UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José dos Campos
Instituto de Ciência e Tecnologia

JANAÍNA ARAÚJO DE ALVARENGA

EFEITOS DE FORMULAÇÕES PROBIÓTICAS CONTENDO *Lactobacillus paracasei* 28.4 SOBRE O CRESCIMENTO, PRODUÇÃO DE POLISSACARÍDEOS E FORMAÇÃO DE BIOFILMES DE *Streptococcus mutans*

2018

JANAÍNA ARAÚJO DE ALVARENGA

EFEITOS DE FORMULAÇÕES PROBIÓTICAS CONTENDO *Lactobacillus paracasei* 28.4 SOBRE O CRESCIMENTO, PRODUÇÃO DE POLISSACARÍDEOS E FORMAÇÃO DE BIOFILMES DE *Streptococcus mutans*

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE, pelo Programa de Pós-Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL.

Área: Microbiologia / Imunologia. Linha de pesquisa: Doenças infecciosas de interesse médico-odontológico.

Orientadora: Profa. Adj. Juliana Campos Junqueira

Coorientadora: Dra. Patrícia Pimentel de Barros

São José dos Campos

2018

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2019]. Disponível em http://www.ict.unesp.br/biblioteca/normalizacao

Apresentação gráfica e normalização de acordo com as normas estabelecidas pelo Serviço de Normalização de Documentos da Seção Técnica de Referência e Atendimento ao Usuário e Documentação (STRAUD).

Alvarenga, Janaína Araújo de
Efeitos de formulações probióticas contendo Lactobacillus paracasei 28.4 sobre o crescimento, produção de polissacarídeos e formação de biofilmes de Streptococcus mutans / Janaína Araújo de Alvarenga. - São José dos Campos : [s.n.], 2018.
57 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Biopatologia Bucal) - Pós-graduação em Biopatologia Bucal - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2018.
Orientadora: Juliana Campos Junqueira
Coorientadora: Patrícia Pimentel de Barros

1. Lactobacillus paracasei. 2. Streptococcus mutans. 3. Probióticos. 4. Biofilmes. 5. Polímeros extracelulares. I. Junqueira, Juliana Campos, orient. II. Barros, Patrícia Pimentel de , coorient. III. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. IV. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. V. Universidade Estadual Paulista (Unesp). VI. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Prof. Achille Bassi e Seção Técnica de Informática, ICMC/USP
com adaptações - STATI, STRAUD e DTI do ICT/UNESP.
Renata Aparecida Couto Martins CRB-8/8376

BANCA EXAMINADORA

Profa. Adj. Juliana Campos Junqueira (Orientadora)
Universidade Estadual Paulista (Unesp)
Instituto de Ciência e Tecnologia
Campus de São José dos Campos

Profa. Dra. Silvana Soléo Ferreira dos Santos
Universidade de Taubaté (Unitau)
Instituto Básico de Biociências
Campus Bom Conselho, Taubaté

Profa. Adj. Alessandra Bühler Borges
Universidade Estadual Paulista (Unesp)
Instituto de Ciência e Tecnologia
Campus de São José dos Campos

São José dos Campos, 26 de novembro de 2018.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, **Adoniram Magalhães de Alvarenga** e **Laudice Alves Araújo de Alvarenga** por nunca ter faltado amor, carinho, apoio e incentivos. Os princípios naturalmente aprendidos no dia a dia moldaram o ser humano que hoje sou. Minha eterna gratidão à dedicação de mãe em período integral e aos esforços desmedidos de pai sempre em busca de qualidade na nossa criação. Jamais conseguirei retribuir ao tanto que se doaram e continuam a me oferecer. Aprendi que família é dar asas para voar e deixar a certeza das raízes ancoradas no porto seguro.

Ao meu marido **Darlesson Alves do Carmo**, por ser meu maior incentivador, meu amigo, meu companheiro. Por vibrar a cada conquista minha e compreender os momentos de ausência e estresse que cada responsabilidade implica. Sem você não seria possível essa conquista. Tê-lo ao meu lado tornou a caminhada mais suave e me deu forças para continuar.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À minha orientadora, **Profa. Adj**. **Juliana Campos Junqueira**, pelo prazeroso convívio diário no laboratório, pela orientação, pela paciência, pelo suporte, pelo carinho e pela amizade. Sou muito grata ao acolhimento com carinho na primeira iniciação científica, e desde então, por sempre me incentivar e acreditar no meu potencial. Tenho a certeza que tive uma brilhante orientação. Todo meu conhecimento na área da pesquisa é fruto desse seu raro talento em orientar com maestria. A minha eterna gratidão, respeito, carinho e admiração.

À minha coorientadora, **Dra. Patrícia Pimentel de Barros**, a qual convivo e aprendo desde minha chegada ao laboratório. Sua experiência, habilidade e prestatividade foram essenciais ao desenvolvimento desse trabalho. Sou imensamente grata por compartilhar todo seu conhecimento e experiência de uma maneira leve e didática. Aprendi e cresci muito após esse nosso convívio mais próximo.

À minha grande amiga, que a graduação me presenteou, **Jéssica Diane dos Santos**, pelos sempre bons momentos dentro e fora do laboratório, por ter me apresentado à microbiologia, por ser minha enciclopédia diária nos momentos de sufoco, por estar sempre prestativa a ajudar. Aprendi demais com sua experiência no laboratório e sigo aprendendo com tua força e determinação.

À minha amada irmã, **Camila Eugênia Araújo de Alvarenga**, pelo amor e carinho e companheirismo, pela amizade e pelos momentos de alegria em todos esses anos. Agradeço pelas sábias palavras de apoio e incentivo nos momentos em que precisei e pela contribuição, mesmo que de maneira indireta, na realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

À **Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"**, na pessoa do diretor do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos, **Estevão Tomomitsu Kimpara**, e da vice-diretora **Rebeca Di Nicoló**.

Ao **Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal**, na pessoa da coordenadora **Profa. Adj. Luciane Dias de Oliveira.**

À **Profa. Anita Shukla** do Centro para Engenharia Biomédica da Brown University, pela contribuição e parceria no desenvolvimento das formulações probióticas.

Aos **docentes do Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal**.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior** (CAPES) pela concessão de bolsa de mestrado no período de 01/09/2016 a 28/02/2018.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo** (FAPESP) pela concessão da Bolsa de Mestrado no período de 01/03/2018 a 31/08/2018 (Processo nº 2017/15529-8).

À **equipe da Biblioteca** pela ajuda na elaboração deste trabalho, contribuindo com a orientação das normas.

Ao meu marido **Darlesson Alves do Carmo**, que precisou de muita paciência em diversos períodos durante o desenvolvimento deste projeto. Também agradeço ao seu companheirismo e confiança.

Aos meus pais, **Adoniram Magalhães de Alvarenga** e **Laudice Alves Araújo de Alvarenga**, que sempre me incentivaram a estudar e me dedicar ao máximo em busca de meus sonhos e objetivos.

À **minha família**, pelo amor, carinho, companheirismo e alegria em diversos momentos de minha vida.

Aos meus amigos do laboratório, em especial à **Jéssica Diane dos Santos, Maíra Terra Garcia, Felipe de Camargo Ribeiro, Rodnei Dennis Rossoni, Patrícia Pimentel de Barros, Liliana Scorzoni, Luciana Ruano de Oliveira Fugisaki, Lívia Mara Alves Figueiredo Godoi** e **Evelyn Luzia de Souza Santos, Damara da Silva Ávila, Pâmela Beatriz do Rosário Estevam dos Santos, Thais Cristine Pereira, Thaís Aguiar Santos** e **Raquel Teles de Menezes**, pela amizade, carinho, pelos bons momentos dentro e fora do laboratório, por terem me dado força e muita ajuda durante a realização deste trabalho. Todos foram essenciais para o bom andamento desta pesquisa.

Ao técnico **Domingos Gonçalves Pontes**, pela colaboração e amizade durante o curso de mestrado.

Aos funcionários da seção técnica de pós-graduação, **Bruno Shiguemitsu MarquesTanaka**, **Sandra Mara Cordeiro** e **Carolina Lourenço Rei**, pela paciência, prontidão no atendimento e amizade conquistada durante o curso de mestrado.

Aos técnicos superiores em administração universitária, **Carlos Alberto Guedes** e **Michele Ramos dos Santos** por toda a ajuda, colaboração e paciência nos trâmites relativos à bolsa de mestrado.

À assistente de suporte acadêmico IV, **Thais Cachuté Paradella** pela ajuda na aquisição das imagens em microscópio eletrônico de varredura.

SUMÁRIO

RESUMO 9
ABSTRACT 10
1 INTRODUÇÃO 11
2 PROPOSIÇÃO 16
2.1 Objetivo geral 16
2.1.1 Objetivos específicos 16
3 MATERIAL E MÉTODOS 17
3.1 Micro-organismos e condições de crescimento 17
3.2 Preparo da suspensão padronizada de *L. paracasei* 28.4 e *S. mutans* 17
3.3 Preparo das formulações probióticas 18
3.4 Delineamento e divisão dos grupos experimentais 18
3.5 Avaliação do efeito das formulações probióticas sobre *S. mutans* em culturas planctônicas 19
3.6 Avaliação dos efeitos da formulação probiótica sobre os biofilmes de S. mutans 20
3.6.1 Análise do efeito da formulação probiótica sobre a produção de polissacarídeos extracelulares (PEC) por *S. mutans* 21
3.6.2 Análise do efeito da formulação probiótica sobre a biomassa total dos biofilmes de *S. mutans* 23
3.6.3 Análise do efeito da formulação probiótica sobre a contagem de células viáveis dos biofilmes de *S. mutans* 24
3.6.4 Análise do efeito da formulação probiótica sobre a estrututa dos biofilmes de *S. mutans* por Microscopia Eletrônica de Varredura 27
3.6.5 Análise do efeito da formulação probiótica sobre a expressão dos genes *luxS*, *bprA*, *gbpB* e *gtfB* de S. mutans 27
3.7 Análise estatítica 29
4 RESULTADOS 30
4.1 Avaliação dos efeitos das formulações probióticas sobre *S. mutans* em culturas planctônicas 30

4.2 Avaliação dos efeitos da formulação probiótica sobre os biofilmes de S. mutans.....33
4.2.1 Análise do efeito da formulação probiótica sobre a produção de polissacarídeos extracelulares (PEC) por *S. mutans*.....34
4.2.2 Análise do efeito da formulação probiótica sobre a biomassa total dos biofilmes de *S. mutans*.....36
4.2.3 Análise do efeito da formulação probiótica sobre a contagem de células viáveis dos biofilmes de *S. mutans*.....37
4.2.4 Análise do efeito da formulação probiótica sobre a estrututa dos biofilmes de *S. mutans* por Microscopia Eletrônica de Varredura.....38
4.2.5 Análise do efeito da formulação probiótica sobre a expressão dos genes *luxS*, *bprA*, *gbpB* e *gtfB* de S. mutans.....40
5 DISCUSSÃO.....44
6 CONCLUSÃO.....48
REFERÊNCIAS.....49

Alvarenga JA. Efeitos de formulações probióticas contendo *Lactobacillus paracasei* 28.4 sobre o crescimento, produção de polissacarídeos e formação de biofilmes de *Streptococcus mutans* [dissertação]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2018.

RESUMO

O uso de probióticos como método de prevenção para a cárie dental tem sido amplamente investigado com resultados promissores. Portanto, torna-se necessário o desenvolvimento de formulações, para aplicação na cavidade bucal, que contenham cepas probióticas com atividade contra *Streptococcus mutans*. Assim, o objetivo desse projeto foi avaliar os efeitos antimicrobianos de formulações probióticas de *Lactobacillus paracasei* 28.4 sobre a atividade antibacteriana em crescimento planctônico, produção de polissacarídeos e formação de biofilmes de *S. mutans*. Inicialmente, a atividade antibacteriana de 3 diferentes formulações probióticas (concentrações de 0,5, 0,75 e 1% p/v de *gellan gum* em $CaCl_2$) foram testadas em culturas planctônicas sobre cepas de *S. mutans* (cepa padrão UA 159 e 5 cepas clínicas). Os resultados demonstraram inibição total do crescimento das cepas de *S. mutans* quando tratadas com todas as formulações probióticas testadas. Nos estudos subsequentes, foram avaliados os efeitos profiláticos da formulação probiótica na concentração de 1% p/v nos biofilmes de 4 e 24 horas de *S. mutans,* utilizando-se a cepa UA 159 e 2 cepas clínicas. Por meio do método sulfúrico-antrona, foi observado que a aplicação da formulação probiótica reduziu a capacidade de produção de polissacarídeos extracelulares pelas cepas de *S. mutans* em aproximadamente 80% nos dois tempos dos biofilmes testados. A formulação probiótica também foi capaz de reduzir significativamente a biomassa total dos biofilmes de *S. mutans* nos testes de absorbância do Cristal Violeta*,* com redução média na leitura de densidade óptica de 2,15 ± 0,10 no tempo de 4 horas e 2,67 ± 0,25 no tempo de 24 horas. A seguir, os efeitos antimicrobianos da formulação probiótica foram avaliados em biofilmes de *S. mutans* formados sobre a superfície de discos de hidroxiapatita, encontrando-se reduções de 0,57 a 1,54 UFC (Log) na contagem de células viáveis de *S. mutans* nos grupos tratados em relação aos grupos controle*.* Também foi possível observar redução na quantidade de células de *S. mutans* aderidas aos discos de hidroxiapatita pela Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Por fim, utilizando-se análise de Realtime PCR, foram testados os efeitos das formulações probióticas sobre a expressão de genes de virulência de *S. mutans* relacionados à adesão e formação do biofilme. Os resultados mostraram que na presença da formulação probiótica*,* os genes *luxS*, *brpA, gbpB* e *gtfB* de *S. mutans* foram negativamente regulados. Concluiu-se que a formulação probiótica contendo *L. paracasei* 28.4 em *gellan gum* apresentou efeitos inibitórios sobre o crescimento planctônico e biofilme de *S. mutans*, interferindo na produção de polissacarídeos extracelulares, quantidade de biomassa total, viabilidade celular, aderência de células à hidroxiapatita e transcrição de genes de virulência.

Palavras-chave: *Lactobacillus paracasei. Streptococcus mutans*. Probióticos. Biofilmes. Expressão gênica. Atividade antibacteriana. Polímeros extracelulares.

Alvarenga JA. Effects of different probiotics formulations containing Lactobacillus paracasei 28.4 on Streptococcus mutans growth, polysaccharides production and biofilms formation [dissertation]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2018.

ABSTRACT

The use of probiotics as a prevention method for dental caries has been extensively investigated with promising results. Therefore, it becomes necessary to develop formulations, for application in the oral cavity, containing probiotic strains with activity against Streptococcus mutans. Thus, the objective of this project was to evaluate the antimicrobial effects of probiotic formulations of Lactobacillus paracasei 28.4 on the antibacterial activity in planktonic growth, polysaccharide production and biofilms formation of S. mutans using reference and clinical strains. Firstly, antibacterial activity of 3 different probiotic formulations (concentrations of 0.5, 0.75 and 1% w/v of gellan gum in CaCl 2) were tested in planktonic cultures on S. mutans strains (standard strain UA 159 and 5 clinical strains). The results demonstrated complete inhibition of S. mutans strains growth when treated with all probiotic formulations tested. In the subsequent studies, the prophylactic effects of the 1% w/v probiotic formulation on 4 and 24 hours S. mutans biofilms were evaluated using the UA 159 strain and 2 clinical strains. Using the sulfuric-anthrone method, it was observed that the application of the probiotic formulation reduced the production capacity of extracellular polysaccharides by S. mutans strains in approximately 80% in both times of the biofilms tested. The probiotic formulation was also able to significantly reduce the total biomass of S. mutans biofilms in the Crystal Violet absorbance tests, with a mean reduction in the optical density reading of 2.15 ± 0.10 in 4 hours and 2.67 ± 0.25 in 24 hours. Next, the antimicrobial effects of the probiotic formulation were evaluated in S. mutans biofilms formed on the surface of hydroxyapatite discs, with reductions of 0.57 to 1.54 CFU (Log) in the viable cells count of S. mutans in the treated groups compared to the control groups. It was also possible to observe a reduction in the amount of S. mutans cells adhered to the hydroxyapatite disks by Scanning Electron Microscopy (SEM). Finally, using Realtime PCR analysis, the effects of probiotic formulations on the expression of S. mutans virulence genes related to adhesion and biofilm formation were tested. The results showed that in the presence of the probiotic formulation, the luxS, brpA, gbpB and gtfB genes of S. mutans were down regulated. It was concluded that the probiotic formulation containing L. paracasei 28.4 in gellan gum presented inhibitory effects on planktonic growth and S. mutans biofilm, interfering in the production of extracellular polysaccharides, amount of total biomass, cell viability, cell adhesion to hydroxyapatite and transcription of virulence genes.

Keywords: Lactobacillus paracasei. Streptococcus mutans. Probiotics. Biofilms. Gene expression. Antibacterial activity. Extracellular polymers.

1 INTRODUÇÃO

A cavidade bucal humana é habitada por centenas de espécies bacterianas, sendo que a maioria delas se trata de espécies comensais que mantém o equilíbrio do ecossistema (Belda-Ferre et al., 2012). Portanto, alterações no número e distribuição das espécies bacterianas podem resultar no desenvolvimento de doenças bucais, como a cárie dental. A cárie dental é uma doença oportunista, de caráter multifatorial, fortemente influenciada pelos carboidratos da dieta, pela ação de componentes salivares e pela formação do biofilme bacteriano. Para que o biofilme se comporte de maneira cariogênica, é preciso que ocorra, durante determinado período de tempo, a interação em condições críticas de diversos fatores presentes no ecossistema bucal. O evento mais crucial no desencadeamento do processo carioso é a seleção e dominância de certos grupos específicos de micro-organismos ácidos tolerantes. Nessas condições, pode ocorrer queda substancial no pH do biofilme que resulta na desmineralização dos tecidos dentários (Hamada, Slade, 1980; Gibbons, 1984; Bowen, 2002).

S. mutans é considerado uma das principais espécies bacterianas envolvidas com a cárie dental e possui atributos de virulência que permitem a sua adesão e acumulação na superfície dentária. A capacidade de aderir e formar biofilmes em superfícies duras, metabolizar uma ampla variedade de carboidratos e sobreviver em ambientes de baixo pH constituem fatores chave de virulência desta bactéria, não só para a sua colonização, mas também, para a etiologia da cárie dental (Banas, Vickerman, 2003; Koo et al., 2010; Bowen, Koo, 2011). Em relação a capacidade de formar biofilmes, *S. mutans* apresenta sistemas de regulação gênica denominados de sistemas de dois componentes (Two Component Systems/TCS) descritos como VicRK e CovRS, que regulam diretamente um painel de genes relacionados com a síntese e interação de polissacarídeos extracelulares e formação de biofilme (Senadheera et al., 2005; Tremblay et al., 2009; Stipp et al., 2013). Dentre esses genes, *luxS* e *brpA* controlam a regulação da produção da molécula do *quorum sensing*, Auto-inducer 2(AI-2), que promove a comunicação entre diferentes bactérias presentes em um biofilme misto (Wang et al., 2017). O gene *brpA* codifica uma proteína de superfície envolvida na formação de biofilme,

autólise e divisão celular (Wen et al., 2006). Ambos os genes estão envolvidos na regulação da formação de biofilme de *S. mutans* associada à produção de exopolissacarídeos e às respostas ao estresse oxidativo (Cao et al., 2017).

Na disponibilidade de sacarose, a presença de adesinas e produção de glucanos capacitam *S. mutans* a se aderirem fortemente sobre as superfícies dentárias e formar biofilmes tridimensionais (Lemos et al., 2005). Glucanos são exopolímeros sintetizados por enzimas glicosiltransferases (GTFS), que em combinação com as proteínas ligadoras de glucano (Gbps), promovem aderência e acúmulo de estreptococos cariogênicos na superfície dental. *S. mutans* expressa três glicosiltransferases (GTFS B, C e D) que produzem glucanos solúveis e insolúveis. GTFB e GTFC, que atuam principalmente na formação de glucanos insolúveis em água e ricos em ligações α-1,3-glicosídicas, são localizadas na superfície celular de *S. mutans* e codificadas pelos genes *gtfB* e *gtfC*, respectivamente. Por outro lado, a enzima GTFD, que atua na produção de glucanos solúveis em água e ricos em ligações α-1,6-glicosídicas, é liberada no sobrenadante da cultura e codificada pelo gene *gtfD*. GTFC é adsorvida ao esmalte dentro da película adquirida, enquanto GTFB liga-se avidamente a bactérias que promovem agregação celular e aumento da coesão do biofilme (Bowen, Koo, 2011). Portanto, as enzimas GTFB e GTFC são essenciais no estabelecimento da matriz polissacarídica extracelular do biofilme dental (Koo et al., 2010).

S. mutans também produz proteínas de superfície que apresentam afinidade aos glucanos, as Gbps (Glucan-bindingprotein), que medeiam à interação bacteriana com o glucano extracelular e contribuem para o crescimento do biofilme (Stipp et.al. 2008). Quatro Gbps foram identificadas para a espécie de *S. mutans*, GbpA, GbpB, GbpC e GbpD (Banas, Vickerman, 2003). Entre elas, destaca-se a GbpB que demonstra propriedades imunogênicas e protetoras contra a cárie dental, sendo, portanto, um potencial alvo para o desenvolvimento de vacinas para prevenção dessa doença (Mattos-Graner et al., 2001). Duque et al. (2011) exploraram a estratégia do RNA antisense para analisar as funções biológicas de GbpB e observaram que essa proteína participa da formação do biofilme sacarose dependente e de outras propriedades celulares, como controle da hidrofobicidade celular, resistência ao estresse oxidativo e osmótico, autólise e sensibilidade à antibióticos.

Além da produção de polissacarídeos, *S. mutans* possuem características acidúricas e acidogênicas, que também contribuem significativamente para o desenvolvimento da cárie dental (Bowen, Koo, 2011; Falsetta et al., 2014). Nos biofilmes, a matriz extracelular e o microambiente formados pelas comunidades microbianas propiciam uma elevada resistência ao sistema de defesa do hospedeiro e a ação dos agentes antimicrobianos (Borghi et al., 2014). O biofilme pode prejudicar a resposta imunológica do hospedeiro por construir uma barreira de difusão para fagócitos e citocinas, favorecendo a persistência da infecção (Katragkou et al., 2010).

Desse modo, os fatores de virulência de *S. mutans* auxiliam na proteção dessa bactéria contra possíveis defesas do hospedeiro e contribuem para a capacidade de causar danos teciduais. Com o sequenciamento do genoma de *S. mutans* (UA159 - cepa sorotipo c) foi possível identificar que os genes de virulência estão associados com a aderência aos tecidos dentários e a produção de glucanos, proteases e moléculas de estimulação de citocinas; além de sua alta tolerância ácida (Ajdic et al., 2002). Apesar da prevalência de cárie ter diminuído nas últimas décadas, principalmente em países desenvolvidos, devido a utilização dos fluoretos; a doença ainda constitui um grande problema clínico. Este fato tem estimulado pesquisas na procura de novas formas de prevenção e tratamento para a cárie dental (Simark-Mattsson et al., 2007; Koo et al., 2010).

Probióticos são micro-organismos vivos que têm efeitos positivos sobre a saúde humana quando administrados em quantidades adequadas, aproximadamente 10^7 a 10^{11} unidades formadoras de colônia por mililitros (UFC/mL) (Gonzalez et al., 2012; Su et al., 2013). Os probióticos são classificados como produtos vivos bioterapêuticos (*Live Biotherapeutic Products/LBP*) de acordo com o *Food and Drug Administration* (FDA) e podem ser utilizados em uma variedade de produtos, tais como alimentos, suplementos alimentares e medicamentos (Gonzalez et al., 2012; Olle, 2013). Entre as bactérias consideradas como probióticas, algumas cepas de *Lactobacillus* (*L. acidophilus* ATCC 4356, *L. casei* ATCC 393, *L. paracasei* ATCC BAA52), quando incorporadas em produtos alimentares fermentados, podem exibir atividade antimicrobiana contra agentes patogênicos do trato gastrointestinal e da cavidade oral (Campana et al., 2012; Vilela et al., 2015; Matsubara et al., 2016).

Söderling et al. (2011) estudaram os efeitos das cepas probióticas de *L. rhamnosus* GG, *L. plantarum* 299V e *L. reuteri* PTA 5289 e SD2112 sobre a formação de biofilmes de *S. mutans*, concluindo que todas as cepas analisadas diminuíram a formação de biofilme por *S. mutans in vitro* e a atividade antimicrobiana foi dependente do pH da cultura de *Lactobacillus*. Marttin et al. (2013) testaram os efeitos inibitórios de *L. reuteri* (ATCC PTA 5289) e *L. paracasei* (DSMZ 16671) em biofilmes de *S. mutans*, verificando que ambas as cepas de *Lactobacillus* interferiram com a adesão de *S. mutans* aos discos de hidroxiapatita, mas não interferiram na adesão destes à superfície lisa do vidro.

Em estudo realizado por Lin et al. (2015), filtrados da cultura de 5 espécies de *Lactobacillus* (*L. casei Shirota*, *L. casei* LC01, *L. plantarum* ST-III, *L. paracasei* Lpc-37, e *L. rhamnosus* HN001) também foram capazes de inibir o crescimento e formação de biofilme de *S. mutans*. Segundo os autores, esses efeitos podem estar relacionados com a produção de um ambiente ácido ou com a produção de polipeptídeos antimicrobianos por *Lactobacillus*.

A Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO/OMS) observou que a maioria das formulações probióticas no mercado não foi submetida a testes e verificações adequados (Reid, 2016). Assim, devido à falta de estudos *in vivo* e ensaios clínicos disponíveis, é precoce designar os probióticos como uma alternativa às doenças infecciosas orais. De acordo com uma revisão de Sanders et al. (2016), apesar da rápida expansão global da pesquisa com probióticos, existem poucos estudos focados na eficácia desses agentes. Além disso, as indústrias parecem ser menos propensas a financiar estudos com probióticos em comparação com substâncias químicas.

O Instituto *Center for Biologics Evaluation and Research of the FDA* (CBER/FDA) exige rigorosas especificações para o desenvolvimento de formulações probióticas, como identificação da cepa probiótica por ensaios específicos e reprodutíveis (métodos genotípicos e fenotípicos), determinação da potência dos micro-organismos vivos (contagem de UFC/ml) e realização de testes de pureza ou contaminantes introduzidos durante o processo de fabricação tornando portanto um desafio para pesquisadores e indústrias atuais (Olle, 2013). Além disso, a formulação deve apresentar liberação das bactérias proporcionando tempos de retenção e exposição suficiente na cavidade bucal para que os probióticos possam

colonizar os tecidos do hospedeiro e influenciar a microbiota residente (Wescombe et al., 2012; Devine et al., 2015) e manutenção da viabilidade celular durante a estocagem (Wescombe et al., 2012).

Recentemente, estudos com hidrogéis à base de biopolímeros têm sido desenvolvidos para carreamento de antimicrobianos pelas suas vantagens e propriedades físico-químicas interessantes em condições fisiológicas, além da facilidade de processamento (De Giglio et al., 2011; Annabi et al., 2014). Entre eles, o *gellan gum*, um heteropolissacarídeo natural, está sendo bastante utilizado na indústria alimentícia, farmacêutica e na medicina para o encapsulamento de células, antibióticos e micropartículas (Coutinho et al., 2010; Oliveira et al., 2010; D'Arrigo et al., 2014; Osmałek et al., 2014; Zhu et al., 2015). Recentemente, diferentes tipos de preparações de *gellan gum* têm sido desenvolvidas, variando desde micropartículas e grânulos maiores, até formulações mais líquidas (Agnihotri et al., 2005; Mahdi et al., 2014). A utilização do *gellan gum* como carreador de fármacos apresenta a vantagem da liberação contínua dos antibióticos por período de tempo prolongado (Novac et al. 2014; Posadowska et al., 2016). Os sistemas de carreamento utilizando *gellan gum* apresentam resultados promissores, pois esse biopolímero não apresenta toxicidade para o organismo e oferece uma proteção para o fármaco encapsulado em seu interior. Por exemplo, na administração por via oral, as moléculas do fármaco ficam protegidas no interior do *gellan gum*, evitando sua degradação pelo processo digestivo e, consequentemente, a perda rápida da sua concentração (Miyazaki et al., 1999; Kubo et al., 2003; Zhu et al., 2015).

Assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar os efeitos antimicrobianos de formulações probióticas de *L. paracasei* 28.4, em hidrogéis de *gellan gum*, sobre a atividade antibacteriana, produção de polissacarídeos e formação de biofilmes por *S. mutans*.

2 PROPOSIÇÃO

2.1 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos antimicrobianos de formulações probióticas de *L. paracasei* 28.4 sobre a atividade antibacteriana, produção de polissacarídeos e formação de biofilmes de *S. mutans*.

2.1.1 Objetivos específicos

a) avaliar a atividade antibacteriana de 3 diferentes concentrações de formulações probióticas sobre 5 cepas clínicas e 1 cepa de referência de *S. mutans* por meio do estudo em culturas planctônicas;

b) selecionar a formulação probiótica com maior atividade antimicrobiana, bem como 3 cepas de *S. mutans*, para os estudos subsequentes;

c) testar os efeitos da formulação probiótica sobre a produção de polissacarídeos nas cepas de *S. mutans* utilizando-se do método sulfúrico-antrona;

d) analisar os efeitos da formulação probiótica nos biofilmes de *S. mutans* através da quantificação da biomassa total (método colorimétrico do cristal violeta);

e) analisar os efeitos da formulação probiótica nos biofilmes de *S. mutans* formados em discos de hidroxiapatita por meio da contagem de células viáveis (UFC/mL) e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV);

f) elucidar os mecanismos de ação envolvidos nos efeitos da formulação probiótica sobre *S. mutans* por meio da quantificação da expressão de genes relacionados com a aderência, produção de polissacarídeos e formação de biofilmes.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Micro-organismos e condições de crescimento

Foram utilizadas 5 cepas clínicas de *S. mutans* previamente isoladas de pacientes com lesões de cárie ativa (Garcia, 2018) e a cepa *Lactobacillus paracasei* 28.4 previamente isolada de paciente livre de cáries (Rossoni et al., 2018). Como controle dos experimentos, foi utilizada também a cepa de referência *S. mutans* UA159. Estas cepas são mantidas no Laboratório de Microbiologia e Imunologia Bucal do ICT/UNESP de São José dos Campos em estoques congelados em freezer a menos 80°C (NUAIRE, Minnesota, EUA).

Para ativação desses micro-organismos, a cepa de *L. paracasei* 28.4 foi cultivada em ágar Rogosa SL (Himedia, Mumbai, Índia) e as cepas de *S. mutans* foram cultivadas em ágar Mitis Salivarius (Difco, Detroit, EUA), acrescido de 0,2 UI por mL de meio de bacitracina (Sigma-Aldrich, SP, Brasil) durante 48 horas a 37°C em estufa bacteriológica sob condições de 5% de teor de CO_2.

3.2 Preparo da suspensão padronizada de *L. paracasei* 28.4 e *S. mutans*

L. paracasei 28.4 foi cultivado em caldo de Man, Rogosa & Sharpe (MRS, Difco, Detroit, EUA) a 37°C por 24 horas em estufa bacteriológica sob condições de 5% de teor de CO_2. *S. mutans* foi cultivado em caldo Infuso Cérebro Coração (BHI, Himedia, Mumbai, Índia), acrescido de 5% de sacarose, a 37ºC por 24 horas em estufa bacteriológica, sob condições de 5% de teor de CO_2. Posteriormente, as células microbianas foram centrifugadas a 2000 xg (aproximadamente 4000 rpm) por 5 min (Centrífuga MPW, Warszawa, Polônia), o sobrenadante foi desprezado e o sedimento suspenso em 6 mL de solução fisiológica (NaCl 0,85%). Esse procedimento foi repetido. A contagem do número de células das suspensões foi realizada em espectrofotômetro (B582, Micronal, São Paulo, Brasil) obtendo-se a

concentração de 10^6 micro-organismos/mL de *S. mutans*, 10^{10} micro-organismos/mL de *L. paracasei* 28.4 para o preparo das formulações probiótica, enquanto que para os estudos entre as interações celulares, foi utilizado 10^8 micro-organismos/mL de *L. paracasei* 28.4*.* Os valores de comprimento de onda foram de 600 nm para *L. paracasei* 28.4 e 398 nm para *S. mutans* com densidades ópticas de 2,400 e 1,014 para *L. paracasei* 28.4 e 0,620 para *S. mutans.*

3.3 Preparo das formulações probióticas

As formulações probióticas foram desenvolvidas em colaboração com a Profa. Anita Shukla do Centro para Engenharia Biomédica da Brown University. Para o preparo das formulações, 2 mL da cepa de *L. paracasei* 28.4, padronizada em 10^{10} micro-organismos/mL, foram incorporados em 45 mL das preparações aquosas de hidrogéis em 3 mL de $CaCl_2$, resultando no volume final de 50 mL para cada preparo. Para determinação da melhor viscosidade do hidrogel em $CaCl_2$, três diferentes concentrações (0,5% p/v, 0,75% p/v e 1% p/v), foram testadas.

3.4 Delineamento e divisão dos grupos experimentais

As 3 formulações probióticas foram testadas sobre 5 cepas de *S. mutans*, mais a cepa de referência *S. mutans* UA 159, quanto à atividade bacteriana em culturas planctônicas. A partir desses dados, foram selecionadas 3 cepas clínicas e 1 formulação probiótica para os estudos de produção de polissacarídeos, quantificação de biofilmes formados e análise da expressão de genes de *S. mutans* (Figura 1).

Em todos os testes, foram sempre incluídos os seguintes grupos experimentais:

a) *S. mutans* + hidrogel contendo *L. paracasei* 28.4 (grupo interação com

formulação probiótica);

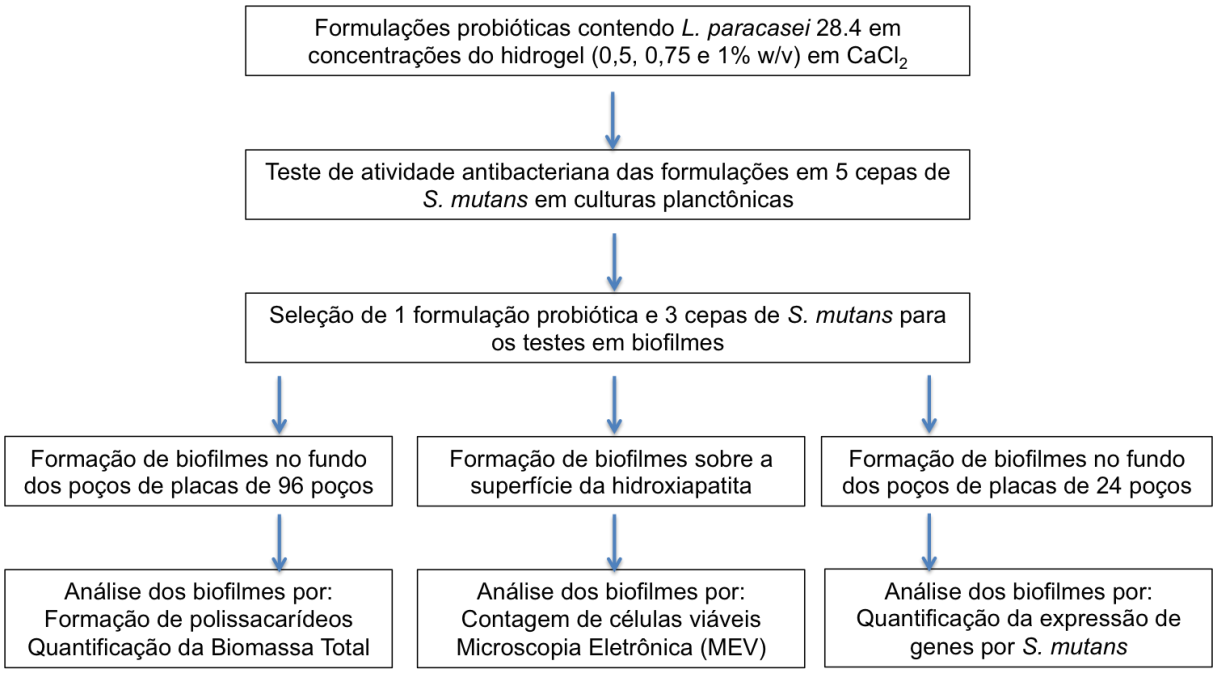
b) *S. mutans* + suspensão de *L. paracasei* 28.4 (grupo interação com suspensão microbiana da cepa *L. paracasei* 28.4);

c) *S. mutans* + solução fisiológica (grupo controle de *S. mutans*);

e) *L. paracasei* 28.4 + solução fisiológica (grupo controle de *L. paracasei* 28.4);

f) Hidrogéis contendo *L. paracasei* 28.4 + solução fisiológica (grupo controle das formulações probióticas).

Figura 1 - Delineamento experimental



Fonte: Elaborado pelo autor.

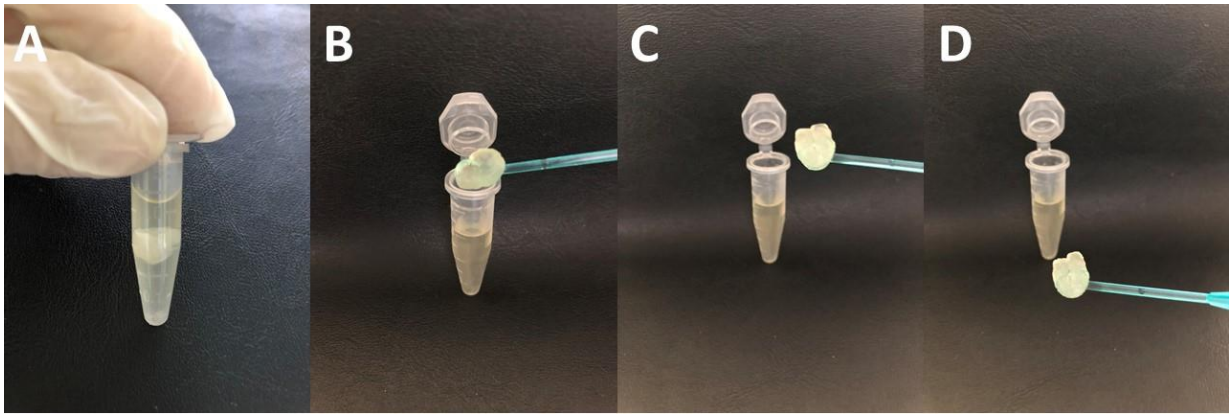
3.5 Avaliação do efeito das formulações probióticas sobre *S. mutans* em culturas planctônicas

A atividade antibacteriana foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Lin et al. (2015) com algumas modificações. Uma alíquota de 250 µL

da suspensão padronizada de *L. paracasei* 28.4 ou das formulações probióticas (0,5% p/v, 0,75% p/v e 1% p/v) foram adicionadas a 1 mL de caldo BHI acrescido de 5% de sacarose em tubos *eppendorfs.* Os tubos foram incubados em estufa bacteriológica sob condições de 5% de teor de CO_2 a 37°C por 24 horas. Após esse período de incubação, a formulação probiótica foi removida (Figura 2) e o pH do meio de cultura foi medido em pHmetro digital. A seguir, 250 µL de *S. mutans* foram adicionados aos tubos.

Após incubação de 24 horas, os tubos foram homogeneizados por 1 min e as culturas foram diluídas serialmente, das quais alíquotas de 5 µL foram semeadas pela técnica da gota em ágar Mitis Salivarius acrescido de 0,2 UI por mL de meio de bacitracina (MSBS) para *S. mutans* e ágar Rogosa para *Lactobacillus*. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica sob condições de 5% de teor de CO_2 a 37°C por 48 horas para contagem das colônias e cálculo de Unidades Formadoras de Colônias (UFC/mL).

Figura 2 - Remoção do hidrogel após 24 horas em caldo



Fonte: Elaborado pelo autor.

3.6 Avaliação dos efeitos da formulação probiótica sobre os biofilmes de *S. mutans*

Após o estudo em culturas planctônicas, a formulação probiótica 1% p/v foi

testada sobre os biofilmes de 3 cepas de *S. mutans,* incluindo 2 cepas clínicas e a cepa *S. mutans* UA 159. De acordo com o delineamento experimental acima descrito, os biofilmes foram formados sobre: 1) fundo de placas de microtiltulação de 96 poços para a quantificação da produção de polissacarídeos extracelulares e análise da biomassa total; 2) superfície de discos de hidroxiapatita (Clarkson Chromatography Inc., PA, USA) para contagem de células viáveis (UFC/mL) e microscopia eletrônica de varredura (MEV); 3) fundo de placas de microtitulação de 24 poços para análise da expressão de genes de virulência de *S. mutans*.

3.6.1 Análise do efeito da formulação probiótica sobre a produção de polissacarídeos extracelulares (PEC) por *S. mutans*

Os biofilmes para análise da produção de polissacarídeos extracelulares foram previamente formados de acordo com a metodologia proposta por Ribeiro et al. (2017) com algumas modificações.

Primeiramente, 50 µL da formulação probiótica ou da suspensão padronizada de *L. paracasei* 28.4 foram adicionados a 100 µL de caldo BHI, acrescido de 5% de sacarose, em poços de placas de 96 poços (KASVI, Curitiba, Brasil). As placas foram incubadas a 37ºC por 24 horas em estufa bacteriológica, sob condições de 5% de teor de CO_2. Após o período de incubação, foi feita a remoção do gel da formulação probiótica, adicionado 50 µL de *S. mutans* e incubados novamente por 4 e 24 horas. Após esses períodos determinados, um *pool* do biofilme de 6 poços foi desagregado com 100 µL de solução fisiológica (NaCl 0,85%) e transferidos para microtubos de 1,5 mL e submetidos a uma centrifugação de 6000 xg (aproximadamente 12000 rpm) por 10 min a 26ºC para remoção do sobrenadante. O sedimento obtido foi lavado 3 vezes com solução fisiológica (NaCl 0,85%). As dosagens dos polissacarídeos extracelulares insolúveis em água foram realizadas utilizando-se o método sulfúrico-antrona descrito por Leyva et al. (2008). O reagente foi preparado imediatamente anterior a análise dissolvendo 0,01 g de Antrona (0,1%) em 1 mL de ácido sulfúrico concentrado (98%). Em seguida, três vezes o volume da solução ácido sulfúrico-antrona foi adicionado a uma parte da

solução extraída e incubada a 4ºC por 10 min. Subsequentemente, incubada a 100ºC por 20 min seguido de 20 min em temperatura ambiente. Após o período de incubação, as amostras foram lidas em leitor de microplacas no comprimento de onda de 620 nm. Os cálculos para as dosagens foram realizados a partir de uma curva padrão obtida de soluções com 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100 µg de glicose/mL (Figuras 3 e 4). Assim, os dados de densidade óptica da produção de polissacarídeos foram convertidos em µg/mL.

Figura 3 - Curva padrão de glicose (100 µg/mL) obtida pelo método sulfúrico-antrona de intervalo 0 - 10 µg representado por um complexo azul esverdeado gerado pelo aquecimento da solução

Fonte: Elaborado pelo autor.

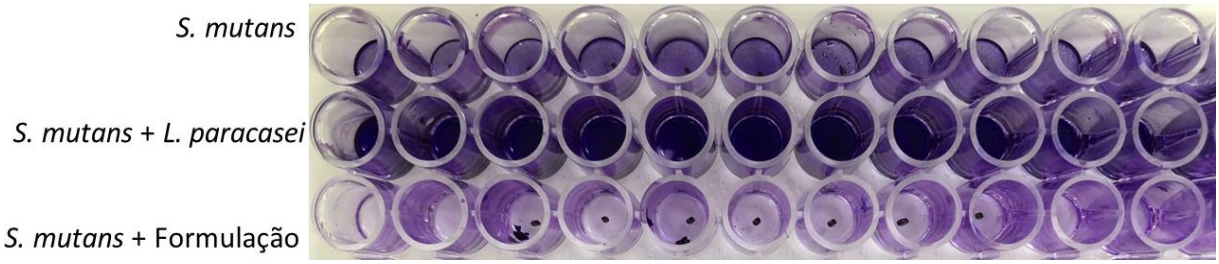
Figura 4 - Imagem ilustrativa do experimento de liberação de polissacarídeos extracelulares por *S. mutans* representado por um complexo azul esverdeado gerado pelo aquecimento dos compostos em solução de ácido sulfúrico-antrona

Fonte: Elaborado pelo autor.

3.6.2 Análise do efeito da formulação probiótica sobre a biomassa total dos biofilmes de *S. mutans*

A quantificação da biomassa dos biofilmes foi realizada pelo método da absorbância do Cristal Violeta seguindo a metodologia descrita no trabalho de Barbosa et al. (2016). Transcorridos os tempos de formação de biofilme conforme descrito no item anterior, 100 µL de metanol a 99% (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) foram adicionados em cada poço para a fixação do biofilme. Passados 15 minutos, o metanol foi removido e a placa mantida em temperatura ambiente overnight (aproximadamente 16 horas). Após o período de incubação, 100 µL de cristal violeta (1% v/v) foi colocado nos poços e mantido durante 20 minutos. Em seguida, os poços foram lavados 3 vezes com 200 µL de solução fisiológica (NaCl 0,85%) e acrescentado 200 µL metanol a 99% para descoloração do biofilme e liberação do sobrenadante. Então, 100 µL do sobrenadante do processo de descoloração foi transferido para placas de 96 poços. A leitura foi realizada em leitor de microplacas com comprimento de onda de 570 nm para medida da absorbância (Figura 5).

Figura 5 - Imagem ilustrativa do experimento de quantificação da biomassa total do biofilme de *S. mutans* pelo método da absorbância do cristal violeta

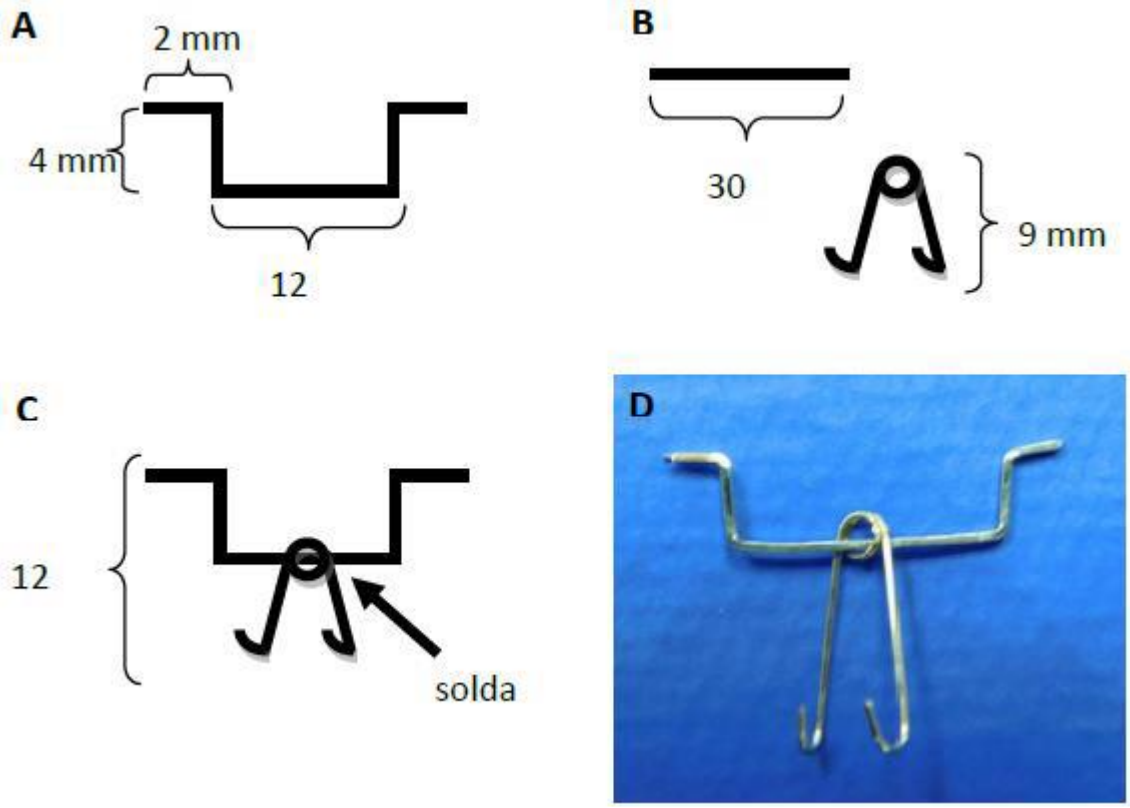


Fonte: Elaborado pelo autor.

3.6.3 Análise do efeito da formulação probiótica sobre a contagem de células viáveis dos biofilmes de *S. mutans*

Para os testes de contagem de células viáveis, os biofilmes de *S. mutans* foram formados em discos de hidroxiapatita (n=5) posicionados em suportes confeccionados com fios ortodônticos (Figura 6), conforme metodologia descrita por Marttinen et al. (2013) com algumas modificações. Discos e suportes, foram colocados em tubos, recobertos com solução fisiológica e autoclavados previamente a formação do biofilme. Os discos foram dispostos nos suportes na posição vertical sem tocar o fundo dos poços da placa de microtitulação de 24 poços (Figura 7).

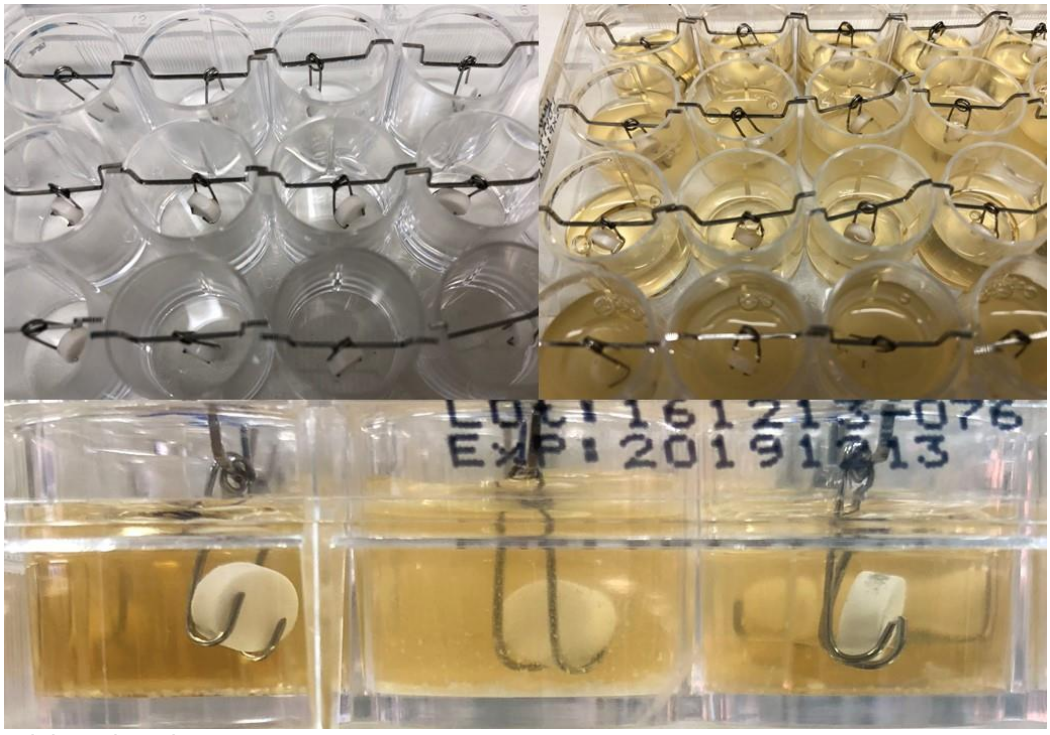
Figura 6 - Suportes confeccionados com fios ortodônticos



Legenda: a) Parte superior do suporte confeccionado com fio ortodôntico retangular 0,40 mm x 0,55 mm (.016" x .022"); b) Parte inferior do suporte confeccionado com fio ortodôntico duro elástico redondo Ø 0,45 mm (.018"); c) Soldagem das partes superior e inferior do suporte; d) Suporte preparado e soldado.
Fonte: Cópia autorizada por Marisol dos Santos Velloso.

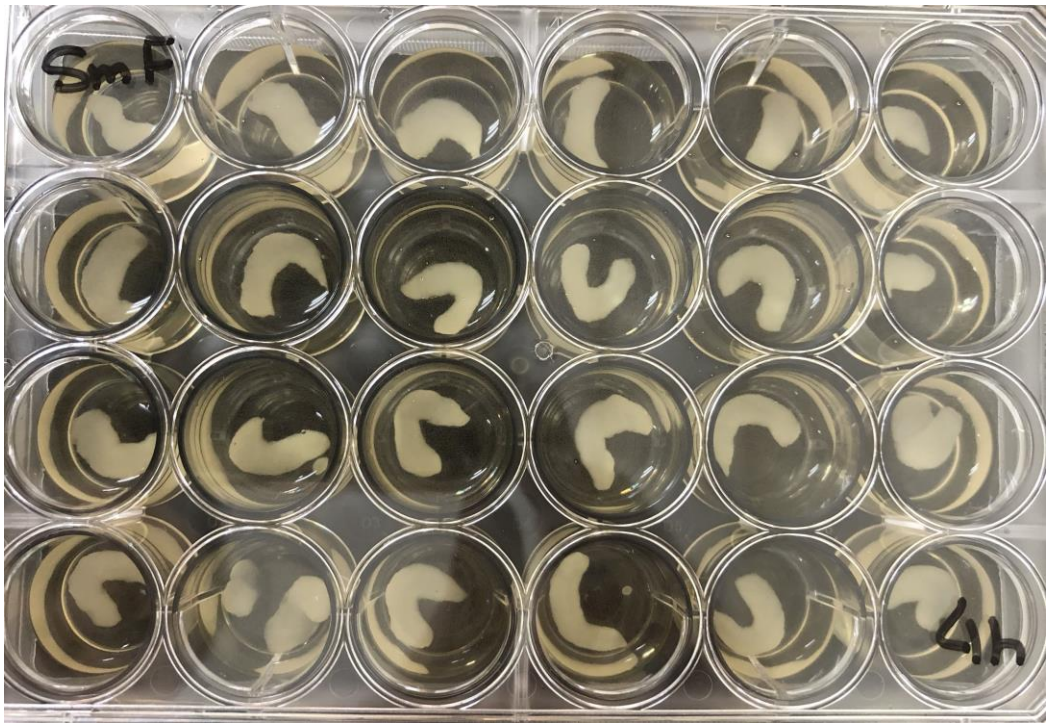
A seguir, 250 µL da formulação probiótica ou da suspensão padronizada de *L. paracasei* 28.4 foram adicionados aos poços contendo 1,5 mL de caldo BHI, acrescido de 5% de sacarose, e incubadas em estufa sob condições de 5% de teor de CO_2 por 24 horas (Figura 8). Após o período de incubação, foi feita a remoção do gel da formulação probiótica, adicionado 250 µL das suspensões padronizadas de *S. mutans* e incubados novamente por 4 e 24 horas para a formação do biofilme. Após cada período, o conjunto suporte-disco foi removido da placa e transferido para outra placa de 24 poços contendo 2 mL de solução fisiológica (NaCl 0,85%). Cada disco foi lavado três vezes para remoção das células fracamente aderidas ao biofilme formado, e posteriormente, transferidos para uma nova placa de 24 poços.

Figura 7 - Disposição dos discos de hidroxiapatita nos suportes confeccionados com fio ortodôntico para a formação do biofilme de *S. mutans*



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 8 - Formulação probiótica em caldo previamente a remoção do gel



Fonte: Elaborado pelo autor.

Transcorridos os tempos de formação do biofilme, cada corpo de prova foi colocado em um novo poço da placa de 24 poços contendo 1 mL de solução fisiológica (NaCl 0,85%) e o biofilme aderido aos discos foi removido utilizando homogeneizador ultra-sônico (Sonopuls HD 2200, Bandelin Eletronic) com potência de 50 W por 30 segundos para romper os agregados microbianos.

A partir da solução obtida, foram realizadas diluições decimais, das quais alíquotas de 5 µL foram semeadas pela técnica da gota em placas de Petri contendo meios de cultura seletivos, ágar Mitis Salivarius acrescido de 0,2 UI por mL de meio de bacitracina para *S. mutans,* e ágar Rogosa para *L. paracasei* 28.4. As placas foram incubadas a 37ºC em estufa sob condições de 5 % de teor de CO_2 por 48 horas. Após este período, as colônias foram contadas para o cálculo de UFC/mL.

3.6.4 Análise do efeito da formulação probiótica sobre a estrutura dos biofilmes de *S. mutans* por Microscopia Eletrônica de Varredura

Para a análise de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), após os tempos de formação dos biofilmes (conforme descrito no item anterior), os corpos de prova de hidroxiapatita, foram transferidos para uma nova placa de 24 poços contendo 1 mL de glutaraldeído a 2,5% para fixação por 1 hora. Após este período, as peças ficaram submersas em 1 mL de solução de álcool nas concentrações de 10, 25, 50, 75 e 90% por 20 min para cada concentração e, posteriormente, em 100% de álcool por 1 hora e colocadas em estufa a 37ºC por 24 horas para secagem completa das peças.

Os corpos de prova foram retirados do fundo da placa com o auxílio de uma pinça estéril, transferidos para *stubs* de alumínio e recobertos com ouro por 160 s a 40 mA (DentonVacuum Desk II). Após a metalização, as peças foram examinadas e fotografadas em Microscópio Eletrônico de Varredura do Instituto de Ciência e Tecnologia (ICT/Unesp), operando em 15 kV no aumento 4000 vezes.

3.6.5 Análise do efeito da formulação probiótica sobre a expressão dos genes *luxS*, *brpA*, *GbpB* e *gtfB* de *S. mutans*

Os genes alvos investigados foram *luxS* e *brpA* (envolvidos na formação do biofilme), *gbpB* (proteína de superfície que se liga ao glucano), *gtfB* (glicosiltransferases B) que foram normalizados pelo gene de referência. Para a escolha do gene normalizador, 2 genes de referência, 16sRNA (RNA ribossomal) e Ldh (Lactato desidrogenase), foram analisados no software *RefFinder (*http://www.leonxie.com/referencegene.phpe). A amostra calibradora do ensaio foi o grupo solução fisiológica (NaCl 0,85%) nos diferentes tempos analisados. Todos os primers utilizados foram específicos para *S. mutans* e não houve amplificação em nenhum outro tipo de micro-organismo. Para a realização da curva padrão de cDNA, foram preparadas diluições seriadas do cDNA (1:10) com a massa inicial de 600 ng

do grupo controle, que neste estudo se refere a *S. mutans* + Solução fisiológica. Cada diluição foi feita em triplicata para cada iniciador testado e a concentração ideal deste, foi padronizada em 100 µM.

Os biofilmes foram previamente formados em fundo de placas de 24 poços, utilizando-se as mesmas concentrações do biofilme descrito no item anterior.

Após cada tempo de formação do biofilme (4 e 24 horas), foi realizada a extração de RNA utilizando-se o Kit Trizol (Ambion, Inc, AM1926), conforme protocolo recomendado pelo fabricante. O RNA extraído foi quantificado usando micro-espectrofotômetro Nanodrop 2000c UV- Vis Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) de acordo com o protocolo do fabricante, e os tubos armazenados no freezer a -80°C.

Para cada reação de síntese da primeira fita de cDNA, foi utilizado 1 µg de RNA, previamente tratado com DNAse I, utilizando o Kit Super Script™ III First-Strand Synthesis Super Mix for qRTPCR (Cat. no. 11752-050, INVITROGEN), de acordo com as especificações do fabricante. A cada reação foi, então, adicionado: 10µL de mix RT (2X); 2 µL de Enzima mix e água livre de RNAse suficiente para um volume final de 20 µL de reação. As reações foram incubadas em termociclador (Mastercycler-Eppendorf) por 20 min a 25ºC, seguidos por 30 min a 50ºC min e 5 min a 85ºC. Transcorrido esse ciclo, os tubos foram colocados no gelo e adicionado 1 µL de RNAse H. A seguir, os tubos foram incubados por mais 30 min a 37ºC e o cDNA armazenado a -20°C.

Para as reações de RT-qPCR foi utilizado o kit SYBR® Green (Kit Platinum® SYBR® Green qPCR Super Mix-UDG - Invitrogen), conforme as recomendações do fabricante. As reações foram realizadas, em triplicata, no termociclador Step One Plus Real-Time PCR System (AppliedBiosystems, Foster, CA, USA), constituindo-se de 12,5 µL de Supermix Platinum SYBR Green, 1 µL de ROX (corante de referência), 10 µM de primer foward, 10 µM de primer reverse, cDNA alvo, sendo completado com água livre de RNAse para um volume final de 25 µL. Os parâmetros de ciclagem para as reações de amplificação foram 50°C por 2 min; 95°C por 2 min; seguidos de 45 ciclos de 95°C por 15 s e 60°C por 30 s, sendo os dados coletados na última etapa. O nível de expressão gênica foi calculado aplicando-se o método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (LivakeSchmittgen, 2001).

3.7 Análise estatística

Para a comparação entre os grupos, inicialmente foi analisada a homogeneidade e variabilidade dos resultados. Posteriormente, foi realizada a análise de variância ANOVA seguida do teste de Tukey para a comparação entre os grupos. Em todos os ensaios experimentais realizados, foi utilizado o programa GraphPad Prism 6.0, com nível de significância de 5%.

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação dos efeitos das formulações probióticas sobre *S. mutans* em culturas planctônicas

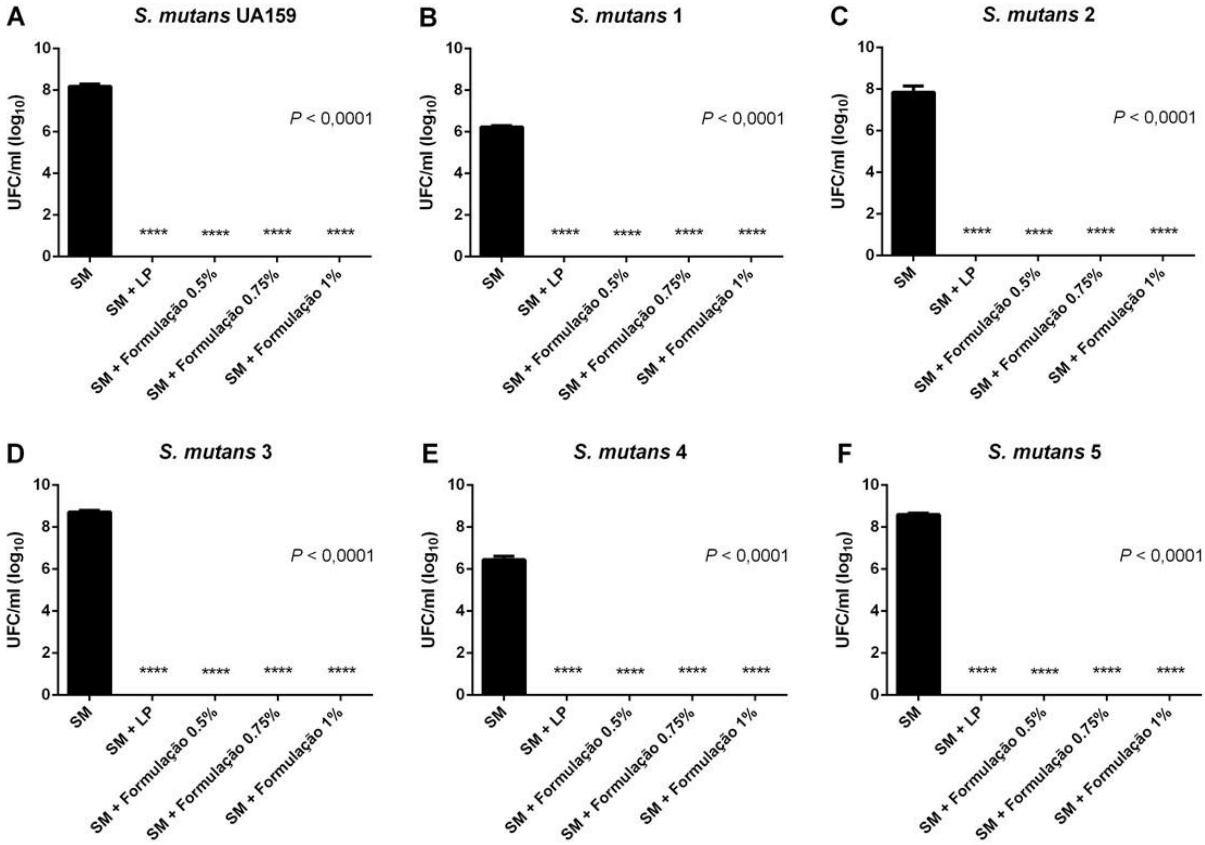
Os efeitos antibacterianos das 3 diferentes concentrações do hidrogel da formulação probiótica de *L. paracasei* 28.4 (0,5%, 0,75% e 1% p/v) foram testados sobre as cepas de *S. mutans* (cepa UA 159 e 5 cepas clínicas).

Os resultados obtidos na contagem de UFC/mL de *S. mutans* nas placas de MSBS demonstraram que a aplicação das formulações probióticas, nas 3 concentrações avaliadas, levou a redução total do crescimento das cepas de *S. mutans* estudadas. Esses resultados também foram encontrados quando apenas a suspensão de *L. paracasei* 28.4 foi aplicada ao meio de cultura (Figura 9). Em relação a contagem de UFC/mL de *Lactobacillus* nas placas de ágar Rogosa, verificou-se que todas as formulações probióticas testadas permitiram a liberação e o crescimento de *L. paracasei* 28.4 no meio de cultura (Figura 10).

A fim de elucidar se a inibição do crescimento das cepas de *S. mutans* possa ter ocorrido pela redução do pH do ambiente promovido pela cepa de *Lactobacillus*, investigamos a alteração dos valores de pH do meio de cultura após as 24 horas de atividade profilática proposta para as formulações probióticas. Os valores de pH encontrados mostraram que somente a formulação probiótica com hidrogel na concentração 0,5% p/v promoveu significativa redução do pH de 7 para aproximadamente 5 ($p < 0.0001$) (Figura 11).

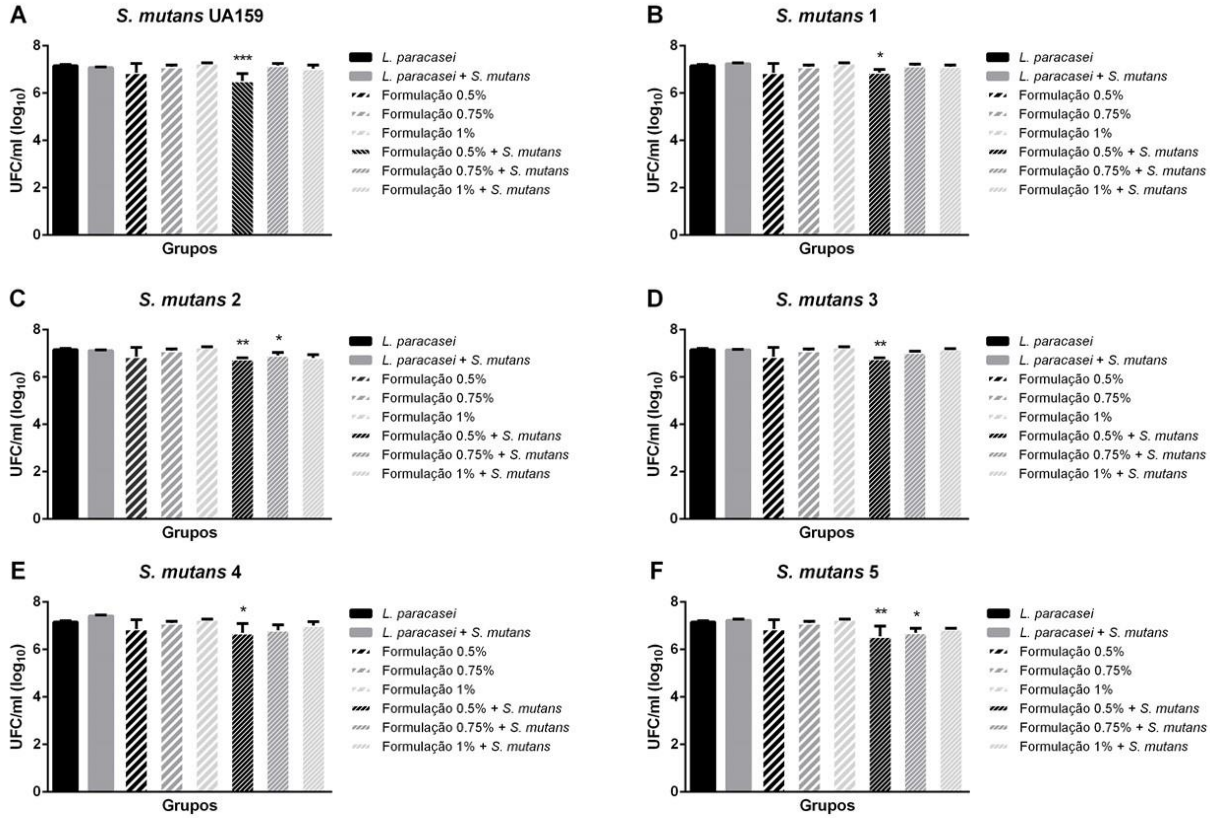
Assim, a inibição do crescimento das cepas de *S. mutans* em culturas planctônicas não pode ser atribuída à alteração do pH local, uma vez que somente uma formulação probiótica apresentou redução do pH em comparação ao grupo controle.

Figura 9 - Média e desvio padrão dos dados de UFC/mL (Log_{10}) obtidos no crescimento planctônico das cepas de *S. mutans* (SM) nos grupos formados por: apenas *S. mutans*, *S. mutans* + suspensão de *L. paracasei* 28.4 *e S. mutans* + Formulações Probióticas (0,5% p/v, 0,75% p/v e 1% p/v)



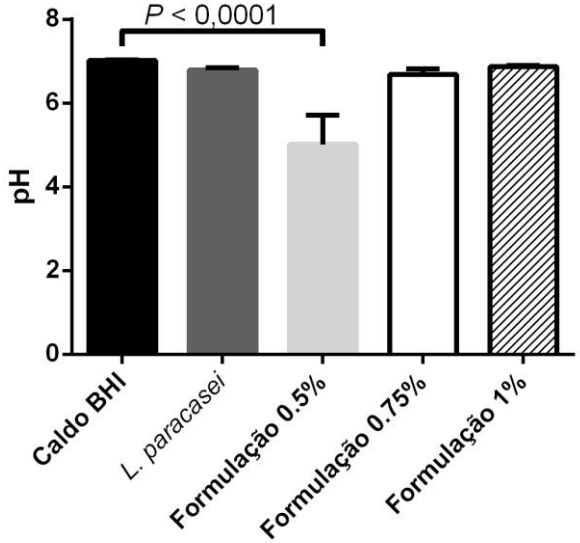
Legenda: Controle *S.mutans* (SM) e interações *S. mutans* com suspensão de *L. paracasei* 28.4 (SM + LP) e com diferentes concentrações do hidrogel da formulação probiótica. Cada coluna apresenta a média de quatro experimentos independentes. Teste ANOVA complementado com teste de Tukey, diferença estatística considerada significativa $p \leq 0.05$. (**** p< 0,0001).
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 10 - Média e desvio padrão dos dados de UFC/mL (Log_{10}) obtidos no crescimento planctônico de *L. paracasei* 28.4 nos grupos controles e nos tratamentos com as cepas de *S. mutans*



Legenda: Controles *L. paracasei* 28.4 e Formulações probióticas, e interações com as cepas de *S. mutans*. Cada coluna apresenta a média de quatro experimentos independentes. Teste ANOVA complementado com teste de Tukey, diferença estatística considerada significativa $p \leq 0.05$.
* (p<0,05) ** (p<0,01) *** (p< 0,001).
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 11 - Média e desvio padrão do pH do meio após 24 horas de liberação de *L. paracasei* 28.4 em caldo BHI nas diferentes concentrações do hidrogel das formulações probióticas (0,5% p/v, 0,75% p/v e 1% p/v) comparados ao pH do caldo BHI

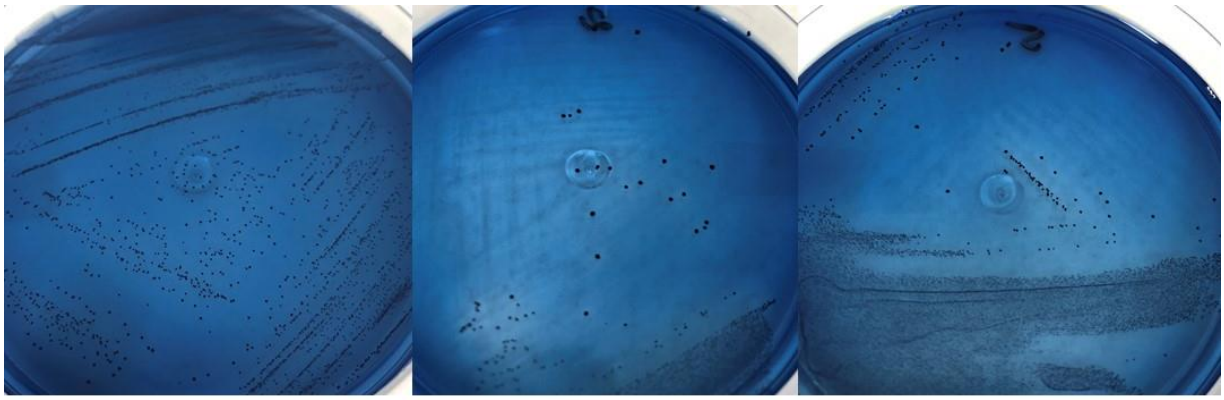


Legenda: Controle (Caldo BHI), *L. paracasei* 28.4 e Formulações probióticas. Cada coluna apresenta a média de dois experimentos independentes em duplicata com n=6. Teste ANOVA complementado com teste de Tukey, diferença estatística considerada significativa $p \leq 0.05$.
Fonte: Elaborado pelo autor.

4.2 Avaliação dos efeitos da formulação probiótica sobre os biofilmes de *S. mutans*

Para os experimentos em biofilmes, foram selecionadas a cepa *S. mutans* UA 159 e mais duas cepas clínicas (*S. mutans* 2 e *S. mutans* 5), que apresentaram nos experimentos realizados, colônias com morfologia celular e crescimento no grupo controle muito similares a cepa de referência (Figura 12). Em relação às formulações probióticas, selecionamos a formulação com concentração do hidrogel de 1% p/v, por apresentar liberação de *Lactobacillus* e valores de pH mais próximos do grupo controle.

Figura 12 - Aspecto morfológico das colônias de *S. mutans* apresentando sua característica de aspecto estrelado e vidro esmerilado em ágar Mitis Salivarius acrescido de 0,2 UI por mL de meio de bacitracina



Fonte: Elaborado pelo autor.

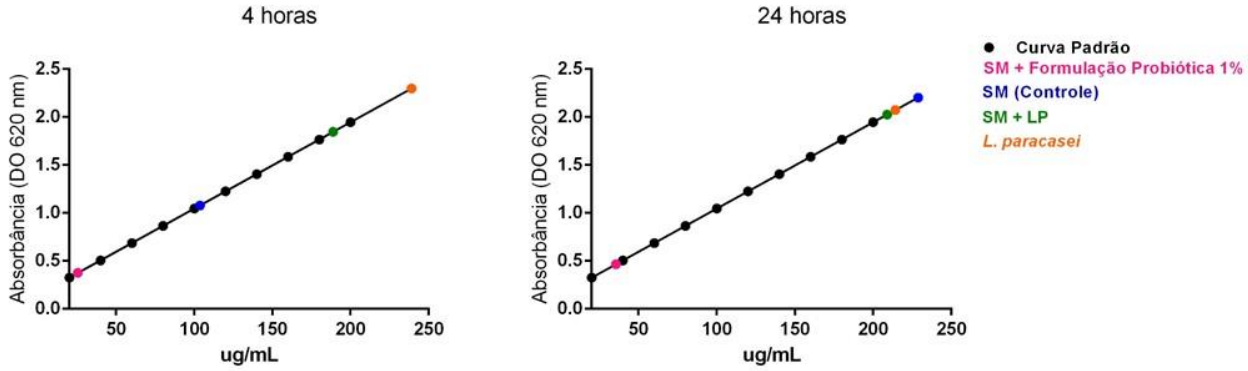
Assim, os biofilmes de *S. mutans* foram formados com a aplicação da formulação probiótica na concentração de 1% p/v. A seguir, os biofilmes foram analisados quanto à produção de polissacarídeos, quantificação da biomassa total, contagem de células viáveis, Microscopia Eletrônica de Varredura e análise da expressão gênica.

4.2.1 Análise do efeito da formulação probiótica sobre a produção de polissacarídeos extracelulares (PEC) por *S. mutans*

Após 4 horas de formação de biofilme, a produção dos polissacarídeos nos grupos tratados com a formulação foi reduzida em torno de 75% em comparação aos grupos controles formados apenas por *S. mutans*. O biofilme formado apenas por *S. mutans* produziu 103,66 µg/mL de polissacarídeos, enquanto que o grupo tratado com formulação probiótica produziu 25,44 µg/mL. Em contrapartida, nos grupos formados por *S. mutans* e suspensão de *L. paracasei* 28.4, foi obtido um aumento de 111% na produção dos polissacarídeos (Figuras 13 e 14).

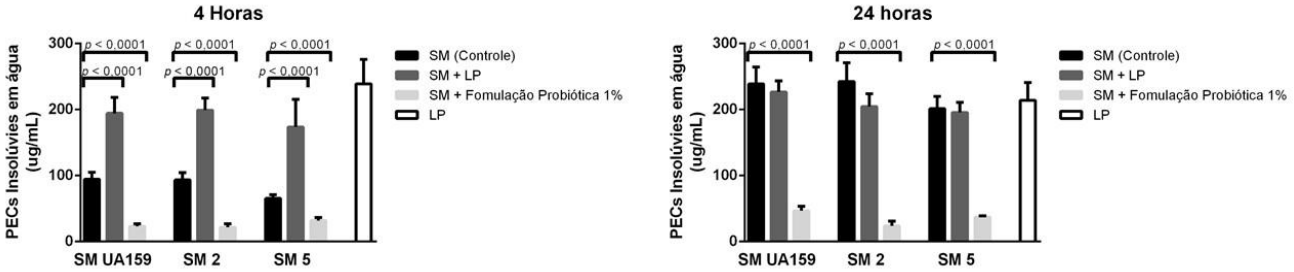
Após 24 horas de formação de biofilme, houve um aumento 2 vezes maior da produção de polissacarídeos por *S. mutans* do que o tempo de 4 horas, indicando que a produção de polissacarídeos vai aumentando significativamente com o transcorrer do tempo do biofilme. Nos grupos tratados com a formulação probiótica, foi obtida uma redução de 85% na produção dos polissacarídeos em comparação aos grupos controles com diferenças significativas. Foi observada formação de polissacarídeos extracelulares no biofilme de *S. mutans* de 228,66 µg/mL, enquanto que o grupo tratado com formulação probiótica produziu 35,556 µg/mL de polissacarídeos (Figuras 13 e 14).

Figura 13 - Curva padrão de glicose e médias dos dados da produção de polissacarídeos extracelulares nos grupos formados por: apenas *S. mutans*, *S. mutans* + Formulação Probiótica, *S. mutans* + suspensão de *L. paracasei* 28.4, e apenas *L. paracasei* 28.4



Legenda: Controle *S. mutans* (SM), *S. mutans* + Formulação Probiótica, *S. mutans* + *L. paracasei* 28.4 (SM + LP) e controle *L. paracasei* 28.4. Cada ponto representa a média de dois experimentos independentes em duplicata com n=4.
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 14 - Média e desvio padrão dos dados de produção de PECs obtidos nos biofilmes de 4 e 24 horas pelas cepas *S. mutans* UA 159, *S. mutans* 2, *S. mutans* 5 e *L. paracasei* 28.4 nos grupos formados por: apenas *S. mutans*, *S. mutans* + Formulação Probiótica, *S. mutans* + suspensão de *L. paracasei* 28.4*,* e apenas *L. paracasei* 28.4

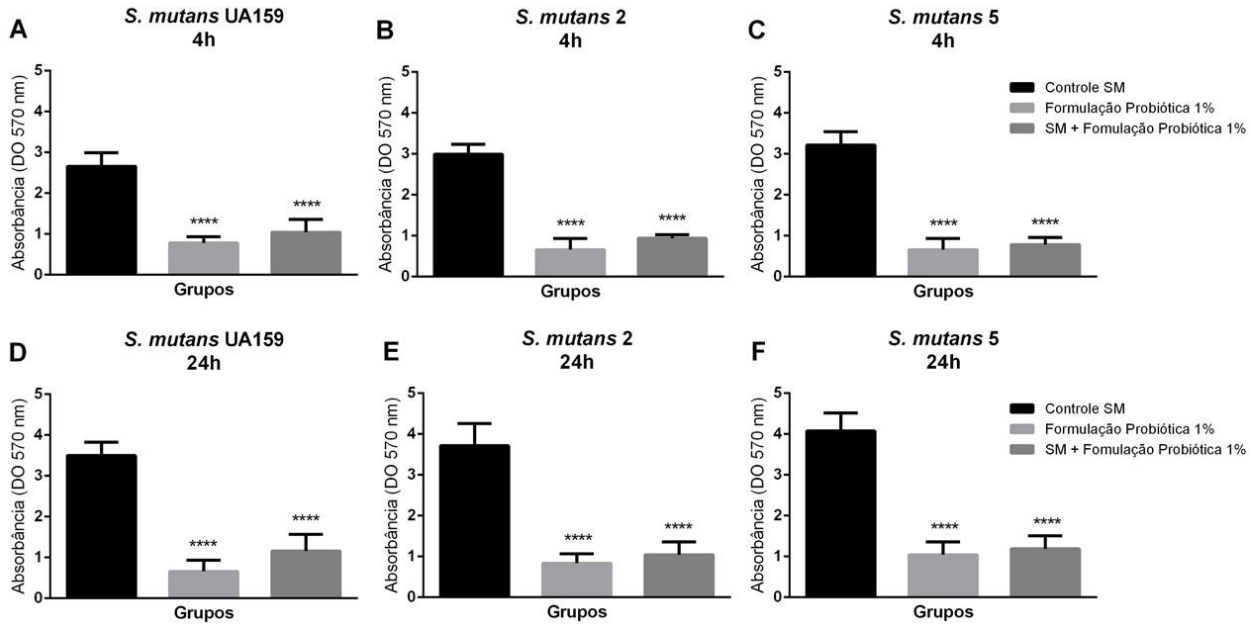


Legenda: Controle *S. mutans* (SM), *S. mutans* + *L. paracasei* 28.4 (SM + LP), *S. mutans* + Formulação Probiótica, e controle *L. paracasei* 28.4. Cada coluna representa a média de dois experimentos independentes em duplicata com n=4. Teste ANOVA complementado com teste de Tukey, diferença estatística considerada significativa $p \leq 0.05$.
Fonte: Elaborado pelo autor.

4.2.2 Análise do efeito da formulação probiótica sobre a biomassa total dos biofilmes de *S. mutans*

Os resultados da análise de absorbância do cristal violeta demonstraram que os biofilmes de *S. mutans* tratados com a formulação probiótica tiveram redução significativa da biomassa total em comparação com o grupo controle. Esses resultados foram encontrados em todas as cepas de *S. mutans* testadas e em ambos os tempos analisados (4 e 24 horas). A redução média da biomassa, medida em densidade óptica, do grupo tratado em relação ao controle foi de 2,03 ± 0,14 no tempo de 4 horas e 2,63 ± 0,22 em 24 horas (Figura 15).

Figura 15 - Média e desvio padrão dos dados de biomassa total pelo teste de cristal violeta, obtidos nos biofilmes de 4 e 24 horas pelas cepas *S. mutans* UA 159, *S. mutans* 2 e *S. mutans* 5 nos grupos formados por: apenas *S. mutans*, *S. mutans* + Formulação Probiótica, e apenas a Formulação Probiótica



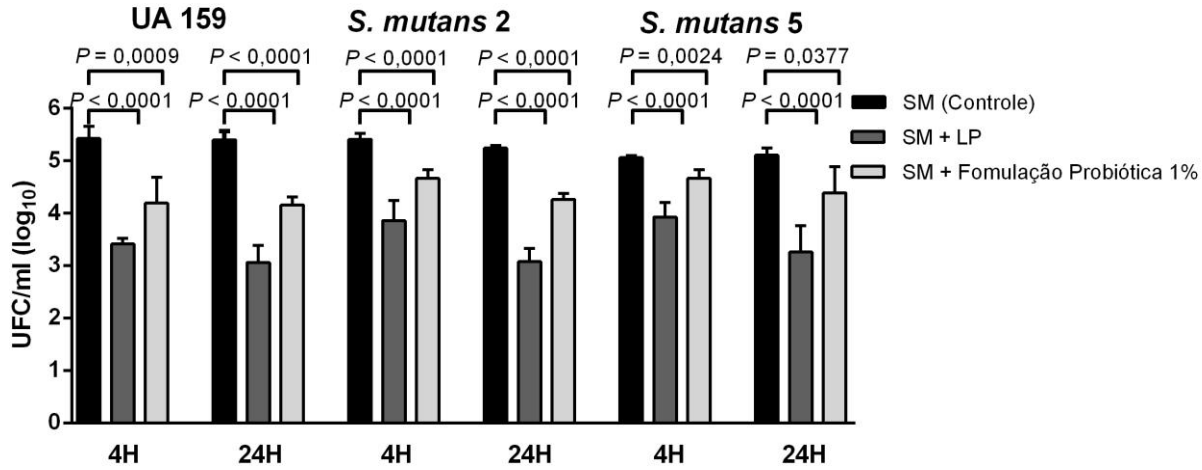
Legenda: Controle *S.mutans* (SM), Controle Formulação Probiótica 1% p/v e interação *S. mutans* com a formulação probiótica 1% p/v. Cada coluna apresenta a média de três experimentos independentes. Teste ANOVA complementado com teste de Tukey, diferença estatística considerada significativa $p \leq 0.05$. **** (p< 0,0001).
Fonte: Elaborado pelo autor.

4.2.3 Análise do efeito da formulação probiótica sobre a contagem de células viáveis dos biofilmes de *S. mutans*

Na contagem de UFC/mL, observou-se redução significante das células viáveis de *S. mutans* nos biofilmes tratados com a suspensão de *L. paracasei* 28.4 ou com a formulação probiótica. Essas reduções foram encontradas em todas as cepas de *S. mutans* estudadas. Quando comparamos o grupo controle aos biofilmes tratados com a formulação probiótica, observamos que a cepa *S. mutans* UA 159 apresentou maiores reduções em relação às cepas clínicas, mostrando redução de 1,23 ± 0,24 $\log_{10}$ no tempo de 4 horas, e 1,24 ± 0,10 $\log_{10}$ em 24 horas. A cepa clínica *S. mutans* 2 apresentou redução de 0,74 ± 0,09 $\log_{10}$ no biofilme de 4 horas e

0,97 ± 0,05 log_{10} em 24 horas, enquanto que a cepa clínica *S. mutans* 5 mostrou, em 4 horas, redução de 0,39 ± 0,08 log_{10} e 0,71 ± 0,22 log_{10} em 24 horas (Figura 16).

Figura 16 - Média e desvio padrão dos dados de UFC/mL (Log_{10}) obtidos nos biofilmes de 4 e 24 horas pelas cepas *S. mutans* UA 159, *S. mutans* 2 e *S. mutans* 5 nos grupos formados por: apenas *S. mutans*, *S. mutans* + suspensão de *L. paracasei* 28.4 e *S. mutans* + Formulação Probiótica



Legenda: Controle *S.mutans* (SM) e interações *S. mutans* com suspensão de *L. paracasei* 28.4 (SM + LP) e com a formulação probiótica 1% p/v. Cada coluna apresenta a média de três experimentos independentes. Teste ANOVA complementado com teste de Tukey, diferença estatística considerada significativa $p \leq 0.05$.
Fonte: Elaborado pelo autor.

4.2.4 Análise do efeito da formulação probiótica sobre a estrutura dos biofilmes de *S. mutans* por Microscopia Eletrônica de Varredura

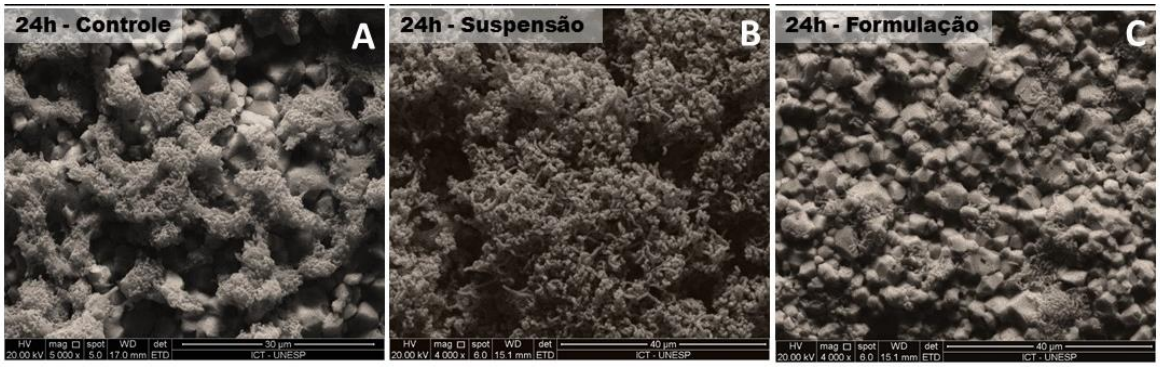
Os biofilmes formados nos discos de hidroxiapatita foram analisados por microscopia eletrônica de varredura (MEV), no qual observamos a colonização inicial das células de *S. mutans* no tempo de 4 horas (Figura 17) e um biofilme maduro após 24 horas de incubação (Figura 18). Biofilmes formados apenas pela cepa de *S. mutans* apresentaram uma grande quantidade de células aderidas à hidroxiapatita,

enquanto que os biofilmes tratados pela formulação probiótica apresentaram poucas células de *S. mutans* dispersas aderidas à superfície da hidroxiapatita.

Figura 17 - MEV dos biofilmes formados no disco de hidroxiapatita no tempo de 4 horas. **A)** biofilme evidenciando adesão celular inicial de *S. mutans*; **B)** biofilme de *S. mutans* + *L. paracasei* 28.4 mostrando predomínio celular de *Lactobacillus*; **C)** biofilme de *S. mutans* + formulação probiótica mostrando uma diminuição significativa no número de células de *S. mutans* em relação ao controle, evidenciando a superfície do disco de hidroxiapatita

Legenda: Aumento original 4000x.
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 18 – MEV dos biofilmes formados no disco de hidroxiapatita no tempo de 24 horas. **A)** biofilme de *S. mutans* **B)** biofilme de *S. mutans* + *L. paracasei* 28.4 mostrando predomínio celular de *Lactobacillus*; **C)** biofilme de *S. mutans* + formulação probiótica mostrando uma diminuição significativa no número de células de *S. mutans* em relação ao controle, evidenciando a superfície do disco de hidroxiapatita



Legenda: Aumento original 4000x.
Fonte: Elaborado pelo autor.

4.2.5 Análise do efeito da formulação probiótica sobre a expressão dos genes *luxS*, *brpA*, *gbpB* e *gtfB* de *S. mutans*

Com a finalidade de elucidar os efeitos da formulação probiótica sobre a formação do biofilme de *S. mutans*, foi utilizada a qPCR para avaliar o nível de expressão de genes relacionados a adesão, formação de biofilme e produção de polissacarídeos. Para isso, os biofilmes formados após 4 e 24 horas (*S. mutans, S. mutans + L. paracasei 28.4* e *S. mutans* + formulação probiótica) foram submetidos à extração do RNA total e quantificados na concentração de ng/µL. A quantidade obtida e a pureza das amostras, a relação 260/280 nm foram maiores que 1,80, sendo assim, adequadas para o processo de transcrição reversa como indicado no Quadro 1.

Quadro 1 – Concentração e grau de pureza de RNA após a extração dos biofilmes

	Amostra	Concentração (ng/µL)	260/280 nm	260/230 nm
4 horas	SM UA 159	1094,6	2,01	0,95
	SM UA 159 + LP	2939,2	2,02	1,54
	SM UA 159 + F	690	2,02	1,42
	SM 2	1649,6	2,06	1,34
	SM 2 + LP	1484,1	1,86	1,62
	SM 2 + F	938,1	1,76	1,43
	SM 5	889,3	1,96	1,06
	SM 5 + LP	3818,7	2,04	1,65
	SM 5 + F	1237,2	2,02	0,97
24 horas	SM UA 159	1233,9	2,03	1,24
	SM UA 159 + LP	3804,1	1,99	1,87
	SM UA 159 + F	1410,2	1,94	0,65
	SM 2	2300	2,05	1,7
	SM 2 + LP	4515,2	1,73	1,63
	SM 2 + F	793,7	1,78	0,88
	SM 5	1295,4	2	0,96
	SM 5 + LP	6964,6	1,96	1,89
	SM 5 + F	1210,5	1,99	0,97

Fonte: Elaborado pelo autor.

A massa de 600 ng de cDNA foi padronizada para todas as amostras pois obteve-se melhor amplificação. Todos os iniciadores utilizados neste experimento apresentaram uma eficiência de entre 100 e 110%. Procurou-se observar em todas as curvas, eficiência ±100%, Slope ±-3,32, coeficiente de correlação ≥ 0,99. Esses dados estão apresentados no Quadro 2.

Quadro 2 - Valores de Slope, correlação e eficiência da amostra *S. mutans* UA159

Iniciador	Nome	Slope	Correlação (R^2)	Eficiência
brpA	Proteína A reguladora de biofilme	3,106	0,99	108,01
luxS	Enzima envolvida no quórum sensing	3,104	0,99	109,79
gbpB	Proteína B ligante de glucano	3,091	0,993	110,615
gtfB	Glicosil transferase	3,294	0,989	101,83
LdH	Lactato desidrogenase	3,189	0,997	105,85

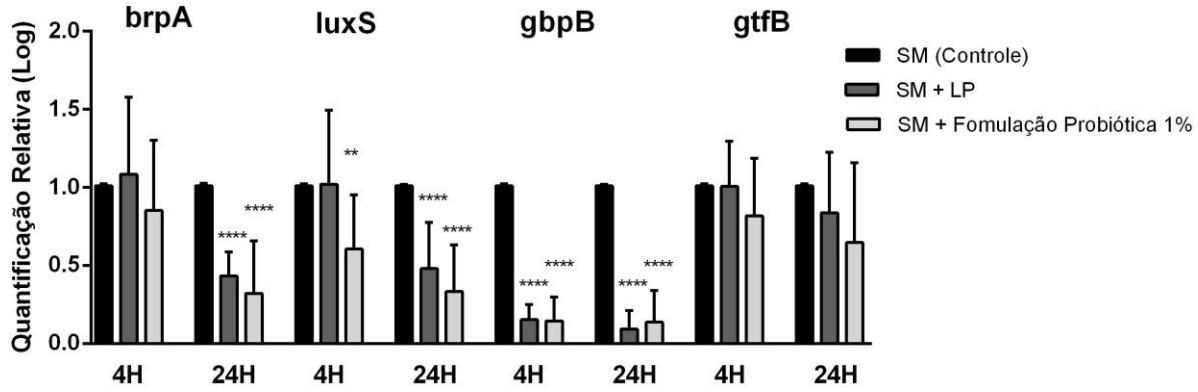
Fonte: Elaborado pelo autor.

Os resultados da quantificação relativa representam a variação no nível de expressão dos genes alvos entre os grupos de *S. mutans* + células de *L. paracasei* 28.4 e *S. mutans*+ formulação probiótica em relação a amostra calibradora (*S. mutans* + NaCl). O perfil de amplificação obtida em cada amostra do *S. mutans* (SM UA 159, SM2 e SM5) foram muito semelhantes nos 3 grupos estudados e por isso a análise da expressão gênica foi realizada com os valores de Ct das 3 amostras em triplicata do *S. mutans*. Os resultados foram obtidos como valores relativos da expressão gênica (com base na fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$) em comparação a um alvo-interno de referência, previamente selecionado, e que resulta em valor 1. O experimento foi realizado pelo aparelho StepOnePlus™ System (Life Technologies, Carlsbad, California, EUA) que já calculou a quantificação relativa na base Log. Expressão relativa dos genes alvos em biofilmes formados pelos grupos de *S. mutans* descritos acima nos tempos de 4 e 24 horas foram demonstradas abaixo (Figura 19).

Os resultados dos testes anteriores, precedentes à análise da expressão gênica de *S. mutans*, mostraram um comportamento uniforme para todas as cepas de *S. mutans* testadas. Portanto para na avaliação da expressão gênica, os

resultados para cada grupo, foram expressos de forma unificada com média e desvio padrão representativo das 3 cepas estudadas.

Figura 19 - Média e desvio padrão da quantificação relativa (log) da expressão dos genes envolvidos na formação do biofilme (*luxS e brpA*), da proteína de superfície que se liga ao glucano (*gbpB*), e glicosiltransferase B (*gtfB*) nas células de *S. mutans* em biofilmes monotípicos e associados a cepa probiótica *L. paracasei* 28.4 e a Formulação Probiótica 1% p/v por meio do PCR quantitativo em tempo real, em relação ao controle (*S. mutans*)



Legenda: Controle *S.mutans* (SM), interação *S. mutans* com *L. paracasei* 28.4 e *S. mutans* com a formulação probiótica 1% p/v. Cada coluna apresenta a média de três experimentos independentes. Valores são expressos pela média e desvio padrão. Teste *t-Student* foi utilizado na quantificação relativa da expressão gênica. (**p* ≤ 0.05, **** *p*<0.0001).
Fonte: Elaborado pelo autor.

5 DISCUSSÃO

O uso de probióticos tem sido considerado uma estratégia promissora para o controle de várias doenças da cavidade bucal (Kim, Mylonakis, 2012; Su et al., 2013; Ishikawa et al., 2015; Vilela et al., 2015; Ribeiro et al., 2016; Rossoni et al., 2018), podendo ser usado na prevenção e tratamento de mucosites, doença periodontal e peri-implantar (Galofré et al., 2018), halitoses, cárie dental (Twetman et al., 2009, Rossoni et al., 2018) e candidoses bucais (Vilela et al., 2015; Ribeiro et al., 2016; Rossoni et al., 2018).

Muitos micro-organismos apresentam características probióticas, destacando-se cepas dos gêneros *Bifidobacterium*, *Saccharomyces*, *Bacillus* e *Lactobacillus* (Guarner et al., 2012; Herbel et al., 2013; Vilela et al., 2015; Rossoni et al., 2018). Os micro-organismos do gênero *Lactobacillus* são comensais que habitam a cavidade bucal de cerca de 60% da população (Ramamurthy, 2014; Rossoni et al., 2018) e já foram considerados o principal patógeno envolvido na doença cárie devido a sua capacidade de produzir ácidos na presença de sacarose e sobreviver em pH baixo (Jalasvuori, 2012). No entanto, atualmente sabe-se que *Lactobacillus* não se acumulam em grande número no biofilme dental e que seu papel na cárie dental está associado com a progressão das lesões cavitárias (Chhour et al., 2005; Zhang et al., 2014; Caufield et al., 2015). Além disso, estudos indicam que cepas clínicas provenientes de um ambiente sadio podem atuar conferindo proteção frente à micro-organismos patogênicos (Rossoni et al., 2018).

Desse modo, o interesse em terapias probióticas de prevenção e controle da cárie dental tem crescido significativamente com resultados promissores (Tanzer et al., 2010; Twetman et al., 2009; Twetman, Keller, 2012; Yanine et al., 2013; Vilela et al., 2015; Rossoni et al., 2018). O uso de probióticos têm mostrado agir de maneira a afetar a ecologia bucal de modo específico, impedindo a aderência de *Streptococcus mutans* (Simark-Mattsson et al., 2007; Laleman et al., 2014) e estimulando a ação imunomodulatória do hospedeiro (Mendi et al., 2016), sem causar efeitos colaterais para os tecidos bucais (Saavedra et al., 2004). Estudos prévios comprovaram benefícios no uso de cepas de *Lactobacillus* para o controle de micro-organismos cariogênicos, entretanto essas cepas foram incorporadas em produtos alimentícios

(Ahola et al., 2002; Simark-Mattsson et al., 2007; Twetman et al., 2009; Haukioja, 2010; Hasslöf et al., 2010; Keller et al., 2011; Holgerson et al., 2013; Lin et al., 2015). Nesse contexto, o objetivo do presente estudo foi incorporar a cepa probiótica *L. paracasei* 28.4 em hidrogel de *gellan gum* e avaliar seus efeitos contra *S. mutans*, buscando-se assim desenvolver formulações probióticas para uso local na cavidade bucal voltadas para a prevenção da cárie dental.

Inicialmente, foram testados os efeitos de 3 diferentes concentrações do hidrogel das formulações probióticas sobre culturas planctônicas de *S. mutans.* As formulações probióticas apresentaram atividade antibacteriana sobre todas as cepas de *S. mutans* testadas promovendo inibição total no crescimento de *S. mutans.* A atividade antibacteriana de uma formulação probiótica oral também foi testada sobre *S. mutans* por Elgamily et al. (2018). Esses autores testaram um enxaguatório bucal experimental contendo *L. rhamnosus* B-445 sobre uma cepa clínica de *S. mutans* por meio de teste de ágar-difusão, verificando-se a formação de halos de inibição significativos após 72 horas de observação. Tanto em nosso estudo como no trabalho de Elgamily et al. (2018), não houve correlação entre a atividade inibitória de *S. mutans* com alterações do pH do meio local, que poderiam ser provocadas pelo uso das formulações probióticas. Em estudo clínico, Sanghvi et al. (2018) também não observaram aumento significativo dos valores de pH da cavidade bucal de pacientes tratados com cápsulas probióticas contendo as cepas *Lactobacillus rhamnosus* GG‑HS111, *Lactobacillus acidophilus*‑HS101 e *Bifidobacterium bifidum*.

Esses dados sugerem que a atividade antibacteriana observada pode estar associada com a competição por nutrientes entre *S. mutans* e a cepa probiótica e/ou por substâncias antimicrobianas secretadas por *Lactobacillus* que podem inibir o crescimento de patógenos bucais. Em estudo recente do nosso grupo de pesquisa (Rossoni et al., 2018), foram avaliados os efeitos antibacterianos dos sobrenadantes filtrados das culturas de 22 cepas clínicas de *Lactobacillus*, isoladas da cavidade bucal de indivíduos saudáveis, sobre *S. mutans* (cepa UA 159). Os sobrenadantes da maior parte das cepas de *Lactobacillus* testadas foram capazes de inibir *S. mutans*, incluindo a cepa *L. paracasei* 28.4, que é a cepa usada nas formulações probióticas em *gellan gum* do presente trabalho. Esses resultados sugerem que *L. paracasei* 28.4 deve secretar substâncias bioativas no meio de cultura, presentes no sobrenadante, que inibem o crescimento de *S. mutans*.

Em estudos subsequentes do presente trabalho, foram realizados diferentes experimentos para avaliar os efeitos da formulação probiótica de 1% sobre biofilmes de *S. mutans.* O tratamento dos biofilmes de *S. mutans* com a formulação probiótica levou a redução na produção de polissacarídeos extracelulares por *S. mutans*, na formação de biofilmes e na inibição da expressão de genes de virulência.

Como os polissacarídeos extracelulares são importantes fatores de virulência de *S. mutans* envolvidos na aderência e formação do biofilme (Marsh 2003; Cummins, 2013), a supressão desse mecanismo de patogenicidade torna-se um importante meio de controle da cárie dental (Koo et al., 2003; Leyva et al., 2008; Koo et al., 2010; Chen et al., 2015). No presente trabalho, verificamos que tanto o grupo controle formado apenas por *S. mutans*, como o grupo controle formado apenas *L. paracasei* 28.4, apresentaram alta produção de PECs. Esses resultados estão de acordo com a literatura que mostram que, além de *S. mutans*, algumas espécies de *Lactobacillus*, como *L. paracasei* e *L. plantarum,* também, possuem a capacidade de produzir polissacarídeos intra e extracelulares (Wang et al. 2014). Quando os biofilmes de *S. mutans* foram tratados com a suspensão de *L. paracasei* 28.4, houve um aumento da produção de PECs no início da formação do biofilme (4 horas) comparado ao grupo controle formado apenas por *S. mutans*. Entretanto, foi observada redução média de 80% na produção de PECs nos biofilmes tratados com a formulação probiótica (4 e 24 horas). Esses dados sugerem que a administração de *L. paracasei* 28.4 incorporado em formulações probióticas promoveu um sistema de liberação controlado, com tempo suficiente para as células de *L. paracasei* 28.4 inibirem *S. mutans* e consequentemente a formação de PECs.

A seguir, os efeitos da formulação probiótica sobre os biofilmes de *S. mutans* foram analisados pelos testes de absorbância do cristal violeta, contagem de células viáveis e microscopia eletrônica de varredura (MEV). Os resultados demonstraram que nos biofilmes de *S. mutans* tratados com a formulação probiótica ocorreram reduções significativas na quantidade de biomassa total, no número de células viáveis de *S. mutans* e na aderência de *S. mutans* à superfície da hidroxiapatita em relação ao grupo controle. Jeong et al. (2018) também encontraram significante redução da capacidade de formação de biofilme por *S. mutans* e *S. sobrinus* quando esses foram tratados com cepas de *Lactobacillus* derivadas do Kefir e comercializadas como probióticos. Kim e Lee (2016) verificaram redução nos

biofilmes de *S. mutans* associados a duas espécies diferentes de *L. lactis* na contagem de UFC/mL e em microscopia confocal. Jian et al. (2016) estudaram a relação de *Lactobacillus rhamnosus* GG no biofilme de 6 diferentes espécies de micro-organimos orais, dentre eles *S. mutans*, observando redução de UFC/mL nos biofilmes formados em discos de hidroxiapatita.

Nesse estudo, observamos que os níveis de transcrição dos genes envolvidos na regulação e formação de biofilmes, *luxS, brpA, gbpB* e *gtfB,* foram suprimidos nos grupos tratados com a formulação probiótica. Alguns estudos prévios também demonstraram diminuição da expressão de genes de virulência de *S. mutans* por cepas de *Lactobacillus.* Wen et al. (2010) verificaram menor quantidade na expressão dos genes *luxS*, g*bpB* e *gtfB* de *S. mutans* em co-culturas com *L. casei* comparado com as monoculturas de *S. mutans*. Kim, Lee (2016) observaram redução na expressão dos genes *gtfB, gtfC* e *gtfD* de *S. mutans* quando cultivados em associação com as cepas de *Lactobacillus lactis* HY499 e *L. lactis* ATCC 19435.

Assim, os resultados obtidos no presente trabalho demonstram que a formulação probiótica em *gellan gum* contendo *L. paracasei* 28.4 tem potencial para ser usada na prevenção da cárie dental, inibindo o crescimento de *S. mutans* e a formação do biofilme dentário.

6 CONCLUSÃO

Diante dos resultados expostos, concluiu-se que a formulação probiótica contendo *L. paracasei* 28.4 em *gellan gum*:

a) apresentou atividade antibacteriana sobre a cepa de referência UA 159 e mais 5 cepas clínicas de *S. mutans*;
b) promoveu redução na produção de polissacarídeos extracelulares nos biofilmes de *S. mutans*;
c) reduziu a quantidade de biomassa total nos biofilmes formados por *S. mutans*;
d) diminui a viabilidade celular e aderência das células à hidroxiapatita na formação de biofilmes de *S. mutans*;
e) suprimiu os níveis de transcrição na expressão de genes de virulência de *S. mutans*.

Portanto, a formulação probiótica desenvolvida nesse trabalho apresenta um método promissor no controle de *S. mutans* e prevenção da cárie dental.

REFERÊNCIAS*

Agnihotri SA, Aminabhavi TM. Development of novel interpenetrating network gellan gum-poly(vinyl alcohol) hydrogel microspheres for the controlled release of carvedilol. Drug Dev Ind Pharm. 2005 Jul;31(6):491-503. PubMed PMID: 16109622.

Ahola AJ, Yli-Knnuuttila H, Suomalainen T, Poussa T, Ahlström A, Meurman JH, et al. Short-term consuptiom of probiotic-containing cheese and its effect on dental caries risk factors. Arch Oral Biol. 2002 Nov;47(11):799-804. PMID: 12446187

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. USA. 2002; 99: 14434–39. doi: 10.1073/pnas.172501299. PubMed PMID: 12397186; PMCID: PMC137901

Annabi N, Tamayol A, Uquillas JA, Akbari M, Bertassoni LE, Cha C, et al. 25th anniversary article: Rational design and applications of hydrogels in regenerative medicine. Adv Mater. 2014 Jan 8;26(1):85-123. Review. PubMed PMID: 24741694; PubMed Central PMCID:PMC3925010.

Aryantini NP, Yamasaki E, Kurazono H, Sujaya IN, Urashima T, Fukuda K. In vitro safety assessments and antimicrobial activities of Lactobacillus rhamnosus strains isolated from a fermented mare's milk. Anim Sci J. 2017 Mar;88(3):517-525. doi: 10.1111/asj.12668. Epub 2016 Aug 1. PubMed PMID: 27476815.

Banas JA, Vickerman MM. Glucan-binding proteins of the oral streptococci. Crit Rev Oral Biol Med. 2003;14:89-99.

Barbosa JO, Rossoni RD, Vilela SF, de Alvarenga JA, Velloso M dos S, Prata MC, et al. Streptococcus mutans can modulate biofilm formation and attenuate the virulence of Candida albicans. PLoS One. 2016;11(3):e0150457. doi: 10.1371/journal.pone.0150457. PubMed PMID: 26934196; PMCID: PMC4774980

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. doi: 10.1038/ismej.2011.85. PubMed PMID: 21716308; PMCID: PMC3246241 18

Bitoun JP, Liao S, Yao X. BrpA is involved in regulation of cell envelope stress responses in Streptococcus mutans. J. Appl Environ Microbiol. 2012; 78(8):2914-22.

Borghi E, Romagnoli S, Fuchs BB, Cirasola D, Perdoni F, Tosi D. Correlation between Candida albicans biofilm formation and invasion of the invertebrate host Galleria mellonella. Future Microbiol. 2014;9:163-73 doi: 10.2217/fmb.13.159. PubMed PMID: 24571071

Bowen WH. Do we need to be concerned about dental caries in the coming millennium? Crit Rev Oral Biol Med. 2002;13(2):126–31. PubMed PMID: 12097355

* Baseado em: International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [atualizado 04 nov 2015; acesso em 25 jan 2017]. U.S. National Library of Medicine; [about 6 p.]. Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Bowen WH, Koo H. Biology of Streptococcus mutans-derived glucosyltransferases: role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms. Caries Res. 2011;45:69–86 doi: 10.1159/000324598 PubMed PMID: 21346355

Campana R, Federici S, Ciandrini E, Baffone W. Antagonistic activity of Lactobacillus acidophilus ATCC 4356 on the growth and adhesion/invasion characteristics of human Campylobacter jejuni. Curr Microbiol. 2012;64(4):371-8. doi: 10.1007/s00284-012-0080-0. PubMed PMID: 22271268

Cao L, Zhang ZZ, Xu SB, Ma M, Wei X. Farnesol inhibits development of caries by augmenting oxygen sensitivity and suppressing virulence-associated gene expression inStreptococcus mutans. J Biomed Res. 2017 Jul 13;31(4):333-343. doi: 10.7555/JBR.31.20150151. PubMed PMID: 28808205; PubMed Central PMCID: PMC5548994.

Caufield PW, Schön CN, Saraithong P, Li Y, Argimón S. Oral Lactobacilli and Dental Caries: A Model for Niche Adaptation in Humans. J Dent Res. 2015 Sep;94(9 Suppl):110S-8S. doi: 10.1177/0022034515576052. Epub 2015 Mar 10.

Chen L, Ren Z, Zhou X, Zeng J, Zou J, Li Y. Inhibition of Streptococcus mutans biofilm formation, extracellular polysaccharide production, and virulence by an oxazole derivative. Appl Microbiol Biotechnol. 2016 Jan;100(2):857-67. doi:10.1007/s00253-015-7092-1. Epub 2015 Nov 3. PubMed PMID: 26526453.

Chhour KL, Nadkarni MA, Byun R, Martin FE, Jacques NA, Hunter N. Molecular analysis of microbial diversity in advanced caries. J Clin Microbiol. 2005 Feb;43:843-9. PMID: 15695690.

Coutinho DF, Sant SV, Shin H, Oliveira JT, Gomes ME, Neves NM. Modified gellangum hydrogels with tunable physical and mechanical properties. Biomaterials 2010;31(29):7494-502.

Cummins D. Dental caries: a disease which remains a public health concern in the 21st century--the exploration of a breakthrough technology for caries prevention. J Clin Dent. 2013;24 Spec no A:A1-14. Review. PubMed PMID: 24156135.

D'Arrigo G, Navarro G, Di Meo C, Matricardi P, Torchilin V. Gellan gum nanohydrogel containing anti-inflammatory and anti-cancer drugs: a multi-drug delivery system for a combination therapy in cancer treatment. Eur J Pharm Biopharm. 2014 May;87(1):208-16. doi: 10.1016/j.ejpb.2013.11.001. Epub 2013 Nov 9. PubMed PMID: 24215783.

De Giglio E, Cometa S, Ricci MA, Cafagna D, Savino AM, Sabbatini L, et al. Ciprofloxacin-modified electrosynthesized hydrogel coatings to prevent titanium-implant-associated infections. Acta Biomater. 2011;7:882-91. doi: 10.1016/j.actbio.2010.07.030. PubMedPMID: 20659594

Devine DA, Marsh PD, Meade J. Modulation of host responses by oral commensal bacteria. J Oral Microbiol. 2015 Feb 6;7:26941. doi: 10.3402/jom.v7.26941. eCollection 2015. PubMed PMID: 25661061; PubMed Central PMCID: PMC4320998.

Duque C, Stipp RN, Wang B, Smith DJ, Hofling JF, Kuramitsu HK. Downregulation of GbpB, a component of the VicRK regulon, affects biofilm formation and cell surface characteristics of Streptococcus mutans. Infec Immun. 2011;79(2):786-96.

Elgamily H, Mosallam O, El-Sayed H, Mosallam R. Antibacterial effectiveness of probiotic-based experimental mouthwash against cariogenic pathogen: an in vitro study. Eur J Dent. 2018 Jan-Mar;12(1):7–14. doi: 10.4103/ejd.ejd_253_17

Falsetta ML, Klein MI, Colonne PM, Scott-Anne K, Gregoire S, Pai CH, et al. Symbiotic relationship between Streptococcus mutans and Candida albicans synergizes virulence of plaque biofilms in vivo. Infection and immunity. 2014;82(5):1968-81. doi: 10.1128/IAI.00087 PubMed PMID: 24566629; PMCID: PMC3993459

Galofré M, Palao D, Vicario M, Nart J, Violant D. Clinical and microbiological evaluation of the effect of Lactobacillus reuteri in the treatment of mucositis and peri-implantitis: A triple-blind randomized clinical trial. J Periodontal Res. 2018 Jun;53(3):378-390. doi: 10.1111/jre.12523. Epub 2018 Jan 19. PubMed PMID: 29352461.

Garcia MT. Clorina como fotossensibilizador para terapia fotodinâmica sobre Streptococcus mutans [dissertação]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2018.

Gibbons RJ. Adherent interactions which may affect microbial ecology in the mouth. J Dent Res. 1984;63:378–385. doi: 10.1177/00220345840630030401. PubMed PMID: 6583240

González-Hernández LA, Jave-Suarez LF, Fafutis-Morris M, Montes-Salcedo KE, Valle-Gutierrez LG, Campos-Loza AE, et al. Synbiotic therapy decreases microbial translocation and inflammation and improves immunological status in HIV-infected patients: a double-blind randomized controlled pilot trial. Nutr J. 2012 Oct 29;11:90. doi: 10.1186/1475-2891-11-90. PubMed PMID: 23101545; PubMed Central PMCID: PMC3494555.

Grady NG, Petrof EO, Claud EC. Microbial therapeutic interventions. Semin Fetal Neonatal Med. 2016 Dec;21(6):418-423. doi:10.1016/j.siny.2016.04.005. Epub 2016 Apr 25. Review. PubMed PMID: 27133778; PubMed Central PMCID: PMC5079850.

Guarner F, Khan AG, Garisch J, Eliakim R, Gangl A, Thomson A, et al. World Gastroenterology Organisation Global Guidelines:probiotics and prebiotics October 2011. J Clin Gastroenterol. 2012;46:468–81. doi: 10.1097/MCG.0b013e3182549092.

Hamada S, Slade HD. Biology, immunology, and cariogenicity of Streptococcus mutans. Microbiol Rev. 1980;44(2):331–84 PubMed PMID: 6446023;PMCID: PMC373181.

Hasslöf P, Hedberg M, Twetman S, Stecksén-Blicks C. Growth inhibition of oral mutans streptococci and candida by commercial probiotic lactobacilli--an in vitro study. BMC Oral Health. 2010 Jul 2;10:18. doi: 10.1186/1472-6831-10-18. PubMed PMID: 20598145; PubMed Central PMCID: PMC2908555.

Haukioja A. Probiotics and oral health. Eur J Dent. 2010 Jul;4(3):348-55. PMID: 20613927.

Herbel SR, Vahjen W, Wieler LH, Guenther S. Timely approaches to identify probiotic species of the genus Lactobacillus. Gut Pathog. 2013;5(1):27.

Holgerson PL, Vestman NR, Claesson R, Ohman C, Domellof M, Tanner ACR, et al. Oral microbial profile discriminates breast-fed from formula-fed infants. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2013 Feb;56(2):127-36. doi: 10.1097/MPG.0b013e31826f2bc6.

Ishikawa KH, Mayer MP, Miyazima TY, Matsubara VH, Silva EG, Paula CR, et al. A multispecies probiotic reduces oral Candida colonization in denture wearers. J Prosthodont. 2015;24(3):194-9. doi: 10.1111/jopr.12198. PubMed PMID: 25143068

Jalasvuori H, Haukioja A, Tenovuo J. Probiotic Lactobacillus reuteri strains ATCC PTA 5289 and ATCC 55730 differ in their cariogenic properties in vitro. Arch Oral Biol. 2012 Dec;57(12):1633-8. doi: 10.1016/j.archoralbio.2012.07.014. Epub 2012 Sep 23.

Jeong D, Kim DH, Song KY, Seo KH. Antimicrobial and anti-biofilm activities of Lactobacillus kefiranofaciens DD2 against oral pathogens. J Oral Microbiol. 2018 May 28;10(1):1472985. doi: 10.1080/20002297.2018.1472985. eCollection 2018.PubMed PMID: 29868163; PubMed Central PMCID: PMC5974711.

Katragkou A, Kruhlak MJ, Simitsopoulou M. Interactions between human phagocytes and Candida albicans biofilms alone and in combination with antifungal agents. J Infect Dis. 2010;201(12):1941–9. doi: 10.1086/652783. PubMed PMID: 20415537

Keller MK, Hasslöf P, Stecksén-Blicks C, Twetman S. Co-aggregation and growth inhibition of probiotic lactobacilli and clinical isolates of mutans streptococci: an in vitro study. Acta Odontol Scand. 2011 Sep;69(5):263-8. doi: 10.3109/00016357.2011.554863. Epub 2011 Feb 9.

Kim YJ, Lee SH. Inhibitory effect of Lactococcus lactis HY 449 on cariogenic biofilm. J Microbiol Biotechnol. 2016;26: 1829–35. doi: 10.4014/jmb.1604.04008

Kim Y, Mylonakis E. Caenorhabditis elegans immune conditioning with the probiotic bacterium Lactobacillus acidophilus strain NCFM enhances gram-positive immune responses. Infect Immun. 2012;80(7):2500-8. doi: 10.1128/IAI.06350-11. PubMed PMID: 22585961; PMCID: PMC3416467

Klimek J, Hellwig E, Ahrens G. Fluoride taken up by plaque, by the underlying enamel and by clean enamel from three fluoride compounds in vitro. Caries Res. 1982;16:156-61.

Koo H, Duarte S, Murata RM, Scott-Anne K, Gregoire S, Watson GE. Influence of cranberry proanthocyanidins on formation of biofilms by Streptococcus mutans on saliva-coated apatitic surface and on dental caries development in vivo. Caries Res. 2010;44:116–26.

Koo H, Hayacibara MF, Schobel BD, Cury JA, Rosalen PL, Park YK, et al. Inhibition of Streptococcus mutans biofilm accumulation and polysaccharide production by apigenin and tt-farnesol. J Antimicrob Chemother. 2003;52:782–9.

Kubo W, Miyazaki S, Attwood D. Oral sustained delivery of paracetamol from in situ-gelling gellan and sodium alginate formulations. Int J Pharm. 2003 Jun 4;258(1-2):55-64. PubMed PMID: 12753753.

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

Leyva A, Quintana A, Sánchez M, Rodríguez EN, Cremata J, Sánchez JC. Rapid and sensitive anthrone-sulfuric acid assay in microplate format to quantify carbohydrate in biopharmaceutical products: method development and validation. Biologicals. 2008;36:134–41.

Lin X, Chen X, Chen Y, Jiang W, Chen H. The effect of five probiotic lactobacilli strains on the growth and biofilm formation of Streptococcus mutans. Oral Dis. 2015 Jan;21(1):e128-34. doi: 10.1111/odi.12257. Epub 2014 Jun 3. PubMed PMID: 24806217.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods. 2001 Dec;25(4):402-8. PubMed PMID: 11846609.

Loskill P, Zeitz C, Grandthyll S, Thewes N, Müller F, Bischoff M, et al. Reduced adhesion of oral bacteria on hydroxyapatite by fluoride treatment. Langmuir. 2013 May 7;29(18):5528-33. doi: 10.1021/la4008558. Epub 2013 Apr 23. PubMed PMID: 23556545.

Marsh PD. Are dental diseases examples of ecological catastrophes? Microbiology. 2003;149:279–94.

Marttinen AM, Haukioja AL, Keskin M, Soderling EM. Effects of Lactobacillus reuteri PTA 5289 and L. paracasei DSMZ16671 on the adhesion and biofilm formation of Streptococcus mutans. Curr Microbiol. 2013;67:193–9.

Matsubara VH, Bandara HM, Mayer MP, Samaranayake LP. Probiotics as Antifungals in Mucosal Candidiasis. Clin Infect Dis. 2016;62(9):1143–53. doi: 10.1093/cid/ciw038. PubMed PMID: 26826375

Matsubara VH, Wang Y, Bandara HM, Mayer MP, Samaranayake LP. Probiotic lactobacilli inhibit early stages of Candida albicans biofilm development by reducing their growth, cell adhesion, and filamentation. Appl Microbiol Biotechnol. 2016; 100(14):6415-26. doi: 10.1007/s00253-016-7527-3. PubMed PMID: 27087525

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.

Mendi A, Köse S, Uçkan D, Akca G, Yilmaz D, Aral L, et al. Lactobacillus rhamnosus could inhibit Porphyromonas gingivalis derived CXCL8 attenuation. J Appl Oral Sci. 2016 Jan-Feb;24(1):67-75. doi: 10.1590/1678-775720150145. PubMed PMID: 27008259; PubMed Central PMCID: PMC4775012.

Million M, Angelakis E, Maraninchi M, Henry M, Giorgi R, Valero R, et al. Correlation between body mass index and gut concentrations of Lactobacillus reuteri, Bifidobacterium animalis, Methanobrevibacter smithii and Escherichia coli. Int J Obes. 2013;1460-6 doi: 10.1038/ijo.2013.20 PubMed PMID: 23459324

Miyazaki S, Aoyama H, Kawasaki N, Kubo W, Attwood D. In situ-gelling gellan formulations as vehicles for oral drug delivery. J Control Release. 1999 Aug 5;60(2-3):287-95. PubMed PMID: 10425334.

Mylonakis E, Ausubel FM, Perfect JR, Heitman J, Calderwood SB. Killing of Caenorhabditis elegans by Cryptococcus neoformans as a model of yeast pathogenesis. Proc Natl Acad Sci USA. 2002;99(24):15675-80.

Novac O, Lisa G, Profire L, Tuchilus C, Popa MI. Antibacterial quaternized gellan gum based particles for controlled release of ciprofloxacin with potential dermal applications. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl. 2014 Feb 1;35:291-9. doi: 10.1016/j.msec.2013.11.016. Epub 2013 Nov 20. PubMed PMID: 24411380.

Oliveira JT, Gardel LS, Rada T, Martins L, Gomes ME, Reis RL. Injectable gellan gum hydrogels with autologous cells for the treatment of rabbit articular cartilage defects. J Orthop Res. 2010 Sep;28(9):1193-9. doi: 10.1002/jor.21114. PubMed PMID: 20187118.

Olle B. Medicines from microbiota. Nat Biotechnol. 2013;31(4):309-15. doi: 10.1038/nbt.2548 PubMed PMID: 23563425

Osmałek T, Froelich A, Tasarek S. Application of gellan gum in pharmacy and medicine. Int J Pharm. 2014 May 15;466(1-2):328-40. doi:10.1016/j.ijpharm.2014.03.038. Epub 2014 Mar 20. Review. PubMed PMID: 24657577.

Posadowska U, Brzychczy-Wloch M, Pamula E. Injectable gellan gum-based nanoparticles-loaded system for the local delivery of vancomycin in osteomyelitis treatment. J Mater Sci Mater Med. 2016 Jan;27(1):9. doi: 10.1007/s10856-015-5604-

2. Epub 2015 Nov 30. PubMed PMID: 26621310; PubMed Central PMCID: PMC4666281.

Ramamurthy PH, Swamy HS, Bennete F, Rohini M, Nagarathnamma T. Relationship between severeearly childhood caries, salivary mutans streptococci, and lactobacilli in preschool children of low socioeconomic status in Bengaluru city. J Indian Soc Pedod Prev Dent. 2014;32:44–47. doi: 10.4103/0970-4388.127054.

Reid G. Probiotics: definition, scope and mechanisms of action. Best Pract Res Clin Gastroenterol. 2016;30(1):17-25. doi: 10.1016/j.bpg.2015.12.001. PubMed PMID: 27048893 20

Ribeiro FC, de Barros PP, Rossoni RD, Junqueira JC, Jorge AOC. Lactobacillus rhamnosus inhibits Candida albicans virulence factors in vitro and modulates imune system in Galleria mellonella. Appl Microbiol.2017;122(1):201-11. https://doi.org/10.1111/jam.13324

Rivera-Espinoza Y, Gallardo-Navarro Y. Non-dairy probiotic products. Food Microbiol. 2010;27(1):1-11. doi: 10.1016/j.fm.2008.06.008. PubMed PMID: 19913684

Rossoni RD, Velloso MDS, de Barros PP, de Alvarenga JA, Santos JDD, Santos Prado ACCD, et al. Inhibitory effect of probiotic Lactobacillus supernatants from the oral cavity on Streptococcus mutans biofilms. Microb Pathog. 2018;123:361-67.

Rossoni RD, de Barros PP, de Alvarenga JA, Ribeiro FC, Velloso MDS, Fuchs BB, et al. Antifungal activity of clinical Lactobacillus strains against Candida albicans biofilms: identification of potential probiotic candidates to prevent oral candidiasis. Biofouling. 2018;34:212–25.

Saavedra JM, Abi-Hanna A, Moore N, Yolken RH. Long-term consumption of infant formulas containing live probiotic bacteria: tolerance and safety. Am J Clin Nutr. 2004 Feb;79(2):261-7.

Sanders ME, Shane AL, Merenstein DJ. Advancing probiotic research in humans in the United States: Challenges and strategies. Gut Microbes. 2016;7(2):97-100. doi: 10.1080/19490976.2016.1138198. PubMed PMID: 26963522; PMCID: PMC4856453

Sanghvi U, Chhabra T, Sethuraman R. Effect of probiotics on the amount and pH of saliva in edentulous patients: A Prospective study. J Indian Prosthodont Soc. 2018;18:277-81.

Senadheera MD, Guggenheim B, Spatafora GA, Huang YC, Choi J, Hung DC. 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.

Shanahan F, Dinan TG, Ross P, Hill C. Probiotics in transition. Clin Gastroenterol Hepatol. 2012;10(11):1220-4. doi: 10.1016/j.cgh.2012.09.020. PubMed PMID: 23010563

Simark-Mattsson C, Emilson CG, Hakansson EG, Jacobsson C, Roos K, Holm S. Lactobacillus-mediated interference of mutans streptococci in caries-free vs. caries-active subjects. Eur J Oral Sci. 2007;115(4):308-14. doi: 10.1111/j.1600-0722.2007.00458.x. PubMed PMID: 17697171

Söderling EM, Marttinen AM, Haukioja AL. Probiotic lactobacilli interfere with Streptococcus mutans biofilm formation in vitro. Current Microbiology. 2011;62:618 – 22. doi: 10.1007/s00284-010-9752-9. PubMed PMID: 0835828

Stipp RN, Goncalves RB, Hofling 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.

Stipp RN, Boisvert H, Smith DJ, Hofling JF, Duncan MJ, Mattos-Graner RO. CovR and VicRK regulate cell surface biogenesis genes required for biofilm formation in Streptococcus mutans. PloS one. 2013;8(3):e58271.

Su Y, Zhang B, Su L. CD4 detected from Lactobacillus helps understand the interaction between Lactobacillus and HIV. Microbiol Res. 2013;168(5):273-7. doi: 10.1016/j.micres.2012.12.004. PubMed PMID: 23318049

Tanzer JM, Thompson A, Lang C, Cooper B, Hareng L, Gamer A, et al. Caries inhibition by and safety of Lactobacillus paracasei DSMZ16671. J Dent Res. 2010 Sep;89(9):921-6. doi: 10.1177/0022034510369460. Epub 2010 Jun 2.

Tremblay YD, Lo H, Li YH, Halperin SA, Lee SF. Expression of the Streptococcus mutans essential two-component regulatory system VicRK is pH and growth-phase dependent and controlled by the LiaFSR three-component regulatory system. Microbiology (Reading, England). 2009;155(Pt 9):2856 -65.

Twetman L, Larsen U, Fiehn NE, Stecksen-Blicks C, Twetman S. Coaggregation between probiotic bacteria and caries-associated strains: An in vitro study. Acta Odontol Scand. 2009;27:1–5.

Twetman S, Keller MK. Probiotics for caries prevention and control. Adv Dent Res. 2012 Sep;24(2):98-102. doi: 10.1177/0022034512449465.

Vilela SF, Barbosa JO, Rossoni RD, Santos JD, Prata MC, Anbinder AL, et al. Lactobacillus acidophilus ATCC 4356 inhibits biofilm formation by C. albicans and attenuates the experimental candidiasis in Galleria mellonella. Virulence. 2015;6(1):29-39. doi: 10.4161/21505594.2014.981486. PubMed PMID:25654408; PubMed Central PMCID: PMC4603435.

Viszwapriya D, Subramenium GA, Radhika S, Pandian SK. Betulin inhibits cariogenic properties of Streptococcus mutans by targeting vicRK and gtf genes. Antonie Van Leeuwenhoek. 2017 Jan;110(1):153-165. doi: 10.1007/s10482-016-0785-3. Epub 2016 Oct 18. PubMed PMID: 27757704.

Wang X, Li X, Ling J. Streptococcus gordonii LuxS/autoinducer-2 quorum-sensing system modulates the dual-species biofilm formation with Streptococcus mutans. J Basic Microbiol. 2017 Jul;57(7):605-616. doi: 10.1002/jobm.201700010. Epub 2017 May 9. PubMed PMID: 28485524.

Wen ZT, Baker HV, Burne RA. Influence of BrpA on critical virulence attributes of Streptococcus mutans. J Bacteriol. 2006;188(8):2983–92.

Wen ZT, Burne RA. LuxS-mediated signaling in Streptococcus mutans is involved in regulation of acid and oxidative stress tolerance and biofilm formation. J Bacteriol. 2004;186(9):2682–91.

Wen ZT, Yates D, Ahn SJ, Burne RA. Biofilm formation and virulence expression by Streptococcus mutans are altered when grown in dual-species model. BMC Microbiol. 2010 Apr 14;10:111. doi: 10.1186/1471-2180-10-111. PubMed PMID: 20398271; PubMed Central PMCID: PMC2867949.

Wen ZT, Nguyen AH, Bitoun JP. Transcriptome analysis of LuxS-deficient Streptococcus mutans grown in biofilms. J Mol Oral Microbiol. 2011;26(1):2–18.

Wescombe PA, Hale JD, Heng NC, Tagg JR. Developing oral probiotics from Streptococcus salivarius. Future Microbiol. 2012;7(12):1355-71. doi: 10.2217/fmb.12.113. PubMed PMID: 23231486

Yanine N, Araya I, Brignardello-Petersen R, Carrasco-Labra A, González A, Preciado A, et al. Effects of probiotics in periodontal diseases: a systematic review. Clin Oral Investig. 2013 Sep;17(7):1627-34. doi: 10.1007/s00784-013-0990-7. Epub 2013 May 9.

Zhang Y, Liu Y, Ma Q, Song Y, Zhang Q, Wang X, et al. Identification of Lactobacillus from the saliva of adult patients with caries using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. PLoS One. 2014 Aug;9(8):e106185. doi: 10.1371/journal.pone.0106185. eCollection 2014. PubMed PMID: 25166027; PubMed Central PMCID: PMC4148440.

Zhu L, Ao J, Li P. A novel in situ gel base of deacetylase gellan gum for sustained ophthalmic drug delivery of ketotifen: in vitro and in vivo evaluation. Drug Des Devel Ther. 2015 Jul 29;9:3943-9. doi: 10.2147/DDDT.S87368. eCollection 2015. PubMed PMID: 26251573; PubMed Central PMCID: PMC4524385.