

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

MARIA EDUARDA LISBOA PAGNUSSATTI

**Microbiota da cavidade bucal associada à saúde e à cárie dentária:
uma revisão sistemática da literatura e análise *in silico* de estudos
clínicos**

Porto Alegre – Rio Grande do Sul
2024

Maria Eduarda Lisboa Pagnussatti

**Microbiota da cavidade bucal associada à saúde e à cárie dentária:
uma revisão sistemática da literatura e análise *in silico* de estudos
clínicos**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como pré-requisito para a obtenção do título de Doutora em Clínica Odontológica – Cariologia e Dentística.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Alex Arthur

Porto Alegre – RS

2024

A minha família, especialmente meus pais, Maria Cristina de Souza Lisboa e Paulo Roberto Pagnussatti, por além de acreditarem nos meus sonhos, me incentivarem e me apoiarem nas minhas escolhas, serem meu espelho, de ética, pessoas e pais.

Ao meu irmão, Lorenzo Lisboa Pagnussatti, que me ensinou que ter alguém para dividir a vida deixa tudo mais leve e bonito.

Amo vocês de todo o meu coração.

CIP - Catalogação na Publicação

Lisboa Pagnussatti, Maria Eduarda

Microbiota da Cavidade Bucal associada à saúde ou à cárie dentária: uma revisão sistemática de literatura e análise in silico de estudos clínico / Maria Eduarda Lisboa Pagnussatti. -- 2024.

156 f.

Orientador: Rodrigo Alex Arthur.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Odontologia, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Porto Alegre, BR-RS, 2024.

1. Microbiota Bucal. 2. Cárie dentária . 3. Saúde bucal . 4. Biomarcadores. I. Arthur, Rodrigo Alex, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

AGRADECIMENTOS

À Deus, pois sem ele essa caminhada teria sido muito mais difícil; por todas as noites que me senti cansada, desestimulada, com medo do caminho que decidi seguir, por todas as noites que senti falta de estar junto da minha família, por todos os momentos em que me vi com medo de perder alguém que eu amasse por causa de uma Pandemia que assolou o mundo por dois longos anos. Mas Ele nunca me deixou sozinha, sempre que precisei ele me acolheu de braços abertos e preencheu todos os medos com segurança, meu cansaço com mais estímulo e meu coração com mais amor.

Aos meus Pais, Maria Cristina e Paulo e também ao meu Irmão Lorenzo, por mesmo longe sempre se fazerem presentes. Por terem me apoiado quando decidi estudar longe de vocês, por serem meus portos-seguros, meus amigos, incentivadores, admiradores e as pessoas mais importantes da minha vida. Não somos a família perfeita, mas somos e sempre seremos nós quatro. Amo vocês de todo o meu coração.

Ao meu orientador Prof. Dr. Rodrigo Alex Arthur, por mais uma vez desempenhar o papel de me orientar com maestria e brilhantismo. Obrigada por compartilhar comigo seu conhecimento, pela ajuda, paciência e dedicação para que essa Tese pudesse ser escrita. Foram ao total 6 anos trabalhando juntos e posso dizer que minha admiração pelo Mestre e Profissional só aumenta a cada dia. O senhor é meu exemplo e tenho uma grande admiração por todo o seu trabalho.

Aos queridos professores da USP – Campus Ribeirão Preto, Prof. Dr. Wilson Araújo da Silva Jr (Faculdade de Medicina) e Prof. Dr. João Paulo Bianchi Ximenez (Faculdade de Farmácia) por terem me recebido tão bem e de forma tão acolhedora na semana que passei com eles para aprender mais sobre bioinformática. Obrigada pela dedicação durante todos esses anos, pelas inúmeras reuniões que fizemos para tirar minhas dúvidas e também por toda a paciência. Serei sempre grata por ter tido a oportunidade de conhecê-los e poder trabalhar juntamente com ambos. Deixo aqui também, minha admiração por cada um de vocês.

Aos também queridos aluno de Graduação Raphael Murray e aluno de Doutorado Rafael dos Santos Bezerra que, juntamente com o Prof. Dr. Wilson e o Prof. João, foram extremamente acolhedores e ajudaram a tornar possível todas as etapas da pesquisa, ensinando, estando sempre dispostos a tirar dúvidas e a resolver os problemas que aconteciam no meio do caminho. Vocês foram essenciais nessa caminhada e tenho certeza que terão um futuro brilhante na trajetória profissional de ambos.

Ao meu grande amigo Heitor Sales de Barros Santos, que iniciou a trajetória dele na pós-graduação apenas um ano depois de mim e que se tornou meu companheiro durante todo o meu segundo ano de Mestrado e todos esses anos de Doutorado. Ami, poder compartilhar essa caminhada contigo, poder trabalhar contigo esses anos todos e, principalmente, poder aprender tanto contigo todos os dias tornou essa caminhada muito mais fácil. Fomos de colegas à amigos, de amigos à confidentes. Eu sempre irei lembrar das nossas inúmeras chamadas de vídeo, conversas, noites e dias trabalhando juntos. Obrigada por ter me ensinado tanto, por ter sido meu incentivador, meu amigo

durante todos esses anos. Sou extremamente grata por termos dividido essa caminhada juntos e saiba que sempre estarei torcendo por ti e te apoiando no que for necessário, te amo.

A todos os meus amigos queridos, aqueles que fiz na pós-graduação e os que fiz nesses anos todos. Todos vocês, cada um, teve um papel importante nessa minha caminhada e sou extremamente grata por cada um estar e fazer parte da minha vida.

A todos os Professores da Cariologia da UFRGS que compartilharam seu saber com tanta dedicação, excelência e paixão. Obrigada por toda ajuda durante esse período, seja com palavras ou com ensinamentos e conhecimento compartilhados comigo. Deixo aqui meu agradecimento por serem exemplos de Mestres dos quais me sinto sortuda de ter conhecido e convivido todos esses anos.

Aos demais Professores que tive a oportunidade de conhecer, conviver e aprender, aos demais colegas e amigos que fiz no LABIM e nas dependências da Faculdade de Odontologia da UFRGS, graças ao Programa de Pós-Graduação.

A CAPES pela bolsa concedida durante meus anos de Doutorado, possibilitando que eu continuasse a ir em busca da realização desse sonho, me tornar Doutora em Clínica Odontológica – Cariologia e Dentística pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Por último, mas não menos importante, gostaria de agradecer a mim mesma. Por não ter desistido todas as vezes que eu me questioneei se eu estava no lugar e no caminho certo, principalmente quando me fizeram pensar que as minhas escolhas não me levariam ao lugar que eu sei que eu vou chegar; quando me fizeram me questionar das minhas escolhas, que eu escolhi POR MIM E PARA MIM. Obrigada, “eu” do passado, que mesmo nas dificuldades e no meio de dúvidas se manteve firme no caminho que eu escolho e crio para mim.

Por focarmos naquilo que já passou e não aconteceu, nos limitamos de novas possibilidades. A percepção é fundamental, principalmente para reconhecer novos caminhos. Se não abrirmos a porta para adentrar em um novo ambiente, permaneceremos no mesmo lugar.

- em todos os instantes há portas que abrem e portas que se fecham.

**Kennedi Lazzari – poeta
@_poetasia**

RESUMO

Microbiota da cavidade bucal associada à saúde e à cárie dentária: uma revisão sistemática da literatura e análise *in silico* de estudos clínicos

O objetivo geral dessa Tese de Doutorado é comparar o Microbiota da cavidade bucal de indivíduos livres de cárie com indivíduos com doença cárie, tanto em nível taxonômico, quanto em nível funcional, na tentativa de identificar possíveis biomarcadores associados à saúde e/ou à cárie dentária. Essa Tese está dividida em dois Capítulos. O Capítulo 1 descreve uma revisão sistemática realizada de acordo com o guideline PRISMA com busca em sete diferentes bases de dados (MEDLINE/PUBMED, Web of Science, EMBASE, LILACS, SciELO, Scopus e Google Scholar) no ano de 2023 que incluiu ao final 54 estudos observacionais (43 estudos transversais e 11 estudos de coorte). Esses estudos avaliaram a composição do Microbiota da cavidade bucal (saliva e/ou placa dentária) por meio de métodos de sequenciamento de segunda geração (de forma direcionada ou não-direcionada) correspondendo à um total de 3.486 participantes (1.666 livres de cárie e 1.820 com cárie). O bacterioma da cavidade bucal foi avaliado em 51 estudos e o micobioma da cavidade bucal foi avaliado em 3 estudos. Apesar dos estudos serem bem distintos no que diz respeito às suas características metodológicas, a abundância de 87 gêneros bacterianos e 44 gêneros fúngicos foi reportada como sendo estatisticamente diferente entre indivíduos livres de cárie e indivíduos com cárie. *Atopobium* spp., *Bifidobacterium* spp., *Capnocytophaga* spp., *Fusobacterium* spp., *Lactobacillus* spp., *Olsenella* spp., *Prevotella* spp., *Pseudomonas* spp., *Scardovia* spp., *Selenomonas* spp., *Streptococcus* spp. and *Veillonella* spp. parecem ser mais abundantes na cavidade bucal de indivíduos que possuem cárie dentária, enquanto que parece não haver um padrão específico de distribuição do componente fúngico entre esses indivíduos. Diferentes padrões funcionais parecem estar mais relacionados ou às condições de saúde ou às condições de doença cárie. A qualidade metodológica da maioria dos estudos foi considerada como satisfatória. O Capítulo 2 trata-se de uma análise *in silico* de 4 estudos clínicos que avaliaram a composição do bacterioma da cavidade bucal (usando sequenciamento de segunda geração de forma direcionada) em indivíduos livres de cárie e em indivíduos com cárie. Os dados brutos referentes às amostras clínicas (saliva e/ou placa dentária) de 193 indivíduos livres de

cárie e de 174 indivíduos com cárie foram obtidos de repositórios digitais de domínio público. Análises de alfa-diversidade, beta-diversidade e abundância diferencial relativa foram realizadas através do software online MicrobiomeAnalyst e também com *scripts* desenvolvidos para o software R Studio. Alfa e beta diversidades mostraram-se diferentes estatisticamente entre indivíduos com cárie e livres de cárie ($p < 0,05$). A análise da abundância relativa diferencial demonstrou que *Lautropia* spp., *Neisseria* spp., e *Leptotrichia* spp., são mais abundantes na cavidade bucal de indivíduos livres de cárie, enquanto que *Capnocytophaga* spp., *Corynebacterium* spp., *Megasphaera* spp., *Prevotella* spp., *Saccharibacteria_genera_incertae_sedis*, *Selenomonas* spp., *Streptococcus* spp. e *Veillonella* spp. estão presentes em maior abundância na cavidade bucal de indivíduos com cárie. O bacterioma da cavidade bucal de indivíduos livres de cárie também parece desempenhar funções que são diferentes em comparação com as funções desempenhadas pelo bacteriome de indivíduos com cárie. De forma geral, os resultados dessa Tese indicam que grupos de microrganismos, bem como padrões funcionais específicos codificados pela microbiota avaliada, são diferentemente abundantes na cavidade bucal entre indivíduos livres de cárie e indivíduos com cárie. Alguns microrganismos e padrões funcionais podem ser considerados como futuros candidatos a biomarcadores das condições de saúde ou de doença cárie. A validade clínica desses achados precisa ser confirmada por futuros estudos clínicos longitudinais e também estudos experimentais.

Palavras-chave: Microbiota bucal, Saúde bucal, Cárie dentária, Biomarcadores.

ABSTRACT

Oral cavity microbiota and dental caries: a systematic literature review and *in silico* analysis of clinical studies

The aim of this Thesis is to compare the microbiome of the oral cavity of caries-free individuals and of individuals with caries disease, both at a taxonomic and functional levels, in an attempt to identify possible biomarkers associated with health and/or with dental caries. This Thesis is divided into two Chapters. Chapter 1 describes a systematic review carried out in accordance with the PRISMA guideline with a search in seven different databases (MEDLINE/PUBMED, Web of Science, EMBASE, LILACS, SciELO, Scopus and Google Scholar) in the year 2023, which included at the end 54 observational studies (43 cross-sectional studies and 11 cohort studies). These studies evaluated the composition of the oral cavity microbiome (saliva and/or dental plaque) using second-generation sequencing methods (targeted or non-targeted) corresponding to a total of 3,486 participants (1,666 caries-free and 1,820 with caries). The oral cavity bacteriome was evaluated in 51 studies and the oral cavity mycobiome was evaluated in 3 studies. Although the studies are very different with regard to their methodological characteristics, the abundance of 87 bacterial genera and 44 fungal genera was reported to be statistically different between caries-free individuals and individuals with caries. *Atopobium* spp., *Bifidobacterium* spp., *Capnocytophaga* spp., *Fusobacterium* spp., *Lactobacillus* spp., *Olsenella* spp., *Prevotella* spp., *Pseudomonas* spp., *Scardovia* spp., *Selenomonas* spp., *Streptococcus* spp. and *Veillonella* spp. appear to be more abundant in the oral cavity of individuals who have dental caries, while there appears to be no specific pattern of distribution of the fungal component among these individuals. Distinct functional patterns seem to be more related to either health conditions or caries disease conditions. The methodological quality of most studies was considered satisfactory. Chapter 2 is an *in silico* analysis of 4 clinical studies that evaluated the composition of the bacteriome of the oral cavity (using targeted second-generation sequencing) in caries-free individuals and in individuals with caries. Raw data referring to clinical samples (saliva and/or dental plaque) from 193 caries-free individuals and 174 individuals with caries were obtained from public domain digital repositories. Analyzes

of alpha-diversity, beta-diversity and relative differential abundance were carried out using the MicrobiomeAnalyst online software and also with scripts developed for the R Studio software. Alpha and beta diversities were statistically different between individuals with caries and caries-free individuals ($p < 0.05$). Differential relative abundance analysis demonstrated that *Lautropia* spp., *Neisseria* spp., and *Leptotrichia* spp. are more abundant in the oral cavity of caries-free individuals, while *Capnocytophaga* spp., *Corynebacterium* spp., *Megasphaera* spp., *Prevotella* spp., *Saccharibacteria_genera_incertae_sedis*, *Selenomonas* spp., *Streptococcus* spp. and *Veillonella* spp. are present in greater abundance in the oral cavity of individuals with caries. The bacteriome of the oral cavity of caries-free individuals also appears to perform functions that are different compared to the functions performed by the bacteriome of individuals with caries. In general, the results of this Thesis indicate that groups of microorganisms, as well as specific functional patterns encoded by the microbiota, are differentially abundant in the oral cavity between caries-free individuals and individuals with caries. Some microorganisms and functional patterns can be considered as future candidates for biomarkers of health conditions or caries disease. The clinical validity of these findings needs to be confirmed by future longitudinal clinical studies and also experimental studies.

Key-words: Oral microbiota, oral health, dental caries, biomarkers.

SUMÁRIO

Sessão	Páginas
Antecedentes e Justificativas	01 a 11.
Objetivos	12.
Capítulo 1 (Artigo1)	13 a 92.
Capítulo 2 (Artigo 2)	93 a 149.
Considerações finais	150 a 151.
Conclusão	152.
Referências	153 a 156.

ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVAS

1. Cárie Dentária

A cárie dentária é uma doença polimicrobiana, biofilme-dependente, decorrente de um processo de disbiose, desencadeada por ácidos frequentemente produzidos por microrganismos sacarolíticos presentes no biofilme dentário, resultantes da metabolização dos carboidratos da dieta (Sheiman e James, 2015), que induzem um desequilíbrio no balanço físico-químico entre o conteúdo mineral do dente e o fluido do biofilme. A dissolução dos tecidos dentários, quando não controlada, pode acabar resultando na formação de uma lesão que se inicia em nível ultraestrutural (subclínico), podendo progredir para formação de cavidades nas superfícies do esmalte e também dentina (Anderson, 2002; Björndal e Mjör, 2002; Featherstone, 2004). Nesse contexto, a cárie dentária é uma doença crônica, caracterizada como uma destruição localizada dos tecidos dentários que pode ser afetada pelo fluxo salivar e composição da saliva, exposição ao flúor, dieta, hábitos e comportamentos dos indivíduos (Selwitz et al., 2007).

A lesão de cárie diagnosticada clinicamente é o sinal clínico da doença cárie dentária. Quando o processo de perda de minerais está ativo (havendo predomínio dos eventos de desmineralização), as lesões não cavitadas em esmalte apresentam características como coloração esbranquiçada, aspecto opaco e superfície porosa, enquanto que as lesões cavitadas com envolvimento dentinário apresentam características de coloração amarelada ou acastanhadas, que são removidas em lascas e com aspecto de couro ou de tecido amolecido e úmidas. Dessa forma, ao apresentar lesões com essas características clínicas, o indivíduo é diagnosticado com doença cárie ativa. Contrariamente, lesões em esmalte que apresentam características de lesão esbranquiçada porém brilhosa, com aspecto liso e que estão localizadas, geralmente, um pouco acima de regiões gengivais e margens cervicais e lesões em dentina que apresentam características de coloração mais amarronzada à preta, com brilho e de consistência dura, muitas vezes encontradas em sulcos e fissuras e também em cavidades, indicam inativação do processo de perda de minerais, e o indivíduo é considerado clinicamente saudável. De forma geral, medidas de controle precisam ser

adotadas em indivíduos cárie ativos para possibilitar a paralização do avanço das lesões de cárie.

a) Epidemiologia da cárie dentária

Embora a cárie dentária seja uma doença evitável com medidas de prevenção como, por exemplo, boa higienização, políticas públicas de saúde como disponibilidade de fluoretos nas águas de abastecimento público, o uso dentifrícios fluoretados, e dieta com reduzida frequência de ingestão de açúcares, ainda assim, afeta milhões de pessoas no mundo, sendo a cárie não tratada a condição bucal mais prevalente a nível mundial. (Borg-Bartolo et al., 2022; Wen et al., 2022). De acordo com dados obtidos recentemente, estima-se que 34% da população mundial, apresentava cárie dentária no ano de 2015, o que equivale a 2,5 bilhões de pessoas no mundo todo (Kassebaum et al., 2015). Entre os anos de 1999 a 2019, um levantamento epidemiológico realizado a nível global, demonstrou que 64,6% dos casos de cárie no mundo (tanto na dentição decídua, quanto na dentição permanente), foram atribuídos à desigualdade sócio-demográfica, o que demonstra que esta doença ainda afeta grande parte da população mundial e que deve ser encarada como um desafio de saúde pública global (Wen et al., 2019).

Por isso, fatores de ordem sócio-econômica e contextual estão fortemente associados com uma maior experiência de cárie nos dias atuais. Em idade pré-escolar, a cárie afeta quase metade das crianças (48%), havendo, inclusive, variações decorrentes da localização geográfica. O continente Africano apresenta-se como o de menor prevalência para esta doença, enquanto que países dos continentes Asiático, Oceania, América do Norte e Central, apresentam prevalências de cárie maiores do que a média mundial (Uribe et al., 2021). Já em adultos e idosos, a cárie apresenta-se como a condição de saúde que mais afeta a população mundial, novamente mostrando que existem variações dependendo da localização geográfica e principalmente de fatores socioeconômicos e demográficos (principalmente renda anual e residir em grandes centros urbanos ou em regiões rurais)(Borg-Bartolo et al., 2022).

O perfil epidemiológico da doença atualmente caracteriza-se por uma polarização, com a maioria das pessoas não sendo afetada por essa doença ou sendo levemente afetada, enquanto que poucos indivíduos são severamente acometidos.

Além disso, observa-se uma menor velocidade de progressão das lesões, desde a detecção dos primeiros sinais clínicos até a formação de cavidades e possibilidade de diagnóstico mais precoce e adoção de medidas de controle menos invasivas.

No Brasil, o Ministério da Saúde tem organizado levantamentos epidemiológicos em âmbito nacional para investigar a distribuição da doença cárie na população. O levantamento mais recente, intitulado Pesquisa Nacional de Saúde bucal, SB-BRASIL 2020 (vigência 2021-2022), ainda não divulgou seus resultados definitivos. Sendo assim, os dados provenientes do SB-BRASIL no ano de 2010 (Ministério da Saúde Brasil, 2010), apontam que 46,6% das crianças brasileiras com 5 anos estavam livres de cárie na dentição decídua, enquanto que aos 12 anos, 43,5% apresentaram a mesma condição na dentição permanente. Nas idades de 15-19, 35-44 e 65-74 anos, os percentuais foram 23,9%, 0,9% e 0,2%, respectivamente. Aos 5 anos de idade, uma criança brasileira possui, em média, um ceo-d (que demonstra o número de dentes cariados, restaurados ou com extração indicada na dentição decídua) igual a 2,43, com predomínio do componente “cariado”, o qual é responsável por mais de 80% deste índice. Essa média do índice ceo-d é mais elevada nas regiões Centro-Oeste, Norte e Nordeste, quando comparado com a média das regiões Sul e Sudeste. Crianças com 12 anos e adolescentes com 15-19 anos apresentaram, em média, um CPO-D (que demonstra o número de dentes cariados, perdidos ou com extração indicada ou dentes restaurados na dentição permanente) igual a 2,07 e 4,25, respectivamente, sendo as menores médias encontradas nas regiões Sul e Sudeste e as maiores nas regiões Centro-Oeste, Norte e Nordeste. Nos adultos, o CPO-D médio foi de 16,75 na faixa etária de 35-44 anos e de 27,53 na faixa de 65-74 anos. Destaca-se o fato de que o componente “perdido” é responsável por cerca de 44,7% do índice no grupo de 35-44 anos e 92% no grupo de 65-74 anos. Os percentuais de CPO-D/ceo-d=0 (que indicam indivíduos livres de cárie) são sempre inferiores nas regiões Centro-Oeste, Norte e Nordeste quando comparados com os das regiões Sul e Sudeste. Mesmo com esses números, o Brasil ainda é considerado um país com baixa prevalência de cárie dentária segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), porém, ainda é grande o número de indivíduos que necessitam de atenção e de tratamento para essa condição. A presença da cárie dentária pode afetar negativamente a qualidade de vida relacionada à saúde bucal tanto de crianças como de adultos, levando a uma condição bucal de completa destruição

dentária e dor, além de também comprometer a mastigação, promover a perda de apetite e de peso, estar relacionada com o déficit de crescimento, dificuldades na fala, alteração nos padrões de sono, diminuição do rendimento escolar e/ou trabalho, e a alteração no comportamento (baixa autoestima), diminuindo a socialização e comprometendo o bem estar geral do indivíduo (Boing et al., 2014; Kassebaum et al., 2015; Scweidicke et al., 2015; Costa et al., 2018).

b) Processo de desenvolvimento da lesão de cárie e sua relação com a microbiota da cavidade bucal

A desmineralização dos tecidos dentários (esmalte e dentina) possui uma relação intrínseca com a atividade metabólica proveniente dos microrganismos do biofilme que recobrem esses tecidos. O desequilíbrio mineral induzido por ácidos, principalmente o ácido láctico, provenientes do metabolismo dos microrganismos sacarolíticos presentes no biofilme dentário, acabam se acumulando na fase fluída do biofilme, o que leva à queda do pH ao ponto em que condições na interface biofilme-dente tornam-se subsaturadas e esses ácidos desmineralizam parcialmente a camada mais superficial do esmalte. Uma vez que os açúcares são eliminados da boca pela deglutição e diluição salivar, os ácidos do biofilme podem ser neutralizados pela ação do tamponamento salivar. O pH do fluido do biofilme retorna ao estado de neutralidade no qual a supersaturação em relação aos íons cálcio e fosfato é novamente atingido e parte dos minerais perdidos são redepositados nos tecidos dentários em um processo de remineralização. Dessa forma, processos de desmineralização são intercalados com processos de remineralização ao longo dia. A perda líquida de minerais resulta no aumento da porosidade, alargamento dos espaços entre os cristais de esmalte e amolecimento da superfície, permitindo que os ácidos se difundam mais profundamente no dente, enquanto que os processos de remineralização tendem a remineralizar as camadas mais superficiais da lesão resultando em desmineralização do mineral abaixo da superfície (desmineralização subsuperficial) (Pitts et al., 2017). É importante salientar, que quanto mais frequentes forem os eventos de desmineralização dos tecidos dentários ao longo do dia (maior perda de mineral e sucessivas quedas de pH), mais difícil será manter um grau de saturação na saliva

compatível com remineralização, havendo aumento na quantidade de mineral perdido que pode culminar com o surgimento de uma lesão de cárie clinicamente visível (Manji e Fejerskov, 1991; Kidd e Fejerskov, 2004).

Os microrganismos considerados cariogênicos, ou seja, aqueles capazes de promover desmineralização das estruturas dentárias, devem ser capazes de produzir ácidos a partir da metabolização de açúcares da dieta, uma característica denominada de acidogenicidade e, além disso, devem ser capazes de sobreviver em condições de pH reduzido, característica denominada de aciduricidade (Loesche, 1986). Em uma microbiota bucal considerada normal, esses microrganismos representam menos de 1% do total dos microrganismos encontrados na cavidade bucal (Marsh, 2003). Contudo, quando ocorre a redução do pH em razão da produção dos ácidos, ocorre uma modificação microbiológica com consequente aumento na proporção de espécies acidúricas (Correia et al., 2012). Classicamente tanto os *Streptococcus mutans* quanto os *Lactobacillus spp.* foram considerados, por muito tempo, como as principais bactérias envolvidas com o início e progressão das lesões cariosas, respectivamente (Caulfield et al., 1993; Van Houte, 1994). Ambos são acidogênicos e acidúricos.

Nesse sentido, algumas filosofias de pensamento se propuseram a discutir o papel que as bactérias e, posteriormente também outros microrganismos, desempenhavam na etiologia da cárie dentária. Assim, a primeira filosofia chamava-se “Hipótese da Placa Específica”. Essa Hipótese sugeria que apesar de o biofilme dentário possuir uma grande diversidade de microrganismos, a presença de alguns – mesmo que em pequenas proporções – e em especial do *S. mutans*, estaria envolvida com o desenvolvimento da doença. A segunda filosofia, chamada de “Hipótese da Placa Não-Específica” diferentemente da primeira, considerava importante a atividade metabólica de todas as bactérias presentes no biofilme dental, e, dessa forma, uma heterogeneidade de microrganismos estaria envolvida com o desenvolvimento da doença e não apenas a atividade metabólica de algumas espécies. (Marsh 1994; 2003). Uma terceira filosofia propõe, então, que microrganismos associados à cárie dentária podem ser normalmente encontrados em sítios saudáveis, porém em níveis muito baixos para serem considerados clinicamente relevantes. Portanto, a doença cárie seria resultado de mudanças na ecologia do biofilme (com uma modificação da microbiota

residente e comensal) induzida por mudanças ambientais tais como repetidas quedas de pH devido a ingestão de açúcares, as quais favorecem o crescimento de espécies acidogênicas e também ácido-tolerantes. Essa filosofia, conhecida como “Hipótese da Placa Ecológica” (Marsh 1994; 2003), indica que a cárie dentária é uma doença que se desenvolve como consequência de um processo de disbiose, e é atualmente a mais aceita.

Hoje sabe-se que além de diferentes condições físicas (pH, temperatura, pressão de oxigênio, disponibilidade de nutrientes, dentre outras) a heterogeneidade espacial da cavidade bucal deve-se também à presença de distintas comunidades microbianas nos diferentes sítios da cavidade bucal. Com isso, é importante dizer que a microbiota é sítio-específica, ou seja, cada sítio irá ter sua própria microbiota, que geralmente não difere ao nível de gênero, mas sim, ao nível de espécie microbiana. Assim, cada microrganismo estará habitando ativamente um local de sua escolha, onde irá crescer e se dividir, mas fora desse local este microrganismo se apresenta em baixa abundância, com taxas metabólicas reduzidas, além de expressão gênica alterada e diferente organização espacial (Mark-Welch et al., 2019). Apesar disso, há evidências sugerindo que diferentes superfícies dentárias (hígidas, com lesão inativa ou com lesão ativa) de indivíduos com cárie ativa apresentam o mesmo comportamento funcional, sinalizando que, apesar das diferenças taxonômicas sítio-específicas, o processo de disbiose ocorre de forma semelhante modulando a função da microbiota de cada sítio (Corralo et al., 2021). Por fim, compreende-se também que, além de a cavidade bucal abrigar distintas comunidades microbianas que são altamente específicas para cada sítio (Mark-Welch et al., 2019), as diferentes comunidades apresentam-se como um Microbiota central ou microbiota central generalista (*core microbiome*), que seria comum a todos os indivíduos, e que têm como papel principal a manutenção da estabilidade funcional e homeostase, afim de manter um ecossistema saudável (Zaura et al., 2009).

A composição da microbiota da cavidade bucal também varia de acordo com o tipo de superfície (hígida, cavitada). Nesse contexto, na presença de cavidades, por serem sítio retentivas, a composição da microbiota acaba sendo modificada. Um estudo feito por Corralo et al., (2021) corrobora com a informação acima, demonstrando que existe diferença na composição da microbiota em superfícies hígidas, quando comparadas com superfícies com lesões cavitadas e não cavitadas.

Com base em todos os conhecimentos que foram sendo adquiridos até então, sabe-se que não apenas as bactérias classicamente conhecidas, como *S. mutans* e *Lactobacillus spp.* fazem parte do processo de disbiose associado ao desenvolvimento da cárie dentária. O que ainda não é muito bem claro é quem são esses outros microrganismos e qual papel eles desempenham na doença cárie.

2. A Microbiota Bucal

a) O papel da Microbiota Bucal no processos Saúde-Doença cárie dentária

Nos últimos anos, os avanços e o desenvolvimento de novos métodos de identificação molecular permitiram avaliar com muito mais detalhes a composição da microbiota humana, como por exemplo da cavidade nasal, do trato gastrointestinal, do trato urogenital e também da cavidade bucal, sugerindo que os processos saúde-doença podem estar diretamente associados às comunidades de microrganismos dessas regiões e às mudanças que ocorrem nessa microbiota com o passar do tempo.

Desde os primeiros métodos de sequenciamento de DNA, também conhecidos como *Métodos de Sequenciamento Clássico ou de Primeira Geração* (Maxam e Gilbert, 1977; Sanger, 1977) até os métodos mais modernos, muito se descobriu sobre o papel do Microbiota humano. Nos dias atuais, os métodos mais utilizados de sequenciamento são os de *Sequenciamento de Alto Rendimento*. Esse tipo de sequenciamento possibilita a análise de uma quantidade de dados muito maior do que as metodologias mais antigas, o que viabiliza sequenciar muito mais nucleotídeos por reação, além de permitir que haja um processo de geração de dados muito mais robusto e rápido (Mardis, 2008; Cullum et al., 2011). O fluxo de trabalho dos sequenciadores NGS é formado por 4 etapas sendo elas a construção de bibliotecas, processo de amplificação do material genético, o sequenciamento propriamente dito desse material genético e a análise dos dados. Para a construção das bibliotecas, há geração de fragmentos de tamanhos compatíveis com a tecnologia a ser utilizada, além da adição de adaptadores e marcadores. A etapa de amplificado consiste na geração de cópias de cada fragmento a ser sequenciado, por meio de uma reação de "PCR" (reação em cadeia da enzima polimerase). A etapa de sequenciamento consiste no processo de leitura da sequência obtida e última etapa, a análise de dados, consiste no alinhamento, montagem dos fragmentos e quantificação

(Dick et al., 2009; Mardis et al., 2013; Delchierico et al., 2015). Dentre as plataformas de sequenciamento do tipo NGS, destacam-se o Pirosequenciamento, o Ion Torrent e o Illumina dentre os mais utilizados nos estudos de sequenciamento de microrganismos (Dick et al., 2009). Os dados produzidos por essas diferentes tecnologias têm possibilitado uma melhor compreensão do papel do Microbiota da cavidade bucal nos processos de saúde—doença.

Graças aos métodos moleculares de sequenciamento e atualmente, aos métodos mais modernos, sabe-se que a cavidade bucal é um ambiente que apresenta uma comunidade microbiana altamente diversificada, o que em grande parte deve-se aos diferentes habitats presente neste local, como tecidos duros (dentes, materiais restauradores, próteses, aparelhos ortodônticos), tecidos moles (mucosa jugal, gengivas e fluído crevicular, assoalho bucal, palato duro e mole, língua e lábios) além da presença de saliva (Yamashita e Takeshita, 2017). Dessa forma, habitam na cavidade bucal mais de mil espécies de microrganismos (Wade, 2013). Dentre esses, a maior abundância encontrada e catalogada até então, faz parte Domínio Bacteria. Contudo, espécies de fungos, arqueias e vírus também coabitam a cavidade bucal.

Esses microrganismos podem interagir uns com os outros de forma sinérgica, por meio do estabelecimento de redes metabólicas e de complementação enzimática para otimizar a obtenção de energia para fins de manutenção da viabilidade celular, ou por meio de relações de antibiose/competição, caracterizadas, dentre diversos fatores, pela produção de bacteriocinas e de metabólitos que modulam o crescimento e atividade metabólica da comunidade (Lemos *et al.*, 2005; Marsh, 2015; Marsh, 2018). Um perfeito equilíbrio entre simbiose e antibiose é necessário para que haja homeostasia microbiana na cavidade bucal e uma condição de harmonia entre microbiota e hospedeiro.

Nesse sentido, os microrganismos comensais desempenham um papel importante na manutenção da saúde bucal, estando envolvidos em processos de resistência à colonização por microrganismos patogênicos, promovendo a alcalinização de ácidos produzidos por alguns microrganismos e até mesmo estando envolvidos na manutenção e desenvolvimento do sistema imunológico do hospedeiro (Espinoza et al., 2018; Tanner et al., 2018; Sedghi et al., 2021). A resiliência da microbiota comensal é de suma importância para resistir aos fatores estressores que promovem a transição de um

estado de saúde para um estado de disbiose (Rosier et al., 2018; Wade, 2020). Alguns microrganismos, como *Streptococcus* spp. e *Veillonella* spp., atuam metabolizando a arginina e a uréia, produzindo amônia com o objetivo de neutralizar os ácidos provenientes da metabolização dos açúcares da dieta, que são produzidos pelos microrganismos acidogênicos. Além desse mecanismo de proteção, algumas espécies de *Actinomyces* spp., *Lactobacillus* spp. e *Veillonella* spp., também possuem a capacidade de converter esses ácidos mais fortes como o ácido láctico em ácido acético ou propiônico, além de utilizar alguns ácidos como substrato energético (Benitez-Paes et al., 2014; Huang et al., 2016; Nyvad & Takahashi, 2020; Chen et al., 2020). Porém, se os fatores estressores acabarem perturbando constantemente esse equilíbrio alterando essa resiliência, o estado de disbiose pode ser rapidamente atingido. Em termos de cárie dentária, dentre os fatores ambientais que potencialmente são capazes de romper o equilíbrio entre microbiota e hospedeiro, destacam-se a frequente ingestão de carboidratos fermentáveis, especialmente a sacarose (Takahashi & Nyvad, 2008; Takahashi & Nyvad, 2016; Marsh, 2018).

Diferenças na abundância de determinados grupos de microrganismos são encontradas entre indivíduos livres de cárie e com cárie dental. Utilizando a plataforma de sequenciamento Illumina, observou-se que a saliva de adultos livres de cárie apresenta maior abundância de *Haemophilus parasuius*, *Oribacterium parvum*, *Prevotella bergensis*, *Prevotella scopos*, *Streptococcus infantis*, *Streptococcus pseudopneumoniae*, *Streptococcus oralis*, enquanto que *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus vaginalis*, *Prevotella denticola*, *Propionibacterium acidifaciens*, *Parascardovia denticolens*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* estão em maior abundância na saliva de adultos com cárie (Belstrom et al., 2017). Utilizando a plataforma de sequenciamento ION-Torrent, foi possível observar que o biofilme dentário de crianças livres de cárie apresenta maior abundância de *Actinomyces urogenitalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Capnocytophaga* sp. oral taxon 324, *Leptotrichia* sp. oral taxon 225, *Streptococcus* sp. AS14 and *Treponema lecithinolyticum*, enquanto que a abundância de *Actinomyces* sp. HPA0247, *Atopobium parvulum*, *Atopobium* sp. B52, *Lachnospiraceae bacterium oral taxon 082*, *Oribacterium asaccharolyticum*, *Oribacterium* sp. oral taxon 108, *Prevotella* sp. F0091, *Veillonella*

parvula, *Veillonella sp. 3_1_44*, dentre outros, é maior em crianças com cárie (Al-Hebshi et al., 2018). Por meio de pirosequenciamento foi possível observar que biofilme dentário de idosos que não possuem cárie nas superfícies radiculares apresenta maior abundância de *Aggregatibacter sp.*, *Bacteroidetes G2_sp*, *Bergeyella sp.*, *Capnocytophaga sp.*, *Capnocytophaga granulosa*, *Capnocytophaga leadbetteri*, *Corynebacterium matruchotii*, *Delfia acidovorans*, *Fusobacterium sp.*, *Porphyromonas sp.*, *Prevotella intermedia*, *Tanerella sp.*, enquanto que a abundância de *Anaeroglobus geminatum*, *Actinomyces sp.*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus salivarius*, *Olsenella profusa*, *Prevotella multisaccharivorax*, *Prevotella denticola*, *Propionibacterium acidifaciens*, *Streptococcus mutans*, *Veillonella parvula* é maior naqueles indivíduos que apresentavam cárie radicular (Chen et al., 2015). Em relação aos fungos, sequenciamento de amostras de biofilme dentário sugere que crianças livres de cárie possuem uma maior abundância de *Mycosphaerella spp.*, *Mycosphaerella tassiana*, *Trichosporon spp.*, *Trichosporon dohaense*, enquanto que crianças com cárie apresentam maior abundância de *Candida spp.*, *Candida dubliniensis*, *Cyberlindnera spp.*, *Cyberlindnera jadinii* (de Jesus et al., 2020). Outro estudo também sugere que a cavidade bucal de crianças livres de cárie apresenta maior abundância de *Alternaria alternata*, *Curvibasidium cygneicollum*, *Cystofilobasidium macerans*, *Filobasidium stepposum*, *Leucosporidium yakuticum*, *Mortierella alpina*, *Mucor racemosus*, *Penicillium expansum*, *Rhizomucor variabilis* enquanto que maior abundância de *Cutaneotrichosporon dermatite* é maior na cavidade bucal de crianças com cárie (Fechney et al., 2019).

É preciso enfatizar que, tão importante quanto as modificações microbiológicas e o conhecimento da microbiota associada à saúde ou à cárie dentária, é o esclarecimento sobre a forma com que a essas modificações afetam a fisiologia e o metabolismo global da comunidade microbiana, esteja ela presente na saliva ou no biofilme dentário, e de que forma isso está também está relacionado ao processo saúde-doença cárie. Por exemplo, evidências têm sugerido que saliva de indivíduos com doença cárie apresenta maior expressão de genes relacionados ao metabolismo de glicanos e de carboidratos, enquanto genes relacionados ao metabolismo de lipídeos estiveram mais expressos em indivíduos livres de cárie (Belstrom et al., 2017). Nesse sentido, a análise do metatranscriptoma (conjunto de transcritos) das comunidades

microbianas pode fornecer dados mais robustos que auxiliam um melhor entendimento sobre a participação do Microbiota no desenvolvimento de cárie dental (Nyvad et al., 2013; Takahashi, 2015).

Desta forma, o que se tem na literatura nos dias atuais são diferentes estudos, que encontram diferentes grupos de microrganismos, que por sua vez são diferencialmente mais abundantes em condição de saúde quando comparados à condição de doença cárie, não sendo possível, a partir da análise isolada de cada trabalho, concluir se existe de fato, ou não, grupos específicos de microrganismos ou de funções que sejam indicadores do estado de disbiose e que atuem como possíveis marcadores de cárie dentária.

É a partir da busca por esse entendimento taxonômico e também funcional da microbiota da cavidade bucal relacionada à saúde ou à cárie dental que esse trabalho se insere. A partir da análise de mais de 50 estudos, busca-se responder alguns questionamentos: existe algum microrganismo, ou grupos de microrganismos, que podem ser considerados marcadores dos estados de saúde e de doença?; existe alguma função desempenhada por esse(s) microrganismo(s) que contribui para o estado de saúde ou de doença?

Os indivíduos não são diagnosticados com cárie até que os sinais clínicos induzidos pela disbiose sejam visíveis (ou seja, uma lesão de cárie claramente detectada pela inspeção visual-tátil), o que já indica um estágio avançado de perda mineral dentária: seria desejável, então, identificar sinais precoces de disbiose (seja no nível taxonômico ou funcional) que pudessem indicar indivíduos em risco de desenvolvimento de doença cárie antes da detecção clínica das lesões cariosas. Uma análise agrupada da evidência disponível pode ajudar a recolher pistas iniciais e a identificar padrões comuns associados à saúde ou a condições de doença.

OBJETIVOS

O objetivo desta Tese é comparar o Microbiota da cavidade bucal de indivíduos livres de cárie com indivíduos com doença cárie, tanto em nível taxonômico quanto em nível funcional, na tentativa de identificar marcadores associados à saúde e/ou à cárie dentária. A hipótese de trabalho é que o Microbiota da cavidade bucal de indivíduos com doença cárie é diferente (tanto em nível taxonômico quanto funcional) em comparação ao Microbiota da cavidade bucal de indivíduos livres de cárie.

Os objetivos específicos são:

- *Identificar filos, gêneros e espécies microbianas que são diferencialmente abundantes na cavidade bucal entre indivíduos livres de cárie e indivíduos com doença cárie dentária;
- *Identificar as principais rotas metabólicas diferencialmente enriquecidas na cavidade bucal entre indivíduos livres de cárie e indivíduos com doença cárie dentária;
- *Avaliar a diversidade de microrganismos presentes na cavidade bucal de indivíduos livres de cárie e compará-la aos indivíduos com cárie dentária;
- *Identificar potenciais marcadores microbiológicos ou padrões funcionais associados às condições de saúde ou de doença cárie.

Esta Tese está dividida em dois Capítulos, descritos abaixo:

Capítulo 1. Oral microbiota: taxonomic composition and functional profile in caries-free and in caries-affected individuals – a systematic review.

Capítulo 2. Oral bacteriome of caries-free and of caries-affected individuals: potential microbial markers identified by *in silico* analysis of pooled data from clinical studies

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A cavidade bucal possui um Microbiota cuja diversidade é a segunda maior do corpo humano, compreendendo mais de 1000 espécies de bactérias, e também incluindo fungos, arqueias e vírus. A diversidade deste Microbiota e funções desempenhadas despertam interesse de toda a comunidade científica, o que justifica o aumento do número de estudos sobre esse assunto nos últimos anos.

Os resultados do Capítulo 1 indicam que há determinados grupos de microrganismos na cavidade bucal, especialmente bactérias, cujas abundâncias parecem estar associadas às condições de saúde ou de doença cárie. *Actinomyces* spp., *Bergeyella* spp., *Cardiobacterium* spp., *Corynebacterium* spp., *Leptotrichia* spp., *Neisseria* spp. e *Porphyromonas* spp. foram encontradas de forma mais abundante em indivíduos sem cárie, enquanto que *Atopobium* spp., *Bifidobacterium* spp., *Capnocytophaga* spp., *Fusobacterium* spp., *Lactobacillus* spp., *Olsenella* spp., *Prevotella* spp., *Pseudomonas* spp., *Scardovia* spp., *Selenomonas* spp., *Streptococcus* spp. e *Veillonella* spp. foram mais abundantes em indivíduos com cárie. Essas diferenças sinalizam uma importante modificação microbiológica em decorrência do processo de disbiose. Paralelamente à tal modificação, observou-se também que biossíntese de aminoácidos, metabolismo de lipídeos, atividade desaminase, dentre outras, são funções enriquecidas no Microbiota bucal de indivíduos livres de cárie. Conjuntamente, esses resultados indicam que a função desempenhada pela microbiota é tão importante quanto a composição do Microbiota no processo saúde-doença cárie dentária. Porém, fica evidente a grande heterogeneidade das condições experimentais entre os estudos avaliados (no que diz respeito à coleta e processamento das amostras clínicas, forma de apresentação dos resultados, características da população estudada, dentre outros fatores). Apenas em 2022 foi elaborado um Guideline com o objetivo de orientar os pesquisadores na condução de estudos de Microbiota (Zaura et al., 2021). Espera-se que dessa forma, tenhamos um padrão de análises e formas de conduzir os estudos, o que facilita a comparação dos resultados entre um estudo e outro, podendo obter-se um padrão taxonômico e também funcional para melhor entendimento do papel do Microbiota em relação às doenças da cavidade bucal.

A análise *in silico* do Capítulo 2 indicou, de forma mais específica, que *Lautropia* spp., *Neisseria* spp., e *Leptotrichia* spp., são frequentemente mais abundantes na cavidade bucal de indivíduo livres de cárie, enquanto que *Capnocytophaga* spp., *Corynebacterium* spp., *Megasphaera* spp., *Prevotella* spp., *Saccharibacteria_genera_incertae_sedis*, *Selenomonas* spp., *Streptococcus* spp. e *Veillonella* spp. estão presentes em maior abundância na cavidade bucal de indivíduos com cárie. Funções específicas parecem ser desempenhadas por esses microrganismos contribuindo para as condições de saúde ou de doença cárie. Importante ressaltar que, exceto para *Megasphaera* spp., *Selenomonas* spp. e *Saccharibacteria_genera_incertae_sedis*, todos o demais gêneros apresentados foram detectados em abundância relativa superior a 2%. *Megasphaera* spp., *Selenomonas* spp. e *Saccharibacteria_genera_incertae_sedis* foram detectados em abundância inferior a 1%, o que indica a importância de se conhecer microrganismos pouco abundantes para uma melhor compreensão do processo saúde-doença.

Consideramos que o estudo do Microbiota bucal e a análise agrupada da evidência disponível, trazem importantes informações que poderão proporcionar o desenvolvimento de softwares e de testes que irão auxiliar no diagnóstico precoce do estado de disbiose, possibilitando a reversão desse estado e a paralização da doença, e também na identificação de indivíduos que estejam sob risco de desenvolvimento de cárie dentária. Estratégias podem ser adotadas para modificar o ambiente da cavidade bucal a fim de modular esse Microbiota e manter a cavidade bucal em condição compatível com saúde.

CONCLUSÃO

Os resultados da presente Tese indicam que grupos de microrganismos são diferentemente abundantes na cavidade bucal entre indivíduos livres de cárie e indivíduos com cárie. A cavidade bucal de indivíduos livres de cárie apresenta maior abundância de *Actinomyces* spp., *Bergeyella* spp., *Cardiobacterium* spp., *Corynebacterium* spp., *Lautropia* spp., *Leptotrichia* spp., *Neisseria* spp. e *Porphyromonas* spp. enquanto que a cavidade bucal de indivíduos com cárie apresenta maior abundância de *Atopobium* spp., *Bifidobacterium* spp., *Capnocytophaga* spp., *Corynebacterium* spp., *Fusobacterium* spp., *Lactobacillus* spp., *Megasphaera* spp., *Olsenella* spp., *Prevotella* spp., *Pseudomonas* spp., *Saccharibacteria*, *Scardovia* spp., *Selenomonas* spp., *Streptococcus* spp. e *Veillonella* spp. Padrões funcionais específicos também parecem estar associados com condições de saúde (biosíntese de lisina, metabolismo de lipídeos, nitrogênio e de ácido linoleico, atividade de desaminases e transferases, produção de bacteriocinas e motilidade bacteriana) e com condições de cárie dentária (metabolismo de amino açúcares, de amido, de sacarose, de fructose, de manose, de poliaminas e menaquiol, metabolism de triptofano, tirosina, purina e pirimidina, transportadores de membrana para captura de açúcares, biosíntese de peptidoglicanos e de glicosfingolipídeos, resistência á antibióticos, glicólise, gliconeogênese, dentre outros). Alguns microrganismos e padrões funcionais podem ser considerados como futuros candidatos a biomarcadores das condições de saúde ou de doença cárie. A validade clínica desses achados precisa ser confirmada por futuros estudos clínicos longitudinais e também estudos experimentais. A validade clínica desses achados precisa ser confirmada por futuros estudos clínicos longitudinais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-HEBSHI, N.N.; BARANIYA, D.; CHEN, T.; HILL, J.; PURI, S.; TELLEZ, M.; HASAN, N.A.; COLWELL, R.R.; ISMAIL, A. Metagenome sequencing-based strain-level and functional characterization of supra gingival microbiome associated with dental caries in children. **Journal of Oral Microbiology**, 11: 1557986, 2018.

ANDERSON, M. Risk Assessment And Epidemiology Of Dental Caries: Review Of The Literature. **Pediatr Dent.**, v. 24, n.5, p. 377-385, 2002.

BELSTROM, D.; CONSTANCIAS, F.; LIU, Y.; YANG, L.; DRAUTZ-MOSES, D.I.; SCHUSTER, S.C.; KOHLI, G.S.; JAKOBSEN, T.H.; HOLMSTRUP, P.; GIVSKOV, M. Metagenomic and Metatranscriptomic Analysis of Saliva Reveals Disease-Associated Microbiota in Patients With Periodontitis and Dental Caries. **NPJ Biofilms Microbiomes**, 3:23, 2017.

BENITEZ-PÁEZ, A.; BELDA-FERRE, P.; SIMÓN-SORO, A.; MIRA, A. Microbiota diversity and gene expression dynamics in human oral biofilms. **BMC Genomics.**, Apr 27;15:311, 2014.

BJORNDAL, L. e MJÖR, I. A. Dental Caries: Characteristics Of Lesions And Pulpal Reactions. **Pulp-dentin biology in restorative dentistry**, p. 55-75, 2002.

BOING, A.F.; BASTOS, J.L.; PERES, K.G.; ANTUNES, J.L.; PERES, M.A. Social determinants of health and dental caries in Brazil: a systematic review of the literature between 1999 and 2010. **Rev Bras Epidemiol.**, 17 Suppl 2:102-15. 2014.

BORG-BARTOLO, R.; ROCCUZZO, A.; MOLINERO-MOURELLE, P.; SCHIMMEL, M.; GAMBETTA-TESSINI, K.; CHAURASIA, A.; KOCA-ÜNSAL, R.B.; TENNERT, C.; GIACAMAN, R.; CAMPUS, G. Global prevalence of edentulism and dental caries in middle-aged and elderly persons: A systematic review and meta-analysis. **J Dent.**, Dec;127:104335, 2022.

CAULFIELD, P.W.; CUTTER, G.R.; DASANAYAKE, A.P. Initial Acquisition of Mutans Streptococci by Infants: Evidence for a Discrete Window of Infectivity. **J. Dent Res.**, v.72, n.1, p. 37 -44, 1993.

CHEN, L.; QIN, B.; DU, M.; ZHONG, H.; XU, Q.; LI, Y.; ZHANG, P.; FAN, M. Extensive description and comparison of human supra-gingival microbiome in root caries and health. **PLoS One**, Feb 6;10(2):e0117064, 2015.

CHEN, W.; JIANG, Q.; YAN, G.; YANG, D. The oral microbiome and salivary proteins influence caries in children aged 6 to 8 years. **BMC Oral Health.**, Oct 28;20(1):295, 2020.

CORREIA, M. F.; TENUTA, L.M.A; DEL BEL CURY, A.A.; CURY, J.A. Mineral Ions in the Fluid of Biofilms Formed on Enamel and Dentine Shortly after Sugar Challenge. **Caries Res.**, v.46, p. 408-412, 2012.

COSTA, S.M.; MARTINS, C.C; PINTO, M.Q.C.; VASCONCELOS, M.; ABREU, M.H.N.G. Socioeconomic Factors and Caries in People between 19 and 60 Years of Age: An Update

of a Systematic Review and Meta-Analysis of Observational Studies. **Int J Environ Res Public Health.**, Aug 18;15(8):1775, 2018.

CULLUM, R.; ALDER, O.; HOODLESS, P.A. The next generation: using new sequencing technologies to analyse gene regulation. **Respirology**, 16: 210-222, 2011.

DEL CHEIRICO, F.; ANCORA, M.; MARCACCI, M.; CAMMÀ, C.; PUTIGNANI, L.; SALVATORE CONTI. Choice of Next-Generation Sequencing Pipelines. Alessio Mengoni et al. (eds.), **Bacterial Pangenomics: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology**, vol. 1231, Chapter 3, pages 31-46.

DICK, G.J.; ANDERSSON, A.F.; BAKER, B.J.; SIMMONS, S.L.; THOMAS, B.C.; YELTON, A.P.; BANFIELD, J.F. Community-wide analysis of microbial genome sequence signatures. **Genome Biology.**, 10: R85-1 a R85-16, 2009.

ESPINOZA, J.L.; HARKINS, D.M.; TORRALBA, M.; GOMEZ, A.; HIGHLANDER, S.K.; JONES, M.B., et al. Supragingival plaque microbiome ecology and functional potential in the context of health and disease. **mBio.**, 9(6):e01631-18, 2018.

FEATHERSTONE, J.D.B. The Continuum of Dental Caries – Evidence for a Dynamic Disease Process. **J Dent Res.**, v.83, Spec Iss C, p. C39-C42, 2004.

FECHNEY, J.M.; BROWNE, G.V.; PRABHU, N.; IRINYI, L.; MEYER, W.; HUGHES, T.; BOCKMANN, M.; TOWNSEND, G.; SALEHI, H.; ALDER, C.J. Preliminary study of the oral mycobiome of children with and without dental caries. **Journal of Oral Microbiology**, 11:1536182, 2018.

HUANG, X.; PALMER, S.R.; AHN, S-J.; RICHARD, V.P.; WILLIAMS, M.L.; NASCIMENTO, M.M., et al. A Highly Arginolytic Streptococcus Species That Potently Antagonizes Streptococcus mutans. **Appl Environ Microbiol.**, Jan 29; 82(7):2187-201, 2016.

KASSEBAUM, N.J.; BERNABÉ, E.; DAHIYA, M.; BHANDARI, B.; MURRAY, C.J.L.; MARCENES, W. Global Burden of Untreated Caries: A Systematic Review and Metaregression. **Journal of Dental Research**, v. 94, n. 5, p. 650–658, 2015.

KIDD, E; FEJERSKOV, O. What constitutes dental caries? Histopathology of carious enamel and dentin related to the action of cariogenics biofilms. **J. Dent. Res.**, vol.83, n. C, p. C35-C38, 2004.

KUMAR, S.; KROON, J.; LALLOO, R. A systematic review of the impact of parental socio-economic status and home environment characteristics on children's oral health related quality of life. **Health Qual Life Outcomes**, Mar 21;12:41, 2014.

LEMOS J.A.; ABRANCHES, J.; BURNE, R.A. Responses of cariogenic streptococci to environmental stresses. **Curr Issues Mol Biol** 7:95–107, 2005.

LOESCHE, J.W. Role of Streptococcus mutans in Human Dental Decay. **Microbiol Rev.**, v.50, n.4, p. 353-380, 1986.

MANJI, F.; FEJERSKOV, O.; NAGELKERKE, N.J.D.; BAELUM, V. A random effects model for some epidemiological features of dental caries. **Community Dent. Oral Epidemiol.**, v.19, p. 324-328, 1991.

MARDIS, E.R. Next-generation DNA sequencing methods. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, 9: 387-402, 2008.

MARDIS, E.R. Next generation sequencing platforms. **Annual Review of Analytical Chemistry**, 26(8): 287-303, 2013.

MARK WELCH, J.L.; DEWHIRST, F.E.; BORISY, G.G. Biogeography of the Oral Microbiome: The Site-Specialist Hypothesis. **Annu Rev Microbiol.** 2019 Sep 8;73:335-358.

MARSH, P. D. Are dental diseases examples of ecological catastrophes? **Microbiology**, v. 149, p. 279-294, 2003.

MARSH, P.D.; HEAD, D.A.; DEVINE, D.A. Ecological approaches to oral biofilms: control without killing. **Caries Res.**, 49 Suppl 1:46-54, 2015.

MARSH, P.D. In Sickness and in Health-What Does the Oral Microbiome Mean to Us? An Ecological Perspective. **Adv Dent Res.**, Feb;29(1):60-65, 2018.

MAXAM, A.M.; GILBERT, W. A new method for sequencing DNA. **Proc Natl Acad Sci USA.** 74: 560-564, 1977.

NYVAD, B.; CRIELAARD, W.; MIRA, A.; TAKAHASHI, N.; BEIGHTON, D. Dental caries from a molecular microbiological perspective. **Caries Res.**, 47(2):89-102, 2013.

NYVAD, B.; TAKAHASHI, N. Integrated hypothesis of dental caries and periodontal diseases. **J Oral Microbiol.**, Jan 7;12(1):1710953, 2020.

PITTS, B.G.; ZERO, D.T.; MARSH, P.D.; EKSTRAND, K.; WEINTRAUB, J.A.; RAMOS-GOMEZ, F.; TAGAMI, J.; TWETMAN, S.; TSAKOS, G.; ISMAIL, A. Dental Caries. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, article n. 17030, 2017.

ROSIER, B.T.; MARSH, P.D.; MIRA, A. Resilience of the Oral Microbiota in Health: Mechanisms That Prevent Dysbiosis. **J Dent Res.**, Apr;97(4):371-380, 2018.

TANNER, A.C.R.; KRESSIER, C.A.; ROTHMILLER, S.; JOHANSSON, I.; CHALMERS, N.I. The Caries Microbiome: Implications for Reversing Dysbiosis. **Adv Dent Res.**, Feb;29(1):78-85, 2018.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc Natl Acad Sci USA**, 74: 5463-5467, 1977.

SCHWENDICKE, F.; DORFER, C.E.; SCHLATTMANN, P.; FOSTER PAGE, L.; THOMSON, W.M.; PARIS, S. Socioeconomic inequality and caries: a systematic review and meta-analysis. **J Dent Res.**, Jan;94(1):10-8, 2015.

SEDGHI, L.; DIMASSA, V.; HARRINGTON, A.; LYNCH, S.V.; KAPILA, Y.L. The oral microbiome: Role of key organisms and complex networks in oral health and disease. **Periodontol 2000**, Oct;87(1):107-131, 2021.

SHEIHAM, A.; JAMES, W.P.T. Diet and Dental Caries: The Pivotal Role of Free Sugars Reemphasized. **Journal of Dental Research**, v. 94, n. 10, p. 1341–1347, 2015.

URIBE, S.E.; INNES, N.; MALDUPA, I. The global prevalence of early childhood caries: A systematic review with meta-analysis using the WHO diagnostic criteria. **Int J Paediatr Dent.**, Nov;31(6):817-830, 2021.

VAN HOUTE, J. Role of Micro-organisms in Caries Etiology. **J Dent Res.**, v.73, n.3, p.672-681, 1994.

TAKAHASHI, N.; NYVAD, B. Caries ecology revisited: microbial dynamics and the caries process. **Caries Res.**, 42(6):409-418, 2008.

TAKAHASHI, N. Oral Microbiome Metabolism: From "Who Are They?" to "What Are They Doing?". **J Dent Res.**, 94(12):1628-37, 2015.

TAKAHASHI, N.; NYVAD, B. Ecological Hypothesis of Dentin and Root Caries. **Caries Res.**, 50(4):422-431, 2016.

WADE WG. The oral microbiome in health and disease. **Pharmacol Res.**, 69(1):137-143, 2013.

WADE, W.G. Resilience of the oral microbiome. **Periodontol 2000.**, Jun;86(1):113-122, 2021.

WEN, P.Y.F.; CHEN, M.X.; ZHONG, Y.J., DONG, Q.Q.; Wong, H.M. Global Burden and Inequality of Dental Caries, 1990 to 2019. **J Dent Res.**, Apr;101(4):392-399, 2022.

YAMASHITA, Y.; TAKESHITA, T. The oral microbiome and human health. **J Oral Sci.**, 59(2):201-206, 2017.

ZAURA, E.; KEIJSER, B.J.; HUSE, S.M.; CRIELAARD, W. Defining the healthy "core microbiome" of oral microbial communities. **BMC Microbiol.**, Dec 15;9:259, 2009.

ZAURA, E.; PAPPALARDO V.Y.; BUIJS, M.J.; VOLGENANT, C.M.C.; BRANDT, B.W. Optimizing the quality of clinical studies on oral microbiome: A practical guide for planning, performing, and reporting. **Periodontol. 2000.** 85:210-236, 2021.