

## RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)  
autor(a), o texto completo desta tese  
será disponibilizado somente a partir  
de 17/03/2018.

**Remberto Marcelo Argandoña Valdez**

**Papel de cepas de *Streptococcus mutans* e *Bifidobacterium*  
spp. na etiologia ou proteção contra doenças bucais**

**Araçatuba**

**2016**

**Remberto Marcelo Argandoña Valdez**

**Papel de cepas de *Streptococcus mutans* e *Bifidobacterium*  
spp. na etiologia ou proteção contra doenças bucais**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Araçatuba, como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciência Odontológica – Área de Concentração: Saúde Bucal da Criança.

Orientadora: Profa. Dra. Cristiane Duque

**Araçatuba**

**2016**

Catálogo na publicação (CIP)  
Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca da FOA / UNESP

Argandoña Valdez, Remberto Marcelo  
A686p      Papel de cepas de *Streptococcus mutans* e *Bifidobacterium* spp.  
na etiologia ou proteção contra doenças bucais / Remberto Marcelo Argandoña  
Valdez. – Araçatuba, 2016

110 f.: il. ; tab. + 1 CD-ROM

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista,  
Faculdade de Odontologia de Araçatuba  
Orientadora: Prof. Cristiane Duque

1. Cárie dentária 2. Doença periodontal 3. *Streptococcus*  
4. *Lactobacillus* 5. *Bifidobacterium*. I. Título

Black D27  
CDD 617.645

## **Dedicatória**

Dedico primeiramente este trabalho aos meus pais e também à todos que me acolheram em Araçatuba, cidade de ruas calmas, abarrotado de personagens anônimos, e com a sensação permanente de que aqui tudo é possível.

Obrigado Brasil!

## **Agradecimentos**

Em primeiro lugar agradeço a Deus, pela força e guia o tempo inteiro.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cristiane Duque, minha orientadora; uma pessoa determinada em seus projetos, amiga dos alunos e amante de sua profissão. Sou grato, não só pela notável orientação científica, mas, especialmente, pelo permanente incentivo, disponibilidade e cordialidade demonstrada. Nesse momento, não posso deixar de lhe expressar o meu mais profundo e sincero OBRIGADO.

À Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho”, na pessoa do atual Diretor Prof. Dr. Wilson Roberto Poi e do Vice-Diretor Prof. Dr. João Eduardo Gomes Filho.

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciência Odontológica da Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho”, na pessoa do coordenador Prof. Dr. Luciano Tavares Angelo Cintra e do vice-coordenador Prof. Dr. Juliano Pelim Pessan. Particularmente ao ex-coordenador Prof. Dr. Alberto Carlos Botazzo Delbem, pelo acolhimento afetuoso e pelas facilidades brindadas para a realização desse projeto. Agradeço ainda, por toda a disponibilidade manifestada e pelo interesse com que sempre acompanhou o decorrer dos trabalhos.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sandra Maria Herondina Ávila de Aguiar, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cristiane Duque, Prof. Dr. Célio Percinoto, Prof. Dr. Alberto Carlos Botazzo Delbem, Prof. Dr. Juliano Pelim Pessan, Prof. Dr. Robson Frederico Cunha, da Área Saúde Bucal da Criança da Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho”, pela orientação constante e experiências compartilhadas. Especialmente ao Prof. Dr. Robson Frederico Cunha do qual tive o privilégio de ser seu aluno por três anos, além de excelente professor, ele é uma das pessoas mais íntegras que conheci.

Aos funcionários do departamento Mário e Ricardo, pela atenção e colaboração.

À Valéria de Queiroz Marcondes Zagato, Cristiane Regina Lui Matos e Lilian Sayuri Mada da seção de Pós-Graduação da FOA/UNESP, pela atenção que sempre me dispensaram.

Gostaria de deixar aqui um agradecimento especial aos alunos de iniciação científica, Luis Mateus de Almeida Matias e Lucas Lourenço por todo o apoio concedido; agradeço, em particular, a inestimável disponibilidade da Vanessa Rodrigues dos Santos pelo acompanhamento e impulso na evolução do trabalho.

Não poderia esquecer dos meus grandes amigos, colegas, alunos da graduação, mestrandos e doutorandos. Deixo a todos eles o meu apreço e gratidão: Daniela, Danielle, Dinah, Douglas Jesse, Karina, Kelly, Laís, Liliana, Loiane, Luciene, Maria Luiza, Márjully, Natalia, Jackeline, Mariana, Paula, Thayse, Renan e Tatiana. De modo especial a Carla, José Antonio, Kevin e Marcelle.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Argelia Almaguer Flores da Universidade Nacional Autônoma do México–UNAM, obrigado pelos ensinamentos, sugestões e afabilidade com que me acolheu no seu laboratório durante o doutorado-sanduíche. À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Laurie Ann Ximénez-Fyvie, por todos os ensinamentos o meu muito obrigado. Sou grato, também, à doutoranda Adriana Patricia Rodríguez Hernández pela atenção e disponibilidade prestada.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rina María González Cervantes e à Universidade Autônoma Metropolitana, agradeço a valiosa colaboração.

A todos aqueles amigos, embora não mencionados, sempre estiveram presentes ao meu lado ou em pensamento.

Ao campus da FOA-UNESP pela acolhida, em todas as suas dependências.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), pela bolsa concedida e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio-pesquisa.

Por fim, refiro-me a toda minha família, em que cada um, à seu modo, ajudou para que esse projeto pessoal torne-se realidade. Deixo aqui, meu muito obrigado para meus Pais, à Angela e ao Remberto, ao meus irmãos Pablo, Cecilia e Cristian e a minha esposa Daisy que com certeza estão vibrando comigo nesse momento.

## **Epígrafe**

*Quando você quer alguma coisa, todo o Universo conspira para que você realize o seu desejo.*

*Paulo Coelho*



## Resumo geral

Valdez, RMA. Papel de cepas de *Streptococcus mutans* e *Bifidobacterium* spp. na etiologia ou proteção contra doenças bucais. 2016. 110f. Tese (Doutorado em Ciência Odontológica) Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2016.

A boca é um ecossistema complexo composto por centenas de espécies microbianas que apresentam características genotípicas e fenotípicas distintas que permitem sua adaptação e sobrevivência às adversidades desse ambiente. *Streptococcus mutans* é a espécie bacteriana mais relacionada à etiologia da cárie dentária, devido principalmente ao seu potencial acidogênico, acidúrico e na aderência e formação de biofilme dental. Outras espécies bacterianas, como as bifidobactérias, foram detectadas em diversos sítios bucais incluindo lesões cariosas iniciais ou cavitadas e estão sendo relacionadas à etiologia da cárie precoce da infância (CPI). Contrariamente, efeito benéfico na prevenção da doença periodontal tem sido observado para as bifidobactérias pelo fato dessas espécies competirem e interferirem na aderência e formação do biofilme de patógenos periodontais. Assim, ambiguidade em relação ao papel das bifidobactérias na etiologia ou prevenção de doenças bucais está sendo observada na literatura. Este trabalho foi dividido em três capítulos. Os objetivos foram: 1) avaliar a diversidade genotípica e as características fenotípicas de cepas de *S. mutans*, isoladas do biofilme dental de crianças CPI e CPI-severa (CPI-S) em comparação com crianças livres de cárie (LC); 2) avaliar a capacidade de produzir e tolerar ácidos, de formar biofilme e de induzir lesões iniciais de cárie *in vitro* por espécies de bifidobactérias comparadas à de espécies bacterianas já reconhecidas no contexto da cárie dentária e 3) investigar o efeito antagonista *in vitro* de algumas espécies de bifidobactérias sobre biofilmes de *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis* e *Streptococcus oralis*. No capítulo 1, cepas de *S. mutans* de amostras de biofilme de crianças com CPI, CPI-S e LC foram isoladas em meio Agar Mitis Salivarius com bacitracina e avaliadas geneticamente pelo método de AP-PCR (Reação em Cadeia da Polimerase usando Iniciadores Arbitrários) e fenotipicamente pelos métodos de acidogenicidade, verificando o pH final das culturas após exposição a alta concentração de glicose; de aciduricidade, medida pelo crescimento bacteriano após exposição à pHs ácidos e de formação de biofilme *in vitro* com a quantificação da biomassa do biofilme em leitor de ELISA. No Capítulo 2, as seguintes espécies bacterianas foram incluídas: *Bifidobacterium lactis*, *B. longum*, *B. animalis*, *B. dentium*, *S. mutans*, *S. sobrinus*,

*Lactobacillus acidophilus*, *L. casei* e *Actinomyces israeli*. Para avaliação do potencial cariogênico dessas espécies bacterianas foram realizados os testes de acidogenicidade, aciduricidade, formação de biofilme *in vitro* e ensaios de indução de lesão de cárie inicial em dentes bovinos verificando a dureza superficial do esmalte em microdurômetro. Os ensaios de biofilme e de indução de lesão de cárie foram realizados com todas as espécies isoladas ou combinadas com *S. mutans* ou *S. mutans/S.sobrinus*. No capítulo 3, os periodontopatógenos *F. nucleatum*, *P. gingivalis* e uma espécie da microbiota bucal indígena, *S. oralis*, foram cultivados em microplacas para formar biofilmes na presença de *B. longum*, *B. lactis*, *B. infantis*, isoladamente ou em combinação. A capacidade de competição dessas espécies foi avaliada por meio das contagens das bactérias após 24, 72 e 168 h de crescimento empregando a técnica de *checkerboard DNA-DNA hybridization*. Os resultados do capítulo 1 mostraram que não houve diferença na diversidade genotípica nem na capacidade acidogênica de cepas de *S. mutans* obtidas de crianças CPI e CPI-S em comparação com aquelas isoladas de crianças LC. Os genótipos de *S. mutans* de CPI-S formaram mais biofilmes e foram mais tolerantes a ácidos que os isolados LC. Com relação ao capítulo 2, *B. animalis* e *B. longum* foram as espécies mais acidogênicas e acidúricas, comparáveis à *S. mutans* e *L. casei*. Todas as espécies tiveram um aumento significativo na biomassa do biofilme quando combinados com *S. mutans* ou com *S. mutans/S. sobrinus*. A maior perda de esmalte superficial foi produzida quando *B. longum* ou *B. animalis* foram inoculados com *S. mutans* ou *S. mutans/S. sobrinus*. No capítulo 3, os resultados mostraram que *B. infantis* e *B. lactis* tiveram um melhor efeito antagonista sobre crescimento de *F. nucleatum* (24h e 72h) e *P. gingivalis* (168 horas) e não apresentaram influência sobre o crescimento de *S. oralis* (168 horas). Conclui-se que a tolerância ácida parece ser o fator de virulência de *S. mutans* mais importante para a patogênese da cárie precoce da infância. Assim como as bactérias cariogênicas, *B. longum* e *B. lactis* apresentam potencial acidogênico e acidúrico e também capacidade de formar biofilmes e induzir a desmineralização de esmalte em associação com *S. mutans*. Enquanto, *B. lactis* e *B. infantis* exerceram efeito inibitório sobre o crescimento de patógenos periodontais.

## General Abstract

Valdez, RMA. The role of *Streptococcus mutans* strains and *Bifidobacterium* spp. in the etiology or protection against oral diseases. 2016. 110f. Tese (Doutorado em Ciência Odontológica) Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2016.

The mouth is a complex ecosystem composed of hundreds of microbial species with different genotypic and phenotypic characteristics that allow their adaptation and survival in the adversity of that environment. *Streptococcus mutans* is the bacterial species more closely related to the etiology of dental caries, mainly due to its acidogenic and aciduric potential and adherence and formation of dental biofilm. Other bacterial species, such as bifidobacteria, have been detected in oral sites including initial and cavitated carious lesions and have been related to the etiology of early childhood caries (ECC). In contrast, beneficial effect of bifidobacteria in the prevention of periodontal disease has been observed because they compete and interfere with the adherence and biofilm formation by periodontal pathogens. Thus, ambiguity regarding the role of bifidobacteria in the etiology or prevention of oral diseases has been observed in the literature. This work was divided into three chapters. The objectives were: 1) to evaluate the genotypic diversity and phenotypic characteristics of *S. mutans* strains isolated from dental biofilm of ECC and severe-ECC (S-ECC) children compared to caries-free children (CF); 2) to evaluate the ability to produce and tolerate acids, to form biofilm and inducing in vitro initial carious lesions by species of bifidobacteria compared to the bacterial species already recognized in the context of dental caries and 3) to investigate the in vitro antagonistic effect of some bifidobacteria species on biofilms of *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis* and *Streptococcus oralis*. In Chapter 1, *S. mutans* strains from biofilm samples of children with ECC, S-ECC and CF were isolated in Agar Mitis Salivarius with bacitracin and genetically evaluated by AP-PCR method (Arbitrary Primers - Polymerase Chain Reaction) and phenotypically by acidogenicity methods, verifying the final pH of the cultures after exposure to high glucose concentration; aciduricity, measured by bacterial growth after exposure to acid pH and in vitro biofilm formation by means the quantification of the biofilm biomass in ELISA reader. In Chapter 2, the following bacterial species were included: *Bifidobacterium lactis*, *B. longum*, *B. animalis*, *B. dentium*, *S. mutans*, *S. sobrinus*, *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei* and *Actinomyces*

*israeli*. Acidogenicity, aciduricity and biofilm formation assays were performed for evaluating the cariogenic potential of these bacterial species and initial caries lesion induction tests on bovine teeth for checking the surface enamel hardness in microdurometer. Biofilm formation and carious lesion induction assays were performed with all species either alone or in combination with *S. mutans* or *S. mutans* / *S.sobrinus*. In Chapter 3, the periodontal pathogens *F. nucleatum*, *P. gingivalis* and a species of indigenous oral microbiota, *S. oralis*, were cultured in microtiter plates to form biofilms in the presence of *B. longum*, *B. lactis*, *B. infantis*, either alone or in combination. The competition ability of these species was assessed by bacterial counts after 24, 72 and 168 h of growth using the DNA-DNA hybridization checkerboard technique. Results from Chapter 1 showed no difference in the genotypic diversity or acidogenic ability of *S. mutans* strains collected from ECC and S-ECC children compared to those from CF children. The genotypes of *S. mutans* formed higher biofilm biomasses and were more tolerant to acids than those isolated from CF. With respect to chapter 2, *B. animalis* and *B. longum* were the most acidogenic and aciduric species, comparable to *S. mutans* and *L. casei*. All species had a significant increase in biomass of biofilm when combined with *S. mutans* or *S. mutans* / *S. sobrinus*. The greatest loss of surface enamel was produced when *B. longum* or *B. animalis* were inoculated with *S. mutans* or *S. mutans* / *S. sobrinus*. In Chapter 3, the results showed that *B. infantis* and *B. lactis* had a better antagonistic effect on *F. nucleatum* (24h and 72h) and *P. gingivalis* (168 hours) growth and showed no influence on the growth of *S. oralis* (168 hours). It is concluded that acid tolerance seems to be the most important virulence factor of *S. mutans* for the pathogenesis of early childhood caries. As well as the cariogenic bacteria, *B. longum* and *B. lactis* have acidogenic and aciduric potential and also ability to form biofilms and induce enamel demineralization in association with *S. mutans*. While *B. infantis* and *B. lactis* presented inhibitory effect on the growth of periodontal pathogens.

## Lista de Figuras

### Capítulo 1

- Figure 1** Dendrogram with genetic similarity indices (AP-PCR method, primer OPA-02) verified among *S. mutans* strains sampled from biofilm of CF, ECC and S-ECC groups. Individual bands were analyzed by matrices generated by UPGMA analysis using coefficient SSM (simple matching). Tonalities of gray in the dendrogram illustrate identical or highly related isolates ( $SSM \geq 0.819 \pm 0.161$ ). 41
- Figure 2** **Acidogenicity (acid production).** A. Glycolytic curves. Means of pH values through glycolysis. B. Means of the area under the curve (AUC) of glycolytic pH fall. Bars denote standard deviation for both 42
- Figure 3** **Aciduricity (acid tolerance).** Box plots of *S. mutans* counts (converted in log CFU +1) obtained after baseline (Figure A - Time 0) and 60 min (Figure B - Time 60) of exposition to glycine buffer in different pHs. 36 43
- Figure 4** **Biofilm formation.** Absorbance values (550nm) obtained for 48h biofilm of *S. mutans* genotypes from CF, ECC and S-ECC children. 44

### Capítulo 2

- Figure 1** Acidogenicity (acid production). Means (standard deviations) of area under the curve (AUC) of pH values obtained for bacterial strains during pH drop. 66

**Figure 2** Aciduricity (acid tolerance). Means (standard deviations) of 67  
percentage (%) of bacterial growth obtained after baseline (Time  
0) and 60 min (Time 60) of exposition to glycine buffer in pH  
5.0 or pH. 2.8 in relation to pH 7.0.

**Figure 3** Enamel demineralization. Percentage of surface hardness loss 68  
(%SHL) after 7 days of (A) dual-species and (B) multi-species  
biofilm exposure. Sm: *S. mutans* 3VF2, Ss: *S. sobrinus*, Bl: *B.*  
*longum*, Ba: *B. animalis*, Bla: *B.lactis*, Bd: *B. dentium*, Lc: *L.*  
*casei*, La: *L. acidophilus*, Ai: *Aisraelii*

### Capítulo 3

**Figure 1** Antagonism of single species of bifidobacteria on *F. nucleatum* 83  
(A), *P. gingivalis* (B) and *S. oralis* (C) growth.

<sup>a</sup> Different lower letters show statistical difference among the  
groups of bifidobacteria, according to ANOVA and Tukey tests.

\*Statistical difference between 24 and 72h, considering each  
group separately, according to ANOVA and Tukey tests.

‡Statistical difference between 24 and 168h, considering each  
group separately, according to ANOVA and Tukey tests.

¥ Statistical difference between 72 and 168h, considering each  
group separately, according to ANOVA and Tukey tests.

**Figure 2** Antagonism of the combinations of bifidobacteria on *F.* 85  
*nucleatum* (A), *P. gingivalis* (B) and *S. oralis* (C) growth.

<sup>a</sup> Different lower letters show statistical difference among the  
groups of bifidobacteria, according to ANOVA and Tukey tests.

\* Statistical difference between 24 and 72h, considering each  
group separately, according to ANOVA and Tukey tests.

‡ Statistical difference between 24 and 168h, considering each group separately, according to ANOVA and Tukey tests.

¥ Statistical difference between 72 and 168h, considering each group separately, according to ANOVA and Tukey tests.

## Lista de Tabelas

### Capítulo 1

- Table 1** Description of the study population 39
- Table 2** Number of isolates and genotypes of *S. mutans* from CF, ECC and S-ECC groups. 40

### Capítulo 2

- Table 1** Biofilm formation. Absorbance values (550nm) obtained after 48h of bacterial biofilm formation. 64
- Table 2** Virulence factors comparisons among the groups of microorganisms 65

### Capítulo 3

- Table 1** Experimental groups for testing the antagonism of bifidobacteria on periodontal bacteria. 81



## Lista de Abreviaturas

AAPD: The American Academy of Pediatric Dentistry; Academia Americana de Odontopediatria.

ANOVA: Analysis Of Variance; Análise de variância

AP-PCR: Arbitrary Primer Polymerase Chain Reaction; Reação em cadeia da polimerase com utilização de iniciadores aleatórios.

AUC: Area Under the Curve; área sob a curva

ATCC: American Type Culture Collection; Coleção de microorganismos norte-americana

ATP: Adenosine triphosphate; Trifosfato de adenosina.

ATR: Acid tolerance response; resposta de tolerância ácida

BHI: Brain Heart Infusion Agar; Agar Infusão de Cérebro e Coração

CD: Conducted by One Examiner; Conduzido por um examinador

CF: Caries Free; Livre de cárie

CFU: Colony-forming units; Unidades formadoras de colônia

dmfs: Decayed Missing Filled Surfaces; Superfícies cariadas, perdidas ou restauradas

DNA: Deoxyribonucleic acid; Ácido desoxirribonucleico

dNTPs: desoxirribonucleotídeo trifosfatado

ECC: Early childhood caries; Cárie precoce da infância

EDTA: Ethylenediamine tetraacetic acid; ácido etilendiamino tetra-acético

EPS: extracellular polysaccharides; polissacarídeos extracelulares

FAO/WHO: Food and Agriculture Organization of the United Nations/ World Health Organization; Organização para Alimentação e Agricultura das Nações Unidas/ Organização Mundial de Saúde

GtfB: Glucosyltransferase B; Glicosiltransferase B

MRS: Man, Rogosa and Sharpe

MS: *mutans streptococci*

MSB: Mitis Salivarius Agar with bacitracin/Agar Mitis Salivarius com bacitracina

OD: Optical density; Densidade óptica

PCR: Polymerase Chain Reaction; Reação em cadeia da polimerase

pH: potencial Hidrogeniônico

RNA: Ribonucleic acid; ácido ribonucleico

SDS: sodium dodecyl sulfate; Dodecil sulfato de sódio

S-ECC: Severe early childhood caries; Cárie severa da infância

SSM: Simple Matching Coefficient; Coeficiente de similaridade

SH: Surface Hardness; dureza de superfície

TE buffer: Tris-EDTA buffer; tampão Tris-EDTA

TSA: Trypticase Soy Agar; Ágar de soja Trypticase

TBE: Tris-borato-EDTA; Base Tris, ácido Bórico e EDTA.

WHO: World Health Organization; Organização Mundial de Saúde

## Sumário

1 INTRODUÇÃO GERAL	20
2 Capítulo 1- <b>Genotypic diversity and phenotypic traits of <i>Streptococcus mutans</i> isolates and their relation to severity of early childhood caries</b>	
ABSTRACT	26
INTRODUCTION	27
MATERIALS AND METHODS	28
RESULTS	31
DISCUSSION	32
CONCLUSION	35
REFERENCES	36
TABLES	39
FIGURES	41
3 Capítulo 2 - <b>In vitro investigation of the cariogenic potential of bifidobacteria compared with caries associated bacteria</b>	
ABSTRACT	47
INTRODUCTION	48
MATERIALS AND METHODS	49
RESULTS	53
DISCUSSION	55
REFERENCES	59
TABLES	64
FIGURES	66

**4 Capítulo 3 - Molecular analysis of the in vitro antagonist growth effect of Bifidobacteria on the biofilm of periodontal pathogens**

ABSTRACT	71
INTRODUCTION	72
RESULTS AND DISCUSSION	73
MATERIAL AND METHODS	75
REFERENCES	77
TABLES	81
FIGURES	83
ANEXO A	86
ANEXO B	87
ANEXO C	88
ANEXO D	89
ANEXO E	95
ANEXO F	98
REFERENCIAS – INTROD. GERAL	106

## Referências - Introdução Geral<sup>1</sup>

Abrahamsson TR, Sinkiewicz G, Jakobsson T, Fredrikson M, Bjorksten B. Probiotic lactobacilli in breast milk and infant stool in relation to oral intake during the first year of life. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2009; 49:349-354.

American Academy of Pediatric Dentistry, Council on Clinical Affairs . Policy on Early Childhood Caries (ECC): Classifications, Consequences, and Preventive Strategies. *Oral Health Policies* 2014:50-52.

Baca-Castañón ML, De la Garza-Ramos MA, Alcázar-Pizaña AG, Grondin Y, Coronado-Mendoza A, Sánchez-Najera RI, Cárdenas-Estrada E, Medina-De la Garza CE, Escamilla-García E. Antimicrobial Effect of *Lactobacillus reuteri* on Cariogenic Bacteria *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus mutans*, and Periodontal Diseases *Actinomyces naeslundii* and *Tannerella forsythia*. *Probiotics and Antimicrobial Proteins.* 2015;7 (1): 1-8.

Beighton D, Gilbert SC, Clark D, Mantzourani M, Al-Haboubi M, Ali F, Ransome E, Hodson N, Fenlon M, Zoitopoulos L, Gallagher J. Isolation and identification of *Bifidobacteriaceae* from human saliva. *Appl Environ Microbiol.* 2008; 74: 6457–6460.

Caglar E, Sandalli N, Twetman S, Kavaloglu S, Ergeneli S, Selvi S. Effect of yoghurt with *Bifidobacterium DN-173 010* on salivary mutans streptococci and lactobacilli in young adults. *Acta Odont Scand.* 2005; 63:317-320.

Caglar E, Kuscu OO, Selvi Kuvvetli S, Kavaloglu Cildir S, Sandalli N, Twetman S. Short-term effect of ice-cream containing *Bifidobacterium lactis* Bb-12 on the number of salivary mutans streptococci and lactobacilli. *Acta Odontol Scand.* 2008; 66:154-158.

Cildir SK, Germec D, Sandalli N, Ozdemir FI, Arun T, Twetman S. Reduction of salivary mutans streptococci in orthodontic patients during daily consumption of yoghurt containing probiotic bacteria. *Eur J Orthod.* 2009; 31:407- 4011.

Drury TF, Horowitz AM, Ismail IA, Maertens, MP, Rozier GR, Selwitz, RH. Diagnosing and reporting early childhood caries for research purposes. *J Public Health Dent.* 1999; 59:192-197.

---

<sup>1</sup> Referências de acordo com as normas Vancouver

Duque C, Negrini TC, Sacono NT, Boriollo MFG, Hofling JF, Hebling J, Spolidorio DMP. Genetic polymorphism of *Streptococcus mutans* strains associated with incomplete caries removal. *Braz J Oral Sci.* 2009; 8(1): 2-8.

Fushinobu S. Unique sugar metabolic pathways of bifidobacteria. *SBiosci Biotechnol Biochem.* 2010; 74(12):2374-84.

Gibson GR, Wang X. Regulatory effects of bifidobacteria on the growth of other colonic bacteria. *J Appl Bacteriol.* 1994; 77: 412–420.

Haukioja A, Yli-Knuutila H, Loimaranta V, Kari K, Ouwehand AC, Meurman JH, Tenovuo J. Oral adhesion and survival of probiotic and other lactobacilli and bifidobacteria in vitro. *Oral Microbiol Immunol.* 2006;21:326–332.

Hojo K, Nagaoka S, Murata S, Taketomo N, Ohshima T, Maeda N. Reduction of vitamin K concentration by salivary *Bifidobacterium* strains and their possible nutritional competition with *Porphyromonas gingivalis*. *J Appl Microbiol.* 2007;103: 1969–1974.

Lemos JA, Abranches J, Burne RA. Responses of cariogenic streptococci to environmental stresses. *Curr Issues Mol Biol.* 2005;7:95-107.

Mantzourani M, Gilbert SC, Sulong HN, Sheehy EC, Tank S, Fenlon M, Beighton D. The isolation of bifidobacteria from occlusal carious lesions in children and adults. *Caries Res.* 2009; 43: 308–313.

Mattos-Graner RO, Correa MSNP, Latorre MRO, Peres RCR, Mayer MPA. Mutans streptococci oral colonization in 12-30-month-old Brazilian children over a one year follow-up period. *J Public Health Dent.* 2001a;61(3):161-67.

Mattos-Graner RO, Zelante F, Line RC, Mayer MP. Association between caries prevalence and clinical, microbiological and dietary variables in 1.0 to 2.5-year-old Brazilian children. *Caries Res.* 1998; 32: 319-23

Marsh PD. Dental plaque as a biofilm: the significance of pH in health and caries. *Compend Contin Educ Dent.* 2009; 30 (2): 76-8, 80, 83-7; quiz 88, 90.

Modesto M, Biavati B, Mattarelli P. Occurrence of the family Bifidobacteriaceae in human dental caries and plaque. *Caries Res* 2006; 40: 271–276.

Mohebbi SZ, Virtanen JI, Vahid-Golpayegani M, Vehkalahti MM. Feeding habits as determinants of early childhood caries in a population where prolonged breastfeeding is the norm. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2008; 36:363-9.

Nagaoka S, Hojo K, Murata S, Mori T, Ohshima T, Maeda N. Interactions between salivary *Bifidobacterium adolescentis* and other oral bacteria: in vitro coaggregation and coadhesion assays. *FEMS Microbiol Lett.* 2008;281:183-189.

Nakajo K, Takahashi N, Beighton D. Resistance to acidic environments of caries-associated bacteria: *Bifidobacterium dentium* and *Bifidobacterium longum*. *Caries Res.* 2010; 44(5):431-7.

Nozari A, Motamedifar M, Seifi N, Hatamizargaran Z, Ranjbar MA. The effect of iranina customary used probiotic yogurt on the children's salivary cariogenic microflora. *J Dent.* 2015 Jun; 16(2): 81-6.

Paster BJ, Olsen I, Aas JA, Dewhirst D. The breadth of the bacterial diversity in the human periodontal pocket and other oral sites. *Periodontology* 2000. 2006;2: 80-87.

Ramos-Gomez FJ, Weintraub JA, Gansky SA, Hoover CI, Featherstone JD. Bacterial, behavioral and environmental factors associated with early childhood caries. *J Clin Pediatr Dent.* 2002;26(2):165-73.

Sansone C, van Houte J, Joshipura K, Kent R, Margolis HC. The association of mutans streptococci and non-mutans streptococci capable of acidogenesis at a low pH with dental caries on enamel and root surfaces. *J Dent Res.* 1993; 72:508-516.

Saxelin M, Tynkkynen S, Mattila-Sandholm T, de Vos WM. Probiotic and other functional microbes: from markets to mechanisms. *Curr Opin Biotechnol* 2005; 16:204-211.

Saxena, D., Y. Li, and P. W. Caufield. 2005. Identification of unique bacterial gene segments from *Streptococcus mutans* with potential relevance to dental caries by subtraction DNA hybridization. *J Clin Microbiol.* 43:3508-3511.

Saxena D, Caufield PW, Li Y, Brown S, Song J, and Norman R. Genetic classification of severe early childhood caries by use of subtracted DNA fragments from *Streptococcus mutans*. *J Clin Microbiol* 2008 Sep;46(9):2868-73.

SBBRASIL. Ministério da Saúde. Departamento de Atenção Básica. Projeto SB Brasil 2003: condições de saúde bucal da população brasileira 2002-2003: resultados principais. Brasília: Ministério da Saúde, abr. 2010. [http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/projeto\\_sb2004.pdf](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/projeto_sb2004.pdf). Acesso: 16/01/2016.

Smith DJ. Dental caries vaccines: prospects and concerns. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2002;13:335-349.

Socransky SS, Haffajee AD. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontol* 2000 2002; 28:12-55.

Taipale T, Pienihakkinen K, Alanen P, Jokela J, Soderling E. Administration of *Bifidobacterium animalis subsp. lactis BB-12* in early childhood: a post trial effect on caries occurrence at four years of age. *Caries Res* 2013;47(5):364-72.

Tanner AC, Kent RL Jr, Holgerson PL, Hughes CV, Loo CY, Kanasi E, Chalmers NI, Johansson I. Microbiota of severe early childhood caries before and after therapy. *J Dent Res*. 2011 Nov; 90(11):1298-305.

Teughels W, Teughels W, Durukan A, Ozelik O, Pauwels M, Quirynen M, Haytac MC. Clinical and microbiological effects of *Lactobacillus reuteri* probiotics in the treatment of chronic periodontitis: a randomized placebo-controlled study; *J. Clin. Periodontol*. 2013;40(11):1025-1035.

Torlakovic L, Klepac-Ceraj V, Ogaard B, Cotton SL, Paster BJ, Olsen I. Microbial community succession on developing lesions on human enamel. *J Oral Microbiol*. 2012; 4. doi: 10.3402/jom.v4i0.16125. Epub 2012 Mar 14.

Twetman S, Derawi B, Keller M, Ekstrand K, Yucel-Lindberg T, Stecksén-Blicks C. Short-term effect of chewing gums containing probiotic *Lactobacillus reuteri* on the levels of inflammatory mediators in gingival crevicular fluid. *Acta Odontol Scand*. 2009;67(1):19–24.



van Essche M, Loozen G, Godts C, Boon N, Pauwels M, Quirynen M., Teughels W. Bacterial antagonism against periodontopathogens. *J Periodontol* 2013;84:801-811.

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; 75:1008-1014.

van Houte J, Sansone C, Joshipura K, Kent R. In vitro acidogenic potential and mutans streptococci of human smooth-surface plaque associated with initial caries lesions and sound enamel. *J Dent Res.* 1991; 7:1497-1502.

van Ruyven FO, Lingstrom P, van Houte J, Kent R. Relationship among mutans streptococci, “low-pH” bacteria, and iodophilic polysaccharide-producing bacteria in dental plaque and early enamel caries in humans. *J Dent Res* 2000;79:778-784.

World Health Organization. WHO. Media Center. Oral Health. Em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs318/en/>. Acesso em 22 de janeiro de 2016.

Zhu Y, Xiao L, Shen D, Hao Y. Competition between yogurt probiotics and periodontal pathogens in vitro. *Acta Odontol Scand.* 2010; 68:261–8.

