

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 18/05/2019.



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



ELKIN JAHIR FLOREZ SALAMANCA

INFLUÊNCIA DA MATRIZ EXTRACELULAR NA EXPRESSÃO GÊNICA DE
***Streptococcus mutans* EM BIOFILME CARIOGÊNICO.**

Araraquara

2017



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



ELKIN JAHIR FLOREZ SALAMANCA

INFLUÊNCIA DA MATRIZ EXTRACELULAR NA EXPRESSÃO GÊNICA DE
***Streptococcus mutans* EM BIOFILME CARIOGÊNICO.**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Reabilitação Oral Área de Materiais Odontológicos e Prótese, da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista para obtenção do título de Mestre em Reabilitação Oral.

Orientador: Profa. Dra. MARLISE INÊZ KLEIN

Araraquara

2017

Florez Salamanca, Elkin Jahir

Influência da matriz extracelular na expressão gênica de *Streptococcus mutans* em biofilme cariogênico / Elkin Jahir Flórez Salamanca. -- Araraquara: [s.n.], 2017

126 f.; 30 cm.

Dissertação (Mestrado em Prótese) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia

Orientadora: Profa. Dra. Marlise Inêz Klein Furlan

1. Biofilmes 2. Cárie dentária 3. Expressão gênica 4. Matriz extracelular 5. *Streptococcus mutans* I. Título

ELKIN JAHIR FLOREZ SALAMANCA

**INFLUÊNCIA DA MATRIZ EXTRACELULAR NA EXPRESSÃO GÊNICA DE
Streptococcus mutans EM BIOFILME CARIOGÊNICO**

Comissão Julgadora:

Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Presidente e orientador: Profa. Dra. Marlise Inês Klein Furlan

2ºExaminador: Profa. Dra. Fernanda Lourenção Brighenti

3ºExaminador: Profa. Dra. Cristiane Duque

Araraquara 18/05/17

DADOS CURRICULARES

ELKIN JAHIR FLOREZ SALAMANCA

NASCIMENTO: 28/03/1988 – Bucaramanga, Santander – Colômbia

FILIAÇÃO: Ana Ines Salamanca Maluendas (Mãe)
Domingo Florez Jaimes (Pai)

2015/Atual Curso de Pós-Graduação em Reabilitação Oral, nível Mestrado
Universidade Estadual Paulista UNESP, Araraquara- Brasil

2005/2011 Curso de Graduação em Odontologia
Universidad Santo Tomas de Aquino Bucaramanga, Santander -
Colômbia

AGRADECIMENTOS

Durante uma palestra na Universidade de Cornell em 1994, Carl Sagan apresentou para o público “o pálido ponto azul”, uma fotografia do planeta Terra feita em 14 de fevereiro de 1990, pela sonda espacial Voyager 1 a uma distância de cerca de 6,4 bilhões de quilômetros, aproveitando o momento compartilhou suas reflexões sobre o significado mais profundo por trás da ideia do pálido ponto azul:

“Desse ponto de observação, a Terra talvez não apresentasse nenhum interesse especial. Para nós, no entanto, ela é diferente. Olhem de novo para o ponto. É ali. É a nossa casa. Somos nós. Nesse ponto, todos aqueles que amamos, que conhecemos, de quem já ouvimos falar, todos os seres humanos que já existiram, vivem ou viveram as suas vidas.

... todos os inventores e exploradores, professores de moral, políticos corruptos, “superastros”, “líderes supremos”, todos os santos e pecadores da história da nossa espécie, ali – num grão de poeira suspenso num raio de sol. A Terra é um palco muito pequeno em uma imensa arena cósmica.

...Nossas atitudes, nossa pretensa importância, a ilusão de que temos uma posição privilegiada no Universo, tudo é posto em dúvida por esse ponto de luz pálida. O nosso planeta é um pontinho solitário na grande escuridão cósmica circundante. Em nossa obscuridade, em meio a toda essa imensidão, não há nenhum indício de que, de algum outro mundo, virá socorro que nos salve de nós mesmos.

... Talvez não exista melhor comprovação da loucura das vaidades humanas do que esta distante imagem de nosso mundo minúsculo. Para mim, ela sublinha a responsabilidade de nos relacionarmos mais bondosamente uns com os outros e de preservarmos e amarmos o pálido ponto azul, o único lar que conhecemos”¹³⁸.

Com este pensamento, só quero agradecer a cada uma das pessoas amáveis com as quais convivo e compartilho, que tem facilitado este período de aprendizado. Obrigado por toda paciência, apoio e orientação, graças a vocês, humildemente, posso afirmar que estou fazendo um aporte de escala molecular para um universo de dimensões cósmicas.

Aproveito também para agradecer as instituições que fizeram possível o desenvolvimento da pesquisa: à Faculdade de Odontologia da UNESP por disponibilizar equipamentos e laboratórios, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro brindado mediante o processo 2014/054230 e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa 830071/20008.

Florez Salamanca EJ. Influência da matriz extracelular na expressão gênica de *Streptococcus mutans* em biofilme cariogênico [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2017.

Resumo

A cárie representa a doença humana mais prevalente no mundo, sua etiologia é dependente de biofilme e da dieta. Os biofilmes são comunidades altamente dinâmicas e estruturadas de células microbianas que se encontram embebidas em uma matriz extracelular tridimensional (MEC). Esta estrutura age como uma barreira que limita a difusão e fornece estabilidade e proteção aos microrganismos. *Streptococcus mutans* tem um potencial acidogênico e acidúrico, orquestra a construção do biofilme e modula sua virulência, produzindo ácidos lipoteicóicos (LTA), DNA extracelular (eDNA) e exopolissacarídeos (EPS), promovendo assim a adesão e coesão microbiana. Ao mesmo tempo a MEC produzida dificulta a difusão de metabólitos no biofilme. O objetivo do estudo foi determinar por meio de RT-qPCR a dinâmica da expressão de genes de *S. mutans* associados ao metabolismo de LTA (*dltABCD*, *SMU_775c*), eDNA (*lytST*, *IrgAB*, *ccpA*) e exopolissacarídeos (*gtfBCD*, *gbpB*, *dexA*), durante o desenvolvimento da MEC de biofilmes mistos em um estudo longitudinal. Biofilmes mistos de *S. mutans* UA159 (cepa parental) ou Δ *gtfB* (mutante com deleção do gene *gtfB*), *Actinomyces naeslundii* ATCC 12104 e *Streptococcus gordonii* DL-1 foram formados em discos de hidroxiapatita revestidos de película salivar, e cultivados a 37° C e 5% de CO₂ em caldo triptona e extrato de levedura contendo 25% de saliva e alternando 0,1% de sacarose (escassez) e 0,5% de sacarose + 1% de amido (abundância). O pH do meio de cultura manteve-se ácido durante o período experimental, sendo menor após longos períodos de incubação. Todos os genes foram expressos em todas as idades (29, 43, 55, 67, 79, 91, 103 e 115 horas) nos dois tipos de biofilme, apresentado níveis distintos. Os genes associados ao LTA e EPS foram expressos de um modo semelhante, tendo maiores níveis de expressão duas horas após o fornecimento de carboidratos o mesmo comportamento foi registrado para as duas cepas, com maiores níveis de expressão para UA159 parental. Os genes associados a eDNA apresentaram uma dinâmica de expressão diferente entre a cepa parental e a cepa Δ *gtfB*. Para UA159 os genes *IrgAB* foram altamente expressos em 29h, e não demonstram ter uma relação com os genes *lytST*, enquanto que no biofilme Δ *gtfB* observou-se uma

relação inversa entre *lytS* e *IrgAB* nos horários em que o meio estava “fresco” (duas horas após a troca). Para os dois biofilmes o gene *lytT* apresentou os níveis de expressão mais baixos sem ter diferenças entre os horários. O produto do gene *ccpA* ativa ou reprime a expressão de determinados genes como resposta à disponibilidade de carboidratos, e esta relação com carboidratos foi evidente para UA159. Portanto, a deleção de *gtfB* influencia a dinâmica de expressão dos genes avaliados, diminuindo a magnitude de expressão principalmente dos genes associados com EPS, e alternando o perfil de expressão de genes associados com a presença de eDNA na matriz extracelular.

Palavras-chave: Biofilmes. Cárie dentária. Expressão gênica. Matriz extracelular. *Streptococcus mutans*.

Florez Salamanca EJ. Influence of the extracellular matrix on *Streptococcus mutans* gene expression in a cariogenic biofilm [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2017.

Abstract

Dental caries represents the most prevalent human disease worldwide, its etiology is biofilm-diet dependent. Biofilms are highly dynamic and structured communities of microbial cells that are enmeshed in a three-dimensional extracellular matrix (ECM). This structure acts as a diffusion-limiting barrier providing stability and protection to the microorganisms. *Streptococcus mutans* is acidogenic, aciduric, and orchestrates the biofilm build-up process. It modulates the biofilm's virulence by producing lipoteichoic acids (LTA), extracellular DNA (eDNA) and exopolysaccharides (EPS), thereby promoting microbial adhesion and cohesion. The resulting ECM hinders diffusion in the biofilm. The aim of the study was to determine via RT-qPCR the dynamics of expression of *S. mutans* genes associated with LTA (*dltABCD*, *SMU_775c*), eDNA (*lytST*, *IrgAB*, *ccpA*) and exopolysaccharides (*gtfBCD*, *gbpB*, *dexA*) metabolism, during ECM development in mixed-species biofilm by time-lapse studies. Mixed-species biofilms of *S. mutans* UA159 (parental strain) or Δ *gtfB* (mutant with deletion of the gene *gtfB*), *Actinomyces naeslundii* ATCC 12104 and *Streptococcus gordonii* DL-1 were formed onto saliva-coated hydroxyapatite discs. These biofilms were cultivated at 37°C and 5% CO₂ in triptone with yeast extract containing saliva 25% and alternating 0.1% sucrose (scarcity) and 0.5% sucrose + 1% starch (abundance). The pH of the spent media remained acid during the experimental periods, and was lower after prolonged incubation periods. All genes were expressed at distinct levels in both biofilm types at all ages (29, 43, 55, 67, 79, 91, 103 and 115 hours). Genes associated with LTA and EPS were expressed in a similar way, having higher expression levels two hours after providing carbohydrates. Both strains presented similar expression profile, with higher expression levels in UA159 biofilm. Genes associated with eDNA presented a different expression dynamic between the parental strain and Δ *gtfB* strain. In UA159 biofilms *IrgAB* genes were highly expressed at 29h, and did not appear to be related with *lytST* genes, while in Δ *gtfB* biofilms an inverse relationship between *lytS* and *IrgAB* was detected at times when the medium was "fresh" (two hours after medium change). For both

biofilms, the *lytT* gene presented the lowest expression levels, without having differences between the periods. The product of *ccpA* gene activates or represses the expression of certain genes as a response to the carbohydrates availability, this phenomenon more evident in UA159 biofilm. Therefore, the deletion of *gtfB* influences the expression dynamics of the evaluated genes, decreasing both the magnitude of the expression of genes associated with EPS, and changing the expression profile of associated genes with the presence of eDNA in the matrix.

Key words: Biofilms. Dental caries. Extracellular matrix. Gene expression. *Streptococcus mutans*.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	14
2.1 Cárie Dental.....	14
2.1.1 Definição.....	14
2.1.2 Epidemiologia da cárie.....	16
2.2 Biofilme Dental.....	18
2.2.1 Definição.....	18
2.2.2 Formação do biofilme.....	19
2.2.3 Microrganismos cariogênicos.....	21
2.3 Matriz Extracelular de Biofilme	22
2.3.1 Exopolissacarídeos.....	23
2.3.2 DNA extracelular (eDNA).....	27
2.3.3 Ácidos lipoteicóicos (LTA).....	29
2.4 Microrganismos e Genes de Interesse Envolvidos no Desenvolvimento da Cárie.....	32
3 PROPOSIÇÃO.....	41
4 MATERIAL E MÉTODO.....	42
4.1 Delineamento e Padronização de Primers.....	42
4.1.1 Delineamento.....	42
4.1.2 Padronização.....	44
4.2 Formação de Biofilmes.....	58
4.2.1 Preparo dos biofilmes.....	58
4.2.2 Formação de película salivar.....	58
4.2.3 Inóculo bacteriano e formação do biofilme misto.....	59
4.3 Isolamento do RNA e Síntese de cDNA para Análise da Dinâmica da Expressão Gênica dos Biofilmes Via qPCR.....	63
4.3.1 Remoção e processamento do biofilme.....	63
4.3.2 Isolamento do RNA.....	64
4.3.3 Síntese de cDNA.....	67
4.3.4 Expressão gênica via qPCR.....	68
4.4 Análises Estatísticas.....	69

5 RESULTADOS.....	70
5.1 Dinâmica do pH do Meio de Cultura Durante o Crescimento dos Biofilmes.....	70
5.2 Dinâmica de Expressão Gênica de <i>S. mutans</i> em Biofilmes Mistos.....	71
5.2.1 Dinâmica de expressão gênica de <i>S. mutans</i> UA159.....	71
5.2.2 Dinâmica de expressão gênica de <i>S. mutans</i> $\Delta gffB$.....	80
5.3 Comparação da Expressão Gênica entre os Biofilmes Formados pelas Cepas de <i>S. mutans</i> Parental UA159 e Mutante $\Delta gffB$.....	88
6 DISCUSSÃO.....	98
7 CONCLUSÃO.....	107
REFERÊNCIAS.....	108
ANEXO A.....	124

1 INTRODUÇÃO

Os biofilmes são considerados uma das formas de vida mais bem-sucedidas, pois são comunidades de células microbianas que se organizam dentro de um microambiente fornecido pela matriz extracelular³⁹. Essa matriz extracelular (MEC) é fundamental para a existência dos biofilmes, pois a mesma fornece uma estrutura tridimensional que gera estabilidade, além de afetar a distribuição e difusão de produtos metabólicos dos microrganismos dessas comunidades (tanto nos ambientes internos do biofilme, quanto no externo que circunda o biofilme) deixando-os disponíveis para serem utilizados por outros organismos que habitam o biofilme³⁹.

Streptococcus mutans é considerado um dos principais microrganismos associados ao desenvolvimento da cárie dentária. Ele produz exoenzimas glucosiltransferases (Gtfs) e frutossiltransferases (Ftf) para a formação da MEC rica em exopolissacarídeos quando sacarose e amido estão disponíveis¹⁶. Ainda, DNA extracelular (eDNA) e ácidos lipoteicóicos (LTA do inglês *lipoteichoic acids*) extracelulares são detectados em elevadas quantidades em biofilmes cariogênicos^{22, 125, 137}.

Os açúcares da dieta que são fermentados por *S. mutans* e outros organismos acidogênicos facilitam a formação de microambientes altamente ácidos (pH 4,5 – 5,5) dentro do biofilme e na interface do biofilme - superfície de hidroxiapatita¹⁷⁶. À medida que ácidos são produzidos e mantidos dentro do biofilme (sem neutralização pela saliva), o estresse ácido aumenta, a diversidade microbiana é reduzida, o que favorece a proliferação de uma microbiota acidogênica e altamente tolerante ao ácido¹⁵⁷. Consequentemente, a acidez local assegura o crescimento do biofilme e a dissolução do tecido mineralizado.

O entendimento dos mecanismos biológicos responsáveis pela construção da MEC de biofilmes cariogênicos é necessário para o desenvolvimento de estratégias preventivas e terapêuticas, tornando-se importante esclarecer a influência dos componentes da MEC na expressão gênica de *S. mutans* e de sua virulência. Portanto, no presente estudo foi avaliado a expressão dos genes associados com metabolismo de eDNA (*lytST*, *IrgAB*, *ccpA*) e

de LTA (*dltABCD*, *SMU_775c*), bem como de genes relacionados à produção de exopolissacarídeos da MEC (*gtfBCD*, *gbpB*, *dexA*) usando biofilmes mistos in vitro com cepa parental e cepa mutante com deleção do gene *gtfB*.

7 CONCLUSÃO

Todos os genes de *S. mutans* avaliados no estudo foram expressos durante as diferentes idades do biofilme, tendo diversos níveis e diferentes comportamentos:

- Os genes relacionados com o metabolismo do LTA foram fortemente influenciados pela disponibilidade de recursos, apresentando um comportamento e valores semelhantes entre os biofilmes crecidos pelas duas cepas UA159 e $\Delta gtfB$ (exceto o gene *dltB*).
- Os genes associados a eDNA apresentam a maior variabilidade entre as duas cepas. O operon *IrgAB* apresentou um pico de expressão as 29h para biofilme UA159. No caso dos biofilmes crecido com $\Delta gtfB$ se observou uma relação inversa entre o gene *lytS* e *IrgAB*.
- A expressão dos genes associados à EPS estava diretamente relacionada com uma maior disponibilidade de carboidratos. O comportamento das duas cepas foi bem semelhante, porém, a magnitude de expressão foi menor para $\Delta gtfB$.

O gene *gtfB* demonstrou sua importância na construção do biofilme, pois foi afetada a expressão (e conseqüente acúmulo) de alguns constituintes principais da MEC (i.e., EPS e LTA).

REFERÊNCIAS*

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. Abranches J, Nascimento MM, Zeng L, Browngardt CM, Wen ZT, Rivera MF, et al. CcpA regulates central metabolism and virulence gene expression in *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol.* 2008;190(7):2340-9.
3. Ahn SJ, Qu MD, Roberts E, Burne RA, Rice KC. Identification of the *Streptococcus mutans* LytST two-component regulon reveals its contribution to oxidative stress tolerance. *BMC Microbiol.* 2012; 1 (12): 187.
4. Ahn SJ, Rice KC, Oleas J, Bayles KW, Burne RA. The *Streptococcus mutans* Cid and Lrg systems modulate virulence traits in response to multiple environmental signals. *Microbiology.* 2010; 156 (10):3136-47.
5. Ahn SJ, Rice KC. Understanding the *Streptococcus mutans* Cid/Lrg system through CidB function. *Appl Environ Microbiol.* 2016; 82 (20): 6189-203.
6. Ajdić D, McShan WM, Mclaughlin RE, Savić G, Chang J, Carson MB, et al. Genome sequence of *Streptococcus mutans* UA159, a cariogenic dental pathogen. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99 (22):14434-9.
7. Allesen-Holm M, Barken KB, Yang L, Klausen M, Webb JS, Kjelleberg S, et al. A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms. *Mol Microbiol.* 2006; 59 (4):1114-28.
8. Bagramian RA, Garcia-Godoy F, Volpe AR. The global increase in dental caries. A pending public health crisis. *Am J Dent.* 2009; 21 (1): 3-8.
9. Banas JA, Vickerman MM. Glucan-binding proteins of the oral streptococci. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2003; 14 (2):89-99.
10. Banas JA, Russell RR, Ferretti JJ. Sequence analysis of the gene for the glucan-binding protein of *Streptococcus mutans* Ingbritt. *Infect Immun.* 1990; 58(3): 667-73.
11. Banas JA. Virulence properties of *Streptococcus mutans*. *Front Biosci.* 2004; 9:1267-77.

* De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/Home/Biblioteca/guia-de-normalizacao-marco-2015.pdf>

12. Bayles KW. The biological role of death and lysis in biofilm development. *Nat Rev Microbiol.* 2007; 5(9):721-6.
13. Becker MR, Paster BJ, Leys EJ, Moeschberger ML, Kenyon SG, Galvin JL, et al. Molecular analysis of bacterial species associated with childhood caries. *J Clin Microbiol.* 2002; 40(3): 1001-9.
14. Bergeron LJ, Morou-Bermudez E, Burne RA. Characterization of the fructosyltransferase gene of *Actinomyces naeslundii* WVU45. *J Bacteriol.* 2000; 182 (13):3649-54.
15. Bowen WH, Amsbaugh SM, Monell-Torrens S, Brunelle J, Kuzmiak-Jones H, Cole MF. A method to assess cariogenic potential of foodstuffs. *J Am Dent Assoc.* 1980; 100 (5): 677–81.
16. 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.
17. Bowen, William H. The Stephan Curve revisited. *Odontology* 2013; 101 (1): 2-8.
18. Branda SS, Vik S, Friedman L, Kolter R. Biofilms: the matrix revisited. *Trends Microbiol.* 2005; 13 (1):20-6.
19. Brock JH, Reiter B. Chemical and biological properties of extracellular slime produced by *Staphylococcus aureus* grown in high-carbohydrate, high-salt medium. *Infect Immun.* 1976; 13 (3): 653–60.
20. Bustin, SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem.* 2009; 55 (4): 611-22.
21. Carlsson, J. Bacterial metabolism in dental biofilms. *J Adv Dent Res.* 1997; 11 (1): 75-80.
22. Castillo MCP. Função de DNA extracelular e de ácido lipoteicoico nas propriedades estruturais e funcionais da matriz extracelular de biofilmes cariogênicos [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da Unesp; 2016.
23. Chiu TH, Baker JJ. Lipoteichoic acid from *Streptococcus sanguis* is a natural glucosyl acceptor for glucosyltransferases. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994; 202 (3):1407-12.

24. Ciardi JE, Reilly JA, Haller RH, Bowen WH, Rølla G. The role of lipoteichoic acid in the adherence and colonization of oral streptococci. In: Shockman GD, Wicken AJ, editor. Chemistry and biological activities of bacterial surface amphiphiles. New York: Academic Press; 1981. p. 353-64.
25. Cross SE, Kreth J, Zhu L, Sullivan R, Shi W, Qi F, Gimzewski JK. Nanomechanical properties of glucans and associated cell-surface adhesion of *Streptococcus mutans* probed by atomic force microscopy under in situ conditions. *Microbiology*. 2007; 153 (Pt 9): 3124–32.
26. Cury JA de Oliveira BH, AP dos Santos, Tenuta LM. Are dental fluoride releasing materials clinically effective on caries control? *Dent Mater*. 2016; 32 (3): 323-33
27. Cury JA, Koo H. Extraction and purification of total RNA from *Streptococcus mutans* biofilms. *Anal Biochem*. 2007; 365 (2):208-14.
28. Das T, PK Sharma, Busscher HJ, van der Mei HC, Krom BP. Role of extracellular DNA in initial bacterial adhesion and surface aggregation. *Appl Environ Microbiol*. 2010; 76 (10): 3405-8.
29. Denapaite D, Brückner R, Hakenbeck R, Vollmer W. Biosynthesis of teichoic acids in *Streptococcus pneumoniae* and closely related species: lessons from genomes. *Microb Drug Resist*. 2012; 18 (3):344-58.
30. Duarte S, Klein MI, Aires CP, Cury JA, Bowen WH, Koo H. Influences of starch and sucrose on *Streptococcus mutans* biofilms. *Oral Microbiol Immunol*. 2008; 23 (3):206-12.
31. Duque C, Stipp RN, Wang B, Smith DJ, Höfling JF, Kuramitsu HK, et al. Downregulation of GbpB, a component of the VicRK regulon, affects biofilm formation and cell surface characteristics of *Streptococcus mutans*. *Infect Immun*. 2011; 79 (2): 786-96.
32. Dye BA, Tan S, Smith V, Lewis BG, Barker LK, Thornton-Evans G, et al. Trends in oral health status: United States, 1988-1994 and 1999-2004. *Vital Health Stat 11*. 2007; (248):1-92.
33. Ellwood DC, Tempest DW. Effects of environment on bacterial wall content and composition. *Adv Microb Physiol*. 1972; 7: 83–116.
34. Fejerskov O, Manji F. Reactor paper: risk assessment in dental caries. In: Bader JD, editor. Risk assessment in dentistry. North Carolina, Chapel Hill: University of Dental Ecology; 1990. p. 215–7.

35. Fejerskov O. Changing paradigms in concepts on dental caries: consequences for oral health care. *Caries Res* 2004; 38 (3): 182 – 91.
36. Firestone AR, Schmid R, Muhlemann HR. Cariogenic effects of cooked wheat starch alone or with sucrose and frequency-controlled feedings in rats. *Arch Oral Biol.* 1982; 27 (9): 759-63.
37. Fitzgerald RJ, Adams BO, Fitzgerald DB, Knox KW. Cariogenicity of human plaque lactobacilli in gnotobiotic rats. *J Dent Res.* 1981; 60(5):919-26.
38. Fitzgerald RJ, Fitzgerald DB, Adams BO, Duany LF. Cariogenicity of human oral lactobacilli in hamsters. *J Dent Res.* 1980;59(5):832-7.
39. Flemming HC, Wingender J. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol.* 2010; 8(9):623-33.
40. Flemming HC, Wingender J, Szewzyk U, Steinberg P, Rice SA, Kjelleberg S. Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nat Rev Microbiol.* 2016; 14(9): 563-75.
41. Fu DT, Robyt JF. Maltodextrin acceptor reactions of *Streptococcus mutans* 6715 glucosyltransferases. *Carbohydr Res.* 1991; 217: 201-11.
42. Götz F. *Staphylococcus* and biofilms. *Mol Microbiol.* 2002; 43(6): 1367–78.
43. Gregoire S, Xiao J, Silva BB, Gonzalez I, Agidi PS, Klein MI, et al. Role of glucosyltransferase B in interactions of *Candida albicans* with *Streptococcus mutans* and with an experimental pellicle on hydroxyapatite surfaces. *Appl Environ Microbiol.* 2011; 77(18):6357-67.
44. Grönroos L, Saarela M, Mättö 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.
45. Gross M, Cramton SE, Götz F, Peschel A. Key role of teichoic acid net charge in *Staphylococcus aureus* colonization of artificial surfaces. *Infect Immunol.* 2001; 69(5): 3423-6.
46. Gründling A, Schneewind O. Synthesis of glycerol phosphate lipoteichoic acid in *Staphylococcus aureus*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007; 104 (20): 8478-83.
47. 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.

48. Guo L, Shi W. Salivary biomarkers for caries risk assessment. *J Calif Dent Assoc.* 2013; 41(2):107-9, 112-8.
49. Haas W, Banas JA. The glucan binding domain of the *Streptococcus mutans* glucan binding protein. *Adv Exp Med Biol.* 1997; 418: 707-8.
50. Haisman RJ, Jenkinson HF. Mutants of *Streptococcus gordonii* Challis over-producing glucosyltransferase. *J Gen Microbiol.* 1991; 137 (3):483-9.
51. Hamada S, Slade HD. Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiol Rev.* 1980; 44 (2):331-84.
52. Hannig C, Ruggeri A, Al-Khayer B, Schmitz P, Spitzmüller B, Deimling D, et al. Electron microscopic detection and activity of glucosyltransferase B, C, and D in the in situ formed pellicle. *Arch Oral Biol.* 2008; 53 (11):1003-10.
53. Hardy L, Jacques NA, Forester H, Campbell LK, Knox KW, Wicken AJ. Effect of fructose and other carbohydrates on the surface properties, lipoteichoic acid production, and extracellular proteins of *Streptococcus mutans* Ingbritt grown in continuous culture. *Infect Immun.* 1981; 31 (1): 78-87.
54. Hayacibara MF, Koo H, Vacca-Smith AM, Kopec LK, Scott-Anne K, Cury JA, et al. The influence of mutanase and dextranase on the production and structure of glucans synthesized by streptococcal glucosyltransferases. *Carbohydr Res.* 2004; 339 (12): 2127-37.
55. Hayes M, Da Mata C, Cole M, McKenna G, Burke F, Allen PF. Risk indicators associated with root caries in independently living older adults. *J Dent.* 2016; 51: 8-14.
56. Hazlett KR, Mazurkiewicz JE, Banas JA. Inactivation of the gene of *Streptococcus mutans* gbpA alters structural and functional aspects of plaque biofilm which are compensated by recombination of the genes gtfB and gtfC. *Infect Immun.* 1999; 67 (8): 3909-14.
57. Hazlett, KR, Michalek SM, Banas JA. Inactivation of the gbpA gene of *Streptococcus mutans* increases virulence and promotes in vivo accumulation of recombinations between the glucosyltransferase B and C genes. *Infect Immun* 1998; 66 (5): 2180-5.
58. Hicks J, Garcia-Godoy F, Flaitz C. Biological factor in dental caries: role of saliva and dental plaque in dynamic process of demineralization and remineralization (Part 1). *J Clin Pediatr Dent* 2003; 28 (1): 47 – 52.

59. Hicks J, Garcia-Godoy F, Flaitz C. Biological factor in dental caries: enamel structure and caries process in the dynamic process of demineralization and remineralization (Part 2). *J Clin Pediatr Dent.* 2004; 28 (2): 119 - 24.
60. Hicks J, Garcia-Godoy F, Flaitz C. Biological factor in dental caries: role of remineralization and fluoride in the dynamic process of demineralization and remineralization (Part 2). *J Clin Pediatr Dent.* 2004; 28: (3) 203 - 14.
61. Hogg SD, Lightfoot I. Interaction of streptococcal lipoteichoic acid with artificial tooth pellicle. *Arch Oral Biol.* 1989; 34 (8): 615–20.
62. Hogg SD, Whiley RA, De Soet JJ. Occurrence of lipoteichoic acid in oral streptococci. *Int J Syst Bacteriol.* 1997; 47 (1):62-6.
63. Hojo K, Nagaoka S, Ohshima T, Maeda DNAs. Bacterial interactions in dental biofilm development. *J Dent Res* 2009; 88 (11):. 982-90.
64. Hope CK, Wilson M. Analysis of the effects of chlorhexidine on oral biofilm vitality and structure based on viability profiling and an indicator of membrane integrity. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48 (5):1461-8.
65. Hu W, Li L, Sharma S, Wang J, McHardy I, Lux R, et al. DNA builds and strengthens the extracellular matrix in *Myxococcus xanthus* biofilms by interacting with exopolysaccharides. *PLoS One.* 2012; 7 (12): e51905.
66. Hwang G, Klein MI, Koo H. Analysis of the mechanical stability and surface detachment of mature biofilms by *Streptococcus mutans* applying a range of external shear forces. *Biofouling.* 2014; 30 (9): 1079-91.
67. Hwang G, Liu Y, Kim D, Sun V, Aviles-Reyes A, Kajfasz JK, et al. Simultaneous spatiotemporal mapping of in situ pH and bacterial activity within an intact 3D microcolony structure. *Sci Rep.* 2016; 6: 32841.
68. Igarashi K, Lee IK, Schachtele CF. Effect of dental plaque age and bacterial composition on the pH of artificial fissures in human volunteers. *Caries Res.* 1990;24(1):52-8.
69. Jacques NA, Hardy L, Campbell LK, Knox KW, Evans JD, Wicken AJ. Effect of carbohydrate source and growth conditions on the production of lipoteichoic acid by *Streptococcus mutans* Ingbritt. *Infect Immun.* 1979; 26 (3):1079-87.

70. Jakubovics NS, Gill SR, SE Iobst, Vickerman MM, Kolenbrander PE. Regulation of gene expression in a mixed-genus community: stabilized arginine biosynthesis in *Streptococcus gordonii* by coaggregation with *Actinomyces naeslundii*. *J Bacteriol.* 2008; 190 (10): 3646-57.
71. Jordan HV, Keyes PH. Aerobic, gram-positive, filamentous bacteria as etiologic agents of experimental periodontal disease in hamsters. *Arch Oral Biol.* 1964; 9(4):401-14.
72. Karatan E, Watnick P. Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2009; 73 (2):310-47.
73. 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.
74. Keyes, PH. The infectious and transmissible nature of experimental dental caries. *Arch Oral Biol.* 1960; 1(4): 304-20,.
75. Kidd EAM, Fejerskov O. What constitutes dental caries? Histopathology of carious enamel and dentin related to the action of cariogenic biofilms. *J Dent Res.* 2004; 83(Suppl 1): C35 - 8.
76. Klapper I, CJ Rupp, Title D, Purevdorj B Stoodley P. Viscoelastic fluid description of bacterial biofilm materials properties. *Biotechnol Bioeng.* 2002; 80 (3): 289-96.
77. Klein MI, DeBaz L, Agidi S, Lee H, Xie G, Lin AH, et al. Dynamics of *Streptococcus mutans* transcriptome in response to starch and sucrose During biofilm development. *PLoS One* 2010; 5 (10): e13478.
78. Klein MI, Duarte S, Xiao J, Mitra S, Foster TH, Koo H. Structural and molecular basis of the role of starch and sucrose in *Streptococcus mutans* biofilm development. *Appl Environ Microbiol.* 2009; 75 (3): 837-41.
79. Klein MI, Hwang G, Santos PHS, Campanella OH, Koo H. *Streptococcus mutans*-derived extracellular matrix in cariogenic oral biofilms. *Front Cell Infect Microbiol.* 2015, 5:10.
80. Klein MI, Scott-Anne KM, Gregoire S, Rosalen PL, Koo H. Molecular approaches for viable bacterial population and transcriptional analyses in a rodent model of dental caries. *Mol Oral Microbiol.* 2012; 27 (5):350-61

81. Klein MI, Xiao J, Lu B, Delahunty CM, Yates III JR, Koo H. Streptococcus mutans protein synthesis during mixed-species biofilm development by high-throughput quantitative proteomics. *PLoS One*. 2012; 7 (9):e45795.
82. Koo H, Falsetta ML, Klein MI. The exopolysaccharide matrix: a virulence determinant of cariogenic biofilm. *J Dent Res*. 2013; 92 (12):1065-73
83. Kovács M, Halfmann A, Fedtke I, Heintz M, Peschel A, Vollmer W, et al. A functional *dlt* operon, encoding proteins required for incorporation of d-alanine in teichoic acids in gram-positive bacteria, confers resistance to cationic antimicrobial peptides in *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol*. 2006;188 (16):5797-805.
84. Krasse B. The Vipeholm dental caries study: recollections and reflections 50 years later. *J Dent Res*. 2001; 80 (9):1785-8.
85. Kreth J, Vu H, Zhang Y, Herzberg MC. Characterization of hydrogen peroxide-induced DNA release by *Streptococcus sanguinis* and *Streptococcus gordonii*. *J Bacteriol*. 2009; 191 (20): 6281-91.
86. Kuramitsu HK, Wondrack L, McGuinness M. Interaction of *Streptococcus mutans* glucosyltransferase with teichoic acids. *Infect Immun*. 1980; 29 (2): 376-82.
87. Lemos JA, Burne RA. A model of efficiency: stress tolerance by *Streptococcus mutans*. *Microbiology*. 2008; 154 (11):3247-55.
88. Levine M. Susceptibility to dental caries and the salivary proline-rich proteins. *Int J Dent*. 2011; 2001: 953412..
89. Li Y, Burne RA. Regulation of the *gtfBC* and *ftf* gene of *Streptococcus mutans* in biofilms in response to pH and carbohydrate. *Microbiology*. 2001; 147 (10): 2841-8.
90. Liao S, Klein MI, Heim KP, Fan Y, Bitoun JP, Ahn SJ, et al. *Streptococcus mutans* extracellular DNA is upregulated during growth in biofilms, actively released via membrane vesicles, and influenced by components of the protein secretion machinery. *J Bacteriol*. 2014; 196 (13):2355-66.
91. Liljemark WF, Bloomquist C. Human oral microbial ecology and dental caries and periodontal diseases. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1996; 7 (2): 180-98.
92. Loesche WJ. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol Rev*. 1986; 50 (4): 353–80.

93. Lynch DJ, Fountain TL, Mazurkiewicz JE, Banas JA. Glucan-binding proteins are essential for shaping *Streptococcus mutans* biofilm architecture. *FEMS Microbiol Lett.* 2007; 268 (2):158-65.
94. Manji F, Fejerskov O. Dental caries in developing countries in relationship to the appropriate use of fluorides. *J Dent Res* 1990; 69 (2 Suppl): 733-41,
95. Mann EE, Wozniak DJ. *Pseudomonas* biofilm matrix composition and niche biology. *FEMS Microbiol Rev.* 2012; 36 (4):893-916.
96. Marcenes W, Kassebaum NJ, Bernabé E, Flaxman A, Naghavi M, Lopez A, et al. Global burden of oral conditions in 1990-2010: a systematic analysis. *J Dent Res.* 2013; 92(7):592-7.
97. Marsh PD. Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. *Adv Dent Res.* 1994; 8 (2): 263–71.
98. Marsh PD. Are dental diseases examples of ecological catastrophes? *Microbiology.* 2003; 149 (Pt 2): 279-94.
99. Mattos-Graner RO, Klein MI, Smith DJ. Lessons learned from clinical studies: roles of mutans streptococci in the pathogenesis of dental caries. *Curr Oral Health Rep.* 2014; 1 (1): 70–8.
100. Mattos-Graner RO, Smith DJ, King WF, Mayer MP. Water-insoluble glucan synthesis by mutans streptococcal strains correlates with caries incidence in 12- to 30-month-old children. *J Dent Res.* 2000; 79 (6):1371-7.
101. Mattos-Graner RO, Zucchi P, Smith DJ, Duncan MJ. Mutant analysis of the gene encoding glucan binding protein B indicates an essential role in *Streptococcus mutans* (abstract 91). *J Dent Res.* 2002; 81(Spec Iss A):A- 40.
102. Mattos-Graner RO, Jin S, King WF, Chen T, Smith DJ, Duncan MJ. Cloning of the *Streptococcus mutans* gene encoding glucan binding protein B and analysis of genetic diversity and protein production in clinical isolates. *Infect Immun.* 2001; 69 (11): 6931-41.
103. Mattos-Graner RO, Porter KA, Smith DJ, Hosogi Y, Duncan MJ. Functional analysis of glucan binding protein B from *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol.* 2006; 188 (11): 3813-25
104. Melvaer KL, Helgeland K, Rölla G. A charged component in purified polysaccharide preparations from *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguis*. *Arch Oral Biol.* 1974; 19 (7):589-95.

105. Melvaer KL, Helgeland K, Rølla G. Some physical and chemical properties of 'soluble' and 'insoluble' polysaccharides produced by strains of *Streptococcus mutans* and *sanguis*. *Caries Res.* 1972; 6 (1):79.
106. Miller CH. Degradation of sucrose by whole cells and plaque of *Actinomyces naeslundii*. *Infect Immun.* 1974; 10 (6): 1280-91.
107. Ministério da Saúde. Brasil. Conheça a política que faz muitos brasileiros voltarem a sorrir. Brasília. 2015. [acesso 2017 mar 10]. Disponível em: http://dab.saude.gov.br/portaldab/ape_brasil_sorridente.php
108. Ministério da Saúde, Brasil. SB BRASIL 2010 Pesquisa Nacional de Saúde Bucal. Brasília: Editora MS; 2012. [acesso 2017 mar 07]. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/pesquisa_nacional_saude_bucal.pdf
109. Morris A, Steele J, White DA. The oral cleanliness and periodontal health of UK adults in 1998. *Br Dent J.* 2001;191(4):186-92.
110. Nakano K, Ooshima T. Serotype classification of *Streptococcus mutans* and its detection outside the oral cavity. *Future Microbiol.* 2009; 4(7): 891–902.
111. Neuhaus FC, Baddiley J. A continuum of anionic charge: structures and functions of D-alanyl-teichoic acids in gram-positive bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2003; 67(4):686-723.
112. Newbrun E. Histopathology of dental caries. In: Newbrun E, *Cariology*. Baltimore: Williams & Wilkins; 1979.
113. Nobbs AH, Lamont RJ, Jenkinson HF. *Streptococcus* adherence and colonization. *Microbiol Mol Biol Rev* 2009; 73 (3): 407-50.
114. Nolan T, Hands RE, Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat Protoc.* 2006; 1 (3): 1559-82.
115. Nyström T. Global systems approach to the physiology of the starved cell. In: Kjelleberg S, editor. *Starvation in bacteria*. New York: Springer; 1993. p. 129-50.
116. 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.

117. Nyvad B, Kilian M. Comparison of the initial streptococcal microflora on dental enamel in caries-active and in caries-inactive individuals. *Caries Res.* 1990; 24 (4):267-72.
118. Oppenheim FG, Salih E, Siqueira WL, Zhang W, Helmerhorst EJ. Salivary proteome and its genetic polymorphisms. *Ann N Y Acad Sci.* 2007; 1098:22-50.
119. Ouanounou A. Xerostomia in the geriatric patient: causes, oral manifestations, and treatment. *Compend Contin Educ Dent.* 2016; 37 (5):306-11.
120. Paes-Leme AF, Koo H, Bellato CM, Bedi G, Cury JA. The role of sucrose in cariogenic dental biofilm formation--new insight. *J Dent Res.* 2006; 85 (10): 878-87.
121. Palmer RJ, Gordon SM, Cisar JO, Kolenbrander PE. Coaggregation-mediated interactions of streptococci and actinomyces detected in initial human dental plaque. *J Bacteriol.* 2003; 185 (11): 3400–9.
122. Palmer RJ. Composition and development of oral bacterial communities. *Periodontology 2000.* 2014; 64 (1): 29 - 39
123. Parisotto TM, Stipp R, Rodrigues LK, Mattos-Graner RO, Costa LS, Nobre-Dos-Santos M. Can insoluble polysaccharide concentration in dental plaque, sugar exposure and cariogenic microorganisms predict early childhood caries? A follow-up study. *Arch Oral Biol.* 2015; 60 (8):1091-7.
124. Paster BJ, Boches SK, Galvin JL, Ericson RE, Lau CN, Levanos VA, Sahasrabudhe A, Dewhirst FE. Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J Bacteriol.* 2001; 183 (12):3770-83
125. Perry JA, Cvitkovitch DG, Lévesque CM. Cell death in *Streptococcus mutans* biofilms: a link between CSP and extracellular DNA. *FEMS Microbiol Lett.* 2009; 299 (2):261-66.
126. Petersen FC, Tao L, Scheie AA. DNA Binding-Uptake System: a Link between Cell-to-Cell Communication and Biofilm Formation. *J. Bacteriol.* 2005; 187 (13): 4392–400.
127. Petersen PE. World Health Organization Global policy for improvement of oral health - World Health Assembly 2007. *Int Dent J.* 2008; 58 (3): 115-21.

128. Pucca GA Jr, Gabriel M, de Araujo ME, de Almeida FC. Ten years of national oral health policy in Brazil: innovation, boldness, and numerous challenges. *J Dent Res.* 2015; 94(10):1333-7
129. Reese S, Guggenheim B. A novel TEM contrasting technique for extracellular polysaccharides in *in vitro* biofilms. *Microsc Res Tech.* 2007; 70 (9):816-22.
130. Reichmann NT, Gründling A. Location, synthesis and function of glycolipids and polyglycerolphosphate lipoteichoic acid in Gram-positive bacteria of the phylum Firmicutes. *FEMS Microbiol Lett.* 2011; 319 (2):97-105.
131. Ribeiro CC, Tabchoury CP, Del Bel Cury AA, Tenuta LM, Rosalen PL, Cury JA. Effect of starch on the cariogenic potential of sucrose. *Br J Nutr.* 2005; 94 (1):44-50.
132. Rickard AH, Gilbert P, High NJ, Kolenbrander PE, PS Handley. Bacterial coaggregation: an integrated process in the development of multi-species biofilms. *Trends Microbiol* 2003; 11 (2): 94-100.
133. Robinson C, Strafford S, Rees G, Brookes SJ, Kirkham J, Shore RC, et al. Plaque biofilms: the effect of chemical environment on natural human plaque biofilm architecture. *Arch Oral Biol.* 2006; 51(11):1006-14.
134. Rogers HJ, Morgan AG, Batley H, Deery C. Why, what and how: caries control for erupting molars. *Dent Update* 2015; 42 (2):154-6, 159.
135. Rogers JD, Palmer RJ Jr, Kolenbrander PE, Scannapieco FA. Role of *Streptococcus gordonii* amylase-binding protein A in adhesion to hydroxyapatite, starch metabolism, and biofilm formation. *Infect Immun.* 2001; 69 (11): 7046-56.
136. Rölla G, Ciardi JE, Bowen WH. Identification of IgA, IgG, lysozyme, albumin, alpha-amylase and glucosyltransferase in the protein layer adsorbed to hydroxyapatite from whole saliva. *Scand J Dent Res.* 1983; 91 (1):186-90.
137. Rölla G, Oppermann RV, Bowen WH, Ciardi JE, Knox KW. High amounts of lipoteichoic acid in sucrose-induced plaque *in vivo*. *Caries Res.* 1980; 14 (4):235-8.
138. Sagan C. Voce está aqui. In: Sagan C. Pálido ponto azul uma visão da humanidade no espaço. São Paulo: Companhia das letras; 1996.
139. Sahin K, Khashai F, Forghany A, Krasieva T, Wilder-Smith P. Exploring mechanisms of biofilm removal. *Dentistry (Sunnyvale).* 2016; 6 (4): 371.

140. Sampaio-Maia B, Monteiro-Silva F. Acquisition and maturation of oral microbiome throughout childhood: an update. *Dent Res J*. 2014; 11(3): 291–301.
141. Sanders WE, Sanders CC. Modification of normal flora by antibiotics: effects on individuals and the environment. In: Koot RK, Sande MA, editor. *New dimensions in antimicrobial chemotherapy*. New York: Churchill Livingstone; 1984. p. 217–41.
142. Scannapieco FA, Torres G, Levine MJ. Salivary alpha-amylase: role in dental plaque and caries formation. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1993; 4 (3-4): 301-7.
143. Scannapieco FA, Torres GI, Levine MJ. Salivary amylase promotes adhesion of oral streptococci to hydroxyapatite. *J Dent Res*. 1995; 74 (7): 1360-6.
144. Schilling KM, Bowen WH. The activity of glucosyltransferase adsorbed onto saliva-coated hydroxyapatite. *J Dent Res*. 1988; 67 (1):2-8.
145. Schooling SR, Hubley A, TJ Beveridge. Interactions of DNA With biofilm-derived membrane vesicles. *J Bacteriol*. 2009; 191 (13): 4097-102.
146. Selwitz RH, Ismail AI, Pitts NB. Dental caries. *Lancet*. 2007; 369 (9555):51-9.
147. Siqueira WL, Zhang W, Helmerhorst EJ, Gygi SP, FG Oppenheim. Identification of protein components in vivo human acquired enamel pellicle using LC-ESI-MS / MS. *J Proteome Res* 2007; 6 (6): 2152-60.
148. Smith EG, Spatafora GA. Gene regulation in *S. mutans*: complex control in a complex environment. *J Dent Res*. 2012;91 (2):133-41.
149. Soares CL. Constructing public oral health policies in Brazil: issues for reflection. *Braz Oral Res*. 2012; 26 (Suppl 1): 94-102.
150. Socransky SS, Hubersak C, Propas D. Induction of periodontal destruction in gnotobiotic rats by a human oral strain of *Actinomyces naeslundii*. *Arch Oral Biol*. 1970; 15 (10):993-5.
151. Spatafora G, Rohrer K, Barnard D, Michalek S. A *Streptococcus mutans* mutant that synthesizes elevated levels of intracellular polysaccharide is hypercariogenic in vivo. *Infect Immun*. 1995; 63 (7):2556-63.

152. Spatafora GA, Sheets M, June R, Luyimbazi D, Howard K, Hulbert R, et al. Regulated expression of the *Streptococcus mutans* *dlt* genes correlates with intracellular polysaccharide accumulation. *J Bacteriol.* 1999; 181 (8):2363-72.
153. Srinivasan D, Louis CJ. Evaluation of caries in deciduous second molar and adjacent permanent molar in mixed dentition. *J Pharm Biomed Sci.* 2015; 7 (2):S572-5.
154. Steinberger RE, Holden PA. Extracellular DNA in single- and multiple-species unsaturated biofilms. *Appl Environ Microbiol.* 2005; 71 (9):5404-10.
155. Stewart PS, Franklin MJ. Physiological heterogeneity in biofilms. *Nat Rev Microbiol.* 2008; 6 (3):199-210.
156. Stipp RN, Gonçalves RB, Höfling JF, Smith DJ, Mattos-Graner RO. Transcriptional analysis of *gtfB*, *gtfC*, and *gbpB* and their putative response regulators in several isolates of *Streptococcus mutans*. *Oral Microbiol Immunol.* 2008; 23 (6): 466-73.
157. Takahashi N, Nyvad B. The role of bacteria in the caries process: ecological perspectives. *J Dent Res.* 2011; 90 (3): 294-303
158. Takahashi N. Oral microbiome metabolism: from "who are they?" to "what are they doing?". *J Dent Res.* 2015; 94 (12):1628-37
159. Tanzer JM, Thompson, Sharma K, Vickerman MM, Haase EM Scannapieco FA. *Streptococcus mutans* out-compete *Streptococcus gordonii* in vivo. *J Dent Res* 2012; 91 (5): 513-9.
160. Ten Cate JM. Novel anticaries and remineralizing agents: prospects for the future. *J Dent Res.* 2012; 91 (9): 813-5.
161. The Human Microbiome Project Consortium. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature.* 2012; 486 (7402): 207-14.
162. Thurnheer T, Gmür R, Shapiro S, Guggenheim B. Mass transport of macromolecules within an in vitro model of supragingival plaque. *Appl Environ Microbiol.* 2003; 69 (3): 1702-9.
163. Vacca-Smith AM, Scott-Anne KM, Whelehan MT, Berkowitz RJ, Feng C, Bowen WH. Salivary glucosyltransferase B as a possible marker for caries activity. *Caries Res.* 2007; 41 (6): 445-50.

164. Vacca-Smith AM, Bowen WH. Binding properties of streptococcal glucosyltransferases for hydroxyapatite, saliva-coated hydroxyapatite, and bacterial surfaces. *Arch Oral Biol.* 1998; 43 (2):103-10.
165. Vacca-Smith AM, Venkitaraman AR, Quivey RG Jr, Bowen WH. Interactions of streptococcal glucosyltransferases with alpha-amylase and starch on the surface of saliva-coated hydroxyapatite. *Arch Oral Biol.* 1996; 41 (3): 291-8.
166. Valm AM, Mark Welch JL, Rieken CW, Hasegawa Y, Sogin ML, Oldenbourg R, et al. Systems-level analysis of microbial community organization through combinatorial labeling and spectral imaging. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011; 108 (10): 4152-7.
167. van der Weijden GA, Hioe KP. A systematic review of the effectiveness of self-performed mechanical plaque removal in adults with gingivitis using a manual toothbrush. *J. Clin Periodontol.* 2005; 32 (Suppl 6): 214-28
168. van Hijum SA, Kralj S, Ozimek LK, Dijkhuizen L, van Geel-Schutten IG. Structure-function relationships of glucansucrase and fructansucrase enzymes from lactic acid bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2006; 70 (1): 157-76.
169. Venkitaraman AR, Vacca-Smith AM, Kopec LK, Bowen WH. Characterization of glucosyltransferaseB, GtfC, and GtfD in solution and on the surface of hydroxyapatite. *J Dent Res.* 1995; 74 (10):1695-701.
170. Walker GJ, Pulkownik A, Morrey-Jones JG. Metabolism of the polysaccharides of human dental plaque: release of dextranase in batch cultures of *Streptococcus mutans*. *J Gen Microbiol.* 1981; 127 (1): 201-8.
171. Whitchurch CB, Tolker-Nielsen T, Ragas PC, Mattick JS. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science.* 2002; 295 (5559):1487.
172. World Health Organization. WHO releases new report on global problem of oral diseases. [acesso 2017 fev 24]. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2004/pr15/en/>
173. World Health Organization. The world oral health report 2003: continuous improvement of oral health in the 21st century. The approach of the WHO Global Oral Health Programme. Geneva, Switzerland: World Health Organization. 2003. [acesso 2017 fev 21]. Disponível em: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/68506/1/WHO_NMH_NPH_ORH_03.2.pdf

174. Wozniak DJ, Parsek MR. Surface-associated microbes continue to surprise us in their sophisticated strategies for assembling biofilm communities. *F1000Prime Rep.* 2014; 6:26.
175. Wright CJ, Burns LH, Jack AA, Back CR, Dutton LC, Nobbs AH, et al. Microbial interactions in building of communities. *Mol Oral Microbiol.* 2013; 28(2):83-101
176. Xiao J, Klein MI, Falsetta ML, Lu B, Delahunty CM, Yates JR 3rd, et al. The exopolysaccharide matrix modulates the interaction between 3D architecture and virulence of a mixed-species oral biofilm. *PLoS Pathog.* 2012;8(4):e1002623.
177. Yamashita Y, Bowen WH, Burne RA, Zitsu HK. Role of the *Streptococcus mutans* gtf genes in caries induction in the specific-pathogen-free rat model. *Infect Immun.* 1993; 61 (9):3811-7.
178. Yin JL, Shackel NA, Zekry A, McGuinness PH, Richards C, Putten KV, et al. Real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) for measurement of cytokine and growth factor mRNA expression with fluorogenic probes or SYBR Green I. *Immunol Cell Biol.* 2001; 79(3): 213-21.
179. Zhang X, Senpuku H. Dynamic Changes in the initial colonization of *Streptococcus gordonii* and *Actinomyces naeslundii* using a new Animal model. *Jpn J Infect Dis.* 2013; 66(1): 11-6.