

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 10/02/2024.



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



Ana Carolina Urbano de Araujo Lopes

Influência de agentes com alvos distintos na geração de células persistentes de *Streptococcus mutans* e caracterização dos biofilmes derivados das células persistentes

Araraquara

2022



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



Ana Carolina Urbano de Araujo Lopes

Influência de agentes com alvos distintos na geração de células persistentes de *Streptococcus mutans* e caracterização dos biofilmes derivados das células persistentes

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara para obtenção do título de Mestre em Odontologia, na área de Reabilitação Oral.

Orientadora: Marlise Inêz Klein Furlan

Araraquara
2022

L864i

Lopes, Ana Carolina Urbano de Araujo

Influência de agentes com alvos distintos na geração de células persistentes de *Streptococcus mutans* e caracterização dos biofilmes derivados das células persistentes / Ana Carolina Urbano de Araujo Lopes. -- Araraquara, 2022

109 p. : il., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara
Orientadora: Profa. Dra. Marlise Inêz Klein Furlan

1. Biofilmes. 2. *Streptococcus mutans*. 3. Matriz extracelular.
I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Odontologia, Araraquara. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Ana Carolina Urbano de Araujo Lopes

Influência de agentes com alvos distintos na geração de células persistentes de *Streptococcus mutans* e caracterização dos biofilmes derivados das células persistentes

Comissão julgadora

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Odontologia, com área em Reabilitação Oral

Presidente e orientadora: Dr^a. Marlise Inêz Klein Furlan

2º Examinador: Prof^a. Dr^a. Fernanda Lourenção Brighenti

3º Examinador: Prof^a. Dr^a. Ivone Lima Santana

Araraquara, 10 de fevereiro de 2022.

DADOS CURRICULARES

Ana Carolina Urbano de Araujo Lopes

NASCIMENTO: 17 de setembro de 1995 – São Luís – Maranhão

FILIAÇÃO: Maria Celeste Urbano de Araujo Lopes
Cristiano Lima Lopes

2020 – em andamento Curso de Pós-graduação em Odontologia, com área em Reabilitação Oral, nível Mestrado, pela Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita, Araraquara/São Paulo

2015/2019 Graduação em Odontologia pela Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Maranhão, São Luís/Maranhão

AGRADECIMENTOS

À Deus, por sempre caminhar junto a mim.

À minha família, minha mãe Cristina, minha avó Lealdina e meu avô João (*in memorium*), por serem a minha base. Sem vocês, eu nada seria.

À Gustavo, meu melhor amigo e companheiro, por todo apoio, carinho e compreensão durante esta caminhada.

Às minhas primas, tios, sogros e amigos, por acreditarem em mim e por sempre me apoiarem.

À minha querida orientadora Marlise Klein, por ter me aceito como sua aluna, por toda paciência, dedicação e competência ao longo desta minha formação. Minha admiração e gratidão.

Às professoras Ivone Santana e Fernanda Brighenti, por gentilmente terem aceitado participar da banca avaliadora da dissertação de mestrado, como membros titulares. E às professoras Cecília Ribeiro e Lívia Nordi, como membros suplentes.

Aos professores Lívia Nordi e Ewerton Mima por terem contribuído com este trabalho, aceitando gentilmente participar da minha banca de pré-qualificação e de qualificação do mestrado.

Aos Laboratório de Microbiologia Aplicada e Biologia Molecular, do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese, da Faculdade de Odontologia de Araraquara, pela disponibilidade de utilização do espaço e equipamentos.

Ao Laboratório de Microscopia de Fluorescência Confocal, da Faculdade de Odontologia de Araraquara, em nome da Dra. Paula Barbugli, pela disponibilidade de utilização do Microscópio de Fluorescência Confocal.

À técnica Jaqueline Colin, pelo treinamento, colaboração e todo apoio me oferecido.

À Faculdade de Odontologia de Araraquara, em especial à Pós-Graduação em Odontologia, área de Reabilitação Oral, por possibilitar esse passo na minha formação.

A todos os professores, técnicos, funcionários da Faculdade de Odontologia de Araraquara, especialmente do Departamento de Materiais e Prótese, por todo auxílio e disponibilidade.

Ao José Alexandre Garcia, Cristiano Lamounier e Renan Palomino, por todas as orientações.

Ao grupo de pesquisa “Team Marlise” (Carmélia Lobo, Sabrina Ribeiro, Erick Fratucelli, Guilherme Rocha, Vanessa Coronato, Ricardo Vicente, Matheus Mieli, Elkin Salamanca) pela troca de conhecimentos.

À Vanessa Coronato, minha aluna de Iniciação Científica, pela oportunidade e troca.

À CAPES: O presente trabalho foi realizado com o apoio, durante os primeiros meses, da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001.

À FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processo nº 2019/18249-1; 2020/02946-2) pelo apoio financeiro essencial para realização dessa pesquisa.

Lopes ACUA. Influência de agentes com alvos distintos na geração de células persistentes de *Streptococcus mutans* e caracterização dos biofilmes derivados das células persistentes [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2022.

RESUMO

Cárie dentária é uma doença crônica multifatorial, biofilme-açúcar- dependente. Biofilme dental é uma comunidade microbiana, estruturada e envolta pela matriz extracelular. A recorrência e severidade de lesões cariosas podem estar relacionadas com a presença de células persistentes no biofilme. O objetivo deste trabalho foi investigar a influência de diferentes agentes de tratamento sobre a geração de células persistentes após sucessivos ciclos de tratamentos e caracterizar os biofilmes formados a partir das células persistentes. Para isso, utilizou-se a cepa *Streptococcus mutans* UA159 e como agentes de tratamento, com seus respectivos alvos principais: composto 1771 (metabolismo de ácidos lipoteicóicos), hidroxichalcona 4' (síntese de exopolissacarídeos), miricetina (síntese de exopolissacarídeos), *tt*-farnesol (membrana citoplasmática), fluoreto de sódio (enolase da glicólise), digluconato de clorexidina (antimicrobiano; controle positivo) e veículo (diluyente dos agentes). Inicialmente, os agentes foram testados em cultura planctônica, em duas fases de crescimento: meio da fase exponencial (*mid-log*) e fase estacionária, determinando o período mínimo necessário para matar as células (curva de sobrevivência). Após, células persistentes em biofilme foram geradas a partir da exposição sucessiva a cada agente, durante 10 ciclos de tratamentos consecutivos (após a adesão em modelo em fundo de placa de poliestireno; meio de cultura com sacarose). Ao final, as persistentes recuperadas de cada grupo de tratamento foram utilizadas para a formação de biofilmes sobre discos de hidroxiapatita com película salivar (meio de cultura contendo saliva e sacarose alternado com combinação de saliva, sacarose e amido). O pH do meio foi aferido em diversas fases de desenvolvimento do biofilme. Após 45h de incubação, os biofilmes foram processados para análise de expressão gênica (RT-qPCR); após 67h, para análises bioquímicas (peso seco, proteínas e componentes da matriz extracelular: eDNA, ácidos lipoteicóicos, exopolissacarídeos solúveis e insolúveis), microbiológica (população microbiana) e da arquitetura (microscopia confocal, com quantificação de exopolissacarídeos e bactéria). Os dados foram submetidos à análise estatística descritiva e inferencial ($\alpha=0,05$). Os diferentes agentes de tratamento apresentaram comportamento distinto em ambas as curvas de sobrevivência. A geração de células persistentes foi distinta para cada agente testado. Os biofilmes formados por células persistentes apresentaram-se diferentes, em que os biofilmes formados pós 1771, hidroxichalcona 4' e miricetina são mais jovens em relação aos demais, por apresentarem maior expressão dos genes *16S rRNA*, *gtfB* (exopolissacarídeos insolúveis) e *eno* (glicólise), além de menor de peso seco e exopolissacarídeos insolúveis na matriz. Esses achados são confirmados pela diferença na distribuição (área de cobertura) e menor quantidade dos componentes bactéria e/ou exopolissacarídeos (biovolume) nas imagens de microscopia. Portanto, agentes com diferentes alvos originam células persistentes com capacidade de formação de biofilme alterada, o que é importante no desenvolvimento de formulações para controle de biofilme cariogênico.

Palavras-chave: Biofilmes. *Streptococcus mutans*. Matriz Extracelular.

Lopes ACUA. Influence of agents with distinct targets on the generation of persistent *Streptococcus mutans* cells and characterization of biofilms derived from persistent cells [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2022.

ABSTRACT

Dental caries is a multifactorial biofilm/sugar disease. Biofilm is a microbial community structured and surrounded by the extracellular matrix. The recurrence and severity of carious lesions may be related to persisters cells in the biofilm. This study aimed to investigate the influence of different treatment agents on the generation of persisters cells after successive treatment cycles and to characterize the biofilms formed by these persisters. For this, strain *Streptococcus mutans* UA159 was used, and as treatment agents (targets) were: compound 1771 (lipoteichoic acids metabolism), hydroxychalcone 4' (exopolysaccharides synthesis), *tt*-farnesol (cytoplasmatic membrane), sodium fluoride (enolase; glycolysis), chlorhexidine digluconate (antimicrobial, positive control) and vehicle (diluent of agents). First, the agents were tested in planktonic culture in two growth phases: mid-exponential (mid-log) and stationary phases, determining the minimum period necessary to kill the cells (killing curves). After, persisters in the biofilm were generated from successive exposure to each agent during 10 cycles of consecutive treatments (after adhesion in a model on a polystyrene plate bottom; culture medium with sucrose). Next, the persisters recovered from each group were used to grow biofilms on saliva-coated hydroxyapatite discs (culture medium with saliva and sucrose alternated with a combination of saliva, sucrose, and starch). The pH of the medium was measured at different stages of biofilm development. After 45h, biofilms were processed for gene expression analysis (RT-qPCR); after 67h, for biochemical analysis (dry weight, proteins, and extracellular matrix components: eDNA, lipoteichoic acids, soluble and insoluble exopolysaccharides), microbiological (microbial population), and architecture (confocal microscopy, with quantification of exopolysaccharides and bacteria). Data were subjected to descriptive and inferential statistical analysis ($\alpha=0,05$). The agents showed different behavior in both killing curves. The persisters generation was different for each agent tested. Biofilms formed by persisters showed some specific differences, in which biofilms formed after compound 1771, 4' hydroxychalcone, and myricetin were younger than the others, as they present greater expression of *16S rRNA*, *gtfB*, and *eno* genes, in addition to lower dry weight and insoluble exopolysaccharides in the matrix. Those findings were confirmed by the difference in distribution (coverage area) and the smaller amount of bacterial and/or exopolysaccharide components (biovolume) in the microscopy images. Therefore, agents with different targets originate persisters with distinct biofilm formation capacity, which is important in formulations development for cariogenic biofilm control.

Keywords: Biofilms. *Streptococcus mutans*. Extracellular Matrix.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema dos fatores determinantes do processo de cárie.....	20
Figura 2 - Layout de microplaca para curva de sobrevivência.....	37
Figura 3 - Layout de microplaca para geração de células persistentes	40
Figura 4 - Fluxograma de geração de células persistentes	44
Figura 5 - Aparato confeccionado com fio ortodôntico	46
Figura 6 - Discos sHA posicionados em placa com meio de cultura líquido.....	48
Figura 7 - Desenho experimental do modelo de biofilme utilizado	49
Figura 8 - Fluxograma para processamento dos biofilmes.....	55
Figura 9 - Curva padrão para proteínas	57
Figura 10 - Curva padrão para WSP e ASP	61
Figura 11 - Curva de sobrevivência, em cultura planctônica, na fase <i>mid-log</i>	68
Figura 12 - Curva de sobrevivência, em cultura planctônica, na fase estacionária ..	69
Figura 13 - Curva de geração de células persistentes	71
Figura 14 - pH do meio de cultura	73
Figura 15 - População microbiana; peso seco e quantificação de proteínas.....	74
Figura 16 - Caracterização dos biofilmes formados	77
Figura 17 - Imagens representativas dos biofilmes formados	80
Figura 18 - Biomassa e espessura máxima dos biofilmes avaliados.....	81
Figura 19 – Área de cobertura, em porcentagem, dos biofilmes formados	82
Figura 20 - Expressão gênica dos biofilmes formados	84
Figura 21 - Curva de crescimento de <i>S. mutans</i> (D.O. 540nm).....	101

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Tratamentos e suas concentrações nas duas etapas experimentais.....	33
Tabela 2 - Preparo dos tratamentos para as curvas de sobrevivência	39
Tabela 3 - Preparo dos tratamentos para as curvas de sobrevivência, nos poços sem inóculo	39
Tabela 4 - Cálculo do preparo dos tratamentos	43
Tabela 5 - Construção dos pontos da curva para proteínas	57
Tabela 6 - Curva padrão de glicose para quantificação de WSP	60
Tabela 7 - Curva padrão de glicose para quantificação de ASP	62
Tabela 8 - Ciclos (C) selecionados para uso de colônias persistentes	72
Tabela 9 - Dados quantitativos de população microbiana de células persistentes .	102

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Agentes de tratamento e seus respectivos mecanismos de ação	27
Quadro 2 - Agentes de tratamento utilizados	34
Quadro 3 - Primers utilizados para avaliar expressão gênica.....	52

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 PROPOSIÇÃO	18
2.1 Objetivos Específicos	18
3 REVISÃO DE LITERATURA	19
3.1 Cárie Dentária	19
3.2 Biofilme Dental	21
3.3 Matriz Extracelular	24
3.4 Controle do Biofilme Cariogênico	26
3.5 Persistência Microbiana	27
3.6 Células Persistentes	29
4 MATERIAL E MÉTODO	32
4.1 Material	32
4.1.1 Agentes de tratamento selecionados	32
4.1.2 Cepa	35
4.2 Método	35
4.2.1 Curvas de sobrevivência	35
4.2.2 Geração de células persistentes	40
4.2.3 Caracterização dos biofilmes gerados a partir das células persistentes ..	45
4.3 Análise Estatística	67
5 RESULTADOS	68
5.1 Curvas de Sobrevivência	68
5.2 Geração de Células Persistentes	70
5.3 Caracterização dos Biofilmes Pós-Tratamentos	72
5.3.1 pH do meio de cultura	72
5.3.2 População microbiana	73
5.3.3 Peso seco do biofilme (biomassa ou peso seco insolúvel)	73
5.3.4 Proteínas do biofilme (porção insolúvel)	74
5.4 Componentes da Matriz Extracelular dos Biofilmes	74
5.4.1 Proteínas (porção solúvel)	75
5.4.2 DNA extracelular	75
5.4.3 Exopolissacarídeos solúveis e insolúveis	75
5.4.4 Ácidos lipoteicóicos	76
5.5 Estrutura Tridimensional, Biovolume, Espessura Máxima e Distribuição da Cobertura em Porcentagem de Bactéria e EPS	78

5.6 Expressão Gênica	83
6 DISCUSSÃO	85
7 CONCLUSÃO	90
REFERÊNCIAS.....	91
APÊNDICE A – CURVA DE CRESCIMENTO	101
APÊNDICE B – CÉLULAS PERSISTENTES	102
ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP	105

1 INTRODUÇÃO

As doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) são consideradas um grave problema de saúde pública mundial¹. Em 2019, elas foram incluídas pela Organização Mundial da Saúde (OMS)² na lista das dez maiores ameaças à saúde pública. Na cavidade bucal, tem-se como DCNT a cárie e as doenças periodontais.

Recentemente, muitos estudos têm mostrado uma forte correlação entre as DCNT bucais e as sistêmicas^{3,4}. Como os seus fatores de risco comportamentais e metabólicos estão associados⁵, as estratégias de prevenção de DCNT sistêmicas devem estar alinhadas à promoção de saúde bucal.

Assim, no contexto da saúde bucal, compreende-se que a cárie é um problema de saúde pública mundial⁶ e sua prevenção é crítica para a manutenção da saúde, bucal e sistêmica, da população. Ela é caracterizada como sendo uma doença crônica multifatorial, biofilme-açúcar-dependente. E se manifesta inicialmente pela desmineralização do esmalte, resultado de um desvio na atividade metabólica e na ecologia do biofilme, direcionada pela frequente ingestão de açúcares⁷. O biofilme dental é uma comunidade microbiana, estruturada e organizada, cujo processo de formação é dinâmico e dependente do desenvolvimento de uma matriz extracelular, rica em exopolissacarídeos (EPS) de origem microbiana^{8,9}, a qual envolve o biofilme¹⁰.

Dentre as espécies da microbiota oral, *Streptococcus mutans* tem um papel de destaque. Apesar de não ser a espécie predominante em termos quantitativos^{11,12}, ser igualmente acidogênica (capacidade de produzir ácidos a partir da fermentação de açúcares) e acidúrica (capacidade de ser tolerante ao ambiente ácido) a outras espécies, sua relevância se dá pela sua habilidade de edificar a matriz extracelular. Uma vez que esta espécie consegue produzir e exportar exoenzimas glicosiltransferases (Gtfs), que estão presentes na película salivar e nas superfícies microbianas, e são responsáveis pela produção dos EPS *in situ*⁸. Como eles atuam sobre diversas superfícies, permitem a adesão e o acúmulo de outros microrganismos nos dentes, contribuindo com a maturação do biofilme.

Além dos EPS, a matriz extracelular de biofilmes cariogênicos também é constituída por DNA extracelular (eDNA) e ácidos lipoteicóicos (ALT)¹³. Estes interagem com EPS na formação de biofilmes e poderiam afetar a virulência de *S. mutans*¹⁴ e, ambos influenciam a distribuição de EPS e a organização estrutural de microcolônias no biofilme.

O controle convencional do biofilme cariogênico é através da sua remoção mecânica, com escovação dental e uso do fio dental¹⁵. Associado à higiene oral, o fluoreto de sódio é utilizado como prevenção de cárie, ao promover o controle da desmineralização das superfícies dentais¹⁶. E de forma coadjuvante, pode-se incluir o controle químico do biofilme, com o uso de agentes antimicrobianos, principalmente nos casos em que o desafio cariogênico é elevado. Assim, agentes bioativos que afetem a virulência e/ou a habilidade de microrganismos patogênicos desenvolverem biofilme estão sendo considerados no controle do biofilme cariogênico como estratégias de prevenção^{17,18}.

Entretanto, é pouco conhecido o grau de resistência, tolerância e persistência aos agentes quimioterápicos que agem na cavidade bucal. Achados na literatura sugerem uma estreita relação entre a persistência bacteriana e a recorrência de doenças de natureza crônica¹⁹. E ainda, células persistentes (do inglês *persisters cells*)^{20,21} já foram encontradas em várias culturas, inclusive em *S. mutans*^{22,23} o que justificaria a severidade e recorrência de lesões cariosas.

As células persistentes são subpopulações de células, em um estado de dormência, com um fenótipo de pouco ou nenhum crescimento²⁴. Elas possuem processos metabólicos desacelerados, com pouca ou nenhuma produção de parede celular e síntese proteica²⁵. Por isso, elas não se replicam e nem morrem na presença de agentes antimicrobianos, apresentando, assim, tolerância transitória a diversos fármacos²⁰. Porém, na ausência dos agentes antimicrobianos, elas retornam ao estado de suscetibilidade, dando início a um novo crescimento bacteriano, repopulando o ambiente^{24,26}. Em estudos laboratoriais, percebe-se que poucas delas são formadas na fase exponencial inicial, possuem um aumento significativo na metade da fase exponencial de crescimento (*mid-log*), atingindo o máximo na fase estacionária²⁷. Em biofilmes, as células microbianas podem estar concomitantemente nas diferentes fases de crescimento.

Assim, este estudo objetivou investigar a influência de diferentes agentes de tratamento, com alvos distintos, sobre as células persistentes, geradas após sucessivas aplicações destes. E ainda caracterizar os biofilmes formados, a partir de tais células persistentes.

7 CONCLUSÃO

Assim, conclui-se que os diferentes agentes de tratamento utilizados neste estudo apresentaram um comportamento distinto em suas curvas de sobrevivência, em culturas planctônicas, nas duas fases de crescimento analisadas.

A geração de células persistentes, em biofilmes, também diferiu para cada agente de tratamento avaliado.

Além disso, os biofilmes formados pós-tratamento com composto 1771, hidroxichalcona 4' (C135) e miricetina (J10595) mostraram-se mais jovens, enquanto os demais (*tt*-farnesol e controles fluoreto de sódio, digluconato de clorexidina e veículo) apresentaram-se mais maduros e com fortes fatores associados à virulência.

REFERÊNCIAS*

1. World Health Organization. Global status report on noncommunicable diseases 2010. Geneva: World Health Organization, 2011. [acesso ago 20 2021]. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/44579>.
2. World Health Organization. Global status report on noncommunicable diseases 2014. Geneva: World Health Organization, 2014. [acesso ago 20 2021]. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/148114>.
3. Hayden C, Bowler JO, Chambers S, Freeman R, Humphris G, Richards D, et al. Obesity and dental caries in children: a systematic review and meta-analysis. *Community Dent Oral Epidemiol*. 2013; 41(4): 289-308.
4. Nascimento GG, Leite FRM, Vestergaard P, Scheutz F, López R. Does diabetes increase the risk of periodontitis? a systematic review and meta-regression analysis of longitudinal prospective studies. *Acta Diabetol*. 2018; 55(7): 653-67.
5. World Health Organization. Global action plan on physical activity 2018–2030: more active people for a healthier world. Geneva: World Health Organization, 2018. [acesso set 08 2021]. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/272722>.
6. Kassebaum NJ, Smith AGC, Bernabé E, Fleming TD, Reynolds AE, Vos T et al. Global, regional, and national prevalence, incidence, and disability-adjusted life years for oral conditions for 195 countries, 1990-2015: a systematic analysis for the global burden of diseases, injuries, and risk factors. *J Dent Res*. 2017; 96(4): 380-7.
7. Rosier BT, Marsh PD, Mira A. Resilience of the oral microbiota in health: mechanisms that prevent dysbiosis. *J Dent Res*. 2018; 97(4): 371-380.
8. Bowen WH, Koo H. Biology of *Streptococcus mutans*-derived glucosyltransferases: role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms. *Caries Res*. 2011; 45(1): 69-86.
9. Koo H, Falsetta ML, Klein MI. The exopolysaccharide matrix: a virulence determinant of cariogenic biofilm. *J Dent Res*. 2013; 92(12): 1065-73.

* De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca:

<http://www.foar.unesp.br/Home/Biblioteca/guia-de-normalizacaoatualizado.pdf>

10. Marsh PD. Dental diseases-are these examples of ecological catastrophes?. *Int J Dent Hygiene* 4 (Suppl. 1). 2006; 3-10.
11. Takahashi N, Nyvad B. The role of bacteria in the caries process: ecological perspectives. *J Dent Res*. 2011; 90(3): 294-303.
12. Tanner ACR, Kressirer CA, Rothmiller S, Johansson I, Chalmers NI. The caries microbiome: implications for reversing dysbiosis. *Adv Dent Res*. 2018; 29(1): 78-85.
13. Klein MI, Hwang G, Santos PH, Campanella OH, Koo H. Streptococcus mutans-derived extracellular matrix in cariogenic oral biofilms. *Front Cell Infect Microbiol*. 2015; 5(10): 1-10.
14. Castillo Pedraza MC, Novais TF, Faustoferri RC, Quivey RG Jr, Terekhov A, Hamaker BR et al. Extracellular DNA and lipoteichoic acids interact with exopolysaccharides in the extracellular matrix of Streptococcus mutans biofilms. *Biofouling*. 2017; 33(9): 722-40.
15. van der Weijden GA, Hioe KP. A systematic review of the effectiveness of self-performed mechanical plaque removal in adults with gingivitis using a manual toothbrush. *J Clin Periodontol*. 2005; 32 Suppl 6: 214-28.
16. Ten Cate JM. Novel anticaries and remineralizing agents: prospects for the future. *J Dent Res*. 2012; 91(9): 813-5.
17. Koo H, Schobel B, Scott-Anne K, Watson G, Bowen WH, Cury JA et al. Apigenin and tt-farnesol with fluoride effects on S. mutans biofilms and dental caries. *J Dent Res*. 2005; 84(11): 1016-20.
18. Falsetta ML, Klein MI, Lemos JA, Silva BB, Agidi S, Scott-Anne KK et al. Novel antibiofilm chemotherapy targets exopolysaccharide synthesis and stress tolerance in Streptococcus mutans to modulate virulence expression in vivo. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012; 56(12): 6201-11.
19. Gollan B, Grabe G, Michaux C, Helaine S. Bacterial persisters and infection: past, present, and progressing. *Annu Rev Microbiol*. 2019; 73: 359-85.
20. Lewis K. Persister cells and the riddle of biofilm survival. *Biochemistry*. 2005; 70(2): 267-74.
21. Lewis K. Persister cells. *Annu Rev Microbiol*. 2010; 64: 357-72.
22. Cabral DJ, Wurster JI, Belenky P. Antibiotic persistence as a metabolic adaptation: stress, metabolism, the host, and new directions. *Pharmaceuticals*. 2018; 11(1): 14.

23. Bottner A, He RY, Sarbu A, Nainar, S. H., Dufour, D., Gong, S. G., et al. *Streptococcus mutans* isolated from children with severe-early childhood caries form higher levels of persisters. *Archives of Oral Biology*. 2020; 110:104601.
24. Balaban NQ, Helaine S, Lewis K, Ackermann, M., Aldridge, B., Andersson, D. I. et al. Definitions and guidelines for research on antibiotic persistence *Nature Reviews Microbiology*. 2019; 17(7): 441-8.
25. Lewis K. Persister cells, dormancy and infectious disease. *Nature Reviews Microbiology*. 2007; 5(1): 48-56.
26. Griffin AJ, Li LX, Voedisch S, Pabst O, McSorley SJ. Dissemination of persistent intestinal bacteria via the mesenteric lymph nodes causes typhoid relapse. *Infect Immun*. 2011; 79(4): 1479-88.
27. Keren I, Kaldalu N, Spoering A, Wang Y, Lewis K. Persister cells and tolerance to antimicrobials. *FEMS Microbiol Lett*. 2004; 230(1): 13-8.
28. Brauner A, Fridman O, Gefen O, Balaban NQ. Distinguishing between resistance, tolerance and persistence to antibiotic treatment. *Nature Reviews Microbiology*. 2016; 14(5): 320-30.
29. Selwitz RH, Ismail AI, Pitts NB. Dental caries. *Lancet*. 2007; 369(9555): 51-9.
30. Fejerskov, O., Nyvad, B., Kidd, E. *Cárie dentária: fisiopatologia e tratamento*. 3ª edição. Rio de Janeiro (Rio de Janeiro): Guanabara Koogan; 2017.
31. Sheiham A, James WP. Diet and dental caries: the pivotal role of free sugars reemphasized. *J Dent Res*. 2015; 94(10): 1341-7.
32. Bowen WH. Fluorosis: is it really a problem?. *J Am Dent Assoc*. 2002; 133(10): 1405-7.
33. Klein MI, Duarte S, Xiao J, Mitra S, Foster TH, Koo H. Structural and molecular basis of the role of starch and sucrose in *Streptococcus mutans* biofilm development. *Appl Environ Microbiol*. 2009; 75(3): 837-41.
34. Marsh PD. Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. *Adv Dent Res*. 1994; 8(2): 263-71.
35. Theilade E. The non-specific theory in microbial etiology of inflammatory periodontal diseases. *J Clin Periodontol*. 1986; 13(10): 905-11.

36. Loesche WJ, Rowan J, Straffon LH, Loos PJ. Association of Streptococcus mutants with human dental decay. *Infect Immun*. 1975; 11(6): 1252-60.
37. Cury JA, Francisco SB, Del Bel Cury AA, Tabchoury CP. In situ study of sucrose exposure, mutans streptococci in dental plaque and dental caries. *Braz Dent J*. 2001; 12(2): 101-4.
38. Ribeiro CC, Tabchoury CP, Del Bel Cury AA, Tenuta LM, Rosalen PL, Cury JA. Effect of starch on the cariogenic potential of sucrose. *Br J Nutr*. 2005; 94(1): 44-50.
39. Röllä G. Why is sucrose so cariogenic? The role of glucosyltransferase and polysaccharides. *Scand J Dent Res*. 1989; 97(2): 115-9.
40. Schilling KM, Bowen WH. Glucans synthesized in situ in experimental salivary pellicle function as specific binding sites for Streptococcus mutans. *Infect Immun*. 1992; 60(1): 284-95.
41. Paes Leme AF, Koo H, Bellato CM, Bedi G, Cury JA. The role of sucrose in cariogenic dental biofilm formation-new insight. *J Dent Res*. 2006; 85(10): 878-87.
42. Nyvad B. Microbial colonization of human tooth surfaces. *APMIS Suppl*. 1993; 32: 1-45.
43. Marsh PD. Dental plaque: biological significance of a biofilm and community life-style. *J Clin Periodontol*. 2005; 32 (Suppl 6): 7-15.
44. Marsh, PD., Bowden, GH. Microbial community interactions in biofilms. In: Allison DG, Gilbert P, Lappin-Scott HM, Wilson M. *Community structure and co-operations in biofilms*. Cambridge University Press. 2000, 167-98.
45. Gilbert P, Maira-Litran T, McBain AJ, Rickard AH, Whyte FW. The physiology and collective recalcitrance of microbial biofilm communities. *Adv Microb Physiol*. 2002; 46: 202-56.
46. Flemming HC, Wingender J. The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*. 2010; 8(9): 623-33.
47. Branda SS, Vik S, Friedman L, Kolter R. Biofilms: the matrix revisited. *Trends Microbiol*. 2005; 13(1): 20-6.
48. Bowen WH. Dental caries - not just holes in teeth! A perspective. *Mol Oral Microbiol*. 2016; 31(3): 228-33.

49. Liao S, Klein MI, Heim KP, Fan Y, Bitoun JP, Ahn SJ et al. Streptococcus mutans extracellular DNA is upregulated during growth in biofilms, actively released via membrane vesicles, and influenced by components of the protein secretion machinery. *J Bacteriol.* 2014; 196(13): 2355-66.
50. Brock JH, Reiter B. Chemical and biological properties of extracellular slime produced by *Staphylococcus aureus* grown in high-carbohydrate, high-salt medium. *Infect Immun.* 1976; 13(3): 653-60.
51. Ellwood DC, Tempest DW. Effects of environment on bacterial wall content and composition. *Adv Microb Physiol.* 1972; 7: 83–116.
52. Neuhaus FC, Baddiley J. A continuum of anionic charge: structures and functions of D-alanyl-teichoic acids in gram-positive bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2003; 67(4): 686-723.
53. Featherstone JD. The continuum of dental caries - evidence for a dynamic disease process. *J Dent Res.* 2004; 83: C39-C42.
54. Marsh PD. Are dental diseases examples of ecological catastrophes?. *Microbiology.* 2003; 149: 279-94.
55. Mattos-Graner RO, Klein MI, Smith DJ. Lessons learned from clinical studies: roles of mutans streptococci in the pathogenesis of dental caries. *Curr. Oral Health Rep.* 2014; 1(1): 70-8.
56. Lobo CIV, Lopes ACUA, Klein MI. Compounds with distinct targets present diverse antimicrobial and antibiofilm efficacy against *Candida albicans* and *Streptococcus mutans*, and combinations of compounds potentiate their effect. *J Fungi.* 2021; 7(5): 340.
57. Castillo Pedraza MC, de Oliveira Fratucelli ED, Ribeiro SM, Florez Salamanca EJ, da Silva Colin J, Klein MI. Modulation of lipoteichoic acids and exopolysaccharides prevents *Streptococcus mutans* biofilm accumulation. *Molecules.* 2020; 25(9): 2232.
58. Paganelli FL, van de Kamer T, Brouwer EC, Leavis HL, Woodford N, Bonten MJ et al. Lipoteichoic acid synthesis inhibition in combination with antibiotics abrogates growth of multidrug-resistant *Enterococcus faecium*. *Int J Antimicrob Agents.* 2017; 49(3): 355-63.
59. Richter SG, Elli D, Kim HK, Hendrickx AP, Sorg JA, Schneewind O et al. Small molecule inhibitor of lipoteichoic acid synthesis is an antibiotic for gram-positive bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013; 110(9): 3531-6.

60. Nijampatnam B, Casals L, Zheng R, Wu H, Velu SE. Hydroxychalcone inhibitors of *Streptococcus mutans* glucosyl transferases and biofilms as potential anticaries agents. *Bioorg Med Chem Lett*. 2016; 26(15): 3508-13.
61. Takahashi N. Oral microbiome metabolism: from "Who are they?" to "What are they doing?". *J Dent Res*. 2015; 94(12): 1628-37.
62. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*. 1999; 284(5418): 1318-22.
63. Grant SS, Hung DT. Persistent bacterial infections, antibiotic tolerance, and the oxidative stress response. *Virulence*. 2013; 4(4): 273-83.
64. Leid JG, Shirtliff ME, Costerton JW, Stoodley P. Human leukocytes adhere to, penetrate, and respond to *Staphylococcus aureus* biofilms. *Infect Immun*. 2002; 70(11): 6339-45.
65. LaFleur MD, Kumamoto CA, Lewis K. *Candida albicans* biofilms produce antifungal-tolerant persister cells. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006; 50(11): 3839-46.
66. Harrison JJ, Turner RJ, Ceri H. Persister cells, the biofilm matrix and tolerance to metal cations in biofilm and planktonic *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Microbiol*. 2005; 7(7): 981-94.
67. Scholar EM, Scholar EM, Pratt WB. *The antimicrobial drugs*. Oxford University Press, USA, 2000.
68. Kester JC, Fortune SM. Persisters and beyond: mechanisms of phenotypic drug resistance and drug tolerance in bacteria. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2014; 49(2): 91-101.
69. Gefen O, Balaban NQ. The importance of being persistent: heterogeneity of bacterial populations under antibiotic stress. *FEMS Microbiol Rev*. 2009; 33(4): 704-17.
70. Bigger JW. Treatment of staphylococcal infections with penicillin. *Lancet*. 1944; 244: 497-500.
71. Hobby GL, Meyer K, Chaffee E. Observations on the mechanism of action of penicillin. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 1942; 50(2): 281-5.
72. Lewis K. Programmed death in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2000; 64(3): 503-14.

73. Gutierrez A, Jain S, Bhargava P, Hamblin M, Lobritz MA, Collins JJ. Understanding and sensitizing density-dependent persistence to quinolone antibiotics. *Mol Cell*. 2017; 68(6): 1147-54.
74. Vega NM, Allison KR, Khalil AS, Collins JJ. Signaling-mediated bacterial persister formation. *Nat Chem Biol*. 2012; 8(5): 431-3.
75. Leung V, Lévesque CM. A stress-inducible quorum-sensing peptide mediates the formation of persister cells with noninherited multidrug tolerance. *J Bacteriol*. 2012; 194(9): 2265-74.
76. Manina G, Dhar N, McKinney JD. Stress and host immunity amplify *Mycobacterium tuberculosis* phenotypic heterogeneity and induce nongrowing metabolically active forms. *Cell Host Microbe*. 2015; 17(1): 32-46.
77. Helaine S, Cheverton AM, Watson KG, Faure LM, Matthews SA, Holden DW. Internalization of *Salmonella* by macrophages induces formation of nonreplicating persisters. *Science*. 2014; 343(6167): 204-8.
78. Johnson PJ, Levin BR. Pharmacodynamics, population dynamics, and the evolution of persistence in *Staphylococcus aureus*. *PLoS Genet*. 2013; 9(1): e1003123.
79. Balaban NQ, Merrin J, Chait R, Kowalik L, Leibler S. Bacterial persistence as a phenotypic switch. *Science*. 2004; 305(5690): 1622-5.
80. Moyed HS, Bertrand KP. *hipA*, a newly recognized gene of *Escherichia coli* K-12 that affects frequency of persistence after inhibition of murein synthesis. *J Bacteriol*. 1983; 155(2): 768-75.
81. Vázquez-Laslop N, Lee H, Neyfakh AA. Increased persistence in *Escherichia coli* caused by controlled expression of toxins or other unrelated proteins. *J Bacteriol*. 2006; 188(10): 3494-7.
82. Paul P, Sahu BR, Suar M. Plausible role of bacterial toxin-antitoxin system in persister cell formation and elimination. *Mol Oral Microbiol*. 2019; 34(3): 97-107.
83. Hall AM, Gollan B, Helaine S. Toxin-antitoxin systems: reversible toxicity. *Curr Opin Microbiol*. 2017; 36: 102-10.
84. Defraigne V, Fauvart M, Michiels J. Fighting bacterial persistence: current and emerging anti-persister strategies and therapeutics. *Drug Resist Updat*. 2018; 38: 12-26.

85. Kim W, Escobar I, Fuchs BB, Mylonakis E. Antimicrobial drug discovery against persisters. *Persister Cells and Infectious Disease*. 2019: 273-95.
86. Kaldalu N, Hauryliuk V, Turnbull KJ, La Mensa A, Putrinš M, Tenson T. In vitro studies of persister cells. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2020; 84(4): e00070-20.
87. Lemos JA, Quivey RG, Koo H, Abranches J. *Streptococcus mutans*: a new gram-positive paradigm?. *Microbiology*. 2013; 159: 436-45.
88. Zero DT. Dentifrices, mouthwashes, and remineralization/caries arrestment strategies. *BMC Oral Health*. 2006; 6 (Suppl 1): S9.
89. Lemos JA, Palmer SR, Zeng L, Wen ZT, Kajfasz JK, Freires IA et al. The Biology of *Streptococcus mutans*. *Microbiol Spectr*. 2019; 7(1):10.1128.
90. Wang S, Zhou C, Ren B, Li X, Weir MD, Masri RM et al. Formation of persisters in *Streptococcus mutans* biofilms induced by antibacterial dental monomer. *J Mater Sci Mater Med*. 2017; 28(11): 178.
91. Koo H, Xiao J, Klein MI, Jeon JG. Exopolysaccharides produced by *Streptococcus mutans* glucosyltransferases modulate the establishment of microcolonies within multispecies biofilms. *J Bacteriol*. 2010; 192(12): 3024-32.
92. Klein MI, DeBaz L, Agidi S, Lee H, Xie G, Lin AH et al. Dynamics of *Streptococcus mutans* transcriptome in response to starch and sucrose during biofilm development. *PLoS One*. 2010; 5(10): e13478.
93. Klein MI, Xiao J, Lu B, Delahunty CM, Yates JR 3rd, Koo H. *Streptococcus mutans* protein synthesis during mixed-species biofilm development by high-throughput quantitative proteomics. *PLoS One*. 2012; 7(9): e45795.
94. Lemos JA, Abranches J, Koo H, Marquis RE, Burne RA. Protocols to study the physiology of oral biofilms. *Methods Mol Biol*. 2010; 666: 87-102.
95. Klein MI, Scott-Anne KM, Gregoire S, Rosalen PL, Koo H. Molecular approaches for viable bacterial population and transcriptional analyses in a rodent model of dental caries. *Mol Oral Microbiol*. 2012; 27(5): 350-61.
96. Cury JA, Koo H. Extraction and purification of total RNA from *Streptococcus mutans* biofilms. *Anal Biochem*. 2007; 365(2): 208-14.
97. Stipp RN, Gonçalves RB, Höfling JF, Smith DJ, Mattos-Graner RO. Transcriptional analysis of *gtfB*, *gtfC*, and *gpbB* and their putative response regulators in several isolates of *Streptococcus mutans*. *Oral Microbiol Immunol*. 2008; 23(6): 466-473.

98. Klein MI, Xiao J, Heydorn A, Koo H. An analytical tool-box for comprehensive biochemical, structural and transcriptome evaluation of oral biofilms mediated by mutans streptococci. *J Vis Exp.* 2011; (47): 2512.
99. Yin JL, Shackel NA, Zekry A, McGuinness PH, Richards C, Putten KV et al. Real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) for measurement of cytokine and growth factor mRNA expression with fluorogenic probes or SYBR Green I. *Immunol Cell Biol.* 2001; 79(3): 213-21.
100. Xiao J, Klein MI, Falsetta ML, Lu B, Delahunty CM, Yates JR 3rd et al. The exopolysaccharide matrix modulates the interaction between 3D architecture and virulence of a mixed-species oral biofilm. *PLoS Pathog.* 2012; 8(4): e1002623.
101. Florez Salamanca EJ, Klein MI. Extracellular matrix influence in *Streptococcus mutans* gene expression in a cariogenic biofilm. *Mol Oral Microbiol.* 2018; 33(2): 181-93.
102. Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem.* 1956; 28: 350–6.
103. Tribble GD, Angelov N, Weltman R, Wang BY, Eswaran SV, Gay IC et al. Frequency of Tongue Cleaning Impacts the Human Tongue Microbiome Composition and Enterosalivary Circulation of Nitrate. *Front Cell Infect Microbiol.* 2019; 9: 39.
104. Lundberg JO, Weitzberg E, Gladwin MT. The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. *Nat Rev Drug Discov.* 2008; 7(2): 156-67.
105. Fardal O, Turnbull RS. A review of the literature on use of chlorhexidine in dentistry. *J Am Dent Assoc.* 1986; 112(6): 863-9.
106. Flotra L. Different modes of chlorhexidine application and related local side effects. *J Periodontal Res Suppl.* 1973; 12: 41-4.
107. Kozai K, Wang DS, Sandham HJ, Phillips HI. Changes in strains of mutans streptococci induced by treatment with chlorhexidine varnish. *J Dent Res.* 1991; 70(9): 1252-7.
108. Kuhnert WL, Zheng G, Faustoferri RC, Quivey RG Jr. The F-ATPase operon promoter of *Streptococcus mutans* is transcriptionally regulated in response to external pH. *J Bacteriol.* 2004; 186(24): 8524-8.

109. Derr AM, Faustoferri RC, Betzenhauser MJ, Gonzalez K, Marquis RE, Quivey RG Jr. Mutation of the NADH oxidase gene (nox) reveals an overlap of the oxygen- and acid-mediated stress responses in *Streptococcus mutans*. *Appl Environ Microbiol.* 2012; 78(4): 1215-27.
110. Perry JA, Cvitkovitch DG, Lévesque CM. Cell death in *Streptococcus mutans* biofilms: a link between CSP and extracellular DNA. *FEMS Microbiol Lett.* 2009; 299(2): 261-6.
111. Ahn SJ, Rice KC, Oleas J, Bayles KW, Burne RA. The *Streptococcus mutans* Cid and Lrg systems modulate virulence traits in response to multiple environmental signals. *Microbiology.* 2010; 156: 3136-47.
112. Paula AJ, Hwang G, Koo H. Dynamics of bacterial population growth in biofilms resemble spatial and structural aspects of urbanization. *Nat Commun.* 2020; 11(1): 1354.