships between microbiome, salivary metabolome and host-related salivary parameters were reported [56]. Due to a clear dichotomy presented in the correlations between salivary microbiota and metabolites, it was suggested that individual salivary ecosystems are adapted to either saccharolytic or proteolytic metabolisms. The association between salivary ecotypes and risk for development of oral diseases remains to be assessed in clinical studies.

Metabolomic analyses can also be used to evaluate the effects of dietary components on plaque biofilm and future caries therapies. For example, the metabolome of xylitol was shown to have no effect on glucose metabolism or acid production *in vivo* [46].

A valuable contribution from “OMICS” approaches led to the identification of new treatments based on prebiotics or probiotics. New bacterial species, which can be associated with dental health, have been tested. This was the case for *Streptococcus* A12, which is able to inhibit the growth and intercellular signaling of *S. mutans* and to buffer pH through the arginolytic pathway [39], and *Streptococcus dentisani*, which presents antimicrobial activity on *S. mutans* and is also capable of metabolizing arginine [38]. Both isolated from supragingival plaque of caries-free individuals. Interestingly, analysis of functional genes revealed that a higher enzyme activity was observed in caries-free than caries subjects [57], suggesting that acid fermentation from caries-associated microbiomes may be destroying enzyme activity needed to maintain health.

Regarding the prebiotics, a number of increased evidence supporting the role of arginine metabolism in caries prevention has been shown, due to ammonia production and consequent increase of biofilm pH [58-60]. Using a combination of metatranscriptomics and metabolomics, data suggested that ammonia production from arginine deiminase might be active in initial lesions, whereas urease activity might balance the acidic microbiota of more advanced disease [45]. These findings suggest that the use of commensal bacterial strains may act as probiotics for caries prevention. However, a problem faced by prebiotics or probiotics studies is that little is known about their real effectiveness in clinical situations, as the level of evidence is still limited to unispecies biofilms or *in vitro* studies. An example is tests of strains of *Lactobacilli* as probiotics for dental caries, showing reduction of *S. mutans* in the biofilm. What is the clinical relevance of that antagonist ecologic competition? Are *Lactobacillus* strains really not cariogenic for enamel and dentin? [61].

3.2 CONCLUSIONS

In conclusion, this review highlights the following key points:

1. Integration of “OMICS” data with the biological context is still a challenge;
2. Current ability to analyze microbial composition and function prevents the prospect of developing powerful tools for caries risk assessment;
3. Novel caries biomarkers and development of next-generation diagnostics and therapies for caries control have not evolved to the translational research yet;
4. Due to the lack of standardization at bioinformatics, researchers do not reach a point in common to discover the complex origin of the dysbiosis.

3.3 REFERENCES

1. Petersen PE. Challenges to improvement of oral health in the 21st century--the approach of the WHO Global Oral Health Programme. *Int Dent J*, 2004. 54(6 Suppl 1): p. 329-43.
2. Marsh PD. Microbiology of dental plaque biofilms and their role in oral health and caries. *Dent Clin North Am*, 2010. 54(3): p. 441-54.
3. Harada S, Akhter R, Kurita K, Mori M, Hoshikoshi M, Tamashiro H, et al. Relationships between lifestyle and dental health behaviors in a rural population in Japan. *Community Dent Oral Epidemiol.*, 2005. 33:17-24.
4. Nyvad B, et al. Dental caries from a molecular microbiological perspective. *Caries Res*, 2013. 47(2): p. 89-102.
5. Nascimento MM, et al. Second Era of OMICS in Caries Research: Moving Past the Phase of Disillusionment. *J Dent Res*, 2017. 96(7): p. 733-740.
6. Adler CJ, et al. Sequencing ancient calcified dental plaque shows changes in oral microbiota with dietary shifts of the Neolithic and Industrial revolutions. *Nat Genet*, 2013. 45(4): p. 450-5, 455e1.
7. Loesche WJ. Chemotherapy of dental plaque infections. *Oral Sci Rev*, 1976. 9: p. 65-107.
8. Loesche WJ. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol Rev*, 1986. 50(4): p. 353-80.
9. Tanzer JM, Livingston J, Thompson AM. The microbiology of primary dental caries in humans. *J Dent Educ*, 2001. 65(10): p. 1028-37.

10. Banas JA, Drake DR. Are the mutans streptococci still considered relevant to understanding the microbial etiology of dental caries? *BMC Oral Health*, 2018. 18(1): p. 129.
11. Gross EL, et al., Beyond *Streptococcus mutans*: dental caries onset linked to multiple species by 16S rRNA community analysis. *PLoS One*, 2012. 7(10): p. e47722.
12. Simon-Soro A, et al., A tissue-dependent hypothesis of dental caries. *Caries Res*, 2013. 47(6): p. 591-600.
13. Loesche WJ, Nafe D. Reduction of supragingival plaque accumulations in institutionalized Down's syndrome patients by periodic treatment with topical kanamycin. *Arch Oral Biol*, 1973. 18(9): p. 1131-43.
14. Loesche WJ, Bradbury DR, Woolfolk MP. Reduction of dental decay in rampant caries individuals following short-term kanamycin treatment. *J Dent Res*, 1977. 56(3): p. 254-65.
15. Theilade E. The non-specific theory in microbial etiology of inflammatory periodontal diseases. *J Clin Periodontol*, 1986. 13(10): p. 905-11.
16. Marsh PD. Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. *Adv Dent Res*, 1994. 8(2): p. 263-71.
17. Takahashi N, Nyvad B. Caries ecology revisited: microbial dynamics and the caries process. *Caries Res*, 2008. 42(6): p. 409-18.
18. Marsh PD. Are dental diseases examples of ecological catastrophes? *Microbiology*, 2003. 149(Pt 2): p. 279-94.
19. Rosier BT, et al. Historical and contemporary hypotheses on the development of oral diseases: are we there yet? *Front Cell Infect Microbiol*, 2014. 4: p. 92.
20. Marsh PD, Moter A, Devine DA. Dental plaque biofilms: communities, conflict and control. *Periodontol 2000*, 2011. 55(1): p. 16-35.
21. Human Oral Microbiome Database (HOMD). 2018. Available at. <http://www.homd.org>. Accessed January, 2020.
22. Sampaio-Maia B, Caldas IM, Pereira ML, Perez-Mongiovi D, Araujo R. The Oral Microbiome in Health and Its Implication in Oral and Systemic Diseases. *Adv Appl Microbiol*. 2016. 97:171-210.
23. Aas JA., et al., Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol*, 2005. 43(11): p. 5721-32.
24. Simon-Soro A, Mira A. Solving the etiology of dental caries. *Trends Microbiol*, 2015. 23(2): p. 76-82.
25. Keijser BJ, et al., Pyrosequencing analysis of the oral microflora of healthy adults. *J Dent Res*, 2008. 87(11): p. 1016-20.

26. Zaura E, et al. Defining the healthy "core microbiome" of oral microbial communities. *BMC Microbiol*, 2009. 9: p. 259.
27. Aas JA., et al. Bacteria of dental caries in primary and permanent teeth in children and young adults. *J Clin Microbiol*, 2008. 46(4): p. 1407-17.
28. Tanner AC, et al. Cultivable anaerobic microbiota of severe early childhood caries. *J Clin Microbiol*, 2011. 49(4): p. 1464-74.
29. Kressirer CA, et al. Functional profiles of coronal and dentin caries in children. *J Oral Microbiol*, 2018. 10(1): p. 1495976.
30. Belda-Ferre P, et al. The oral metagenome in health and disease. *Isme j*, 2012. 6(1): p. 46-56.
31. Takahashi N. Oral Microbiome Metabolism: From "Who Are They?" to "What Are They Doing?". *J Dent Res*, 2015. 94(12): p. 1628-37.
32. Hemadi AS, Huang R, Zhou Y, Zou J. Salivary proteins and microbiota as biomarkers for early childhood caries risk assessment. *Int J Oral Sci*. 2017;9:e1.
33. Benitez-Paez A, et al. Microbiota diversity and gene expression dynamics in human oral biofilms. *BMC Genomics*, 2014. 15: p. 311.
34. Duran-Pinedo AE, Frias-Lopez J. Beyond microbial community composition: functional activities of the oral microbiome in health and disease. *Microbes Infect*, 2015. 17(7): p. 505-16.
35. Belda-Ferre P, et al. The human oral metaproteome reveals potential biomarkers for caries disease. *Proteomics*, 2015. 15(20): p. 3497-507.
36. Belstrom D, et al. Metaproteomics of saliva identifies human protein markers specific for individuals with periodontitis and dental caries compared to orally healthy controls. *PeerJ*, 2016. 4: p. e2433.
37. Washio J, et al. Amino acid composition and amino acid-metabolic network in supragingival plaque. *Biomed Res*, 2016. 37(4): p. 251-7.
38. Camelo-Castillo A, et al. *Streptococcus dentisani* sp. nov., a novel member of the mitis group. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2014. 64(Pt 1): p. 60-5.
39. Huang X, et al. A Highly Arginolytic *Streptococcus* Species That Potently Antagonizes *Streptococcus mutans*. *Appl Environ Microbiol*, 2016. 82(7): p. 2187-201.
40. Belstrøm D, Constancias F, Liu Y, Yang L, Drautz-Moses DI, Schuster SC, et al. Metagenomic and metatranscriptomic analysis of saliva reveals disease-associated microbiota in patients with periodontitis and dental caries. *npj Biofilms Microbiomes* 3, 23, 2017.

41. Do T, Sheehy EC, Mulli T, Hughes F, Beighton D. Transcriptomic analysis of three *Veillonella* spp. present in carious dentine and in the saliva of caries-free individuals. *Front Cell Infect Microbiol*. 2015.
42. Dame-Teixeira N, et al. *Actinomyces* spp. gene expression in root caries lesions. *J Oral Microbiol*, 2016. 8: p. 32383.
43. Ev LD. *Candida albicans* e cárie radicular: análise do transcriptoma. Porto Alegre. Dissertação [Mestrado em Clínica Odontológica] - Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2016.
44. Funahashi K, Shiba T, Watanabe T, Muramoto K, Takeuchi Y, Ogawa T, et al. Functional dysbiosis within dental plaque microbiota in cleft lip and palate patients . *Progress in Orthodontics*, 20: 11, 2019.
45. Edlund A, et al. Meta-omics uncover temporal regulation of pathways across oral microbiome genera during in vitro sugar metabolism. *Isme j*, 2015. 9(12): p. 2605-19.
46. Takahashi N, Washio J. Metabolomic effects of xylitol and fluoride on plaque biofilm in vivo. *J Dent Res*, 2011. 90(12): p. 1463-8.
47. Gygi SP, Rochon Y, Franz BR, Aebersold R. Correlation between Protein and mRNA Abundance in Yeast. *Mol Cell Biol*. 1999 Mar;19(3):1720-30.
48. Frias-Lopez J, Duran-Pinedo A. Effect of periodontal pathogens on the metatranscriptome of a healthy multispecies biofilm model. *J Bacteriol*, 2012. 194(8): p. 2082-95.
49. Simon-Soro A, Guillen-Navarro M, Mira A. Metatranscriptomics reveals overall active bacterial composition in caries lesions. *J Oral Microbiol*, 2014. 6: p. 25443.
50. Kreth J, Zhang Y, Herzberg MC. Streptococcal antagonism in oral biofilms: *Streptococcus sanguinis* and *Streptococcus gordonii* interference with *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol*, 2008. 190(13): p. 4632-40.
51. Guo L, et al. *Streptococcus mutans* SpaP binds to RadD of *Fusobacterium nucleatum* ssp. *polymorphum*. *Mol Oral Microbiol*, 2017. 32(5): p. 355-364.
52. Mark Welch JL, et al. Biogeography of a human oral microbiome at the micron scale. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016. 113(6): p. E791-800.
53. Ferrer MD, Mira A. Oral Biofilm Architecture at the Microbial Scale. *Trends Microbiol*, 2016. 24(4): p. 246-248.
54. Takahashi N, Washio J, Mayanagi G. Metabolomics of supragingival plaque and oral bacteria. *J Dent Res*, 2010. 89(12): p. 1383-8.
55. Kobayashi K, Kobayashi K., Soeda W, Watanabe T. Gingival crevicular ph in experimental gingivitis and occlusal trauma in man. *J Periodontol*. 1998. 69:1036-1043.

56. Zaura E, et al. On the ecosystemic network of saliva in healthy young adults. *Isme j*, 2017. 11(5): p. 1218-1231.
57. Yang F, et al. Saliva microbiota carry caries-specific functional gene signatures. *PLoS One*, 2014. 9(2): p. e76458.
58. Liu YL, Nascimento M, Burne RA. Progress toward understanding the contribution of alkali generation in dental biofilms to inhibition of dental caries. *Int J Oral Sci*, 2012. 4(3): p. 135-40.
59. Nascimento MM, et al. The effect of arginine on oral biofilm communities. *Mol Oral Microbiol*, 2014. 29(1): p. 45-54.
60. Nascimento MM, et al, Oral arginine metabolism may decrease the risk for dental caries in children. *J Dent Res*, 2013. 92(7): p. 604-8.
61. Söderling EM, Marttinen AM, Haukioja AL. Probiotic lactobacilli interfere with *Streptococcus mutans* biofilm formation in vitro. *Curr Microbiol*, 2011. 62(2): 618-22.

Table 1 – A summary of some “OMICS” studies that have been performed.

AUTHOR, YEAR	REFERENCES	TECHNIQUE	SAMPLE	MAIN RESULT CLOSER TO TRANSLATIONAL RESEARCH
Simón-Soro et al., 2013	[12]	Metagenomics	Cariou tissue	pH and diet are determinants of the disease during the degradation of enamel, but in dentin caries lesions not only acidogenic but also proteolytic bacteria are involved.
Camelo-Castillo et al., 2014	[38]	Metagenomics	Supragingival plaque of caries-free individuals	<i>Streptococcus dentisani</i> presents antimicrobial activity on <i>S. mutans</i> and seems to moderate biofilm pH through arginine metabolism by the ADS system.
Huang et al., 2016	[39]	Metagenomics	Supragingival plaque of caries-free individuals	<i>Streptococcus</i> A12 presents antimicrobial activity on <i>S. mutans</i> and seems to moderate biofilm pH through arginine metabolism by the arginine deiminase system (ADS).
Belstrom et al., 2017	[40]	Metagenomics Metatranscriptomics	Salivary microbiota	<i>Porphyromonas gingivalis</i> , <i>Tannerella forsythia</i> , <i>Parvimonas micra</i> and <i>Filifactor. alocis</i> were associated with periodontitis. <i>S. mutans</i> and <i>Lactobacillus</i> sp. were associated with dental caries. These findings reinforce the concept that these bacteria are shed from local periodontitis and caries lesions into saliva.
Kressirer et al., 2018	[29]	Metagenomics Metatranscriptomics	Supragingival plaque of caries-free and coronal caries sites from children	<i>Scardovia wiggisiae</i> was considered a new etiological agent of childhood caries. Alcohol dehydrogenase, methylenetetrahydrofolate reductase, and choline kinase genes were detected at higher levels in caries-free suggesting alternative mechanisms to counteract community bacterial acid in health.
Benitez-Paez et al., 2014	[33]	Metatranscriptomics	Supragingival plaque from healthy individuals	Caries-free individuals showed extreme homeostasis with virtually no changes in the active bacterial population after food ingestion.
Benitez-Paez et al., 2014	[33]	Metatranscriptomics	Supragingival plaque from healthy individuals	Specificity according to the biofilm characteristic. In mature biofilms specialized genes have been overexpressed.
Do T et al., 2015	[41]	Metatranscriptomics	Caries lesions and caries-free saliva	There was an overall similarity in transcription profiles in both sample groups suggesting that <i>Veillonella parvula</i> , <i>V. dispar</i> and <i>V. atypica</i> are actively expressing genes that

				are involved in cellular maintenance and survival within diverse environments. In carious lesions, the increased expression of histidine biosynthesis pathway in <i>V. parvula</i> suggests higher intracellular levels of histidine that could provide survival in the acidic environment. Potassium uptake systems may aid in the survival and proliferation of <i>V. parvula</i> in carious lesions.
Damé-Teixeira et al., 2016	[42]	Metatranscriptomics	Root surfaces biofilms	Similar levels of gene expression of <i>Actinomyces</i> spp. were revealed in sound and carious root biofilms.
Ev et al., 2016	[43]	Metatranscriptomics	Root surfaces biofilms	<i>Candida albicans</i> is important to root caries development, and it is expressing genes related to hyphae formation.
Funahashi et al., 2019	[44]	Metatranscriptomics	Supragingival plaque from cleft lip and palate individuals	Ammonia production from ADS might be active in initial lesions, whereas urease activity might balance the acidic microbiota of more advanced disease.
Edlund et al., 2015	[45]	metatranscriptomics metabolomics	Supragingival plaque	Ammonia production from ADS might be active in initial lesions, whereas urease activity might balance the acidic microbiota of more advanced disease.
Takahashi & Washio, 2011	[46]	Metabolomics	Supragingival plaque	Fluoride reduces bacterial acid production from glucose by inhibiting the glycolytic enzyme enolase.
Takahashi & Washio, 2011	[46]	Metabolomics	Supragingival plaque	Xylitol, an important sugar substitute, was shown to have no effect on glucose metabolism or bacterial acid production.
Washio et al., 2016	[37]	Metabolomics	Supragingival plaque	Glutamate might be the main source of ammonia production and contribute to pH-homeostasis.

CAPÍTULO 4 – DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES DA DISSERTAÇÃO

4.1 DISCUSSÃO GERAL

A cárie em dentes permanentes permanece como a condição de saúde mais prevalente em todo o mundo [183]. Evidências demonstram uma maior retenção de dentes na população atual acompanhada por um aumento da incidência de cárie [33]. Esse fato implica um aumento do número de superfícies radiculares expostas ao ambiente bucal que são suscetíveis ao desenvolvimento de cárie radicular, doença que afeta mais de um terço da população geriátrica mundial [22]. A cárie radicular tornou-se um desafio na odontologia devido a sua alta taxa de prevalência e de insucesso dos tratamentos restauradores. Estudos pioneiros dedicados à compreensão da etiologia da cárie dentária propuseram que *S. mutans* seria o agente causador da cárie [2]. *S. mutans*, antes associado somente ao desenvolvimento de lesões em esmalte, passou a ser marcador biológico de cárie radicular [57]. Um estudo realizado demonstrou a complexa maquinaria genética de *S. mutans*, permitindo uma melhor compreensão das funções relacionadas ao início e à progressão da cárie [114]. Apesar de suas importantes estratégias de sobrevivência proporcionarem vantagens competitivas a essa espécie dentro do biofilme, pouco sabe-se sobre a fisiologia e o metabolismo desse microrganismo em seu habitat natural. Dados fornecem evidências de que outros táxons, além de *S. mutans*, estão presentes de maneira numerosa e exibem importantes propriedades fisiológicas no processo de cárie radicular [75]. Além disso, potenciais candidatos envolvidos no desenvolvimento da cárie foram isolados em alguns indivíduos saudáveis [170]. Embora diversos microrganismos façam parte do biofilme cariogênico, *S. mutans* é considerado um importante microrganismo a ser estudado por demonstrar vários fatores de virulência associados ao seu potencial cariogênico [99-101]. Está estabelecido que a cárie dentária é uma doença complexa em que a dieta, o pH da saliva, a anatomia e a composição dentária, o sistema imunológico, entre outros, desempenham um papel fundamental na tendência de desenvolver a doença [184]. Com novas abordagens usando técnicas Ômicas foi possível investigar a avaliação coletiva de várias unidades biológicas relacionadas, como genes, expressão gênica, proteínas e metabólitos. Há um impulso na pesquisa de cárie devido aos avanços das técnicas Ômicas, que os pesquisadores acreditam ser

fundamentais na exploração de novos conhecimentos sobre a etiologia da cárie dentária [176]. No entanto, mesmo com o auxílio dessa avançada tecnologia, ainda não existe consenso sobre o entendimento da dinâmica da comunidade microbiana oral em condições de saúde ou doença, o que dificulta o desenvolvimento de estratégias preventivas contra a cárie dentária. Diante desses desafios, diversas estratégias vêm sendo desenvolvidas como o desenvolvimento de propostas terapêuticas baseadas em interferência por RNA (RNAi) [185], um mecanismo celular responsável pelo silenciamento gênico pós-transcricional atuando sobre o RNA mensageiro (mRNA) ocasionando o silenciamento, por inibição da tradução e/ou degradação do mRNA. Outro método que vem sendo estudado diz respeito à tecnologia CRISPR-Cas9 [186]. O grande interesse suscitado pela tecnologia CRISPR-Cas9 é ser programável para reconhecer e clivar sítios específicos de um gene alvo e, portanto, passível de ser usada para edição de genomas. De maneira geral, métodos como esses podem ser alvos terapêuticos promissores contra a cárie dentária, uma vez que alterações na microbiota de genes específicos associados aos fatores de virulência diminuiriam, conseqüentemente, a nossa dependência da adoção de novos padrões de comportamento advindos do paciente. Entretanto, uma futura aplicação clínica destes modelos terapêuticos ainda requer vigorosas investigações referentes à sua eficácia, seletividade e desenvolvimento de estratégias com efeitos focados em um ecossistema diverso, uma vez que o alvo são os fatores de virulência e não microrganismos específicos.

4.2 CONCLUSÕES

Em conclusão, com relação a análise do transcriptoma de *S. mutans* em ambiente natural de superfície radicular, seguem os pontos-chaves observados:

1. A atividade metabólica de *S. mutans* foi alta em todas as amostras de biofilmes de lesão de cárie radicular enquanto que em amostras de biofilme de superfícies radiculares hígidas foi mínima.
2. Os genes de virulência mais prevalentes em biofilmes de lesão de cárie radicular demonstraram mais expressão dos genes *spaP*, proteína de superfície que apresenta função de adesina, representado pela capacidade de *S. mutans* aderir fortemente e formar biofilmes

tridimensionais sobre a superfície; *glgA* e *fruA*, relacionados à acidogenicidade, representados pela capacidade de produção de ácidos a partir da fermentação de carboidratos; *ciaH*, *comF* e *comD*, relacionados ao *quorum-sensing*, representados pelo processo de comunicação intra e inter espécies microbianas; *gapC*, enzima essencial da via glicolítica, representada por desempenhar funções importantes em vários processos celulares.; *pulA*, relacionado ao processo metabólico de carboidratos, responsável pela síntese e degradação do amido; *SMU_872*, relacionado ao transporte de açúcares, representado por atuar na regulação do transporte e fosforilação do carboidrato frutose; *hrcA*, *ccpA*, *arcC* e *argR*, importantes reguladores transcricionais relacionados à tolerância ao estresse.

3. As funções moleculares e os processos biológicos de sobrevivência dos genes com maior expressão em biofilmes de lesão de cárie radicular e de superfícies radiculares hígidas foram semelhantes.

Embora o *S. mutans* seja um importante microrganismo no desenvolvimento de cárie radicular, por apresentar diversos fatores de virulência que proporcionam vantagens competitivas a esta espécie dentro do biofilme, sua interação com o restante da microbiota é essencial para o entendimento do processo carioso. A cárie dentária compreende um ecossistema diverso, sugerindo uma etiologia polimicrobiana, portanto, estratégias focadas apenas na eliminação do *S. mutans* são provavelmente ineficazes.

Diferentes abordagens Ômicas têm permitido uma caracterização mais completa da composição, do potencial funcional e da atividade desse diversificado microbioma, entretanto novos biomarcadores de cárie não foram descobertos nem foram desenvolvidos testes que poderiam ser eficazes para avaliar o risco de cárie nos estágios pré-clínicos da doença.

Para que esses enormes e heterogêneos conjuntos de dados produzidos pelas técnicas Ômicas tenham sucesso, uma ferramenta chave para estas análises é a bioinformática, que se torna cada vez mais importante, caracterizada por organizar, interpretar, analisar e armazenar todos os dados das Ômicas.

Os desafios são grandes, porém ao utilizá-las, isoladas ou integradas, amparadas pela bioinformática, as Ômicas aplicadas a microrganismos fornecem

dados promissores para os estudos futuros que visem à prospecção, ao desenvolvimento e à inter-relação com outros seres vivos.

CAPÍTULO 5 – PRESS RELEASE

A cárie é uma doença que afeta milhares de pessoas ao redor do mundo em todas as idades. Caracterizada pela destruição dos tecidos dentários, a cárie ocorre como resultado da perda de importantes elementos minerais e orgânicos provocada pelos ácidos gerados pelas bactérias. Microrganismos, como a bactéria *Streptococcus mutans*, são amplamente conhecidos como importantes agentes causadores da cárie dentária. Porém, tendo em vista o pouco conhecimento sobre o comportamento desse microrganismo em seu habitat natural sobre as superfícies dentárias, este trabalho objetivou estudar o papel do *S. mutans* no desenvolvimento da cárie após o auxílio de novas tecnologias para análise de bactérias, denominadas técnicas Ômicas. Os resultados demonstraram que o *S. mutans* é um microrganismo importante no desenvolvimento da cárie, porém outros microrganismos também possuem a capacidade de desenvolver essa doença. Sendo assim, a estratégia que vem sendo proposta por muitos anos de eliminar um microrganismo específico não resolveria a causa da cárie. Hoje, o que existe de tratamento eficiente para a cárie é a mudança de hábito dos indivíduos, pois, alimentos que têm a capacidade de auxiliar as bactérias a produzirem ácidos favorecem o aparecimento das lesões de cárie. Entretanto, pela mudança de comportamento das pessoas ser um grande desafio, a ciência vem tentando descobrir, através das novas tecnologias Ômicas, tratamentos para a cárie que dependam menos do paciente. Por exemplo, alterações na capacidade de produção de ácidos de microrganismos que ajudam a desenvolver a cárie, independente dos hábitos do indivíduo, poderiam controlar o aparecimento da doença.