



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

MARISOL DOS SANTOS VELLOSO

**EFEITOS DE *Lactobacillus* spp. ISOLADOS DA CAVIDADE BUCAL
DE INDIVÍDUOS LIVRES DE CÁRIES SOBRE *Streptococcus mutans*:
estudo do potencial probiótico**

2016

MARISOL DOS SANTOS VELLOSO

**EFEITOS DE *Lactobacillus* spp. ISOLADOS DA CAVIDADE BUCAL DE
INDIVÍDUOS LIVRES DE CÁRIES SOBRE *Streptococcus mutans*: estudo do
potencial probiótico**

Dissertação apresentada ao curso de Odontologia do Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP - Univ Estadual Paulista, 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.

Orientadora: Profa. Adj. Juliana Campos Junqueira

São José dos Campos

2016

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2016]. 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).

Velloso, Marisol dos Santos

Efeitos de *Lactobacillus* spp. isolados da cavidade bucal de indivíduos livres de cáries sobre *Streptococcus mutans*: estudo do potencial probiótico / Marisol dos Santos Velloso. - São José dos Campos : [s.n.], 2016.
61 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Biopatologia Bucal) - Pós-graduação em Biopatologia Bucal - Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista, 2016.

Orientadora: Juliana Campos Junqueira.

1. *Streptococcus mutans*. 2. *Lactobacillus*. 3. Probióticos. 4. Cárie dentária. I. Junqueira, Juliana Campos, orient. II. Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista. III. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho'. IV. UNESP - Univ Estadual Paulista. V. Título.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Adj. Juliana Campos Junqueira (Orientadora)

UNESP – Univ Estadual Paulista
Instituto de Ciência e Tecnologia
Campus de São José dos Campos

Profa. Dra. Silvana Soléo Ferreira dos Santos

UNITAU – Universidade de Taubaté
Instituto Básico de Biociências
Campus Bom Conselho, Taubaté

Profa. Dra. Renata de Oliveira Mattos Graner

UNICAMP – Universidade de Campinas
Faculdade de Odontologia
Campus de Piracicaba

São José dos Campos, 22 de setembro de 2016.

DEDICATÓRIA

Ao meus pais, **Regina Maura dos Santos** e **José Deoclécio Velloso** (*in memorian*) por todo ensinamento, carinho, amor, compreensão e paciência que me fizeram acreditar nos meus sonhos e conquistar todos meus objetivos, me dando suporte e apoio em todos os momentos e escolhas da minha vida. Não há palavras para agradecer-lhes. Independente da distância sei que estarão me acompanhando sempre.

A minha amiga e companheira de laboratório, **Jéssica Diane dos Santos**, por toda paciência, amizade, companheirismo e colaboração, que proporcionaram a realização deste trabalho. Sua presença e ajuda no dia-a-dia foi fundamental para o sucesso dessa dissertação.

A **Deus**, pelas bênçãos recebidas e saúde que me permitiram conquistar a todos meus objetivos com sucesso.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À minha orientadora, **Profa. Adj. Juliana Campos Junqueira**, pelo convívio, dedicação, ajuda, paciência, confiança, orientação e amizade. Sou muito grata por ter tido uma ótima orientadora durante o mestrado. Se eu fui capaz de conquistar meus objetivos com sucesso, foi devido ao seu apoio, dedicação e muita confiança. Não tenho palavras para agradecer-lhe por tudo o que fez pela minha vida profissional e acadêmica, por ter me aberto portas e apresentado oportunidades antes nunca sonhada.

AGRADECIMENTOS

À **UNESP – Univ. Estadual Paulista**, na pessoa do diretor, **Estevão Tomomitsu Kimpara**, do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos, e da vice-diretora **Rebeca Di Nicoló**.

Ao **Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal**, na pessoa da coordenadora **Profa. Dra. Ana Lia Anbinder**.

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

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** pela concessão de bolsa no início do mestrado.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** pela concessão de Bolsa de estudos (#2014/11841-9) e Auxílio à Pesquisa (#2015/09770-9) que possibilitou a aquisição dos materiais necessários para a realização deste trabalho.

Aos Professores **Beth Helen Fuchs** e **Eleftherios Mylonakis** pela recepção, orientação e concessão de bolsa internacional de pesquisadora no laboratório de Doenças Infecciosas do Rhode Island Hospital, por meio do programa Brown-Brazil Initiative da Brown University, que proporcionou um crescimento profissional e pessoal extraordinário. Foi uma das melhores experiências da minha vida.

À **equipe da Biblioteca** pela ajuda na elaboração deste trabalho, contribuindo com o acesso ao material bibliográfico e à bibliotecária **Renata Aparecida Couto Martins** que orientou sua normalização.

À minha mãe, **Regina Maura dos Santos**, que precisou de muita paciência em diversos períodos durante o desenvolvimento deste projeto. Também agradeço ao seu companheirismo e confiança.

Ao meu pai, **José Deoclécio Velloso** (*in memorian*), que sempre me incentivou a estudar e me dedicar ao máximo quando em busca de meus sonhos e objetivos.

Aos meus tios, **Tania Mara dos Santos Mariquito** e **Marco Antônio Mariquito** e aos meus primos **Alessa Mara dos Santos Mariquito** e **Alan Marcel dos Santos Mariquito**, por todo amor, carinho e colaboração, mesmo que indiretamente, neste trabalho. Sem sua ajuda e incentivo eu não teria forças para suportar momentos difíceis da vida e não teria chegado até aqui.

À **minha família**, avós, tios, primos e irmãos de coração, pelo amor, carinho, companheirismo e alegria em diversos momentos de minha vida.

Aos meus amigos do laboratório, em especial à **Jessica Diane dos Santos, Isabela Amêndola, Leileane Cohn, Mirian Marcolan de Melo, Felipe de Camargo Ribeiro, Tamara Carneiro, Rodnei Dennis Rossoni, Janaína Alvarenga, Michele Peneluppi, Simone Vilela, Ana Carolina Chipoletti, Fernanda Freire, Felipe Eduardo Oliveira, Maíra Terra Garcia, Patrícia Pimentel de Barros, Lívia Mara Figueiredo, Daiane de Jesus, Luciana Ruano, Jonatas Rafael e Mariana Sá**, por terem me dado força, amizade e carinho durante a realização deste trabalho. Todos foram essenciais para o bom andamento desta pesquisa.

À **Dra. Maria Ângela Lacerda Rangel Esper** pela amizade e ajuda na fabricação dos suportes com fio ortodôntico para o desenvolvimento da metodologia deste trabalho.

Aos técnicos **Sérgio Giovanny Alves** e **Domingos Gonçalves Pontes**, pela colaboração e amizade durante o curso de mestrado.

Ao Prof. Tit. **Antonio Olavo Cardoso Jorge** pela colaboração e ajuda na realização desse trabalho.

Ao **Prof. Adj. Sérgio Eduardo de Paiva Gonçalves** do Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP/SJC, pela prontidão na ajuda com o equipamento DIAGNOdent.

À **Profa. Dra. Ana Lia Anbinder** do Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP/SJC, pela ajuda com o experimento com os animais e fotos dos biofilmes dentários.

Às Profas. **Celia Regina Gonçalves e Silva** e **Silvana Soléo Ferreira dos Santos**, da Universidade de Taubaté, que me incentivaram a fazer o mestrado, foram base para as minhas escolhas profissional e acadêmica, além de exemplos para minha carreira e vida.

Ao **Prof. Antonio Pedro Ricomini Filho** e à **Profa. Altair Antoninha Del Bel Cury** da Faculdade de Odontologia de Piracicaba FOP/UNICAMP, pela agradável recepção na FOP e ajuda no entendimento da metodologia do biofilme deste trabalho.

Aos funcionários da seção técnica de pós-graduação, **Bruno Shiguemitsu M. Tanaka**, **Ivan Oliveira Damasceno**, **Rosemary de Fátima Salgado** e **Sandra Mara Cordeiro**, pela paciência, prontidão no atendimento, e amizade conquistada durante o curso de mestrado.

Ao **Carlos Alberto Guedes** Técnico Superior em Adm. Universitária por toda a ajuda, colaboração e paciência nos trâmites relativos à bolsa de mestrado.

Ao meu namorado **Thiago Cagliumi Alves** que me ajudou, ao final do mestrado, passar por momentos difíceis e finalizar esse trabalho da melhor forma possível, me dando força e apoio sempre que precisei.

“Somos todos geniais. Mas se você julgar um peixe por sua capacidade de subir em árvores, ele passará sua vida inteira acreditando ser estúpido”. (Albert Einstein)

SUMÁRIO

RESUMO.....	12
ABSTRACT.....	13
1 INTRODUÇÃO.....	14
2 PROPOSIÇÃO.....	16
2.1 Objetivos gerais.....	16
2.2 Objetivos específicos.....	16
3 DETALHAMENTO METODOLÓGICO.....	17
3.1 Comitê de Ética.....	17
3.2 Cepas de micro-organismos.....	17
3.2.1 Padronização da densidade óptica e quantificação celular da suspensão de <i>Lactobacillus</i> spp. em espectrofotômetro.....	18
3.2.2 Preparo da suspensão padronizada de <i>S. mutans</i> e <i>Lactobacillus</i>	19
3.2.3 Preparo do filtrado da cultura de <i>Lactobacillus</i> spp.....	19
3.3 Atividade antibacteriana <i>in vitro</i> de <i>Lactobacillus</i> sobre <i>S. mutans</i> em cultura planctônica.....	20
3.4 Atividade antibacteriana de <i>Lactobacillus</i> sobre <i>S. mutans</i> em biofilmes formados <i>in vitro</i>	21
3.4.1 Grupos experimentais	21
3.4.2 Formação dos biofilmes em discos de hidroxiapatita	22
3.4.3 Determinação do número de UFC/mL	25
3.5 Efeitos de <i>Lactobacillus</i> sobre <i>S. mutans</i> e desenvolvimento de cárie dentária experimental em ratos	25
3.5.1 Animais e grupos experimentais	26
3.5.2 Indução de cárie nos modelos experimentais de ratos,,.....	27
3.6 Análise estatística	33
4 RESULTADOS	34
4.1 Atividade antibacteriana <i>in vitro</i> de <i>Lactobacillus</i> sobre <i>S. mutans</i> em cultura planctônica.....	34
4.2 Atividade antibacteriana de <i>Lactobacillus</i> sobre <i>S. mutans</i> em biofilmes formados <i>in vitro</i>	37

4.3 Efeitos de <i>Lactobacillus</i> sobre <i>S. mutans</i> e desenvolvimento de cárie dentária experimental em ratos	40
5 DISCUSSÃO	43
6 CONCLUSÃO	51
REFERÊNCIAS	52
ANEXO S.....	58

Velloso MS. Efeitos de *Lactobacillus* spp. isolados da cavidade bucal de indivíduos livres de cáries sobre *Streptococcus mutans*: estudo do potencial probiótico [dissertação]. São José dos Campos (SP): Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2016.

RESUMO

Estudos prévios demonstraram que algumas cepas de *Lactobacillus* podem inibir *Streptococcus mutans*. Assim, cepas de *Lactobacillus* pertencentes à microbiota oral residente de indivíduos saudáveis precisam ser investigadas como possíveis estratégias de prevenção para a cárie dentária e outras infecções bucais. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de cepas do gênero *Lactobacillus* isoladas de indivíduos livres de cárie sobre *S. mutans* utilizando modelos de estudo *in vitro* e *in vivo*. No estudo *in vitro*, trinta cepas de *Lactobacillus* isoladas da cavidade bucal foram avaliadas quanto à atividade antibacteriana contra *S. mutans* em crescimento planctônico. A seguir, as cinco cepas que apresentaram maior atividade antibacteriana foram selecionadas para o estudo dos efeitos antimicrobianos sobre biofilmes de *S. mutans* em discos de hidroxiapatita. Para estudo *in vivo*, foi selecionada a cepa de *Lactobacillus* com maior efeito inibitório sobre biofilme de *S. mutans*, procurando-se avaliar seus efeitos no desenvolvimento de cárie experimental em ratos. Os resultados demonstraram que a maioria das cepas de *Lactobacillus* testadas foi capaz de inibir as células de *S. mutans* em crescimento planctônico, alcançando percentual de redução de até 99 %. As cepas, com maior percentual de inibição, selecionadas para os testes em biofilme foram uma de *L. fermentum* e quatro de *L. paracasei*. Todas as cinco cepas foram capazes de inibir a formação do biofilme de *S. mutans*, entretanto diferenças estatisticamente significantes só foram observadas para três das cepas testadas. Assim, para os testes de cárie dentária em ratos foi utilizada apenas uma das cepas de *L. paracasei*. O tratamento com essa cepa levou a uma redução do número de UFC / mL de *S. mutans* presentes na cavidade bucal dos animais, mas não apresentou efeito sobre o desenvolvimento de cáries dentárias. Em todos os grupos experimentais foram observadas áreas de desmineralização do esmalte, mas lesões cavitárias não foram detectadas. Concluiu-se que as cepas isoladas de *L. fermentum* e *L. paracasei* estudadas apresentam potencial probiótico e pode ser consideradas para uso na cavidade bucal, pois possuem atividade inibitória sobre *S. mutans* e diminuem a formação de biofilme por esse micro-organismo cariogênico.

Palavras-chave: *Streptococcus mutans*. *Lactobacillus*. Probióticos. Placa dentária. Cárie dentária.

Velloso MS. Effects of *Lactobacillus* spp. isolated from oral cavity of caries-free subjects on *Streptococcus mutans*: study of potencial probiotic [dissertation]. São José dos Campos(SP): Institute of Science and Tecnology, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2016.

ABSTRACT

Previous studies have demonstrated that certain strains of *Lactobacillus* can inhibit *Streptococcus mutans*. Thereby, *Lactobacillus* strains belonging to the oral microbiota resident from healthy subjects need to be investigated as possible strategies to prevent dental caries and other oral infections. The aim of this study was to evaluate the effect of *Lactobacillus* spp. strains isolated from caries-free subjects on *S. mutans* using study models in vitro and in vivo. In the in vitro study, thirty *Lactobacillus* strains recovered from the oral cavity of caries-free subjects were evaluated for antibacterial activity against *S. mutans* in planktonic culture. Next, the five strains that showed higher antibacterial activity were selected for the study of antimicrobial effects on biofilm of *S. mutans* formed on hydroxyapatite disks. For in vivo study, we selected the *Lactobacillus* strain with greater inhibitory effect on *S. mutans* biofilm, in order to evaluate its effects on the development of experimental caries in rats. The results showed that most of the tested *Lactobacillus* strains were able to inhibit *S. mutans* cells in planktonic culture, reaching a percentage reduction up to 99 %. The strains with higher percentage of inhibition selected for biofilm tests were one strain of *L. fermentum* and four of *L. paracasei*. All five of these strains were able to inhibit biofilm formation of *S. mutans*, however statistically significant differences were only observed for three strains. Thus, for the dental caries test in rats was used only one strain of *L. paracasei*. Treatment with this *Lactobacillus* strain has led to a reduction in the number of CFU / mL of *S. mutans* in the oral cavity of the animals but had no effect on the development of dental caries. In all experimental groups enamel demineralization areas were observed, but cavitary lesions were not detected. It was concluded that *L. fermentum* and *L. paracasei* strains tested have a potential probiotics and could be used in the oral cavity because they have inhibitory activity against *S. mutans* and reduce biofilm formation by this cariogenic micro-organism.

Keywords: *Streptococcus mutans*. *Lactobacillus*. Probiotics. Dental plaque. Dental caries.

1 INTRODUÇÃO

A cavidade bucal humana é habitada por centenas de espécies bacterianas, sendo que a maioria trata-se de espécies comensais que mantêm o equilíbrio do ecossistema. No entanto, algumas espécies possuem papel fundamental no desenvolvimento de doenças bucais, principalmente a cárie dentária (Belda-Ferre et al., 2012).

A cárie dentária foi considerada a doença humana biofilme-dependente mais prevalente, afetando 80-90 % da população em todo o mundo (Petersen, 2004; Peters et al., 2012).

Além dos três fatores primários: hospedeiro (dentes susceptíveis), microbiota (formação de biofilmes por bactérias cariogênicas) e carboidratos advindos da dieta, descritos por Keyes em 1960 para o desenvolvimento da cárie dentária, em 1983, Newbrun acrescentou um quarto fator etiológico que deveria agir simultaneamente aos outros fatores para o desenvolvimento da doença: o tempo (Lima, 2007).

Sendo assim, a cárie pode ser definida como uma doença multifatorial (Cheon et al., 2013) que leva a destruição localizada de tecidos dentais duros por subprodutos ácidos da fermentação de carboidratos por bactérias acidogênicas (Selwitz et al., 2007). Seu desenvolvimento ocorre a partir da formação de um biofilme composto por bactérias altamente eficientes na conversão de carboidratos em ácidos orgânicos que desmineralizam o esmalte do dente (Shen et al., 2004), e que permanece na superfície dentária por determinado período de tempo (Lima, 2007).

Trabalhos pioneiros comprovaram que *S. mutans* seria o principal agente etiológico da cárie dentária (Loesche et al., 1964; Loesche, 1986) e apesar de estudos recentes de biologia molecular terem comprovado um ecossistema diversificado no biofilme dentário, onde *S. mutans* representa apenas uma pequena fração da comunidade bacteriana (Li et al., 2005; Simón-Soro, Mira, 2015), outros estudos ainda buscam induzir competência imunológica para proteger o indivíduo dessa bactéria e descobrir formas de prevenção para a cárie dentária (Koo et al., 2010; Shanmugam et al., 2013; Zhang S, 2013; Lee, Kim, 2014; Lin et al., 2015), como

por exemplo, o uso de probióticos (Simark-Mattsson et al., 2007; Koo et al., 2010; Palombo, 2011; Tao et al., 2011).

O termo probiótico, derivado do grego, significa “para a vida”, antônimo do termo antibiótico (“contra a vida”), e pode também ser definido como “micro-organismos vivos que quando consumidos em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro” (Amara, Shibl, 2015). A maioria dos micro-organismos identificados até o momento com propriedades probióticas são bactérias Gram-positivas e pertencem aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (Wu et al., 2015).

Em relação aos *Lactobacillus*, cepas de diferentes espécies têm sido consideradas probióticas, incluindo *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. casei* Shirota, *L. paracasei*, *L. reuteri*, *L. johnsonii*, *L. plantarum* e *L. rhamnosus* (Simark-Mattsson et al., 2007; Reddy et al., 2010).

Nos últimos anos, diversas descobertas revelaram benefícios na administração de probióticos, que variaram desde a inibição direta de micro-organismos patogênicos, até melhorias das funções do sistema imunológico do hospedeiro (Chung et al., 2004; He et al., 2009; Hasslöf et al., 2010; Rupa, Mine, 2012).

Alguns estudos realizados anteriormente demonstraram que cepas de *Lactobacillus* incorporadas em diferentes produtos comerciais como probióticos apresentaram efeitos inibitórios sobre *Streptococcus mutans* e, portanto poderiam ajudar na prevenção da cárie dentária. Entretanto, como os lactobacilos são bactérias produtoras de ácido láctico e participam do processo de progressão da cárie dentária, os efeitos desse micro-organismo sobre o desenvolvimento de cárie têm sido bastante estudados e discutidos (Matsumoto et al., 2005; Simark-Mattsson et al., 2007; Hasslöf et al., 2010; Tanzer et al., 2010; Söderling et al., 2011; Marttinen et al., 2012; Twetman, Keller, 2012; Holgerson et al., 2013; Schwendicke et al., 2014; Lin et al., 2015)

O não desenvolvimento de cárie dentária em uma pequena parcela da população adulta humana sugere a presença de cepas bacterianas, por exemplo, do gênero *Lactobacillus*, com potencial efeito antagônico contra bactérias cariogênicas (Corby et al., 2005; Belda-Ferre et al., 2012). Essa ideia de usar micro-organismos da microbiota residente para inibir o desenvolvimento de bactérias patogênicas foi

proposta há mais de um século e hoje auxilia no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para infecções (Simark-Mattson et al., 2007).

Tendo em vista que o desenvolvimento de métodos para prevenção das infecções bucais é extremamente importante para a Odontologia e que cepas probióticas de *Lactobacillus* podem ter efeitos inibitórios significativos sobre *S. mutans*, torna-se interessante estudar a ação probiótica potencial de isolados clínicos de *Lactobacillus* de indivíduos que não possuem cárie dentária sobre *S. mutans*, principalmente em relação à formação do biofilme e o desenvolvimento da doença. A identificação de novas cepas de *Lactobacillus* com ação inibitória sobre *S. mutans* poderá contribuir para o desenvolvimento de métodos alternativos para o controle do biofilme bucal e prevenção da cárie dentária.

2 PROPOSIÇÃO

2.1 Objetivos gerais

Avaliar o efeito de cepas do gênero *Lactobacillus* isoladas a partir da cavidade bucal de indivíduos livres de cárie sobre *S. mutans* em modelos de estudos *in vitro* e *in vivo*.

2.2 Objetivos específicos

- a) avaliar a atividade antibacteriana *in vitro* de 30 cepas de *Lactobacillus* isoladas de indivíduos livres de cárie sobre *S. mutans*;
- b) selecionar 5 cepas de *Lactobacillus* com maior inibição contra *S. mutans* para testar a atividade antimicrobiana sobre biofilmes formados *in vitro* em discos de hidroxiapatita;
- c) selecionar 1 cepa de *Lactobacillus* com maior atividade antimicrobiana sobre biofilmes de *S. mutans* para avaliar sua ação probiótica sobre a cárie dentária utilizando modelo de estudo *in vivo* em ratos;
- d) avaliar nos testes *in vitro*, além dos efeitos das cepas de *Lactobacillus* sobre *S. mutans*, avaliar também os efeitos do filtrado da cultura de *Lactobacillus* sobre *S. mutans*, buscando estudar os efeitos inibitórios relacionados ao ambiente ácido e substâncias antimicrobianas secretadas por *Lactobacillus*.

3 DETALHAMENTO METODOLÓGICO

3.1 Comitê de Ética

Esse trabalho foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Instituto de Ciência e Tecnologia da Universidade Estadual Paulista/UNESP Campus de São José dos Campos, cuja aprovação ocorreu em 15 de Agosto de 2014 sob parecer nº 754.634 (ANEXO A), e à Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Ciência e Tecnologia da Universidade Estadual Paulista/UNESP Campus de São José dos Campos, cuja aprovação ocorreu em 15 de Agosto de 2014 sob protocolo nº 09/2014-PA/CEP (ANEXO B). Todos os procedimentos foram realizados de acordo com a Lei 11.794, de 8 de Outubro de 2008.

3.2 Cepas de micro-organismos

Foi utilizada cepa padrão de *Streptococcus mutans* (UA 159) e cepas clínicas de *Lactobacillus* que foram previamente isoladas da cavidade bucal de indivíduos livres de cárie e identificadas por método bioquímico (sistema API 50 CHL, BioMérieux, Marcy l'Etoile, France) e molecular (Reação em cadeia da polimerase – PCR) na tese de doutorado do aluno Rodnei Dennis Rossoni.

Foram utilizadas 22 cepas de *L. paracasei* (1.1, 3.1, 4.2, 6.2, 7.5, 8.4, 10.5, 11.6, 15.8, 16.4, 17.1, 20.3, 21.4, 23.4, 24.1, 25.4, 26.1, 27.1, 28.4, 30.1, 37.1 e 39.2), 5 cepas de *L. rhamnosus* (5.2, 13.1, 19.3, 19.9 e 36.4) e 3 cepas de *L. fermentum* (14.5, 20.4, 31.4).

As cepas utilizadas neste trabalho são mantidas em freezer a -80 °C (NUAIRE, Minnesota, EUA) no Laboratório de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos/UNESP. Para ativação desses micro-organismos, a cepa de *S. mutans* foi cultivada em ágar Infuso Cérebro

Coração (BHI, Himedia, Mumbai, Índia) por 48 h a 37 °C em estufa bacteriológica sob condições de 5 % de teor de CO₂ (Ultrasafe HF212UV, Biosystems, Curitiba, Brasil) e as cepas de *Lactobacillus* foram cultivadas em ágar Rogosa SL (Himedia, Mumbai, Índia) por 4 dias a 37 °C em estufa bacteriológica sob condições de 5 % de teor de CO₂.

A cepa de *S. mutans* foi também semeada em ágar Mitis Salivarius (Difco, Detroit, EUA) acrescido de bacitracina (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil, 0,2 UI por mL de meio) e de 15 % de sacarose (Labsynth, Diadema, Brasil) – MSBS, para confirmação das características das colônias.

3.2.1 Padronização da densidade óptica e quantificação celular da suspensão de *Lactobacillus* spp. em espectrofotômetro

Para padronizar a quantidade de células de *Lactobacillus* a 10⁸ células / mL e definir a densidade óptica dessa concentração em espectrofotômetro, inicialmente as cepas de *Lactobacillus* foram cultivadas em caldo Mann Rogosa Sharpe (MRS, Difco, Detroit, EUA) a 37 °C em estufa bacteriológica sob condições de 5 % de teor de CO₂ por 48 h. Posteriormente, as células microbianas de cada cultura foram centrifugadas a 2000 xg (aprox. 4000 rpm) por 10 min (Centrífuga MPW, Warszawa, Polônia), o sobrenadante foi desprezado e o sedimento suspenso em 6 mL de solução fisiológica (NaCl 0,85 %, Labimpex, São Paulo, Brasil). Esse procedimento foi repetido novamente e o sobrenadante desprezado.

As células foram resuspensas em solução fisiológica e padronizadas a uma turvação correspondente à 0,5 da escala nefelométrica de Mc Farland (aproximadamente 1,5 x 10⁸ células). A partir dessas suspensões foram realizadas leituras das densidades ópticas em comprimento de onda de 600 nm utilizando espectrofotômetro (B582, Micronal, São Paulo, Brasil). Foram realizadas também, diluições seriadas das suspensões e semeaduras de alíquotas de 100µL de cada suspensão em ágar Rogosa SL. As placas foram incubadas a 37 °C em estufa bacteriológica sob condições de 5 % de teor de CO₂ por 48 h, e após esse período as colônias de *Lactobacillus* foram contadas. Os procedimentos descritos foram

repetidos três vezes para definição da densidade óptica ideal correspondente à 10^8 células / mL.

3.2.2 Preparo da suspensão padronizada de *S. mutans* e *Lactobacillus*

S. mutans foi cultivado em caldo Infuso Cérebro Coração (BHI, Himedia, Mumbai, India) acrescido de 15 % de sacarose e *Lactobacillus* foi cultivado em caldo MRS a 37 °C em estufa bacteriológica sob condições de 5 % de teor de CO₂ por 48 h. Posteriormente, as células microbianas de cada cultura foram centrifugadas a 2000 xg (aprox. 4000 rpm) por 10 min, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento suspenso em 6 mL de solução fisiológica. Esse procedimento foi repetido novamente. A quantificação do número de células da suspensão foi realizada através de espectrofotômetro. Os valores dos comprimentos de onda foram de 398 nm para *S. mutans* e 600 nm para as cepas de *Lactobacillus*, enquanto que as densidades ópticas foram de 1,360 para *S. mutans* e 0,880 para *L. fermentum*, 1,014 para *L. paracasei* e 1,040 para *L. rhamnosus*.

3.2.3 Preparo do filtrado da cultura de *Lactobacillus* spp.

Para o preparo do filtrado da cultura de *Lactobacillus*, a cepa foi incubada em caldo MRS a 37 °C por 48 h em estufa bacteriológica a 5 % de teor de CO₂. Após este período foi realizada a suspensão padronizada de 10^8 células / mL conforme descrito anteriormente. Um volume de 1 mL da suspensão padronizada foi transferida para tubo contendo 6 mL de caldo MRS e incubados novamente a 37 °C por 24 h em estufa sob condições de 5 % de teor de CO₂. Após este período, a cultura foi centrifugada a 2000 xg (aprox. 4000 rpm) por 10 min, e o sobrenadante foi filtrado em membrana com poros de diâmetro de 0,22 µm (MFS, Dublin, EUA).

3.3 Atividade antibacteriana *in vitro* de *Lactobacillus* sobre *S. mutans* em cultura planctônica

A atividade antibacteriana foi realizada com as 30 cepas de *Lactobacillus* isoladas da cavidade bucal de indivíduos livres de cáries, e previamente identificadas, baseando-se na metodologia proposta por Lin et al. 2015.

Foram preparadas suspensões padronizadas de *S. mutans* e *Lactobacillus* contendo 10^8 células / mL cada uma, conforme descrito no item 3.2.3. A seguir, 250 µL da suspensão padronizada de *S. mutans* e 250 µL da suspensão padronizada de *Lactobacillus* foram adicionados juntamente em tubos contendo 1,5 mL de caldo BHI. Como grupo controle, 250 µL da suspensão padronizada de *S. mutans* e 250 µL de solução fisiológica foram adicionados em 1,5 mL de caldo BHI. Os tubos foram incubados em estufa bacteriológica sob condições de 5 % de teor de CO₂ a 37 °C por 24 h.

Para determinar a atividade antibacteriana do filtrado da cultura de *Lactobacillus*, 250 µL da suspensão padronizada de *S. mutans* e 250 µL do sobrenadante da cultura de *Lactobacillus* foram adicionados juntamente em tubos contendo 1,5 mL de caldo BHI e incubados em estufa sob condições de 5 % de teor de CO₂ a 37 °C por 24 h. Foram testados dois tipos de sobrenadante da cultura de *Lactobacillus*: sobrenadante da cultura sem ajuste de pH e com pH ajustado a 6,5 com NaOH (Labsynth, Diadema, Brasil), para eliminar os possíveis efeitos do ácido sobre *S. mutans*.

Para avaliar os efeitos do caldo MRS contido no filtrado da cultura de *Lactobacillus* também foi realizado um grupo experimental para controle desse caldo em que 250 µL da suspensão padronizada de *S. mutans* foi combinado a 250 µL de caldo MRS.

Após período de incubação, os tubos foram homogeneizados por 1 min e a partir das suspensões obtidas foram realizadas diluições decimais das culturas, das quais alíquotas de 100 µL foram semeadas em placas de petri contendo meios de cultura seletivos: MSBS para *S. mutans* e ágar Rogosa SL para *Lactobacillus*. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica sob condições de 5 % de teor de CO₂ a 37 °C por 48 h. Após este período, as colônias foram contadas para o cálculo de unidades formadoras de colônias por mL (UFC/mL). Todos os testes foram

realizados em triplicata e repetidos em dois experimentos independentes.

3.4 Atividade antibacteriana de *Lactobacillus* sobre *S. mutans* em biofilmes formados *in vitro*

Foram selecionadas 5 cepas de *Lactobacillus* que apresentaram maior atividade inibitória contra *S. mutans* para estudar a atividade antimicrobiana sobre biofilmes de *S. mutans* formados em discos de hidroxiapatita seguindo a metodologia descrita por Ricomini-Filho (2013) com algumas modificações.

3.4.1 Grupos experimentais

Os grupos experimentais foram distribuídos, para cada cepa de *Lactobacillus*, conforme quadro abaixo:

Quadro 1 – Grupos experimentais utilizados para o teste de formação de biofilme em discos de hidroxiapatita

Grupos experimentais	Ordem de inoculação para cada grupo experimental	
Controles de <i>S. mutans</i>	<i>S. mutans</i> + Solução fisiológica	Solução fisiológica + <i>S. mutans</i>
Controles de <i>Lactobacillus</i>	Solução fisiológica + <i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus</i> + Solução fisiológica
Grupos interação Célula	<i>S. mutans</i> + <i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus</i> + <i>S. mutans</i>
Grupos interação sobrenadante não tratado	<i>S. mutans</i> + filtrado da cultura de <i>Lactobacillus</i> sem ajuste de pH	Filtrado da cultura de <i>Lactobacillus</i> sem ajuste de pH + <i>S. mutans</i>
Grupos interação sobrenadante tratado	<i>S. mutans</i> + filtrado da cultura de <i>Lactobacillus</i> com ajuste de pH	Filtrado da cultura de <i>Lactobacillus</i> com ajuste de pH + <i>S. mutans</i>
Controles do caldo MRS	<i>S. mutans</i> + caldo MRS	Caldo MRS + <i>S. mutans</i>

Fonte: Elaborado pelo autor.

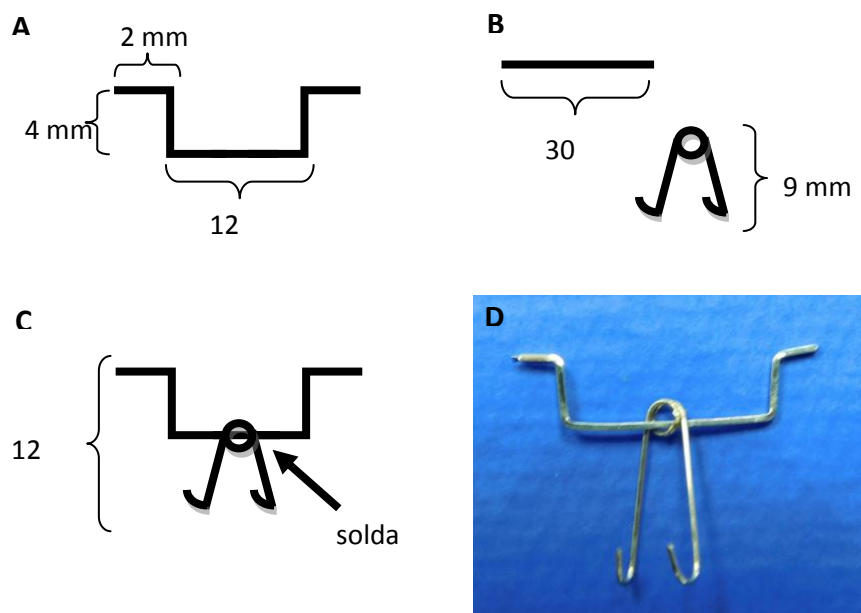
3.4.2 Formação dos biofilmes em discos de hidroxiapatita

Para a formação dos biofilmes, os discos de hidroxiapatita foram posicionados em suportes feitos com fios ortodônticos previamente preparados e soldados. Ambos, discos e suportes foram colocados em tubos de centrífuga, separadamente, recobertos por solução fisiológica e autoclavados antes da utilização na formação de biofilme.

Para a confecção dos suportes foram utilizados fios ortodôntico duro elástico CrNi redondo Ø 0,45 mm (.018") em rolo e fios ortodôntico Morest Standard CrNi retangular 0,40 mm x 0,55 mm (.016" x .022") em vareta. Os suportes foram confeccionados conforme figura 1 e soldados em máquina de solda super micro ponto (SMP 2700, Kernit ind. Mecatrônica Ltda., Indaiatuba, São Paulo, Brasil).

Os discos foram então dispostos nos suportes de forma que se mantivessem na posição vertical, sem tocar no fundo dos poços das placas de 24 poços (KASVI, Curitiba, Brasil) (Figuras 2A, 2B e 3).

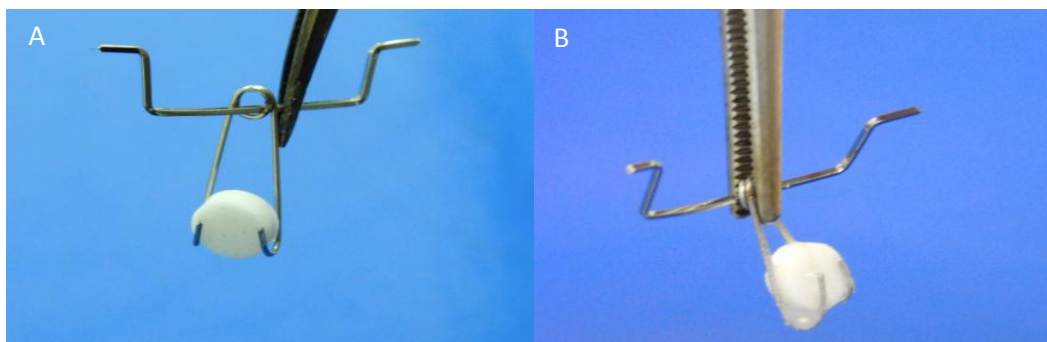
Figura 1 – Confeção dos suportes com fio ortodôntico



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) Montagem por meio de soldagem das partes superior e inferior do suporte; d) Suporte preparado e soldado.

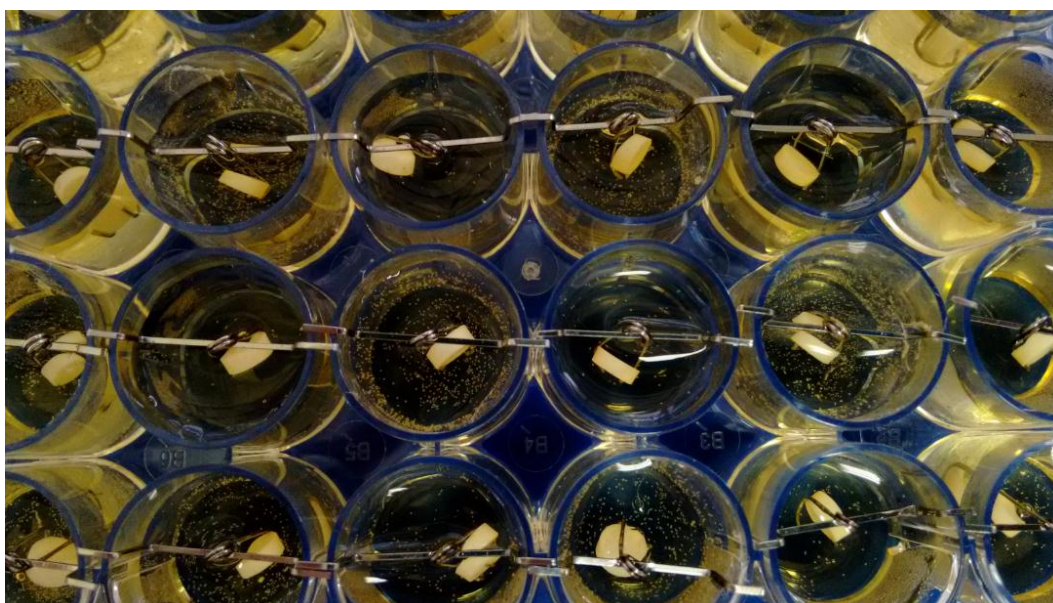
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 2 – Disposição dos discos nos suportes



Legenda: a) Disco de hidroxiapatita posicionado na posição vertical em suporte fabricado com fio ortodôntico, para formação do biofilme *in vitro*. b) Biofilme formado sobre disco de hidroxiapatita posicionado em suporte fabricado com fio ortodôntico.
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 3 – Discos de hidroxiapatita posicionados em suporte fabricado com fio ortodôntico e dispostos em placa de 24 poços para formação do biofilme *in vitro*



Fonte: Elaborado pelo autor.

A seguir, os discos foram recobertos com 2,0 mL de saliva artificial manipulada (carboxi metil celulose 5 g, sorbitol 12 g, cloreto de sódio 0,34 g, cloreto de potássio 0,48 g, cloreto de cálcio diidratado 0,6 g, cloreto de magnésio hexaidratado 0,02 g, fosfato de ácido de potássio 0,13 g, metilparabeno 0,1 g, água purificada q.s.p. 500 mL, Farmácia Nostra Fórmula, São José dos Campos, São

Paulo, Brasil), e incubados por 4 horas a 37 °C em estufa incubadora B.O.D. (Eletrolab 101M/3, São Paulo, Brasil) para formação da película adquirida. Após este período, cada suporte juntamente com o disco foi removido da placa e colocados em outra placa de 24 poços contendo 1,8 mL de uma mistura composta por 70 % de saliva artificial + 30 % de caldo BHI suplementado com 0,3 % de glicose (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) e 67 mmol/L de tampão Sörensen, pH 7,2 (7,0 mL de solução de Na_2HPO_4 + 3,0 mL de solução de KH_2PO_4 - Soluções estoque: A = 11,876g/L de Na_2HPO_4 (Labsynth, Diadema, Brasil), B = 9,079g/L de KH_2PO_4 (Labsynth, Diadema, Brasil)).

Para a avaliação do efeito das cepas de *Lactobacillus* contra *S. mutans* após a adesão inicial de *S. mutans*, foram acrescentados em cada poço, primeiramente 225 µL da suspensão padronizada de *S. mutans* que foram incubadas em estufa sob condições de 5 % de teor de CO_2 a 37 °C por 1 h para adesão inicial de *S. mutans* aos discos. A seguir, foram acrescentados 225 µL da suspensão padronizada de *Lactobacillus*, do filtrado da cultura, do caldo MRS ou de solução fisiológica conforme os grupos experimentais descritos anteriormente.

Para a avaliação do efeito das cepas de *Lactobacillus* contra *S. mutans* antes da adesão inicial do biofilme por *S. mutans*, foram acrescentados em cada poço, primeiramente 225 µL da suspensão padronizada de *Lactobacillus*, ou 225 µL do filtrado da cultura, ou de solução fisiológica ou de caldo MRS e foi realizada a incubação inicial sob condições de 5 % de teor de CO_2 pelo período de 1 h a 37 °C. A seguir, foram acrescentados 225 µL da suspensão padronizada de *S. mutans* ou de solução fisiológica conforme os grupos experimentais descritos anteriormente.

As placas foram incubadas em estufa sob condições de 5% de teor de CO_2 por 16 h 30 min. Após este período de incubação, cada suporte juntamente com o disco foi removido da placa e transferido para outra placa de 24 poços contendo 2 mL de solução fisiológica. Cada um dos discos foi mergulhado, cuidadosamente para não cair do suporte, em solução fisiológica contida nos poços da placa de 24 poços. Cada disco foi mergulhado três vezes no mesmo poço para lavagem e remoção das células fracamente aderidas ao biofilme formado, e posteriormente, foram transferidos para outra placa de 24 poços contendo 1,8 mL de uma mistura composta por 70 % de saliva artificial + 30 % de caldo BHI suplementado com 0,15 % de glicose e 0,15 % de sacarose. As placas foram tampadas e incubadas em

estufa sob condições de 5 % de teor de CO₂ a 37 °C, o caldo foi trocado a cada 24 horas até completar 64 h 30 min de formação do biofilme. A cada troca de caldo foi realizada a medição do pH para cada poço, nos tempo de 16 h 30 min, 40 h 30 min e 64 h 30 min, durante a formação do biofilme.

Todos os testes realizados foram repetidos em dois experimentos independentes em dias diferentes.

3.4.3 Determinação do número de UFC/mL

Após 64 h 30 min, cada disco de hidroxiapatita foi transferido para outra placa de 24 poços contendo 2 mL de solução fisiológica. Cada um dos discos foi mergulhado, cuidadosamente para não cair do suporte, em solução fisiológica contida nos poços da placa de 24 poços. Cada disco foi então mergulhado três vezes no mesmo poço para lavagem e remoção das células fracamente aderidas ao biofilme formado, e posteriormente, foram removidos dos suportes e transferidos para tubos contendo 6 mL de solução fisiológica (NaCl 0,85 %). O biofilme aderido aos discos foi removido utilizando homogeneizador ultra-sônico (Sonopuls HD 2200, Bandelin Eletronic) com potência de 7 W por 30 segundos para romper os agregados microbianos.

A partir da solução obtida, foram realizadas diluições decimais da suspensão do biofilme, das quais alíquotas de 100 µL foram semeadas em placas de petri contendo meios de cultura seletivos: ágar MSBS para *S. mutans* e ágar Rogosa SL para *Lactobacillus*. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica sob condições de 5 % de teor de CO₂ por 48 h. Após este período, as colônias foram contadas para o cálculo de unidades formadoras de colônias por mL (UFC/mL).

3.5 Efeitos de *Lactobacillus* sobre *S. mutans* e desenvolvimento de cárie dentária experimental em ratos

Foi selecionada a cepa de *Lactobacillus* com maior atividade antimicrobiana

sobre o biofilme de *S. mutans* formado *in vitro*, para o estudo de cárie dentária em ratos, utilizando as metodologias propostas por Matsumoto et al. (2005) e Baptista (2009) com algumas modificações.

3.5.1 Animais e grupos experimentais

Foram utilizados quarenta ratos *Wistar* (*Rattus norvegicus albinus*) machos, convencionais, com 28 dias de idade, que foram comprados do biotério central de roedores da Universidade Estadual Paulista – UNESP, Campus de Botucatu. Os animais com 21 dias de idade foram transportados separados em gaiolas de polipropileno recobertas com maravalha e com o mínimo de perturbação do seu bem-estar, de Botucatu até São José dos Campos por profissional qualificado.

Após chegada dos animais no biotério do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos/UNESP, os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno com tampa aramada para apoiar o bebedouro e a ração. A disponibilidade de água e ração foi *ad libitum*, sendo que o consumo foi calculado conforme o peso dos animais (ração = 10 g / 100 g dia, água 10-12 mL / 100 g dia). Foram mantidos 8 animais por gaiola e foi utilizada cama de maravalha. O material da cama, água, ração e gaiolas foram esterilizados em autoclave para evitar contaminação.

Durante o período de 7 dias os animais permaneceram em adaptação e aclimatização no qual apenas a dieta cariogênica foi introduzida e não houve qualquer envolvimento desses animais com o início do processo experimental.

Após o período de adaptação, com os animais com 28 dias de idade, é que foi iniciado o processo experimental, nesse caso, os grupos experimentais foram divididos da seguinte forma: infecção monoespécie com *S. mutans* + dieta cariogênica (Grupo A, n = 8), infecção monoespécie com *Lactobacillus* + dieta cariogênica (Grupo B, n = 8), infecção multiespécie por *S. mutans* e *Lactobacillus* + dieta cariogênica (Grupo C, n = 8), inoculação com solução fisiológica como grupo controle sem infecção + dieta cariogênica (Grupo D, n = 8) e grupo sem infecção, sem inoculação e sem dieta cariogênica para controle da saúde dos animais (Grupo

E, n = 8).

3.5.2 Indução de cárie nos modelos experimentais de ratos

Em todos os grupos experimentais foi induzida a formação de cárie por meio de dieta rica em sacarose utilizando dieta 2000 constituída de 56 % de sacarose (açúcar cristal especial, Colombo, S/A, São Paulo, Brasil), 28 % de leite em pó desnatado (CCGL, Rio Grande do Sul, Brasil), e 16 % de ração para roedores esterilizada e triturada (Müller et al., 2007). Os animais foram alimentados com essa dieta a partir do primeiro dia no biotério do ICT/UNESP (21 dias de idade) até o último dia do experimento, dia da eutanásia (83 dias de idade).

Para o preparo das suspensões padronizadas de *S. mutans* (2×10^8 células) e de *Lactobacillus* (2×10^8 células), *S. mutans* foi cultivado em caldo BHI acrescido de 15 % de sacarose e *Lactobacillus* foi cultivado em caldo MRS a 37 °C em estufa bacteriológica sob condições de 5 % de teor de CO₂ por 48 h. Posteriormente, as células microbianas de cada cultura foram centrifugadas a 2000 *xg* (aprox. 4000 rpm) por 10 min, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento suspenso em 6 mL de solução fisiológica. Esse procedimento foi repetido novamente. A quantificação do número de células da suspensão foi realizada através de espectrofotômetro. Os valores dos comprimentos de onda foram de 398 nm para *S. mutans* e 600 nm para a cepa de *Lactobacillus*, enquanto que as densidades ópticas foram de 1,360 para *S. mutans* e 1,014 para *Lactobacillus*. Posteriormente, 2 mL de cada suspensão padronizada a 10^8 células/mL foi transferida para microtubos e centrifugados (Mini Spin, Eppendorf, Hamburg, Germany) a 2000 *xg* (aprox. 4000 rpm) por 10 min, o sobrenadante foi descartado e o pellet resuspendido em 200 µL.

Para a indução de cárie, os ratos com 28 dias de idade dos Grupos A e B, receberam durante todo o período do experimento dieta cariogênica e foram infectados com *S. mutans* ou *Lactobacillus*, respectivamente, durante 5 dias, sendo realizado uma infecção por dia. Os ratos do grupo controle sem infecção (Grupo D) também receberam dieta cariogênica, porém foram inoculados com solução fisiológica durante 5 dias, sendo realizado uma inoculação por dia. O objetivo das

inoculações de solução fisiológica foi para que os animais deste grupo pudessem ter o mesmo estresse que os animais dos grupos infectados. Os animais do Grupo C receberam dieta cariogênica durante todo o experimento e foram infectados com *S. mutans* durante 5 dias, sendo uma infecção por dia, e depois foram infectados apenas com *Lactobacillus*, 3 vezes por semana, até o final do experimento. Os animais do Grupo E pertenceram ao grupo controle sem infecção, sem dieta cariogênica e sem inoculações, e foram mantidos com o mínimo de estresse. As inoculações de 200 µL da suspensão padronizada de cada micro-organismo foram realizadas com auxílio de seringa estéril com agulha (Descarpack, São Paulo, Brasil) sem bisel (Figura 4).

Figura 4 - Inoculações realizadas na cavidade bucal dos animais com auxílio de seringa



Legenda: a) Seringa estéril sem bisel; b) Inoculação da suspensão de micro-organismo na cavidade bucal do roedor com auxílio de seringa estéril sem bisel.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Para aumentar o desafio cariogênico, os animais dos grupos A, B, C e D receberam água enriquecida com 10 % de sacarose durante todo o experimento. Para acompanhar a colonização de *S. mutans* e *Lactobacillus* amostras foram coletadas da cavidade bucal de cada animal com auxílio de *swab* estéril (Kasvi, Curitiba, Brazil) (Figura 5), durante o período experimental em intervalos de uma semana. Por se tratarem de animais convencionais a primeira coleta foi realizada antes do início do período experimental, ou seja, antes das primeiras inoculações, para avaliação da microbiota presente na cavidade bucal desses animais e posterior

comparação com o perfil de infecção realizado no período experimental. Para a coleta, o *swab* estéril foi colocado na cavidade bucal do animal, e durante o período entre 1 e 2 minutos foram realizados movimentos de rotação do *swab* e deslize sobre a região próxima à oclusal dos molares.

Figura 5 – Coleta de amostras da microbiota da cavidade bucal do roedor com auxílio de *swab* estéril



Fonte: Elaborado pelo autor.

Posteriormente, as pontas dos *swab* foram transferidas para tubos contendo 6 mL de solução fisiológica estéril e estes foram agitados em vórtex por 1 min. A partir da solução obtida, foram realizadas diluições decimais da suspensão obtida, das quais alíquotas de 100 μ L foram semeadas em placas de petri contendo meios de cultura seletivos: MSBS para *S. mutans* e ágar Rogosa SL para *Lactobacillus*. As placas foram incubadas em estufa sob condições de 5 % de teor de CO₂ por 48 h a 37 °C. Após este período, as colônias foram contadas para o cálculo de unidades formadoras de colônias por mL (UFC/mL).

3.5.3 Análise do biofilme dentário

Para análise do biofilme formado na superfície dos dentes, os animais com 83 dias de idade foram submetidos à eutanásia com dose excessiva de anestésico utilizando associação de cloridrato de xilazina e cloridrato de ketamina, via peritonial. A dose de ketamina e xilazina para a eutanásia foi, respectivamente, de 75 mg / kg de peso e 30 mg / kg de peso. A mandíbula foi removida, fotografada (Figura 6) com câmera digital montada em lupa estereoscópica e posteriormente imersa em 12 mL de solução fisiológica estéril. O biofilme aderido foi removido utilizando homogeneizador ultra-sônico com potência de 50 W por 30 s. A partir da solução obtida foram realizadas diluições decimais da suspensão do biofilme das quais alíquotas de 100 µL foram semeadas em placas de petri contendo meios de cultura seletivos: ágar MSBS para *S. mutans* e ágar Rogosa SL para *Lactobacillus*. As placas foram incubadas em estufa sob condições de 5 % de teor de CO₂ por 48 h a 37 °C. Após este período, as colônias foram contadas para o cálculo de unidades formadoras de colônias por mL (UFC/mL).

Figura 6 – Mandíbula direita evidenciando a presença de biofilme dentário



Fonte: Elaborado pelo autor.

3.5.4 Análise do desenvolvimento de cárie dentária

Após a análise do biofilme dentário as mandíbulas foram fixadas em formol a 10 %. Maxilas removidas após eutanásia também foram fotografadas (Figura 7) com câmera digital montada em lupa estereoscópica e posteriormente dissecadas e fixadas em formol a 10 %. Para avaliar a presença de cárie dentária em molares de cada animal foi realizado um estudo duplo-cego no qual mandíbula e maxila de cada animal foram clinicamente avaliados com auxílio de lupa estereoscópica (15x) e fotografados com uma câmera digital montada no aparelho a fim de avaliar as áreas de lesões cariosas (Figura 8), em seguida, foram tiradas radiografias. Foi também utilizado um dispositivo a laser de detecção de cavidades (KaVo DIAGNOdent, Charlotte, NC, EUA) (Figura 9) para avaliar áreas de perda mineral ou desmineralização da estrutura saudável do dente.

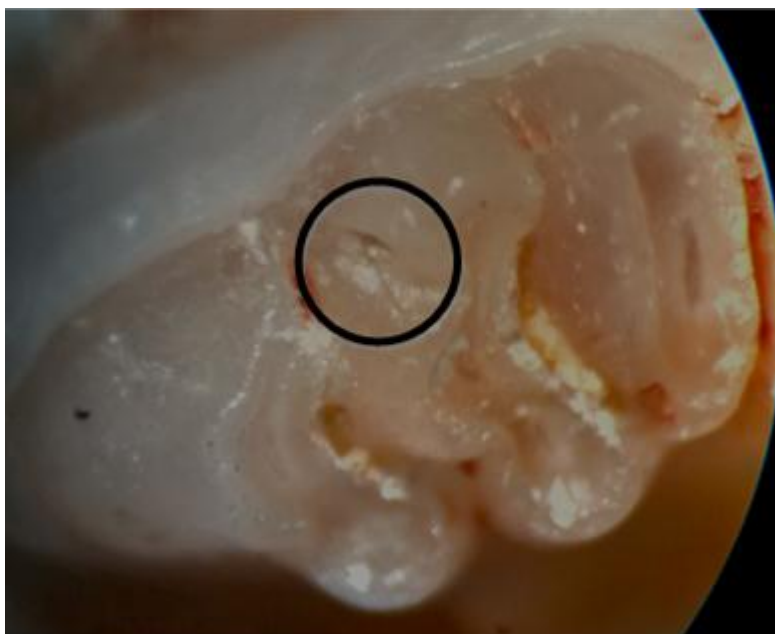
O aparelho apresenta como características técnicas: laser classe 2, luz laser diodo ($\lambda = 655 \text{ nm}$, $P \leq 1 \text{ mW}$), tipo 2095. Primeiramente foi escolhida a ponta para ser utilizada e a calibração do aparelho foi realizada de acordo com as normas do fabricante. A leitura do aparelho varia do valor 0 ao 99 e o cut-point do aparelho utilizado foi 52, ou seja, valores acima de 52 (*cut-point*) indicavam lesões de cárie, valores abaixo de 52 indicavam regiões de desmineralização ou perda mineral.

Figura 7 – Maxila esquerda evidenciando a presença de biofilme dentário



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 8 – Primeiro molar de maxila direita evidenciando a presença de lesão cariosa



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 9 – Detecção de desmineralização e perda mineral em molares de mandíbula esquerda de rato por meio de dispositivo a laser KaVo DIAGNOdent



Fonte: Elaborado pelo autor.

3.6 Análise estatística

Para comparação entre os grupos, inicialmente foi analisada a homogeneidade e variabilidade dos resultados. Posteriormente, foi utilizado o teste t , Kruskal-Wallis, ou teste ANOVA seguido do teste de Tukey para comparação entre os grupos, conforme os experimentos e grupos experimentais. Em todos os ensaios experimentais realizados, foi considerada diferença estatisticamente significativa quando o valor de p foi menor que 0,05. O programa GraphPad Prism versão 5.0 foi utilizado para os testes estatísticos.

4 RESULTADOS

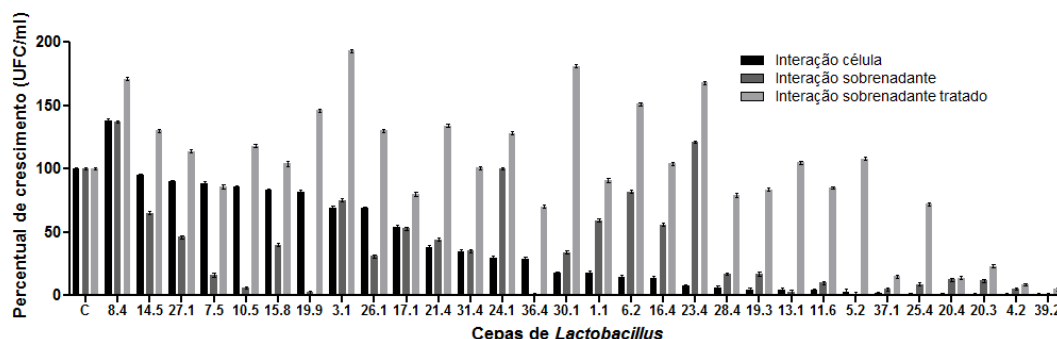
4.1 Atividade antibacteriana *in vitro* de *Lactobacillus* sobre *S. mutans* em cultura planctônica

A atividade antibacteriana *in vitro* foi realizada com todas as trinta cepas de *Lactobacillus* e como resultado, observamos que o crescimento de *S. mutans* foi inibido pela maioria das cepas de lactobacilos testadas, ao interagir diretamente com as células de *Lactobacillus* e com o sobrenadante não tratado (sem ajuste de pH), sendo encontrado valores de pH para esses filtrados entre 3 e 4. O sobrenadante tratado (com o ajuste do pH a 6,5) de algumas cepas de *Lactobacillus* não teve efeito inibitório significativo, em vez disso, permitiu o aumento das células de *S. mutans* (Figura 10).

Conforme dados da Figura 7, as cinco cepas que apresentaram maior atividade antibacteriana em cultura planctônica contra *S. mutans* foram as cepas *L. paracasei* 4.2, *L. paracasei* 20.3, *L. fermentum* 20.4, *L. paracasei* 25.4 e *L. paracasei* 39.2, com diferença estatisticamente significativa ($p < 0,0001$) em comparação com o grupo controle de *S. mutans*, considerando a análise estatística por meio do teste de variância ANOVA (Log10).

Os resultados do controle do caldo MRS demonstraram que o meio de cultura não interferiu no crescimento de *S. mutans*. Não houve diferença estatisticamente significativa em comparação com o grupo controle de *S. mutans* (Figura 11). No que diz respeito à contagem de UFC/ml de *Lactobacillus* não foi observada diferença estatística entre os grupos controle de *Lactobacillus* e o grupo interação (*S. mutans* + *Lactobacillus*) para nenhuma das cepas testadas (Tabela 1).

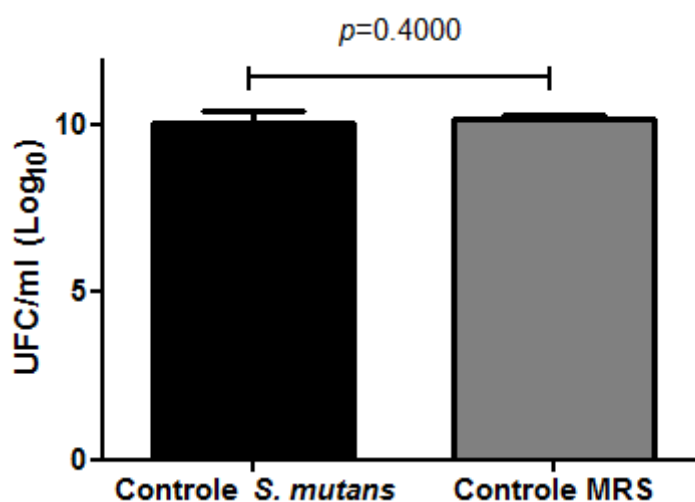
Figura 10 – Percentual de crescimento (UFC/mL) de *S. mutans* (SM) obtido no teste de atividade antibacteriana *in vitro* com as trinta cepas de *Lactobacillus* (LB) estudadas



Legenda: C = controle (SM + solução fisiológica), interação célula (SM + LB), interação sobrenadante (SM + filtrado da cultura de LB) e interação sobrenadante tratado (SM + filtrado da cultura de LB com pH 6,5). O crescimento de *S. mutans* no grupo controle foi considerado como valor absoluto (100 %). Cada coluna do gráfico representa a média de dois experimentos independentes. Desvios padrão são apresentados conforme análise estatística por meio do teste ANOVA complementado com teste de Tukey.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 11 – Média e desvio padrão dos dados de UFC/mL (Log₁₀) de *S. mutans* (SM) obtidos no teste de atividade antibacteriana *in vitro* para os grupos: Controle de SM (SM + solução fisiológica) e Controle do caldo MRS (SM + caldo MRS)



Legenda: Cada coluna do gráfico representa a média de todos os experimentos realizados no teste da atividade antibacteriana. Teste *t* foi realizado como análise estatística, diferença estatística considerada significativa se $p \leq 0.05$.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 1 – Médias e desvios padrão das contagens de UFC/mL de *Lactobacillus* ao final dos experimentos de atividade antibacteriana em cultura planctônica

Cepa	<i>Lactobacillus</i> UFC/mL (Log10 – média $\pm$ desvio padrão*)		
	Controle	Interação célula	<i>p</i> value
1.1	9.80 $\pm$ 0.10	9.44 $\pm$ 0.02	0.1974
3.1	9.41 $\pm$ 0.11	9.27 $\pm$ 0.06	0.3563
4.2	8.74 $\pm$ 0.16	8.64 $\pm$ 0.10	0.4262
5.2	8.91 $\pm$ 0.43	9.42 $\pm$ 0.23	0.3683
6.2	9.74 $\pm$ 0.04	9.51 $\pm$ 0.09	0.0893
7.5	9.01 $\pm$ 0.03	9.15 $\pm$ 0.21	0.5692
8.4	9.42 $\pm$ 0.05	9.67 $\pm$ 0.26	0.4020
10.5	8.80 $\pm$ 0.19	9.02 $\pm$ 0.07	0.3425
11.6	9.73 $\pm$ 0.09	9.78 $\pm$ 0.04	0.6602
13.1	9.39 $\pm$ 0.21	9.18 $\pm$ 0.24	0.5532
14.5	8.47 $\pm$ 0.12	8.84 $\pm$ 0.28	0.2085
15.8	9.09 $\pm$ 0.18	8.46 $\pm$ 0.28	0.1344
16.4	9.81 $\pm$ 0.08	9.76 $\pm$ 0.15	0.8039
17.1	9.53 $\pm$ 0.25	9.42 $\pm$ 0.24	0.7659
19.3	9.00 $\pm$ 0.09	9.29 $\pm$ 0.21	0.2805
19.9	9.68 $\pm$ 0.10	8.81 $\pm$ 0.30	0.3300
20.3	8.79 $\pm$ 0.17	8.76 $\pm$ 0.10	0.4699
20.4	9.13 $\pm$ 0.04	9.19 $\pm$ 0.02	0.3443
21.4	9.88 $\pm$ 0.06	9.44 $\pm$ 0.22	0.1323
23.4	9.34 $\pm$ 0.10	9.19 $\pm$ 0.09	0.3525
24.1	9.42 $\pm$ 0.08	9.45 $\pm$ 0.13	0.8376
25.4	8.97 $\pm$ 0.04	8.83 $\pm$ 0.07	0.2211
26.1	9.29 $\pm$ 0.10	8.24 $\pm$ 0.13	0.0537
27.1	9.38 $\pm$ 0.50	7.15 $\pm$ 0.15	0.0180
28.4	8.43 $\pm$ 0.41	8.45 $\pm$ 0.28	0.9772
30.1	9.09 $\pm$ 0.34	9.23 $\pm$ 0.17	0.7396
31.4	9.72 $\pm$ 0.05	9.49 $\pm$ 0.03	0.2650
36.4	9.11 $\pm$ 0.06	8.94 $\pm$ 0.35	0.6591
37.1	9.10 $\pm$ 0.03	9.12 $\pm$ 0.02	0.5588
39.2	8.85 $\pm$ 0.20	9.09 $\pm$ 0.11	0.3527

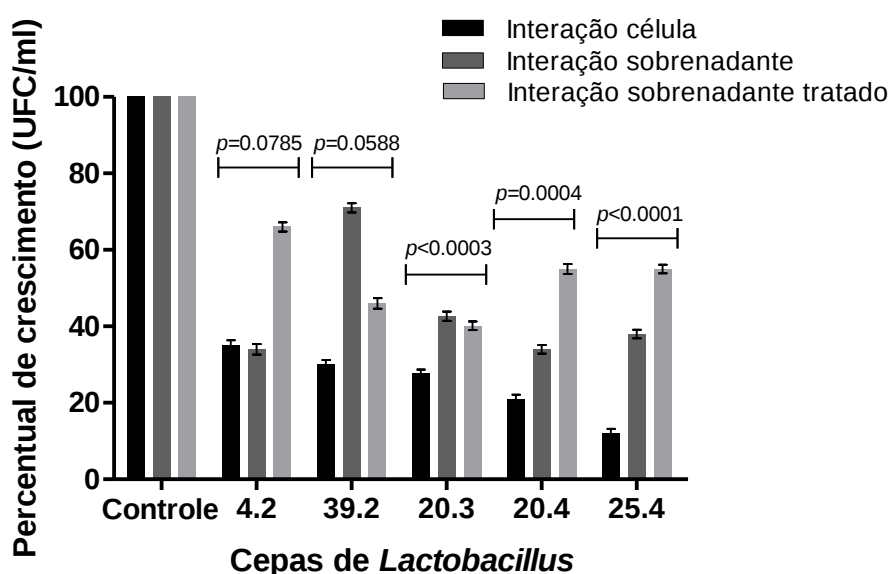
*Valores representam média $\pm$ desvio padrão de dois experimentos independentes em triplicata. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p < 0.05$), teste *t* realizado.

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.2 Atividade antibacteriana de *Lactobacillus* sobre *S. mutans* em biofilmes formados *in vitro*

Para o teste *in vitro* com formação de biofilme foram utilizadas, então, as cepas *L. paracasei* 4.2, *L. paracasei* 20.3, *L. fermentum* 20.4, *L. paracasei* 25.4 e *L. paracasei* 39.2. Como resultado do teste de formação de biofilme com adesão inicial de *S. mutans* observamos que todas as cepas de *Lactobacillus* testadas tiveram efeito inibitório sobre as células de *S. mutans* (Figura 12). Porém, na análise estatística observou-se diferença significativa apenas para as cepas 25.4, 20.4 e 20.3.

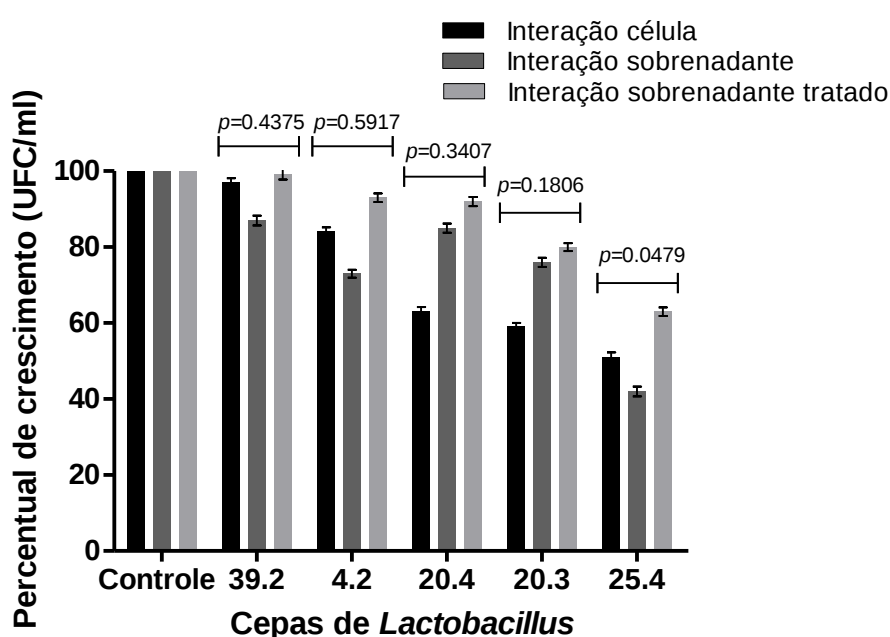
Figura 12 – Percentual de crescimento (UFC/mL) de *S. mutans* (SM) obtido no teste de formação de biofilme *in vitro* com adesão inicial de *S. mutans* com as cinco cepas de *Lactobacillus* (LB) selecionadas



Legenda: Controle (SM + solução fisiológica), interação célula (SM + LB), interação sobrenadante (SM + filtrado da cultura de LB) e interação sobrenadante tratado (SM + filtrado da cultura de LB com pH 6,5). O crescimento de *S. mutans* no grupo controle foi considerado como valor absoluto (100 %). Cada coluna representa a média de dois experimentos independentes. Teste ANOVA complementado com teste de Tukey, diferença estatística considerada significativa se $p \leq 0.05$.
Fonte: Elaborado pelo autor.

Os efeitos inibitórios das células de *Lactobacillus* ou do filtrado da cultura no teste de formação de biofilme sem adesão inicial de *S. mutans* foram menos significativos em comparação com o grupo de controle. A única cepa que apresentou efeito inibitório estatisticamente significativo foi a cepa *L. paracasei* 25.4 ($p = 0,0479$) (Figura 13).

Figura 13 – Percentual de crescimento (UFC/mL) de *S. mutans* (SM) obtido no teste de formação de biofilme *in vitro* sem adesão inicial de *S. mutans* com as cinco cepas de *Lactobacillus* (LB) selecionadas



Legenda: Controle (SM + solução fisiológica), interação célula (SM + LB), interação sobrenadante (SM + filtrado da cultura de LB) e interação sobrenadante tratado (SM + filtrado da cultura de LB com pH 6,5). O crescimento de *S. mutans* no grupo controle foi considerado como valor absoluto (100 %). Cada coluna representa a média de dois experimentos independentes. Teste ANOVA complementado com teste de Tukey, diferença estatística considerada significativa se $p \leq 0.05$.
Fonte: Elaborado pelo autor.

Foi monitorada cada alteração de pH em cada troca do meio de cultura durante a formação dos biofilmes (tempo de crescimento dos biofilmes 16 h 30 min, 40 h 30 min e 64 h 30 min h). O pH foi medido e a média para cada grupo experimental foi avaliada (Tabela 2). Pudemos observar que não houve nenhuma grande alteração nas médias de pH comparando-se os grupos experimentais e os

tempos de formação do biofilme, no entanto, em quase todos os grupos, o pH diminuiu de 7,2 (pH inicial do biofilme) para médias entre 4 e 5.

Tabela 2 – Média das alterações de pH durante os dois testes de formação de biofilme realizados com as cinco cepas de *Lactobacillus* selecionadas nos tempos de 16 h 30 min, 40 h 30 min e 64 h 30 min (pH inicial para todos os grupos experimentais = 7.2)

Cepa	Tempo do biofilme	Controle de <i>S. mutans</i>	Interação célula	Interação sobrenadante	Interação sobrenadante tratado	Controle <i>Lactobacillus</i>
4.2	16h30	5.03±0.05 ^A	5.06±0.10 ^A	5.07±0.17 ^A	5.11±0.15 ^A	6.41±0.27 ^B
	40h30	4.38±0.16 ^A	4.68±0.15 ^B	4.39±0.08 ^{AC}	4.45±0.13 ^{ABC}	5.10±0.07 ^D
	64h30	4.50±0.57 ^A	4.76±0.41 ^{AB}	4.49±0.16 ^A	4.55±0.16 ^A	5.36±0.17 ^B
20.3	16h30	4.92±0.15 ^A	4.10±0.27 ^B	4.79±0.21 ^A	5.09±0.18 ^A	4.20±0.09 ^{BC}
	40h30	4.42±0.25 ^A	5.11±0.21 ^B	4.48±0.17 ^A	4.58±0.19 ^A	5.41±0.23 ^{BC}
	64h30	4.56±0.26 ^A	4.90±0.42 ^A	4.62±0.20 ^A	4.62±0.11 ^A	5.86±0.39 ^B
20.4	16h30	5.04±0.30 ^A	4.13±0.28 ^B	4.97±0.17 ^A	5.24±0.11 ^A	4.22±0.12 ^{BC}
	40h30	4.41±0.15 ^A	5.25±0.33 ^B	4.51±0.18 ^A	4.59±0.32 ^A	5.42±0.26 ^{BC}
	64h30	4.52±0.49 ^A	5.03±0.11 ^A	4.51±0.32 ^A	4.62±0.25 ^A	4.90±0.68 ^A
25.4	16h30	5.00±0.24 ^A	5.34±0.19 ^A	5.08±0.09 ^A	5.11±0.23 ^A	5.38±0.17 ^A
	40h30	4.35±0.17 ^A	4.70±0.29 ^A	4.37±0.32 ^A	4.37±0.21 ^A	5.42±0.17 ^B
	64h30	4.56±0.21 ^A	4.79±0.35 ^{AB}	4.62±0.19 ^A	4.68±0.15 ^A	4.90±0.08 ^B
39.2	16h30	5.06±0.16 ^A	5.14±0.94 ^A	5.13±0.95 ^A	5.19±0.08 ^A	6.47±0.21 ^B
	40h30	4.39±0.13 ^A	4.62±0.19 ^A	4.41±0.06 ^A	4.40±0.27 ^A	5.13±0.17 ^B
	64h30	4.56±0.21 ^A	4.79±0.19 ^A	4.62±0.08 ^A	4.68±0.19 ^A	4.90±0.14 ^A

*Valores representam média ± desvio padrão dos dois testes de formação de biofilme realizados em dois experimentos independentes em quadruplicata. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p < 0.05$). Análise estatística realizada por meio do teste de variância ANOVA.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Em relação à contagem das células de *Lactobacillus* em ambos os experimentos de formação de biofilmes, observamos que não houve diferença comparando-se os grupos controles de *Lactobacillus* com os grupos interação célula. Houve diferença estatisticamente significativa apenas para a cepa 25.4 ($p = 0,0162$) (Tabela 3).

Tabela 3 – Médias e desvios padrão das contagens de UFC/mL de *Lactobacillus* ao final dos experimentos de formação do biofilme

<i>Lactobacillus</i> UFC/mL (Log10 – média e desvio padrão*)					
Cepa	Grupos Experimentais	Biofilme com adesão inicial de <i>S. mutans</i>	<i>p</i> value	Biofilme sem adesão inicial de <i>S. mutans</i>	<i>p</i> value
4.2	Controle	8.78±0.06	0.0834	8.63±0.24	0.9867
	Interação célula	8.40±0.13		8.64±0.20	
20.3	Controle	8.95±0.05	0.2750	8.60±0.11	0.4356
	Interação célula	8.78±0.13		8.47±0.12	
20.4	Controle	8.32±0.12	0.1333	8.60±0.19	0.7870
	Interação célula	8.05±0.91		8.66±0.10	
25.4	Controle	8.83±0.13*	0.0162*	8.96±0.08	0.4235
	Interação célula	8.28±0.10*		8.80±0.17	
39.2	Controle	8.63±0.10	0.1345	8.99±0.66	0.6710
	Interação célula	8.43±0.04		8.96±0.45	

*Valores representam média ± desvio padrão de dois experimentos independentes em quadruplicata (n = 8). * Diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p < 0.05$) determinada pelo teste *t*.

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.3 Efeitos de *Lactobacillus* sobre *S. mutans* e desenvolvimento de cárie dentária experimental em ratos

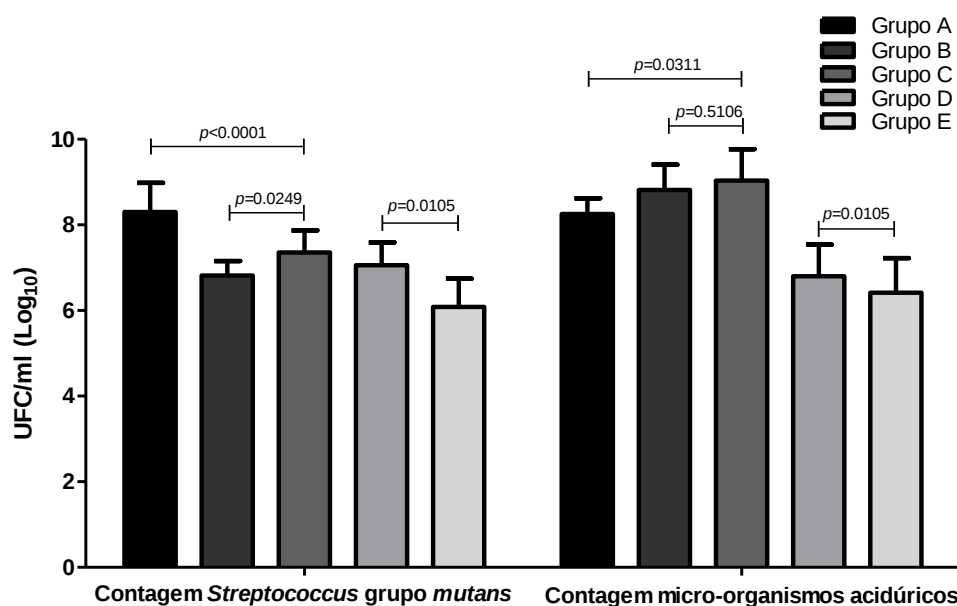
Streptococcus do grupo *mutans* e micro-organismos acidúricos foram recuperados da cavidade bucal de todos os animais antes do início dos experimentos. As coletas demonstraram que os animais tinham estreptococos e micro-organismos acidúricos uma vez que tratam-se de animais convencionais. No entanto, acompanhamos a infecção após as inoculações e pudemos observar que o número de colônias aumentou significativamente durante todo o período experimental.

No final do experimento os micro-organismos foram recuperados a partir dos biofilmes formados nas superfícies dentais. Foram feitas comparações entre os grupos que foram infectados apenas com *S. mutans*, ou apenas com *L. paracasei*

25.4, ou com *S. mutans* e *L. paracasei* 25.4, durante o período experimental (Grupos A, B e C, respectivamente) e entre os grupos que não foram infectados (Grupos D e E). Houve diferença estatística entre todos os grupos analisados exceto na contagem de micro-organismos acidúricos, comparando-se o grupo infectado apenas com *Lactobacillus* (Grupo B) e os infectados com *S. mutans* e *Lactobacillus* (Grupo C) (Figura 14).

Embora as recuperações de colônias do biofilme das mandíbulas dos animais tenham resultado em valores de UFC/mL consideráveis e pudemos observar, por meio da análise clínica, deposição de biofilme sobre as superfícies dos dentes dos animais não foi possível identificar cavidades de cárie significativas nos molares dos animais no exame duplo-cego.

Figura 14 – Contagem de colônias (UFC/mL) de estreptococos do grupo mutans e micro-organismos acidúricos recuperados dos biofilmes formados nas mandíbulas dos animais



Legenda: Grupo A (infecção por *S. mutans* + dieta cariogênica), Grupo B (infecção por *Lactobacillus* + dieta cariogênica), Grupo C (infecção por *S. mutans* + infecção por *Lactobacillus* + dieta cariogênica), Grupo D (controle da dieta, sem infecção + dieta cariogênica), Grupo E (controle negativo, sem infecção e sem dieta cariogênica). Teste ANOVA complementado com teste de Tukey foi realizado como análise estatística, diferença estatística considerada significativa se $p \leq 0.05$.

Fonte: Elaborado pelo autor.

A avaliação feita pelo equipamento de detecção de cárie DIAGNOdent indicou diversas áreas de desmineralização e perda mineral, porém nenhuma área de lesão cáriosa profunda foi detectada com o dispositivo. Observamos diferença estatística significativa apenas entre o grupo controle negativo (sem dieta e sem inoculações) com os grupos experimentais: A (inoculação de *S. mutans* + dieta cariogênica) e C (inoculação de *S. mutans* + *Lactobacillus* + dieta cariogênica). Entre os grupos tratados com dieta cariogênica, não houve diferença estatística (Tabela 4).

Tabela 4 – Mediana dos resultados obtidos ao final do teste *in vivo* por meio do dispositivo DIAGNOdent dos seis molares de cada animal, em maxila e mandíbula

Animais		Grupos experimentais				
		Grupo A	Grupo B	Grupo C	Grupo D	Grupo E
Maxila	1	4.33	1.66	6.83	1.5	1.66
	2	0	1.66	3.66	1.5	1.5
	3	3.5	5.16	4.16	3	0
	4	3.5	2.16	6.66	0	1.66
	5	2	4.83	3.0	4.5	0
	6	1.66	2.16	0	4.16	0
	7	9.83	4.16	7.16	7.16	1.66
	8	1.66	2.0	0	0	0
Mandíbula	1	1.66	1.5	5.66	5.0	7
	2	3.33	3.16	7.0	7.0	0
	3	3.33	3.16	0	1.66	0
	4	3.66	1.5	4.5	2.33	0
	5	1.5	0	7.33	8.5	3
	6	4.0	5.33	0	4.5	0
	7	3.66	5.66	1.5	2	1.66
	8	3.0	1.33	0	0	0
Mediana		3.330	2.160	3.910	2.665	0

Legenda: Não houve diferença estatística entre os grupos com dieta (Kruskal-Wallis).

Fonte: Elaborado pelo autor.

5 DISCUSSÃO

Streptococcus mutans, um dos fatores etiológicos da doença cárie, é um micro-organismo capaz de modular a sua virulência em condições ambientais específicas, por meio de adesão a superfícies sólidas, tornando-o capaz de colonizar a cavidade oral e de formar um complexo multidimensional, conhecido como biofilme bacteriano. Além disso, possui algumas propriedades adicionais que permitem a colonização da cavidade oral, como a capacidade de sobreviver em um meio ácido e a interação específica com outros micro-organismos que colonizam este ecossistema (Krzyściak et al., 2014).

Os micro-organismos do gênero *Lactobacillus* são comensais que colonizam a cavidade oral e já foram considerados o principal agente etiológico da doença cárie, devido a sua capacidade de produzir grande quantidade de ácido na presença de carboidratos e sobreviver em pH extremamente baixo (Jalasvuori et al., 2012). Entretanto, com o desenvolvimento e utilização de métodos quantitativos e de meios de cultura seletivos em estudos bacteriológicos do biofilme, atualmente, sabe-se que *Lactobacillus* não se acumula em grande quantidade no biofilme dental, estando mais associado com a progressão da cárie dentária do que na sua instalação (Chhour et al., 2005; Zhang Y et al., 2014; Caufield et al., 2015).

Por outro lado, agentes antibacterianos e pH baixos, tais como ácido láctico ou bacteriocinas produzidas por esses micro-organismos favorecem a inibição de micro-organismos que não se adaptam a tais condições ambientais. Graças a estas propriedades, algumas cepas específicas de *Lactobacillus* podem ser consideradas para uso como probióticos (Kang et al., 2011; Söderling et al., 2011; Jalasvuori et al., 2012).

O interesse em terapias probióticas de prevenção e controle das doenças orais tem crescido significativamente (Tanzer et al., 2010; Twetman, Keller, 2012; Yanine et al., 2013), e o uso de probióticos têm mostrado afetar a ecologia bucal de modo específico, impedindo a aderência de *Streptococcus mutans* (Simark-Mattsson et al., 2007), sem causar efeitos colaterais no consumo a longo prazo (Saavedra et al., 2004). Portanto, a ingestão de lactobacilos probióticos parece ser um método promissor para a prevenção de cáries dentárias (Cagetti et al., 2013).

Alguns estudos já apresentam resultados benéficos no uso de cepas de *Lactobacillus*, incorporadas em produtos alimentícios, contra micro-organismos cariogênicos e, portanto poderiam ajudar no controle da cárie dentária (Ahola et al., 2002; Simark-Mattsson et al., 2007; Haukioja, 2010; Hasslöf et al., 2010; Keller et al., 2011; Holgerson et al., 2013; Lin et al., 2015).

Foi pensando nessa possibilidade que o objetivo principal do presente estudo foi encontrar uma nova cepa de *Lactobacillus* que seja capaz de inibir *S. mutans*, podendo, posteriormente, ser utilizada para controle de infecções bucais, como por exemplo, a cárie dentária.

É possível que indivíduos que nunca sofreram de cárie dentária possuam na cavidade bucal cepas de *Lactobacillus* que favoreçam esse “cenário saudável” impedindo a progressão e o desenvolvimento da doença cárie (Simark-Mattsson et al., 2007; Belda-Ferre et al., 2012).

Para tanto, no presente estudo foi realizada uma triagem das trinta cepas clínicas de *Lactobacillus* previamente identificadas, avaliando a atividade antibacteriana em cultura planctônica *in vitro* dessas cepas, sobre a cepa padrão de *S. mutans* UA 159. Foram avaliados os efeitos diretos das células de *Lactobacillus* sobre *S. mutans* e também os efeitos anti-*S. mutans* do filtrado da cultura das cepas de *Lactobacillus* sem e com ajuste de pH. Para esses testes o filtrado foi preparado com o caldo MRS, por esse motivo, foi acrescentado o grupo controle de *S. mutans* com caldo MRS, para avaliar a possível interferência do meio na inibição dos filtrados.

Os resultados do teste de atividade antibacteriana nos permitiu selecionar as cepas que apresentaram melhores atividades inibitórias sobre *S. mutans*. As cinco cepas selecionadas foram: *L. paracasei* 4.2, *L. paracasei* 20.3, *L. fermentum* 20.4, *L. paracasei* 25.4 e *L. paracasei* 39.2.

Observamos que houve redução na contagem de UFC / mL de *S. mutans* ao interagir diretamente com as células de *Lactobacillus*, bem como na interação com o filtrado sem ajuste do pH para a maioria das cepas testadas. Para o filtrado que teve o pH ajustado para 6.5, a maioria das cepas não apresentou efeito inibitório. Pode-se considerar, frente a esse resultado, que componentes produzidos por

Lactobacillus possivelmente capazes de inibir espécies competidoras e presentes no filtrado da cultura, possam ser mais ativos em meio ácido.

A literatura tem mostrado que nas interações entre *S. mutans* e *Lactobacillus* o ambiente ácido favorecido pelas cepas de *Lactobacillus* pode ter um efeito inibitório sobre as células de *S. mutans*.

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*.

Keller et al. (2011) estudaram a capacidade *in vitro* de cepas probióticas de *Lactobacillus* em inibirem o crescimento de *S. mutans* isolados da cavidade oral. Todas as cepas de *Lactobacillus* testadas apresentaram capacidade de coagregação com as cepas de *S. mutans*. Os lactobacilos inibiram o crescimento de *S. mutans*, mas a capacidade variou entre as cepas com relação ao pH. Quanto maior o pH, menor foi a inibição encontrada. A inibição do crescimento também foi dependente da concentração de células, alcançando inibição total de *S. mutans* na concentração de 10^7 células / mL de *Lactobacillus*.

Em 2015, Lin et al. também testaram os filtrados da cultura das cepas de *Lactobacillus* sobre *S. mutans* com pH ajustado a 6.5, e sem ajuste de pH, observando que os filtrados de todas as cepas apresentaram efeitos inibitórios, enquanto apenas os filtrados com pH ajustado a 6.5 de duas cepas foram capazes de inibir o crescimento de *S. mutans*.

Para o teste de formação de biofilme foram utilizadas as cinco cepas de *Lactobacillus* que apresentaram melhores efeitos inibitórios contra *S. mutans* no teste de atividade antibacteriana em cultura planctônica. Os discos de hidroxiapatita usados para este ensaio foram posicionados em suportes que permitiram a formação de biofilme por forças de adesão, e não apenas por força da gravidade, como aconteceria num biofilme formado em fundo de placa. Foram avaliados os efeitos das cepas de *Lactobacillus* antes e depois da formação inicial do biofilme por *S. mutans*. O período de 64 h 30 min de formação de biofilme também nos permitiu simular os estágios iniciais da formação desse biofilme e acompanhar as alterações de pH.

Na análise dos resultados, verificou-se que as 5 cepas testadas tiveram efeito inibitório maior contra *S. mutans* quando o biofilme já estava formado por este micro-organismo e as células de *Lactobacillus* ou os filtrados da cultura foram adicionados mais tarde. A menor eficiência na inibição de *S. mutans* quando os lactobacilos foram acrescentados antes da formação inicial de biofilme por *S. mutans* pode ser explicado pelo fato de que *Lactobacillus* têm pouca capacidade para interagir com componentes salivares adsorvidos na película adquirida, e, portanto, teriam menor capacidade de aderência aos discos de hidroxiapatita, reduzindo o seu efeito sobre *S. mutans*.

Bem como no teste em cultura planctônica, na análise das contagens de UFC / mL dos biofilmes, as células de *Lactobacillus* foram mais efetivas em inibir *S. mutans*, seguido pelo sobrenadante não tratado. O sobrenadante tratado não teve nenhum efeito inibitório significativo sobre as células de *S. mutans*. Durante a formação e desenvolvimento dos biofilmes as mudanças de pH entre alguns grupos experimentais diferiram significativamente, mas, apesar das diferenças estatísticas, os valores de pH obtidos foram muito semelhantes entre os grupos. Não obstante, o ajuste do pH para 6,5 pode ter influenciado a atividade de alguma substância secretada por *Lactobacillus*, que perdeu o seu efeito inibitório em ambiente próximo do neutro.

Sabe-se que algumas cepas de *Lactobacillus* são capazes de produzir compostos antimicrobianos, tais como enzimas bacteriolíticas, bacteriocinas e biosurfactantes que são capazes de inibir outros micro-organismos. Como exemplos de bacteriocinas produzidas por lactobacilos e recentemente estudadas podemos citar, gasserin produzida por *L. gasseri* EV1461 (Maldonado-Barragán et al., 2016), fermecin produzida por *L. fermentum* SD11 (Wannun et al., 2016) e 1,7 Paracin produzida por *L. paracasei* HD1-7 (Ge et al., 2016).

Uma variedade destes compostos produzidos por bactérias ou fungos têm estruturas químicas diferentes e funções singulares podendo alterar as condições físicas e químicas do ambiente circundante (Walencka et al., 2008). No entanto fatores físico-químicos, tais como: pH, temperatura e arejamento, pode ter um efeito dramático sobre a produção de bacteriocinas (Parente, Ricciardi, 1994), assim, fatores físico-químicos também, de certa forma, poderiam influenciar a atividade destes compostos, o que pode ter ocorrido neste estudo quando o pH do

sobrenadante da cultura de *Lactobacillus* foi ajustado para 6,5, os efeitos inibitórios contra *S. mutans* foi diminuído.

Apesar das limitações normais de estudos realizados *in vitro*, no presente estudo, os resultados significativos nos permitiram selecionar a cepa de *Lactobacillus paracasei* 25.4, que mostrou atividade inibidora mais elevada sobre *S. mutans* em comparação com as outras cepas em ambos os testes de formação de biofilme, para os testes *in vivo*.

Para o estudo *in vivo* foi induzida cárie dentária por meio de dieta cariogênica, rica em sacarose, e consecutivas inoculações dos micro-organismos estudados. Durante o período experimental foram realizadas coletas de micro-organismos da cavidade bucal dos animais para o acompanhamento da infecção e ao final do experimento foi avaliada a formação do biofilme cariogênico pela recuperação dos micro-organismos dos biofilmes aderidos às superfícies dentárias. Também foi realizada uma análise clínica “duplo-cego” e análises por meio do aparelho DIAGNOdent para detectar regiões de desmineralização e perda mineral.

Como resultado da recuperação dos micro-organismos durante o período experimental foi observado que a infecção se manteve ao longo de todo o experimento. Na análise de UFC / mL do biofilme aderido às superfícies dentárias dos animais pudemos observar que houve uma redução estatisticamente significativa das contagens de *S. mutans* no grupo que foi submetido à infecção por *S. mutans* e *Lactobacillus* em comparação com o grupo em que foi inoculado apenas com *S. mutans*.

Seguindo outra metodologia, Schwendicke et al. (2014) estudaram os efeitos cariogênicos da cepa probiótica de *L. rhamnosus* GG em modelo *in vitro* de biofilme dentário. Foram formados biofilmes com três diferentes composições: biofilme monoespécie de *L. rhamnosus*, biofilme monoespécie de *S. mutans* e biofilme multiespécie de *L. rhamnosus* e *S. mutans*. Os biofilmes foram formados sobre a superfície de dentes bovinos em modelo de cultura contínua por 10 dias e os resultados foram analisados pela perda mineral dos tecidos dentários e pela contagem bacteriana. Os biofilmes multiespécies de *L. rhamnosus* e *S. mutans* causaram perda mineral significativa em relação ao biofilme de *L. rhamnosus* e biofilme de *S. mutans*. Diferente dos resultados do nosso presente estudo, Schwendicke et al., observaram que em relação à contagem bacteriana, não foram

encontradas diferenças estatisticamente significantes entre os diferentes grupos de biofilmes. Os autores concluíram que a cepa de *L. rhamnosus* GG não teve efeito inibitório sobre *S. mutans* e contribuiu para o processo de cárie *in vitro*.

No estudo com o equipamento de detecção de lesões de cárie e perda mineral, DIAGNOdent, foram constatadas diversas áreas de desmineralização e perda mineral. Assim como no estudo duplo-cego, foi também observado a ausência de lesões cariosas profundas. Quanto às desmineralizações e perda mineral, ainda pudemos observar que houve diferença estatística significativa entre o grupo controle negativo (sem dieta e sem inoculações) com os grupos experimentais: A (inoculação de *S. mutans* + dieta cariogênica) e C (inoculação de *S. mutans* + *Lactobacillus* + dieta cariogênica), demonstrando a capacidade de desmineralização proporcionada pela dieta cariogênica.

Falsetta et al., (2014) estudaram *in vivo* a interação entre *S. mutans* e *Candida albicans* em biofilmes dentários. Para isto, os autores utilizaram a mesma cepa de *S. mutans* UA 159, deste presente estudo. Na análise clínica, os autores foram capazes de observar várias áreas de lesões de cárie, mas apenas no grupo co-infectado com *S. mutans* e *C. albicans*. No grupo infectado apenas com *S. mutans*, os autores detectaram grandes áreas de lesões iniciais de cárie, embora estas fossem visivelmente menos graves do que aquelas dos animais co-infectados. Neste caso, os autores sugerem que o desenvolvimento de cáries de superfície lisa é altamente dependente da formação de enzimas glucosiltransferases (*Gtf*) derivados de polissacarídeos extracelulares (EPS) que facilitam a adesão de *S. mutans* (e outros micro-organismos) modulando a formação de biofilme cariogênico *in vivo*, apesar de sulcos das superfícies dentárias proporcionarem sítios de adesão naturais, e a retenção de microrganismos não ser dependente de EPS.

Mattos-Graner et al. (2000) analisaram a síntese de glucanos insolúveis por *S. mutans* e correlacionaram com a incidência de cárie em crianças de 12 a 30 meses de idade e analisando os dados sugeriram que a capacidade da glicosiltransferase estreptocócica para sintetizar glucanos insolúveis a partir da sacarose é um importante fator de virulência no desenvolvimento inicial de cárie, aumentando a capacidade de colonização e infectividade de *S. mutans* e influenciando as características de difusão do biofilme dentário em crianças infectadas.

Neste caso, poderíamos acreditar que, possivelmente, o período de indução de cárie dentária na metodologia utilizada no presente estudo não foi suficiente para formação de lesões cariosas profundas, ou que a cepa de *S. mutans* UA159 utilizada não foi capaz de produzir *Gtf* derivados de EPS suficiente para orquestrar a formação de biofilme cariogênico. Podemos também acreditar na hipótese de que a produção de subprodutos ácidos do metabolismo do açúcar (neste caso, da sacarose) não foi suficiente para promover a grave dissolução do esmalte dentário que levaria ao aparecimento clínico da cavitação, no presente estudo, foi apenas capaz de levar ao desenvolvimento de áreas iniciais de perda mineral.

Outro ponto é que as interações entre micro-organismos que colonizam a cavidade bucal são os principais fatores que afetam o desenvolvimento do biofilme (Wen et al., 2010; Ogawa et al., 2011; Redanz et al., 2011), essas interações podem resultar tanto na aceleração quanto na inibição deste processo. Assim, a virulência de *S. mutans* pode ser determinada não só pelas condições ambientais da cavidade oral, mas também pela composição da microbiota bacteriana (Krzyściak et al., 2014), e os animais utilizados no presente estudo tratavam-se de animais convencionais, com microbiota residente que pode ter interferido no desenvolvimento das lesões cariosas.

Em estudo recente, com proposta semelhante à deste estudo, Teraí et al. (2015) examinaram 896 isolados clínicos, sendo selecionadas 14 cepas de *Lactobacillus* e 36 de estreptococos, quanto aos seus potenciais efeitos benéficos à saúde bucal. Avaliando a produção de compostos voláteis de enxofre ou glucanos insolúveis em água, assim como suas atividades antibacterianas contra bactérias periodontais, adesão às células epiteliais, risco de cariogenicidade e endocardite infecciosa, em estes *in vitro* e *in vivo* os autores foram capazes de selecionar as cepas: *Lactobacillus crispatus* YIT 12319, *Lactobacillus fermentum* YIT 12320, *Lactobacillus gasseri* YIT 12321 e *Streptococcus mitis* YIT 12322 como novos probióticos com potenciais benefícios para a saúde oral, e nenhum efeito adverso sobre a saúde em geral.

Por esse motivo, deve-se considerar que dentro da proposta do presente estudo foi possível selecionar cepas de *L. paracasei* e *L. fermentum* com potencial efeito inibitório sobre o micro-organismo cariogênico *S. mutans*, e novos estudos com essas cepas devem ser considerados para compreender em detalhes seus

mecanismos de ação, seus benefícios para a saúde bucal e a possibilidade de desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

Apesar das limitações deste estudo, podemos concluir que as cepas de *Lactobacillus* estudadas levaram a uma redução do número de UFC / mL de *S. mutans* no estudo *in vitro*, destacando-se as cepas *L. fermentum* (20.4) e *L. paracasei* (4.2, 20.3, 25.4 e 39.2). Enfatizando ainda, a cepa de *L. paracasei* 25.4 que demonstrou capacidade inibitória de estreptococos do grupo mutans presentes na cavidade bucal dos animais no estudo *in vivo*. Essas cepas isoladas apresentam potencial para serem usadas como probióticos na cavidade bucal, no controle da cárie dentária, porque possuem atividade inibitória sobre *S. mutans* e diminuem a formação de biofilme por esse micro-organismo cariogênico.

6 CONCLUSÃO

Diante dos resultados apresentados, concluiu-se que:

- a) tanto no teste da atividade antibacteriana em crescimento planctônico quanto nos testes de biofilmes formados em discos de hidroxiapatita, a maioria das cepas clínicas de *Lactobacillus* spp. foi capaz de reduzir o número de *S. mutans*;
- b) a redução de *S. mutans* observada foi maior quando esses micro-organismos interagiram diretamente com as células de *Lactobacillus* spp. do que quando interagiram com os filtrados da cultura de *Lactobacillus* spp.;
- c) o aumento do pH (ajuste para 6,5) levou a uma diminuição da atividade inibitória de *Lactobacillus* spp. sobre *S. mutans*, sugerindo uma possível ação do ambiente ácido na atividade de metabólitos secretados por *Lactobacillus*;
- d) as cinco cepas de *Lactobacillus* estudadas em biofilme (*L. fermentum* 20.4 e *L. paracasei* 4.2, 20.3, 25.4 e 39.2) tiveram atividade inibitória maior quando inoculadas após a formação inicial do biofilme por *S. mutans*;
- e) a cepa de *Lactobacillus paracasei* 25.4 foi capaz de diminuir a colonização de estreptococos do grupo mutans na cavidade bucal dos animais e não apresentou efeitos cariogênicos;
- f) *L. fermentum* 20.4 e *L. paracasei* 4.2, 20.3, 25.4 e 39.2 apresentam potencial para serem usadas como probióticos na cavidade bucal, porque possuem atividade inibitória sobre *S. mutans* e diminuem a formação de biofilme por esse micro-organismo cariogênico.

REFERÊNCIAS*

- Ahola AJ, Yli-Knnuuttila H, Suomalainen T, Poussa T, Ahlström A, Meurman JH, et al. Short-term consumption of probiotic-containing cheese and its effect on dental caries risk factors. *Arch Oral Biol.* 2002 Nov;47(11):799-804. PMID: 12446187
- Amara AA, Shibl A. Role of probiotics in health improvement, infection control and disease treatment and management. *Saudi Pharm J.* 2015 Apr;23(2):107-14. doi:10.1016/j.jsps.2013.07.001.
- Auclair J, Frappier M, Millette M. *Lactobacillus acidophilus* CL1285, *Lactobacillus casei* LBC80R and *Lactobacillus rhamnosus* CLR2 (Bio-K+): Characterization, manufacture, mechanisms of action and quality control of a specific probiotic combination for primary prevention of *Clostridium difficile* infection. *Clin Infect Dis.* 2015 May;60(Suppl 2):S135-43. doi: 10.1093/cid/civ179.
- Baptista A. Efeito da terapia fotodinâmica na doença cárie. Estudo in vivo [dissertação]. São Paulo (SP): Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, Universidade de São Paulo-USP; 2009.
- 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 Jan;6(1):46-56. doi: 10.1038/ismej.2011.85. Epub 2011 Jun 30.
- Cagetti MG, Mastroberardino S, Milia E, Cocco F, Lingström P, Campus G. The use of probiotic strains in caries prevention: a systematic review. *Nutrients.* 2013 Jul;5(7):2530-50. doi: 10.3390/nu5072530.
- 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.
- Cebeci A, Gürakan GC. Molecular methods for identification of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophiles* using methionine biosynthesis and 16S rRNA genes. *J Dairy Res.* 2008 Nov;75(4):392-8. doi: 10.1017/S0022029908003543. Epub 2008 Jul 14.
- Cheon K, Moser SA, Wiener HW, Whiddon J, Momeni SS, Ruby JD, et al. Characteristics of *Streptococcus mutans* genotypes and dental caries in children. *Eur J Oral Sci.* 2013 Jun;121(3 Pt 1):148-55. doi: 10.1111/eos.12044. Epub 2013 Apr 19.
- 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.
- Chung J, Ha ES, Park HR, Kim S. Isolation and characterization of *Lactobacillus* species inhibiting the formation of *Streptococcus mutans* biofilm. *Oral Microbiol Immunol.* 2004 Jun;19(3):214-6. PMID: 15107076.

Corby PM, Lyons-Weiler J, Bretz WA, Hart TC, Aas JA, Boumenna T, et al. Microbial risk indicators of early childhood caries. *J Clin Microbiol*. 2005 Nov;43(11):5753-9. PMID: 16272513.

Falsetta MI, 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*. *Infect Immun*. 2014 May;82(5):1968-81. doi: 10.1128/IAI.00087-14. Epub 2014 Feb 24.

Ge J, Sun Y, Xin X, Wang Y, Ping W. Purification and partial characterization of a novel bacteriocin synthesized by *Lactobacillus paracasei* HD1-7 isolated from chinese sauerkraut juice. *Sci Rep*. 2016 Jan;6:19366. doi: 10.1038/srep19366.

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;10:18. doi: 10.1186/1472-6831-10-18.

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

He X, Lux R, Kuramitsu HK, Anderson MH, Shi W. Achieving probiotic effects via modulating oral microbial ecology. *Adv Dent Res*. 2009;21(1):53-6. doi: 10.1177/0895937409335626. Epub 2009 Jul 31.

Holgersen 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.

Jalasvuori H, Haukioja A, Tenovu 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):1633-38. doi: 10.1016/j.archoralbio.2012.07.014. Epub 2012 Sep 23.

Kang MS, Oh JS, Lee HC, Lim HS, Lee SW, Yang KH, et al. Inhibitory effect of *Lactobacillus reuteri* on periodontopathic and cariogenic bacteria. *J Microbiol*. 2011 Apr;49(2):193-9. doi: 10.1007/s12275-011-0252-9. Epub 2011 May 3.

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.

Keyes PH. The infectious and transmissible nature of experimental dental caries. Findings and implications. *Arch Oral Biol*. 1960 Mar;1:304-20. PMID: 14408737.

Koo H, Duarte S, Murata RM, Scott-Anne K, Gregoire S, Watson GE, et al. 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(2):116-26. doi: 10.1159/000296306. Epub 2010 Mar 16.

Krzyściak W, Jurczak A, Kościelniak D, Bystrowska B, Skalniak A. The virulence of *Streptococcus mutans* and the ability to form biofilms. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2014 Apr;33(4):499-515. doi: 10.1007/s10096-013-1993-7. Epub 2013 Oct 24.

Lee SH, Kim YJ. A comparative of efficiency the effect of probiotics on cariogenic biofilm model for preventing dental caries. Arch Microbiol. 2014;196(8):601-9. doi: 10.1007/s00203-014-0998-7. Epub 2014 Jun 12.

Li Y, Ku CY, Xu J, Saxena D, Caufield PW. Survey of oral microbial diversity using PCR-based denaturing gradient gel electrophoresis. J Dent Res. 2005 Jun;84(6):559-64. PMID: 15914595.

Lima JEO. Cárie dentária: um novo conceito. Rev Dent Press Ortodon Ortop Facil. 2007 Nov-Dez;12(6):119-30. doi: 10.1590/S1415-54192007000600012.

Lin XL, 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.

Loesche WJ. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. Microbiol Rev. 1986 Dec;50(4):353-80. PMID: 3540569.

Loesche WJ, Socransky SS, Gibbons RJJ. Bacteroides oralis proposed new species isolated from the oral cavity of man. J Bacteriol. 1964 Nov;88:1329-37. PMID: 14234789.

Maldonado-Barragán A, Caballero-Guerrero B, Martín V, Ruiz-Barba JL, Rodríguez JM. Purification and genetic characterization of gassericin E, a novel co-culture inducible bacteriocin from *Lactobacillus gasseri* EV1461 isolated from the vagina of a healthy woman. BMC Microbiol. 2016 Mar;16(1):37. doi: 10.1186/s12866-016-0663-1.

Martinen AM, Haukioja AL, Karjalainen S, Nylund L, Satokari R, Ohman C, et al. Short-term consumption of probiotic lactobacilli has no effect on acid production of supragingival plaque. Clin Oral Investig. 2012 Jun;16(3):797-803. doi: 10.1007/s00784-011-0584-1. Epub 2011 Jul 6.

Matsumoto M, Tsuji M, Sasaki H, Fujita K, Nomura R, Nakano K, et al. Cariogenicity of the probiotic bacterium *Lactobacillus salivarius* in rats. Caries Res. 2005 Nov-Dec;39(6):479-83. PMID: 16251792.

Mattos-Graner RO, Smith DJ, King WF, Mayer MP. Water-insoluble glucan synthesis by mutans streptococcal strains correlates with caries incidence in 12- to 30-month-old children. J Dent Res. 2000 Jun;79(6):1371-7. PMID: 10890715.

McLeod A, Nyquist OL, Snipen L, Naterstad K, Axelsson L. Diversity of *Lactobacillus sakei* strains investigated by phenotypic and genotypic methods. Syst Appl Microbiol. 2008 Oct;31(5):393-403. doi: 10.1016/j.syapm.2008.06.002. Epub 2008 Aug 3.

Müller KP, Rodrigues CR, Núñez SC, Rocha R, Jorge AO, Ribeiro MS. Effects of low power red laser on induced-dental caries in rats. Arch Oral Biol. 2007 Jul;52(7):648-54. Epub 2007 Feb 12. PMID: 17292847.

Newbrun E. Cariology. 2. ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1983.

Nigatu A. Evaluation of numerical analyses of RAPD and API 50CHL patterns to differentiate *Lactobacillus plantarum*, *L. fermentum*, *L. rhamnosus*, *L. sake*, *L. paracucheri*, *L. gallinarum*, *L. casei*, *Weissella minor* and related taxa isolated from kocho and tef. J Appl Microbiol. 2000 Dec;89(6):969-78. PMID: 11123470.

Ogawa A, Furukawa S, Fujita S, Mitobe J, Kawarai T, Narisawa N, et al. Inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm formation by *Streptococcus salivarius* FruA. Appl Environ Microbiol. 2011 Mar;77(5):1572-80. doi: 10.1128/AEM.02066-10. Epub 2011 Jan 14.

Palombo EA. Traditional medicinal plant extracts and natural products with activity against oral bacteria: potential application in the prevention and treatment of oral diseases. Evid Based Complement and Alternat Med. 2011;2011:680354. doi: 10.1093/ecam/nep067. Epub 2011 Jan 12.

Parente E, Ricciardi A. Influence of pH on the production of enterocin 1146 during batch fermentation. Lett Appl Microbiol. 1994 Jul;19(1):12-5.

Peters BM, Jabra-Rizk MA, O'May GA, Costerton JW, Shirtliff ME. Polymicrobial interactions: impact on pathogenesis and human disease. Clin Microbiol Rev. 2012 Jan;25(1):193-213. doi: 10.1128/CMR.00013-11.

Petersen PE. Challenges to improvement of oral health in the 21st century – the approach of the WHO Global Oral Health Programme. Int Dent J. 2004 Dec;54(6 Suppl 1):329-43. PMID: 15631094.

Randhawa S, Brashears MM, McMahon KW, Fokar M, Karunasena E. Comparison of phenotypic and genotypic methods used for the species identification of *Lactobacillus* NP51 and development of a strain-specific PCR assay. Probiotics Antimicrob Proteins. 2010 Dec;2(4):274-83. doi: 10.1007/s12602-010-9057-0.

Redanz S, Standar K, Podbielski A, Kreikemeyer B. A five-species transcriptome array for oral mixed-biofilm studies. PLoS One. 2011;6(12):e27827. doi: 10.1371/journal.pone.0027827. Epub 2011 Dec 14.

Reddy JJ, Sampathkumar N, Aradhya S. Probiotics in dentistry: review of the current status. Rev Clin Pesq Odontol. 2010 Set-Dez;6(3):261-71.

Ricomini-Filho AP. Avaliação de biofilmes multiespécies formados em diferentes substratos e expostos a concentrações salivares de agentes antimicrobianos [tese]. Piracicaba (SP): Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas-UNICAMP; 2013.

Rupa P, Mine Y. Recent advances in the role of probiotics in human inflammation and gut health. *J Agric Food Chem*. 2012 Aug;60(34):8249-56. doi: 10.1021/jf301903t. Epub 2012 Aug 16.

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.

Schwendicke F, Dörfer C, Kneist S, Meyer-Lueckel H, Paris S. Cariogenic effects of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG in a dental biofilm model. *Caries Res*. 2014;48(3):186-92. doi: 10.1159/000355907. Epub 2014 Jan 29.

Selwitz RH, Ismail AI, Pitts NB. Dental caries. *Lancet*. 2007 Jan;369(9555):51-9. PMID: 17208642.

Shanmugam KT, Masthan KMK, Balachander N, Sudha J, Sarangarajan R. Dental caries vaccine – a possible option? *J Clin Diagn Res*. 2013 Jun;7(6):1250-3. doi: 10.7860/JCDR/2013/5246.3053. Epub 2013 Apr 11.

Shen S, Samaranayake LP, Yip HK. *In vitro* growth, acidogenicity and cariogenicity of predominant human root caries flora. *J Dent*. 2004 Nov;32(8):667-78. PMID: 15476962.

Simark-Mattsson C, Emilson C-G, 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 Aug;115(4):308-14. PMID: 17697171.

Simón-Soro A, Mira A. Solving the etiology of dental caries. *Trends Microbiol*. 2015 Feb;23(2):76-82. doi: 10.1016/j.tim.2014.10.010. Epub 2014 Nov 27.

Söderling EM, Marttinen AM, Haukioja AL. Probiotic *Lactobacilli* interfere with *Streptococcus mutans* biofilm formation *in vitro*. *Curr Microbiol*. 2011 Feb;62(2):618-22. doi: 10.1007/s00284-010-9752-9. Epub 2010 Sep 11.

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.

Tao R, Tong Z, Lin Y, Xue Y, Wang W, Kuang R, et al. Antimicrobial and antibiofilm activity of pleurocidin against cariogenic microorganisms. *Peptides*. 2011 Aug;32(8):1748-54. doi: 10.1016/j.peptides.2011.06.008. Epub 2011 Jun 15.

Terai T, Okumura T, Imai S, Nakao M, Yamaji K, Ito M, et al. Screening of probiotic candidates in human oral bacteria for the prevention of dental disease. PLoS One. 2015 Jun;10(6):e0128657. doi: 10.1371/journal.pone.0128657. eCollection 2015.

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

Walencka E, Rózalska S, Sadowska B, Rózalska B. The influence of *Lactobacillus acidophilus* derived surfactants on staphylococcal adhesion and biofilm formation. Folia Microbiol (Praha). 2008;53(1):61-6. doi: 10.1007/s12223-008-0009-y. Epub 2008 May 15.

Wannun P, Piwat S, Teanpaisan R. Purification, characterization and optimum conditions of fermecin SD11, a bacteriocin produced by human orally *Lactobacillus fermentum* SD11. Appl Biochem Biotechnol. 2016 Feb 18. [Epub ahead of print]. PMID: 26892008.

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;10:111. doi: 10.1186/1471-2180-10-111.

Wu CC, Lin CT, Wu CY, Peng WS, Lee MJ, Tsai YC. Inhibitory effect of *Lactobacillus salivarius* on *Streptococcus mutans* biofilm formation. Mol Oral Microbiol. 2015 Feb;30(1):16-26. doi: 10.1111/omi.12063. Epub 2014 Sep 8.

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 S. Dental caries and vaccination strategy against the major cariogenic pathogen, *Streptococcus mutans*. Curr Pharm Biotechnol. 2013;14(11):960-6. PMID: 24372246.

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.

ANEXO A – Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa com Humanos

INSTITUTO DE CIÊNCIA E
TECNOLOGIA CAMPUS SÃO
JOSÉ DOS CAMPOS - UNESP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: EFEITOS DE *Lactobacillus* spp. ISOLADOS DA CAVIDADE BUCAL DE INDIVÍDUOS LIVRES DE CÁRIES SOBRE *Streptococcus mutans*: estudo da ação probiótica

Pesquisador: Marisol dos Santos Velloso

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 34255314.2.0000.0077

Instituição Proponente: Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos - UNESP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 754.634

Data da Relatoria: 15/08/2014

Apresentação do Projeto:

A ideia de usar micro-organismos da microbiota residente para inibir o desenvolvimento de bactérias patogênicas foi proposta há mais de um século e hoje auxilia no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para as infecções. Estudos prévios demonstraram que cepas probióticas de *Lactobacillus* podem inibir *Streptococcus mutans*, entretanto os efeitos de *Lactobacillus* sobre a formação do biofilme e desenvolvimento de cárie

precisam ser investigados. O objetivo deste estudo será avaliar o efeito de cepas do gênero *Lactobacillus* isoladas de indivíduos livres de cárie sobre

S. mutans utilizando modelos de estudo in vitro e in vivo. No estudo in vitro, 30 cepas de *Lactobacillus* isoladas da cavidade bucal de indivíduos livres de cáries serão avaliadas quanto à atividade antibacteriana contra *S. mutans* em crescimento planctônico. A seguir, 10 cepas que apresentarem maior atividade antibacteriana serão selecionadas para o estudo dos efeitos antimicrobianos sobre biofilmes de *S. mutans* formados

em discos de hidroxiapatita. Em todos esses testes, além dos efeitos das cepas de *Lactobacillus* sobre *S. mutans*, serão avaliados também os

efeitos do filtrado da cultura de *Lactobacillus* sobre *S. mutans*, verificando os efeitos inibitórios relacionados ao ambiente ácido e substâncias antimicrobianas secretadas por *Lactobacillus*. Para

Endereço: Av. Engº Francisco José Longo 777

Bairro: Jardim São Dimas

CEP: 12.245-000

UF: SP

Município: SÃO JOSÉ DOS CAMPOS

Telefone: (12)3947-9078

Fax: (12)3947-9010

E-mail: ceph@fosjc.unesp.br

INSTITUTO DE CIÊNCIA E
TECNOLOGIA CAMPUS SÃO
JOSÉ DOS CAMPOS - UNESP



Continuação do Parecer: 754.634

estudo in vivo, será selecionada uma cepa de *Lactobacillus* com maior efeito inibitório sobre biofilme de *S. mutans*, para avaliar seus efeitos no desenvolvimento de cárie experimental em ratos. Após a infecção por *S. mutans* e *Lactobacillus* na cavidade bucal de ratos, serão realizadas coletas de amostras do biofilme dentário para contagem de UFC/mL e análises da maxila e mandíbula em estereomicroscópio para quantificação de lesões de cárie oclusal e de superfície lisa. Os resultados serão submetidos a uma análise exploratória para a seleção do teste estatístico mais adequado para cada experimento desse estudo.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar o efeito de cepas do gênero *Lactobacillus* isoladas de indivíduos livres de cárie sobre *S. mutans* em modelos de estudos in vitro e in vivo.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Nenhum, pois as cepas que serão utilizadas já foram isoladas e identificadas.

Benefícios:

Identificar espécies de *Lactobacillus* com ação probiótica sobre *Streptococcus mutans*

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Para elaborar a pesquisa a pesquisadora irá utilizar cepas de *Lactobacillus* já isoladas da cavidade bucal de indivíduos livres de cárie e identificadas por métodos bioquímicos (sistema API 50 CHL) e PCR (reação em cadeia da polimerase) no projeto de doutorado do aluno Rodnei Dennis Rossoni que estão sendo mantidas em freezer a menos 80°C no Instituto de Ciência e Tecnologia da UNESP/SJC. Neste caso não há nenhuma intervenção em seres humanos.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foi apresentado declaração da autorização de utilização das cepas pela pesquisadora.

Recomendações:

Nd

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Nd

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Endereço: Av. Engº Francisco José Longo 777

Bairro: Jardim São Dimas

CEP: 12.245-000

UF: SP

Município: SAO JOSE DOS CAMPOS

Telefone: (12)3947-9078

Fax: (12)3947-9010

E-mail: ceph@fosjc.unesp.br

INSTITUTO DE CIÊNCIA E
TECNOLOGIA CAMPUS SÃO
JOSÉ DOS CAMPOS - UNESP



Continuação do Parecer: 754.634

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O Colegiado concorda com parecer da relatora.

SAO JOSE DOS CAMPOS, 18 de Agosto de 2014

Assinado por:
JANETE DIAS ALMEIDA
(Coordenador)

Endereço: Av. Engº Francisco José Longo 777

Bairro: Jardim São Dimas

CEP: 12.245-000

UF: SP

Município: SAO JOSE DOS CAMPOS

Telefone: (12)3947-9078

Fax: (12)3947-9010

E-mail: ceph@fosjc.unesp.br

ANEXO B – Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa com Animais

  **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**
CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA
Av. Eng. Francisco José Longo, 777 – Jd. São Dimas
CEP 12201-970 – F. (12) 3947-9028
Fax (12) 3947-9010 / tango@fosjc.unesp.br



CERTIFICADO
CEUA - Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICAMOS, que o protocolo nº 09/2014-PA/CEP, sobre **“Efeitos de Lactobacillus spp. isolados da cavidade bucal de indivíduos livres de cáries sobre Streptococcus mutans: Estudo da ação probiótica”**, sob a responsabilidade de **MARISOL DOS SANTOS VELLOSO**, colaborador **Rodnei Dennis Rossoni**, tendo como orientadora a Profa. Dra. Juliana Campos Junqueira, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotado pelo Conselho Nacional de Experimentação Animal – CONCEA e Lei Arouca nº 11.794 de 08/10/2008 e foi aprovado por esta CEUA.

São José dos Campos, 15 de agosto de 2014.


Prof. Assist. Dr. RUBENS NISIE TANGO
Coordenador

Obs:- Para este trabalho serão utilizados 32(trinta e dois) ratos machos Wistar Rattus norvegicus albinus