

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

Dissertação

Fagos e cárie radicular: análise do metatranscriptoma

Suéllen Panissi Chies

Orientação: Prof^a Dr^a Clarissa Cavalcanti Fatturi Parolo

Porto Alegre, 2024.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

Suéllen Panissi Chies

Fagos e cárie radicular: análise do metatranscriptoma

Dissertação apresentada como parte dos
requisitos obrigatórios para a obtenção do
Título de Mestre em Clínica Odontológica

Orientação: Prof^a Dr^a Clarissa Cavalcanti Fatturi Parolo

Porto Alegre, 2024.

CIP - Catalogação na Publicação

Chies, Suéllen Panissi
Fagos e cárie radicular: análise do
metatranscriptoma / Suéllen Panissi Chies. -- 2024.
51 f.
Orientador: Clarissa Cavalcanti Fatturi Parolo.

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

1. Bacteriófagos. 2. Cárie Radicular. 3.
Transcriptoma. I. Parolo, Clarissa Cavalcanti Fatturi,
orient. II. Título.

Agradecimentos

Primeiramente agradecer a Deus pois sem ele nada disso seria possível.

Aos meus pais Volnei Panissi e Adriana Balbinot Panissi, por todo o apoio sempre que precisei, pelo incentivo ao estudo desde muito cedo, por nunca medirem esforços para que eu alcançasse meus objetivos e meus sonhos, sem vocês isso nunca seria possível.

Ao meu marido Willian Chies por estar do meu lado desde o dia que decidimos traçar nossa caminhada juntos, por não largar a minha mão nunca, por apoiar meus sonhos mesmo que muitas vezes tenha que abdicar da convivência por eles, por ser meu suporte emocional, por me incentivar e lembrar dos meus objetivos sempre que estou desanimada e esgotada, por ser meu porto seguro.

À minha irmã Isabélly Panissi pela parceria durante toda a vida, por saber que sempre que eu precisar terei alguém para contar, pelas longas tarde de estudo e tereré que enfrentamos juntas, com você tudo isso foi mais leve. Agradeço a Deus por todos que citei anteriormente, a minha família, minha base, meu alicerce, meu tudo.

À minha orientadora Prof^a Dr^a Clarissa Cavalcanti Fatturi Parolo por todos os ensinamentos transmitidos durante esses anos de mestrado, por entender meu lado da distância e trabalharmos da melhor maneira possível. Foi uma honra ser sua orientada e espero que possamos trabalhar juntas mais vezes.

Aos meus colegas de mestrado que me acolheram tão bem em uma cidade nova onde não conhecia muitas pessoas, Glenda Marques, Pedro Melecchi, Lara Amanda, Raíssa Ribeiro e João Foly. Em especial um agradecimento a Glenda e Raissa pela amizade e por terem dividido a casa comigo quando precisei. A Raissa por ter me ensinado tanto, por ter sido uma mentora durante este tempo de mestrado. E ao João por ter sido meu companheiro nesta caminhada, desde a primeira vez que nos encontramos, os dois vindos de fora, muito obrigada por ter me ajudado sempre que precisei, agora compartilharemos mais 4 anos de aprendizado. Obrigada pela amizade de todos.

À minha família e amigos do coração por estarmos juntos nessa caminhada da vida, que mesmo com a distância se fazem presentes na minha vida.

À meus sogros Lurde Selle Chies e Valdir Chies que se tornaram meus segundos pais há mais de 10 anos, que sempre me apoiaram e que ficam felizes pela minhas conquistas.

À equipe de Professores da Pós-graduação, em especial aos da cariologia-dentística por todos os ensinamentos passados.

Aos professores e funcionários da Faculdade de Odontologia da UFRGS.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul e à Faculdade de Odontologia da UFRGS, minha casa em Porto Alegre.

Resumo

A cárie dentária é a doença crônica mais prevalente no mundo, que afeta ou já afetou cerca de 80% da população humana, segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS). A cárie radicular ocorre devido a exposição do cemento ou dentina e especialmente está aumentando, provavelmente devido a uma retenção maior de dentes na população mundial. Apesar da cárie ser uma doença multifatorial, os microrganismos do microbioma oral constituem-se como fatores etiológicos primários para a ocorrência da doença. Os fagos estão presentes em abundância nos nichos ecológicos humanos, inclusive na cavidade bucal e devido a sua função lítica e sua função lisogênica podem ter um papel tanto na saúde quanto na doença do hospedeiro. O objetivo deste estudo é identificar os fagos presentes no biofilme e que estariam envolvidos na cárie radicular (RC n=9) e em superfícies radiculares sem a doença (SRS n=10) ao combinar a anotação taxonômica e funcional de dados do metatranscriptoma. Os dados de leitura de sequência foram obtidos como arquivos FASTQ. Anotações taxonômicas e proteicas foram obtidas usando o banco de dados do NCBI. A normalização dos dados dos fragmentos foi realizada utilizando o pacote R DESeq2. A análise estatística para inferir a expressão gênica diferencial entre os grupos de amostras SRS e RC foi realizada utilizando esse mesmo pacote. O número de genes superexpressos e diferencialmente expressos em cada grupo foram calculados e plotados usando o pacote R DEvis. Três tipos de vírus Caudovirale foram identificados a partir dos nossos dados: Myoviridae, Herelleviridae e Siphoviridae. Quase todos esses vírus eram fagos de *Lactobacillus* e expressavam genes que foram significativamente e positivamente regulados nas amostras de RC (log₂FC variando de -27,7 a -2,7). Os fagos que apresentam expressão diferencial em doença com significância estatística são: *Lactobacillus phage phiAQ113*, *Lactobacillus phage Lfelnf*, *Lactobacillus phage Lrm1*, *Lactococcus phage Q33*, *Lactobacillus prophage Lj771*, *Lactobacillus phage KC5a* e *Lactobacillus phage Ldl1* (proteína da fita métrica), o que vai de acordo com os fagos que apresentaram a maior magnitude de diferença entre pacientes SRC e RC. Também, dois fagos de *Streptococcus* foram encontrados em nosso estudo, o fago *M102AD* e *IPP24* ambos encontrados em maior quantidade em pacientes RC, no entanto sem diferença estatística. Os genes expressos nesse estudo codificam para partes estruturais dos fagos (placa, capsídeo, cauda e DNA polimerase), lisina e proteínas hipotéticas ainda sem função definida. Neste estudo todos os fagos foram

encontrados em maiores quantidades em pacientes que apresentam lesões de cárie ativa indicando que estes fagos possam estar associados ao surgimento e manutenção desta doença, porém mais estudos são necessários para podermos de fato associar os fagos com a doença cárie e também para conhecermos melhor os fagos e suas funções dentro do microbioma oral humano.

Palavras chaves: Bacteriófagos; Cárie Radicular; Transcriptoma

Abstract

Dental caries is the most prevalent chronic disease in the world, which affects or has already affected about 80% of the human population, according to data from the World Health Organization (WHO). Root caries occurs due to exposure of cementum or dentin and is especially increasing, probably due to increased tooth retention in the world population. Although caries is a multifactorial disease, the microorganisms of the oral microbiome are primary etiological factors for the occurrence of the disease. Phages are present in abundance in human ecological niches, including in the oral cavity and due to their lytic function and their lysogenic function can play a role in both health and host disease. The objective of this study is to identify the phages present in biofilm and that would be involved in root caries (RC n=9) sound root surfaces (SRS n=10) by combining the taxonomic and functional annotation of meta-transcriptome data. Sequence reading data were obtained as FASTQ files. Taxonomic and protein annotations were obtained using the NCBI database. The data normalization of the fragments was performed using the R DESeq2 package. Statistical analysis to infer the differential gene expression between the groups of SRS and RC samples was performed using this same package. The number of overexpressed and differentially expressed genes in each group were calculated and plotted using the R Devis package. Three types of Caudovirale virus were identified from our data: Myoviridae, Herelleviridae and Siphoviridae. Almost all of these viruses were Lactobacillus phages and expressed genes that were significantly and positively regulated in RC samples (log₂FC ranging from -27.7 to -2.7). The phages that present differential expression in disease with statistical significance are: *Lactobacillus Phage phiAQ113*, *Lactobacillus Phage LfeInf*, *Lactobacillus Phage Lrm1*, *Lactococcus Phage Q33*, *Lactobacillus prophage Lj771*, *Lactobacillus phage KC5a* e *Lactobacillus phage Ldl1* (tape measure protein), which goes according to the phages that presented the greatest magnitude of difference between CRS and RC patients. Also, two phages of Streptococcus were found in our study, phage M102AD and IPP24 both found in greater quantity in RC patients, however without statistical difference. The genes expressed in this study are primarily parts of the structure of the phage (plate base proteins, capsid, tail proteins, and DNA polymerase), lysine, and hypothetical proteins without defined function. In this study, all phages were found in greater quantities in patients with active caries lesions

indicating that these phages may be associated with the emergence and maintenance of this disease, but more studies are needed to be able to actually associate phages with caries disease and also to better understand phages and their functions within the human oral microbiome.

Key-Words: Bacteriophages; Root Caries; Transcriptome.

Equipe Executora

Aluna de Pós-Graduação:

Suéllen Panissi, Mestranda em Clínica Odontológica com ênfase em Cariologia – Dentística do Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Orientadora:

Prof^a. Dr^a. Clarissa Cavalcanti Fatturi Parolo, Doutora em Odontologia, Professora Adjunta do Departamento de Odontologia Preventiva e Social da UFRGS.

Colaboradores:

Nailê Damé-Teixeira: Doutora em Odontologia. Professora da universidade de Brasília .

Thuy Do: Doutora em Microbiologia. Professora do Dental Institute, University of Leeds.

Instituições envolvidas

Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.

Faculdade de Odontologia, Universidade de Leeds, Leeds, Reino Unido.

Faculdade de Odontologia, Universidade de Brasília, Brasília, Brasil.

Sumário

Resumo	6
Abstract	8
Key-Words: Bacteriophages; Root Caries; Transcriptome.	9
Sumário	11
Lista de Abreviaturas	12
Revisão de Literatura	13
Fagos	15
Classificação	15
Estrutura	17
Ciclo de vida	18
Ciclo Lítico	20
Fagos e Odontologia	21
Considerações finais e objetivos do presente estudo	24
Artigo 1	26
Abstract	26
Introduction	27
Materials and methods	28
Patient selection, eligibility criteria, ethical considerations, and clinical sampling	28
Calculation of data and sample size	29
RNA isolation, rRNA depletion, and sequencing	30
Data analysis	30
Results	31
Discussion	33
Conclusion	38
REFERENCES	39

Lista de Abreviaturas

OMS - Organização Mundial de Saúde

pH - Potencial Hidrogênico

EPH - Hipótese da placa ecológica

ICTV - Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

SRS - Grupo Superfície radicular hígida

RC- Grupo cárie radicular

NCBI - Sequence Read Archive do National Center for Biotechnology Information

RNA - Ácido Ribonucleico

dsDNA- DNA de fita dupla

ssDNA - DNA de fita simples

VLPs - Partículas semelhantes a vírus

Revisão de Literatura

A cárie dentária é a doença crônica mais prevalente no mundo, que afeta ou já afetou cerca de 80% da população humana, segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS). A cárie dentária é provocada pela redução do pH do biofilme bucal abaixo de um certo limite onde ocorre a desmineralização do esmalte, iniciando o processo da lesão, esta redução é provocada por ácidos oriundos da dieta metabolizados por microrganismos presentes na cavidade bucal [Mira et al., 2017]. A competência imunológica, característica do esmalte, fatores ambientais externos e componentes salivares são fatores que juntamente com os microrganismos estão relacionados às taxas da doença cárie, fazendo com que a mesma seja conhecida como uma doença multifatorial [Mira et al., 2017]. As ideias sobre o desenvolvimento da doença cárie evoluíram ao longo do tempo e a hipótese que geralmente é aceita é a denominada Hipótese da Placa Ecológica (EPH) proposta por Philip D. Marsh em 1994, onde o mesmo sugeriu que o aparecimento da doença é resultado de um desequilíbrio do microbioma devido ao estresse patológico, resultando no crescimento de patógenos orais relacionados à doença [Rosier et al., 2014].

A cárie radicular, especialmente, está aumentando, provavelmente devido a uma retenção maior de dentes na população mundial, que é consequência de melhores cuidados bucais em geral. Conforme as pessoas envelhecem há um aumento das superfícies radiculares expostas, que juntamente com a diminuição do fluxo salivar contribuem para uma maior possibilidade de desenvolvimento da cárie radicular [Beck, 1990; Peres et al., 2019]. A cárie radicular ocorre devido a exposição do cemento ou dentina tornando estas superfícies suscetíveis ao seu desenvolvimento [Takahashi, Nyvad, 2016]. Há um processo sugerido sobre desenvolvimento da cárie radicular, a ser realizado em duas etapas, onde uma etapa envolve a desmineralização da porção inorgânica e outra etapa a degradação da matriz orgânica exposta a colagenase [Takahashi, Nyvad, 2016]. O papel do biofilme da fase orgânica ainda é desconhecido e o conhecimento das funções do biofilme na cárie radicular podem auxiliar de maneira importante na elaboração de estratégias para o controle desta doença, baseando-se na modulação microbiana, em razão de que as estratégias atuais para o manejo desta doença podem ser um desafio [Takahashi, Nyvad, 2016; Paris et al., 2020]

O estudo da microbiota oral concentrou-se até há pouco tempo principalmente

em bactérias, devido sua abundância, fácil detecção e cultivabilidade. É evidente atualmente que estudar comunidades microbianas através de seus constituintes de maneira individual, não torna possível descrever as relações complexas que existem nas comunidades. Grandes avanços tecnológicos permitiram estudar comunidades como um todo, o que revelou um universo microbiano oral excepcionalmente diversificado [Baker et al., 2017].

Os vírus e fagos são os seres biológicos mais abundantes da terra, porém o componente viral do microbioma humano (viroma), tem sido pouco estudado. Os vírus, principalmente esquecidos no contexto de sua influência sobre as bactérias e o microbioma humano na saúde, embora tenha se demonstrado que os vírus afetam comunidades microbianas em muitos ecossistemas ambientais [Baker et al., 2017; Wang, Gao, Zhao, 2015]. É de conhecimento de que seres humanos saudáveis apresentam uma grande variedade de vírus que infectam células eucariotas e procariotas (fagos), também descobriu-se que o sangue, antes tido como estéril em humanos, em condições de saúde, apresenta vírus e fagos [Baker et al., 2017].

Um estudo realizado por Pride et al [2011] constatou que os Vírus predominam a cavidade bucal e a maioria destes vírus são fagos. Os fagos apresentam um papel relevante na lisogenia devido a sua função genética o que sugere que eles apresentam um papel significativo no delineamento da diversidade microbiana da cavidade bucal [Pride et al., 2011]. Acredita-se que os bacteriófagos apresentam uma influência importante nas estruturas das comunidades bacterianas ao executar pressões de seleções sobre estas comunidades [Wang, Gao, Zhao, 2015]. O conhecimento atual do microbioma oral humano origina-se especialmente de pessoas saudáveis, conhecendo-se pouco sobre as alterações associadas a doenças orais, tanto alterações funcionais específicas quanto alterações microbianas [Wang et al., 2013]. Devido ao sua função lítica (podendo erradicar certas bactérias), sua função lisogênica (transmite novas funções ao hospedeiro) e sua vasta quantidade nos nichos ecológicos humanos, os bacteriófago podem ter capacidade de alterar comunidades de bactérias e como consequência ter um papel na saúde ou na doença do hospedeiro [Pride et al., 2011].

O número total de células bacterianas na Terra é de cerca de 10^{30} , enquanto o número das partículas fágicas é provavelmente dez vezes maior [Olszak et al., 2017]. Existem no biofilme dental aproximadamente 1.010 partículas semelhantes a vírus (VLPs) por grama de placa e na saliva 108 VLPs por ml de saliva [Naidu et al.,

2014]. Os fagos podem ser encontrados nos mesmos habitats que suas presas, e estudos como o de Caselli et al 2020 detectaram fatos em regiões como dorso da língua, palato duro, mucosa bucal, gengiva queratinizada, placa sub e supragengival e saliva [Naidu et al., 2014].

Fagos

Apesar de descobertos no final do século XIX, os fagos ou bacteriófagos ainda são um mistério da biologia moderna, são parasitas intracelulares obrigatórios de procariontes. Os fagos são vírus capazes de destruir bactérias, são as entidades biológicas mais comuns na terra e foram descritos primeiramente por Twort e D'Hérelle, mas foi D'Hérelle quem aplicou o termo há uma substância isolada das fezes. Esta descoberta trouxe vários estudos e a criação do grupo “fagos” onde Max Delbrück, James Watson e Francis Crick foram os cientistas mais consideráveis [Olszak et al., 2017; Steier, de Oliveira, de Figueiredo, 2019].

Os fagos encontram-se em um número provavelmente 10x maior que as bactérias e são facilmente encontrados na biosfera, eles estão em todas as partes e afetam as população de bactérias em todos os ambientes, tendo como único fator que possa limitar seu acontecimento a presença de hospedeiros microbianos. [Olszak et al., 2017]

A influência dos fagos vai muito além de controlar as populações ou comunidades bacterianas, os fagos tem grande influência nos ecossistemas locais e globais devido sua abundância e diversidade [Olszak et al., 2017]. As interações entre fagos e seus hospedeiros vão muito além do que as relações características encontradas entre predador e presa [Olszak et al., 2017]. Ao longo dessa revisão as características dos fagos, bem como do seu papel nos biofilmes orais serão explorados.

Classificação

Os fagos são classificados de acordo com o Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV), que é baseado em homologações e sequências gênicas e protéicas [Lawrence, Baldrige, Handley, 2019].

A ordem de fagos melhor classificada e os primeiros a serem atenciosamente estudados é a Caudovirales, que é dividida em cinco famílias. Posteriormente, outros tipos de fagos, incluindo os fagos filamentosos de DNA de fita simples (ssDNA) Inoviridae e as famílias ssDNA Microviridae também foram descritos. O ICTV define atualmente 19 famílias de fagos, mas as mencionadas anteriormente representam as melhores caracterizadas [Lawrence, Baldrige, Handley, 2019].

Os fagos antigamente eram subdivididos em 6 grupos morfológicos [Novik, Ladutska, Rakhuba 2017]:

A - Compostos por fagos com Capsídeo e cauda longa com bainha contrátil;

B - Compostos por fagos com Capsídeo e cauda longa com bainha rígida;

C - Compostos por fagos com Capsídeo e cauda curta;

D - Representados por Nucleocapsídeo de grande porte com estruturas superficiais fibrosas ou pontiagudas;

E - Fagos incorporando um nucleocapsídeo;

F - Fagos semelhantes a bastonetes ou filamentosos.

O esquema de classificação atual utiliza mais de 40 critérios para sua classificação e as famílias são diferenciadas de acordo com o tipo de ácido nucléico e a morfologia do virião [Novik, Ladutska, Rakhuba 2017]. E são classificados como:

1- Bacteriófagos de cauda: Da ordem Caudovirales, representa o grupo mais numeroso, o capsídeo é composto por revestimento proteico e DNA linear de fita dupla, não possuem envelope externo, possuem cabeça em formato de icosaedro e com base na peculiaridade de cada cauda os Caudovirales foram divididos inicialmente em 3 famílias Myoviridae, Siphoviridae e Podoviridae, sendo as três famílias melhores caracterizadas [Novik, Ladutska, Rakhuba 2017; Lawrence, Baldrige, Handley, 2019]. A família Myoviridae abrange grandes vírions (partículas fágicas) com longa cauda contrátil; Siphoviridae, incluindo vírions com cauda longa, flexível, mas não contrátil; e Podoviridae, abrangendo pequenos vírions com cauda curta e não contrátil [Novik, Ladutska, Rakhuba 2017]. Foram descritas, mais recentemente, outras duas famílias Ackermannviridae e Herelleviridae [Lawrence, Baldrige, Handley, 2019].

2- Fagos sem cauda: Corresponde apenas 4% dos vírus identificados e classificados, são agrupados morfológicamente em 3 tipos: a) fagos com capsídeos poliédricos (na forma de icosaédricos ou formato semelhante com simetria cúbicas);

b) fagos filamentosos; c) fagos com capsídeos de formatos diversos e sem exiso e simetrias visíveis [Novik, Ladutska, Rakhuba 2017].

3- Bacteriófagos contendo DNA com capsídeos poliédricos: Família *Micreviridae*, os vírions tem formato icosaédrico e apresentam no capsídeo DNA de fita dupla. São subdivididos em duas famílias: Família *Corticoviridae* (com um único fago PM2) e Família *Tectiviridae* [Novik, Ladutska, Rakhuba 2017].

4- Bacteriófagos contendo RNA com capsídeos poliédricos: Família *Leviviridae* tem como característica distinta a presença de RNA de fita monofilamentar e Família *Cystoviridae* que apresenta apenas um bacteriófago, apresenta RNA polimerase e 3 moléculas de RNA de fita dupla [Novik, Ladutska, Rakhuba 2017].

5- Bacteriófagos filamentosos: Formado pela Família *Inoviridae* (DNA monofilamentar), Família *Lipotrixviridae* (DNA de fita dupla) e Família *Rudiviridae* (DNA de fita dupla) [Novik, Ladutska, Rakhuba 2017].

6- Bacteriófagos Pleomorficos: Família *Plasmaviridae* com apenas um membro MVL2 (L2), fago sem capsídeo bem definido e que apresenta DNA de cadeia dupla [Novik, Ladutska, Rakhuba 2017].

Estrutura

O capsídeo do bacteriófago ou invólucro proteico é onde está localizado o conteúdo genético do vírus, podendo variar de acordo com sua forma e ser icosaédrico, filamentosos ou cabeça-cauda [Steier, de Oliveira, de Figueiredo, 2019].

A estrutura de um bacteriófago (figura 1) Caudovirales, que é a prevalentemente encontrada na cavidade bucal, é formada por [Steier, de Oliveira, de Figueiredo, 2019]:

- Cabeça: onde o capsídeo contém a fita dupla de DNA, juntamente com proteínas internas.
- Pescoço: conecta cabeça e cauda.
- Cauda: estrutura tubular que permite a passagem do DNA quando em contato com a superfície bacteriana.
- Fibras da cauda: proteínas que se fixam à superfície bacteriana.
- Placa final: contém pinos que penetram na membrana para permitir a liberação do DNA do fago no anfitrião.

Os Caudovirales são os fagos de maior interesse da cavidade oral, o genoma dos Caudovirales é de DNA linear de fita dupla e o número de genes pode variar de quatro a várias centenas, eles apresentam um capsídeo composto por uma capa protéica, sua cabeça possui simetria cúbica de tipo icosaédrico regular ou alongado, não apresentam um envelope externo, possuem capsômeros que são visíveis apenas sob microscopia eletrônica direta e sua cauda forma uma espiral onde nela contém uma placa final, pinos e/ou fibras para a adsorção à superfície de células bacterianas. O seu genoma geralmente consiste em unidades estruturais intercambiáveis de módulos e os genes responsáveis por funções semelhantes são agrupados em clusters [Steier, de Oliveira, de Figueiredo, 2019; Novik, Ladutska, Rakhuba 2017].

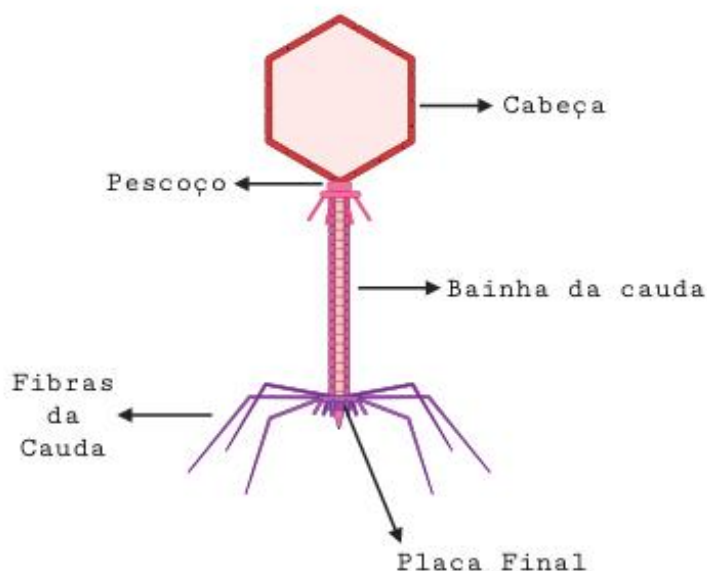


Figura 1: Estrutura geral de um bacteriófago Caudovirales. Criado com Biorender.com

Ciclo de vida

O ciclo de vida de um bacteriófago (figura 2) varia de acordo com o seu efeito na estrutura bacteriana. Ele é chamado de ciclo de vida lítico se o vírus levar à morte da célula hospedeira. E é chamado de ciclo de vida lisogênico quando o seu DNA for copiado no DNA do hospedeiro, recombinando-se com os cromossomos

bacterianos cada vez que a célula se divide, integrando-se ao cromossomo como um profago [Steier, de Oliveira, de Figueiredo, 2019].

Os profagos são os envolvidos no ciclo de vida lisogênico, onde há uma transferência horizontal de genes que pode contribuir para mudanças benéficas no metabolismo do hospedeiro, sobre condições apropriadas estes fagos podem resultar na obtenção de novos fatores de virulência, mecanismos de resistência e regulação positiva do metabolismo em geral, o que resulta em um impacto no ambiente local lhe dando uma vantagem sobre outros microrganismos e remodelando nichos ecológicos [Olszak et al., 2017].

Os fagos temperados podem ser lisogênicos ou líticos dependendo das condições do ambiente, principalmente sob condições de estresse, o fago temperado prossegue para o seu ciclo lítico. A parte lítica do ciclo do fago é idêntica para fagos líticos e temperados [Olszak et al., 2017].

Mais recentemente, foram observados outros dois ciclos de vida (figura 2) nos fagos: os ciclos pseudolisogênico e infecção crônica. Os fagos pseudolisogênicos foram descritos como em um estado de “desenvolvimento paralisado”, seguindo as condições ambientais podem sofrer estilos de vida líticos ou lisogênico, ocorre tanto em fagos líticos como temperados . Estes fagos podem ser referidos como um “estado de transporte”, o material genético deste fago permanece livre no citosol ao invés de ser incorporado no genoma do seu hospedeiro. Já a infecção crônica é o tipo final de ciclo de vida, ela possui semelhança com o ciclo de vida lítico porque o fago se replica ativamente no hospedeiro e produz descendência viral, porém diferentemente dos fagos líticos, os fagos crônicos não lisam o seu hospedeiro exportando a descendência viral por meio uma variedade de mecanismos [Lawrence, Baldrige, Handley, 2019].

Porém, os bacteriófagos de interesse na odontologia em sua maioria são líticos ou chamados também de fagos virulentos. Eles se comportam como vírus, usando os recursos celulares para se replicar e fazendo com que ocorra a ruptura da célula no processo [Steier, de Oliveira, de Figueiredo, 2019].

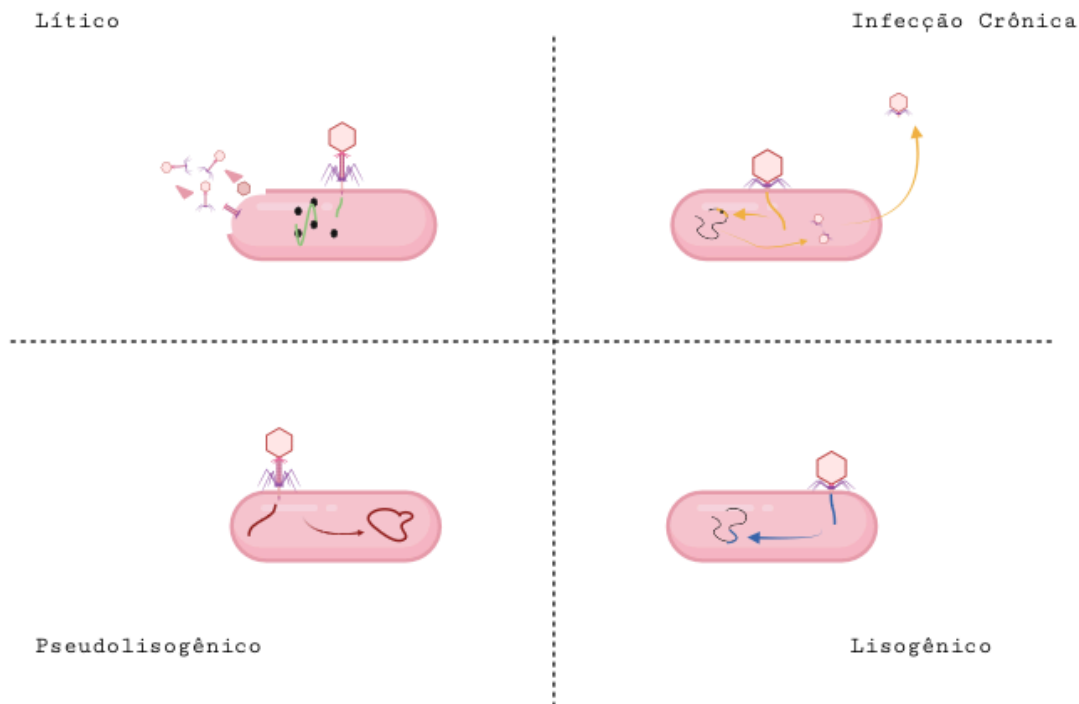


Figura 2: Os quatro estágios de vida dos fagos mais estudados. O estágio de vida lítica consiste na multiplicação do fago e na eventual destruição da bactéria hospedeira. A infecção crônica gera prole viral, porém não destrói a célula. Os fagos em estado pseudolisogênico inserem DNA que permanece circulando no citoplasma. Já o estágio lisogênico envolve a integração dos fagos ao genoma do hospedeiro ou sua inserção como plasmídeos, sem replicação acontecer. Criado com Biorender.com

Ciclo Lítico

O ciclo lítico (figura 3) consiste nas seguintes fases [Steier, de Oliveira, de Figueiredo, 2019]:

1. Ligação: As proteínas da cauda se conectam a um receptor na superfície celular da bactéria;
2. Injeção de DNA: O fago injeta o genoma do DNA através da cauda no citoplasma da bactéria;
3. Replicação do DNA: O DNA do bacteriófago é reproduzido na célula bacteriana, resultando na síntese de proteínas e na formação de novos capsídeos;

4. Montagem de bacteriófagos: Capsídeos são preenchidos com novas partículas fágicas formadoras de DNA;
5. Lise: Os genes criam aberturas na membrana plasmática e nas paredes celulares da bactéria, permitindo a passagem de água e fazendo com que ela se expanda e se rompa, liberando diversos novos bacteriófagos capazes de infectar bactérias próximas.

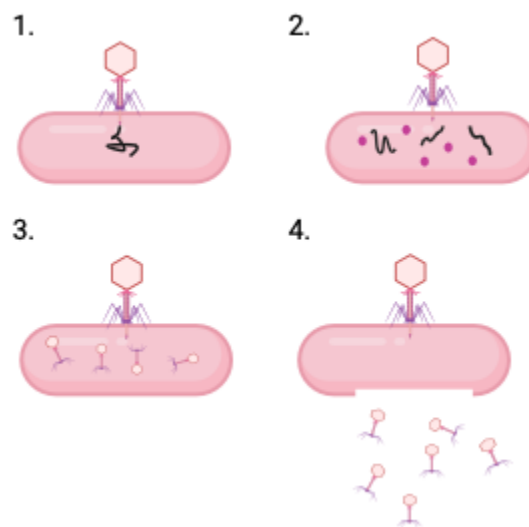


Figura 3: O ciclo lítico de um bacteriófago consiste em várias etapas: (1) adesão ao receptor da célula hospedeira; introdução do seu material genético; (2) replicação do DNA viral e produção de novas proteínas virais; (3) montagem de novas partículas de bacteriófagos; (4) ruptura da célula hospedeira e libertação dos novos fagos. Criado com Biorender.com

Fagos e Odontologia

A diversidade de fagos na cavidade oral do ser humano é surpreendente. Supõe-se que existam mais de 2.000 fagos orais conhecidos por infectar espécies principalmente nos filos Actinomycetota (anteriormente Actinobacteria, que contém espécies cariogênicas de *Scardovia* e *Actinomyces*), Bacteroidota, Fusobacteriota, Pseudomonadota e Bacillota (anteriormente Firmicutes, que contém espécies cariogênicas de *Streptococcus* e *Lactobacillus*) [Szafranski, Slots, Stiesch, 2021].

Um estudo realizado por Ly et al. [2014] nos mostrou que os vírus podem servir como indicadores de saúde bucal, porque supõe que os vírus presentes no biofilme dental da periodontite tenham uma chance consideravelmente maior de eliminar suas bactérias hospedeiras do que os encontrados em cavidades bucais saudáveis.

Em outro estudo realizado por Wang et al. [2013] foram coletadas amostras de placa e swab em estado de saúde ou doença periodontal em mulheres de 30 a 65 anos, neste estudo houve a identificação de certos fagos orais, estes não foram distribuídos de forma uniforme, variando de acordo com diferentes estados periodontais e diferentes tipos de amostras. Este estudo também demonstrou que a abundância de determinados fagos foi consistente com os hospedeiros bacterianos correspondentes, o que sugere o possível envolvimento de fagos na formação de ecossistemas microbianos orais.

Um estudo clínico realizado por Wang, Gao, Zhao, [2015] estudou indivíduos com diferentes condições periodontais (os dados foram separados de acordo com os tipos de amostra, incluindo saliva de indivíduos periodontalmente saudáveis, biofilme de indivíduos periodontalmente saudáveis e biofilme de indivíduos com doença periodontal), demonstrou que as comunidades de fagos podem diferir entre si para indivíduos saudáveis, porém mostraram uma tendência à homogeneização para amostras de gengivas doentes [Wang, Gao, Zhao, 2015].

Foi sugerido que os fagos podem ser importantes na determinação do estabelecimento, manutenção e patogenicidade das bactérias cariogênicas, havendo sido demonstrado que fagos específicos de *Streptococcus* podem aumentar a virulência bacteriana [Delisle et al., 2012] e, também, fagos que infectam espécies de *Actinomyces* promovem o desenvolvimento do biofilme [Shen, et al., 2018]. Embora se saiba pouco sobre os fagos de *Streptococcus mutans*, eles podem ser uma forma inovadora de biocontrole específica e não tóxica devido sua capacidade de penetrar os biofilmes, podendo ser fatores importantes na determinação do estabelecimento, manutenção e patogenicidade deste cariogênico, podendo ser aplicados na prevenção e tratamento da cárie dentária [Ribeiro, Paster, 2023; Delisle et al., 2012]. Alguns produtos genéticos codificados como hidrolases de peptidoglicano (endolisinas), podem ser utilizados clinicamente como agentes diagnósticos e terapêuticos para tratar ou prevenir a doença cárie, porque os mesmos possuem o potencial de lisar e matar bactérias cariogênicas *in vivo*

possivelmente de uma forma direcionada, não afetando organismos não cariogênicos importantes para a manutenção de uma boa saúde oral [Delisle et al., 2012]. Como por exemplo, fagos podem ser modificados para expressar o peptídeo antimicrobiano C16G2220, que possui como alvo específico o *S. mutans* e pode ser usado na terapia anti cárie. Também a lisina ClyR é ativa contra *S. mutans* e *S. sobrinus* ambas espécies cariogênicas, mas não é ativa contra outras espécies como *Streptococcus comensais*, *S. sanguinis*, *S. oralis* e *S. salivarius* [Xu, et al., 2018].

Até o momento, apenas uma pequena fração de fagos e suas lisinas foram explorados, alguns fagos como fagos para *Actinomyces naeslundii*, *Enterococcus faecalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Veillonella spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Neisseria spp.*, *Streptococcus spp.* e *Fusobacterium nucleatum* foram isolados e caracterizados [Xu, et al., 2018; Ribeiro, Paster, 2023]. Um estudo realizado por Dalmaso et. al 2015, isolou fagos de *Streptococcus mutans* para testar suas propriedades antimicrobianas. Um fago de *Streptococcus* Φ APCM01 isolado no estudo apresentou propriedades antimicrobianas promissoras como a capacidade de reduzir o crescimento de *S. mutans* e a formação de biofilme. O Φ APCM01 teve como alvo apenas a cepa DPC6143 de *S. mutans* das 17 cepas testadas, o que é importante, pois esta cepa é do sorotipo e, que é o segundo sorotipo de *S. mutans* mais presente na cavidade oral após o sorotipo c. O estudo também trouxe que a combinação da fago Φ APCM01 com outros tipos de fagos de *S. mutans* formando um coquetel de fagos é mais eficiente pois aumenta a gama de hospedeiros e limita o risco de adaptação bacteriana além de que outras formas de controles como como óleos essenciais e frações bioativas, bactérias comensais, bacteriocinas e bactérias probióticas poderia compensar a estreita gama de hospedeiros e aumentar as chances de prevenir o desenvolvimento de biofilme de *S. mutans* e a formação de cárie. Devido aos avanços tecnológicos que permitiram compreender o microbioma oral associados à doença cárie [Ribeiro, Paster, 2023] novas perspectivas dentro do estudo do microbioma estão sendo pautadas. Mas apesar desta ideia promissora, não existem ainda estudos clínicos com aplicação de fagos para tratamento de cárie dentária, a maior parte dos estudos foca em desfechos secundários associados à doença.

Outras áreas da odontologia já estudam os fagos e sua relação com as doenças bucais, como por exemplo na área periodontal, já sabe-se que pessoas saudáveis tem uma comunidade mais diversificada de bacteriófagos [Wang, Gao, Zhao, 2015], terapias podem ser desenvolvidas baseadas nessas comunidades; na área endodôntica há estudos sobre os efeitos dos fagos nas lesões endodônticas, porém restritos ainda ao *Enterococcus faecalis* [Tinoco, et al., 2016; Paisano et al., 2004]; Na área da implantodontia houve a identificação de um bacteriófago que se ligou a superfície da zircônia o que pode indicar que este fago possa interferir nos biofilmes que causam a periimplantite [Hashimoto, et al., 2011]; E para finalizar na área da patologia uma pesquisa descobriu que os peptídeos bacteriófagos são capazes de estimular a multiplicação de células epiteliais na mucosa oral humana sem causar o desenvolvimento de tumores [Li, et al. 2016], portanto os fagos podem auxiliar na cicatrização da mucosa oral [Steier, de Oliveira, de Figueiredo, 2019].

Considerações finais e objetivos do presente estudo

Devido a sua função lítica (podendo erradicar certas bactérias), sua função lisogênica (transmite novas funções ao hospedeiro) e sua vasta quantidade nos nichos ecológicos humanos, os bacteriófagos podem ter capacidade de alterar comunidades de bactérias e como consequência ter um papel na saúde ou na doença do hospedeiro [Pride et al., 2011]. O conhecimento atual do microbioma oral humano origina-se especialmente de pessoas saudáveis, conhecendo-se pouco sobre as alterações associadas a doenças orais, tanto alterações funcionais específicas quanto alterações microbianas [Wang, et al., 2013].

Nos últimos anos, o sequenciamento do RNA-seq proporcionou novas oportunidades na área da análise do transcriptoma. A análise metatranscriptômica oferece uma perspectiva mais informativa em comparação com a metagenômica, pois estuda principalmente o perfil de expressão gênica e a função *in situ* das comunidades, com isso, pode revelar detalhes sobre populações que são transcricionalmente ativas e não apenas identificar o conteúdo genético de populações bacterianas como mostrado na análise metagenômica em que não há distinção se o DNA genômico utilizado na análise é oriundo de células viáveis ou não, nem se os genes previstos são realmente expressos e em que condições

[Bashiardes, Zilberman-Schapira, Elinav, 2016; Huang et al., 2021].

Há poucos estudos que trabalham com fagos e sua importância para o desenvolvimento de doenças orais e ainda nada específico sobre a cárie radicular, sendo assim, o objetivo deste estudo é identificar os fagos presentes no biofilme e que estariam envolvidos na cárie radicular e em ambientes sem a doença ao combinar a anotação taxonômica e funcional de dados meta-transcriptômicos.

Os objetivos específicos do presente estudo são:

- Analisar a expressão diferencial dos fagos nas condições de saúde e doença estudadas;
- Caracterizar possíveis fagos envolvidos na doença cárie.

A hipótese do nosso estudo é de que há diferença na comunidade de fagos entre ambientes de saúde e ambientes que apresentem a doença cárie.

Artigo 1

Transcriptome analysis of human root surface biofilm - phage expression in health and caries lesion

Abstract

Introduction: Phages are present in the dental biofilm. Due to their lytic and lysogenic functions, they may play a role in health or caries disease that has the microbiome as the primary etiological factor. Very little is known about the phages related to the cariogenic biofilm. **Objectives:** This study aims to identify the phages in the biofilm that would be involved in root caries (RC, n=9) compared with their gene expression in sound root surfaces (SRS =10) through metatranscriptome analysis. **Methodology:** SRS and RC biofilm samples were collected and stored. Samples with total RNA concentration <30 ng were grouped, resulting in 10 samples of healthy root surface and nine samples of biofilm of root caries. Statistical analysis was performed to infer the differential gene expression between the groups of SRS and RC samples using the R DESeq2 package. The number of overexpressed and differentially expressed genes in each group was analyzed using the R Devis package. **Results:** Three types of Caudovirale virus were identified from the samples: Myoviridae, Herelleviridae, and Siphoviridae. Almost all of these viruses were Lactobacillus phages and expressed genes significantly and positively regulated in RC samples (log2FC ranging from -27.7 to -2.7). The phages differentially expressed in root caries are: *Lactobacillus Phage phiAQ113*, *Lactobacillus Phage LfeInf*, *Lactobacillus Phage Lrm1*, *Lactococcus Phage Q33*, *Lactobacillus prophage Lj771*, *Lactobacillus phage KC5a* e *Lactobacillus phage Ldl1*. The genes expressed in this study are primarily parts of the structure of the phage (plate base proteins, capsid, tail proteins, and DNA polymerase), lysine, and hypothetical proteins without defined function. **Conclusion:** In this study, there was a higher gene expression of phages in patients with active caries lesions, indicating that these phages may be associated with the emergence and maintenance of this disease. Further studies are needed to confirm the association of phages with caries

disease and better understand phages and their functions within the human oral microbiome.

Key-Words: Bacteriophages; Root Caries; Transcriptome.

Introduction

Root caries are significantly increasing, probably due to increased tooth retention in the world population, resulting from better oral care. As people age, there is an increase in exposed root surfaces, which, together with decreased salivary flow and reduced ability to maintain oral hygiene, contribute to a greater possibility of root caries [Beck, 1990; Peres et al., 2019; Hellyer, 2021]. The root's surface is covered with cementum. Suppose the gum does not protect this cementum; factors such as inadequate tooth brushing or periodontal treatment of root surfaces often damage or altogether remove the cementum, exposing the underlying dentin.

Dental biofilms are complex microbial communities that colonize tooth surfaces. These biofilms consist of a diverse array of bacteria, fungi, and other microorganisms. Within this microbial universe, countless species coexist and interact, forming dynamic ecosystems that play crucial roles in oral health and disease. The interactions between microbial species within dental biofilms are paramount. These interactions can be cooperative, competitive, or neutral, shaping the overall community structure and function. Cooperation among certain species allows for synthesizing essential nutrients and facilitates biofilm stability. Conversely, competition for resources can lead to the dominance of certain species, potentially contributing to oral diseases such as cavities and periodontal disease. The dynamics of microbial communities within dental biofilms are constantly evolving. Factors such as pH, nutrient availability, and host immune responses influence the composition and abundance of microbial species over time. Understanding these community dynamics is crucial for developing effective strategies to maintain oral health and prevent diseases associated with dysbiosis or microbial imbalance. As we delve deeper into the microbial world within dental biofilms, we gain valuable insights into the complexities of oral health and disease. By recognizing the importance of microbial interactions and community dynamics, we can strive towards promoting a balanced oral microbiome and improving overall well-being [Benítez-Páez et al.,

2014; Marsh, 1994; Marsh, Zaura, 2017; Simón-Soro, 2013]. Significant technological advances (with the use of OMICS) allowed studying communities as a whole, which revealed an exceptionally diverse oral microbial universe [Baker et al., 2017]. Viruses and phages are the most abundant biological beings on earth, but the viral component of the human microbiome (virome) has been little studied. Viruses are mostly forgotten in the context of their influence on bacteria and the human microbiome in health, although it has been shown that viruses affect microbial communities in many environmental ecosystems [Baker et al., 2017; Wang, Gao, Zhao, 2015].

It is known that healthy humans have a wide variety of viruses that infect eukaryotes and prokaryotes (phages) [Baker et al., 2017]. Bacteriophages are believed to have an essential influence on bacterial community structures when performing selection pressures on these communities [Wang, Gao, Zhao, 2015]. Due to its lytic function (being able to eradicate certain bacteria), its lysogenic function (transmits new functions to the host), and its vast amount in human ecological niches, bacteriophage may have the ability to alter bacterial communities and consequently have a role in host health or disease [Pride et al., 2011]. Only some studies have worked with phages and their importance in developing oral diseases. However, there is no study on the involvement of phages in root caries. Thus, this study aims to identify the phages present in the biofilm that would be involved in root caries combining the taxonomic and functional annotation of meta-transcriptomic data. The hypothesis of our study is that there is a difference in the phage community between healthcare environments and environments that present caries disease.

Materials and methods

Patient selection, eligibility criteria, ethical considerations, and clinical sampling

The sampling details in this study have already been described elsewhere [Damé-Teixeira et al., 2018; Damé-Teixeira et al., 2016]. The study participants were patients who attended dental clinics for any dental treatment in two centers: 1) Faculty of Dentistry, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil; and 2) Leeds School of Dentistry, University of Leeds, Leeds, UK. This study was approved by the ethics committee of the Federal University of Rio Grande do Sul (case n° 427.168) and the ethics committee of the NRES Committee Yorkshire & The Humber - Leeds West (protocol n° 2012002DD). Ethical approval was obtained for sample collection, and all participants signed a formal consent form.

Participants were allocated into the healthy root surface group (SRS) and root caries group (RC). Individuals with total prosthesis, antibiotic therapy, or who received head and neck radiotherapy were excluded. There was a good gender balance among the participants. The mean age was 60.4 ± 14.6 years (ranging from 43 to 76 years) for the SRS sample group and 60.1 ± 11.6 years (ranging from 40 to 90 years) for the RC sample group. Neither group had a statistically significant difference in mean age (t-test; $p=0.4$). Participants were asked to avoid brushing, eating, and drinking at night before sampling (12 hours before). Biofilm samples were collected using a sterile periodontal curette of all available root surfaces Gracey 3-4 (SSWhiteDuflex)

The inclusion criteria for the SRS group were as follows: individuals should have at least one exposed site on the root surface without root caries lesion. Solid biofilms of the root surface were collected from 10 participants. For the CR group, the inclusion criteria were as follows: Participants should have at least one active primary cavitate root lesion (soft and yellow dentin). The diagnosis of root caries was performed according to activity criteria by visual-tactile examination [Fejerskov et al., 1991]. Carious dentin samples were collected from 30 patients treated in clinics for restorative treatment. The excavated carious dentin containing soft tissue and biofilm was collected using a sterile excavator (SSWhiteDuflex).

All SRS and RC biofilm samples were immediately placed in a nuclease-free microtube containing 1ml of a protective nucleic acid solution (RNAprotect, Bacteria Reagent, provided by Qiagen) and stored at -80 C until further processing.

Calculation of data and sample size

Metatranscriptome sequence data is available in the Sequence Read Archive of the National Center for Biotechnology Information (NCBI) under access numbers SRS779973 and SRS796739.

The recommendation for differential gene expression calculations is a minimum of seven samples for reliable data normalization, according to the DESeq2 R package [Love, Huber, Anders, 2014].

RNA isolation, rRNA depletion, and sequencing

Total microbial RNA was isolated from biofilm samples using UltraClean^o Microbial RNA Isolation (Mo-bio, San Diego, USA). The digestion of DNase in the column was performed using the QIAGEN RNase-free DNase reagent kit, following the supplier's recommendations. The isolated RNA was quantified using the Quant-It RiboGreen^o RNA Assay kit (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA). Ribosomal RNA was depleted from total RNA extracts using the Epicenter Ribo-Zero 2 kit (using a solution-based hybridization capture) (Illumina, San Diego, CA). Samples with total RNA concentration <30 ng were grouped, resulting in 10 samples of healthy root surface and nine samples of root caries biofilm. Additional sample processing involved library preparations from the enriched mRNA following the Illumina TruSeq library preparation protocols (Illumina, San Diego, CA). The quality of the enriched cDNA samples was analyzed using Agilent Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). The Illumina HiSeq2500 system (Illumina Inc.) was used to sequence cDNA libraries to obtain 2 x 100 bp pair readings. Up to 100 million short readings were obtained for each library.

Data analysis

The sequence reading data were obtained as FASTQ files. Adapter removal and quality cutting were done using cutadapt [Martin, 2011]. The readings were assembled again in contigs using megahit [Li et al., 2015]. Taxonomic and protein annotations were obtained using the NCBI protein database nr with diamond [Buchfink, Xie, Huson, 2014]. The normalization of contig counting data was performed using the R DESeq2 package through a method that divides each sample by its size factor, generating a standard scale and making the samples comparable [Love, Huber, Anders, 2014].

The proportion of transcripts representing genes was calculated as 'reading count > 0/total number of genes'. The median ratio of transcripts was calculated at the species level for both groups. The statistical analysis to infer the differential gene expression between groups of SRS and RC samples was performed using the R DESeq2 package. The significance level was established at $< 10^{-3}$, and P values were adjusted for multiple tests (Wald test corrected by FDR). Each group's overexpressed and differentially expressed genes were calculated and plotted using the R Devis package [Price et al., 2019].

Results

Three families of Caudovirale virus were identified from our data: Myoviridae, Herelleviridae and Siphoviridae (all DNA phages). Almost all of these viruses were Lactobacillus phages and expressed genes that were positively regulated in CR samples (log2FC ranging from -27.7 to -2.7), although some are hypothetical proteins with unidentified functions, constituent parts of phages and lysine were also found. (Table 1).

The presence of certain phages in significant quantities in the analyzed sample, notably *Lactobacillus Phage phiAQ113*, *Lactobacillus prophage Lj77*, and *Lactobacillus phage LfeInf*, underscores their potential role in the context of our study.

The abundance of all phages in the analysis, particularly in patients with active caries lesions, suggests a potential association between these phages and the emergence and maintenance of root caries. Notably, phages such as *Lactobacillus Phage phiAQ113*, *Lactobacillus Phage LfeInf*, *Lactobacillus Phage Lrm1*, *Lactococcus Phage Q33*, *Lactobacillus prophage Lj771*, *Lactobacillus Phage KC5a* and *Lactobacillus Phage Ldl1*, showed higher abundance in the root caries group (RC), further indicating their potential association with the disease.

The phages that present differential expression in disease with statistical significance are *Lactobacillus Phage phiAQ113*, *Lactobacillus Phage LfeInf*, *Lactobacillus Phage Lrm1*, *Lactococcus Phage Q33*, *Lactobacillus prophage Lj771*, *Lactobacillus Phi1KC5a*, and *Lactobacillus phage Ldl1* (tape measure protein), which presented the greatest magnitude of difference between SRS and RC patients.

TABLE 1. List of phages found in the samples group root surface (SRS) and root caries group (RC). The data of the differential expression analysis performed using DESeq2.

Taxonomical Classification	gene (organism)	baseMean	log2FC	padj	Função Gene
Viruses; Caudovirales; Myoviridae	baseplate J-like protein [Lactobacillus phage phiAQ113]	252.6	-27.7	8.32E-49	A protein present in the phage's baseplate, which is a key component of the contractile tail because it mediates both host cell binding and genome injection [Büttner et al., 2016].
Viruses; Caudovirales; Herelleviridae; unclassified Herelleviridae	lysine [Lactobacillus phage Lfelnf]	61.6	-25.7	1.32E-32	Lysines are highly evolved enzymes produced by bacteriophages to digest the bacterial cell wall for the release of phage progeny [Fischetti, 2008].
Viruses; Caudovirales; Siphoviridae	major head protein [Lactobacillus phage Lrm1]	61.2	-25.7	2.83E-16	Larger head protein or capsid that is responsible for protecting the viral genome [White et al., 2012].
Viruses; Caudovirales; Herelleviridae; unclassified Herelleviridae	hypothetical protein Lfelnf_108 [Lactobacillus phage Lfelnf]	31.0	-24.8	3.35E-15	Unknown function
Viruses; Caudovirales; Myoviridae	tape measure protein [Lactobacillus phage phiAQ113]	15.5	-23.8	3.91E-14	Determine the length of the phage tail during morphogenesis [Zago et al., 2013].
Viruses; Caudovirales; Siphoviridae	tail tape measure [Lactococcus phage Q33]	10.4	-23.3	1.48E-13	The tail tape measure (TMP) protein of tail bacteriophages (also called phages) determines the length of the tail and facilitates the transit of DNA to the cell cytoplasm during infection [Mahony, Alqarni, Stockdale, 2016].
Viruses; Caudovirales; Myoviridae	hypothetical protein LJ771_039 [Lactobacillus prophage Lj771]	484.6	-14.2	1.16E-13	Unknown function
Viruses; Caudovirales; Siphoviridae	tape measure protein [Lactobacillus phage Ldl1]	91.7	-11.4	0.0005	Determine the length of the phage tail during morphogenesis [Zago et al., 2013].
Viruses; Caudovirales; Myoviridae	hypothetical protein [Lactobacillus phage KC5a]	69.6	-10.2	4.79E-07	Unknown function
Viruses; Caudovirales; Siphoviridae	DNA polymerase [Lactobacillus phage Ldl1]	17.4	-8.2	0.0136	As DNA polymerases codificadas por vírus, incluindo bacteriófagos, estão envolvidas na replicação do DNA viral [Morcinek-Orłowska, Zdrojewska, Węgrzyn, 2022].
Viruses; Caudovirales; Siphoviridae	putative tape measure protein [Streptococcus phage M102AD]	3.0	-5.6	0.0282	Determine the length of the phage tail during morphogenesis [Zago et al., 2013].
Viruses; Caudovirales; Herelleviridae; unclassified Herelleviridae	hypothetical protein Lfelnf_072 [Lactobacillus phage Lfelnf]	172.5	-2.8	0.0365	Unknown function
Viruses; Caudovirales; Siphoviridae	hypothetical protein IPP24_00016 [Streptococcus phage IPP24]	39.1	-2.5	0.0739	Unknown function

In Table 2, we describe all phages found in this research and what is found about them in the literature, both on the genome and on function and classification

when possible. The theme of phages has yet to be widely studied, and mainly its function in general and in the oral microbiome still needs to be discovered.

Tabela 2. Phages found in our study and literature related to its characteristics.

Phage	Microorganisms that infect	Literature	Characteristic
Lfelnf	Lactobacillus	Greiner et al., 2018	The phage aids in the transport of magnesium across membranes, where Lactobacillus Lfelnf encodes a supposed magnesium carrier.
phiAQ113	Lactobacillus	Zago et al., 2013	Bacteriophage with isometric capsid and contractile tail, presents a linear double-stranded DNA genome, circularly permuted, with a size of 36,566 bp and a G + C content of 37%.
Lrm1	Lactobacillus	Durmaz et al., 2008	It has a genome of 39,989 bp and a G+C content of 45.5%.
Q33	Lactococcus	Mahony Akqarni, Stockdale, 2013	The Q33 genome is organized into clusters functionally related to genes that encode functions such as DNA replication and packaging, morphogenesis, and host cell lysis. The phage Q33 has a long, noncontractile tail of approximately 148.4 nm. Its isometric capsid measures approximately 56.2 nm. The Q33 genome was elucidated as having 31,106 bp in length, with a GC content of 36.22% and containing 53 predicted protein coding ORFs.
Lj771	Lactobacillus	Denou et al., 2008	Profago Lj771 coexists as an integrated profago and excised circular phage DNA, but phage DNA packed in extracellular phage particles has not been detected, Lj771 has also been shown to be highly stable.
Ldl1	Lactobacillus	Casey et al., 2015	Ldl1 is a virulent phage and electron microscopy analysis revealed that this phage has a large head (73.2 nm; n = 15) and a noncontractile long tail (399.11 nm; n = 20). The in vitro propagation of this phage revealed a latent period of 30 to 40 min and an explosion size of 59.9 ± 1.9 phage particles, it is one of the largest phages described for the genus Lactobacillus.
KC5a	Lactobacillus	Villion, Moineau, 2009	This phage was isolated during a study on vaginal biota in the United States and Turkey, can be spontaneously released from the strain Lactobacillus crispatus phages KC5a by the addition of BPDE, a compound found in cigarette smoke, as far as its genome is known has not been published.
KC5a	Lactobacillus	Zago et al., 2013	The genome of phage phiAQ113 and phage Kc5a are closely related.
M102AD	Streptococcus	Delisle et al., 2013	Determine the length of the phage tail during morphogenesis [Zago et al., 2013].
IPP24	Streptococcus	April et al., 2020	Unknown function

Discussion

Thirteen phages were found in our study, 2 phages that infect Streptococcus, 1 phage that infect Lactococcus and 9 phages that infect Lactobacillus, all found in greater quantities in samples from patients who had root caries. Of these, only 9 showed differential expression with statistical significance in RC, 8 of them being

phages that infect *Lactobacillus* and 1 phage that infects *Lactococcus*. A highly expressed number of phages is presented in environments with the disease, confirming the hypothesis of our study that there is a difference in the phage community between healthcare environments and environments that present the caries disease,

The information presented in this study offers an *in vivo* look at how phage communities behave in the human oral cavity. Our study uses RNA-seq sequencing, which has provided new opportunities in the area of transcriptome analysis in recent years. Metatranscriptomic analysis offers a more informative perspective compared to metagenomics because it mainly studies the gene expression profile and *in vivo* function of communities; with this, can reveal details about populations that are transcriptionally active and not only identify the genetic content of bacterial populations as shown in the metagenomic analysis in which there is no distinction if the genomic DNA used in the analysis is derived from cells viable or not, nor whether the predicted genes are actually expressed and under what conditions [Bashiardes, Zilberman-Schapira, Elinav, 2016; Huang et al., 2021]. Our findings confirm the importance of virome in biofilm associated with root caries with a robust metatranscriptomic data. For the analysis, RNA enrichment was performed to remove a significant amount of ribosomal and human RNAs, generating a consistent data set.

Microorganisms reside, in most habitats, in biofilms aggregated to a surface. The biofilm protects its inhabitants and allows spatial organization and long-term colonization. Due to the short distance between cells, biofilm facilitates microbial communication, and microorganisms coexist in synergistic interactions and competition. Usually, these biofilms are in homeostasis with the host. However, certain genetic or environmental factors (smoking, high carbohydrate diet, radiation therapy, among others) can induce dysbiosis, which often leads to chronic destructive inflammation. Periodontal diseases and dental caries are problems caused by biofilm dysbiosis [Szafranski, Winkel, Stiesch, 2017]. Oral biofilms are usually controlled by oral hygiene, immune defense, and salivary flow of the host; these biofilms can inhibit bacteria, fungi, viruses, archaea, and protozoa [Szafranski, Winkel, Stiesch, 2017]. The importance of phages in oral biofilms has recently been explored. Understanding the role of phages in cariogenic microbiomes needs to continue to be explored until clinical applications can be performed.

Phages of Streptococcus, Lactococcus, and Lactobacillus were found in this study; all phages, even those that did not show statistical significance, were found in more significant quantities in patients with root caries. All bacteria infected with phages were cariogenic bacteria and acid-lactic producers. Lactobacilli needs retentive niches to establish because they cannot efficiently adhere to smooth surfaces, and root cavitate lesions are one of the niches of choice. Lactobacillus spp. is often associated with progressing lesions and is the predominant aciduric bacteria in dentin collected from carious root surfaces [Santos et al., 2023]. Streptococcus mutans is also an established cariogenic bacteria that is involved with caries initiation and progression. Phages can be important in the ecological balance of biofilm on root surfaces, and the association of lactobacilli and phages may be relevant to dysbiosis in the cariogenic site. According to Santiago-Rodrigues et al. [2015], in phage and bacterial interaction, the theory of "kill the winner" may be present in periodontal disease. For dental caries, this idea could also be applied. Those bacteria with ecological advantages in a cariogenic environment are more prone to being infected by phages. Phages may be necessary in determining the establishment, maintenance, and pathogenicity of cariogenic bacteria, having shown that specific phages of Streptococcus can increase bacterial virulence [Delisle et al., 2012] and that phages that infect Actinomyces species promote biofilm development [Shen, et al., 2018]. Due to technological advances that allowed understanding of the oral microbiome associated with caries disease, the importance of phages will be progressively explored [Ribeiro, Paster, 2023]. This idea should be confirmed with a longitudinal study and a larger group of studied subjects, but it is a crucial point to be explored in further studies. Following the same line, Wang et al. [2013] found that phages were not distributed uniformly, varying according to different periodontal states and different types of samples. For example, Actinomyces were predominant in plaque samples in periodontal health, and Streptococcus were predominant in swab samples in periodontal health; the abundance of these phages was consistent with the corresponding bacterial hosts, suggesting the possible involvement of phages in forming oral microbial ecosystems.

Our data identified three types of Caudovirale virus: Myoviridae, Herelleviridae, and Siphoviridae. In a study conducted by Caselli et al. [2020], most of the viruses detected were bacteriophages belonging to the order *Caudovirales*, including the families *Siphoviridae*, *Myoviridae*, and *Podoviridae*. *Caudovirales* are

the phages of most significant interest in the oral cavity and belong to the best classified and prevalent order of studied oral phages [Lawrence, Baldrige, Handley, 2019].

The genes expressed in this study are primarily parts of the phage structure, hypothetical proteins without defined function, and Lysine. The Lysine of the phage Lfelnf that infects *Lactobacillus* digests the bacterial cell wall to release the phage's progeny. In the previously cited study by Santiago-Rodriguez et al. [2015] genes associated with promoting lytic gene expression (antirepressors), cell membrane penetration (holins) and lysis (lysins) were expressed in greater quantities in state of periodontal disease. The study hypothesized that the inflammatory environment of the disease may trigger the lytic cycle of some temperate phages and that this may be associated with bacterial stress in periodontal disease. Our study found lysins highly expressed in patients with root caries. The bacteria in the dental caries biofilm are also exposed to stress from pH changes (low pH), and this cariogenic condition can trigger the lytic cycle in dental caries.

Lysins are also described in the literature as important factors that can be used to control dental caries in the near future. Some genetic products encoded as peptidoglycan Hydrolases (endolysins) can be used clinically as therapeutic agents to treat or prevent caries disease because they have the potential to lyse and kill cariogenic bacteria in vivo, possibly in a targeted way, not affecting non-cariogenic organisms essential for maintaining good oral health [Delisle et al., 2012; Fischetti, 2008]. Although little is known about *Streptococcus mutans* phages, they may be an innovative form of specific and non-toxic biocontrol due to their ability to penetrate biofilms. These factors may be important in determining the establishment, maintenance, and pathogenicity of this cariogenic microorganism, which can be applied in the prevention and treatment of dental caries [Ribeiro, Paster, 2023; Delisle et al., 2012]. Phages can be modified to express the antimicrobial peptide C16G2220, which has as its specific target *S. mutans* and can be used in anticaries therapy. Lysine ClyR is also active against *S. mutans* and *S. sobrinus*, both cariogenic species, but is not active against other commensal *Streptococcus* species such as *S. sanguinis*, *S. oralis* and *S. salivarius* [Xu, et al., 2018]. However, only a tiny fraction of phages and their lysines have been explored so far, some phages as phages for *Actinomyces naeslundii*, *Enterococcus faecalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Veillonella spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Neisseria spp.*,

Streptococcus spp. and *Fusobacterium nucleatum* were isolated and characterized [Xu, et al., 2018; Ribeiro, Paster, 2023]. Lysines are stable, safe, and relatively easy to produce; they are active at low concentrations in biofilm and mucosal surfaces, can be more effective than antibiotics, and act synergistically with them. The chance of developing resistance is low by using bacterial components essential for viability as the receptor and projected lysines exhibit a more comprehensive range of hosts. A single lysine could attack up to 10 different species of *Streptococcus* [Szafranski, Winkel, Stiesch, 2017; Garcia, et al., 2014]. In the future, Phages can be used as precise tools for microbiome engineering and microbiota-based therapy, as they usually have a narrow host range; that is, they are specific to a set of strains of the same species, and exceptions may occur, but in most cases is limited to closely related species, rarely to higher taxonomic units. Phages must be able to eliminate pathogens without affecting the indigenous flora, unlike broad-spectrum antibiotics. Alternatively, phages can be genetically modified to extend their host range [Szafranski, Winkel, Stiesch, 2017]. More studies on this topic are needed until clinical trials are conducted.

Lysins are also described in the literature as important factors that can be used to control dental caries in the near future. Some genetic products encoded as peptidoglycan Hydrolases (endolysins) can be used clinically as therapeutic agents to treat or prevent caries disease because they have the potential to lyse and kill cariogenic bacteria in vivo, possibly in a targeted way, not affecting non-cariogenic organisms essential for maintaining good oral health [Delisle et al., 2012; Fischetti, 2008]. Although little is known about *Streptococcus mutans* phages, they may be an innovative form of specific and non-toxic biocontrol due to their ability to penetrate biofilms. These factors may be important in determining the establishment, maintenance, and pathogenicity of this cariogenic microorganism, which can be applied in the prevention and treatment of dental caries [Ribeiro, Paster, 2023; Delisle et al., 2012]. Phages can be modified to express the antimicrobial peptide C16G2220, which has as its specific target *S. mutans* and can be used in anticaries therapy. Lysine ClyR is also active against *S. mutans* and *S. sobrinus*, both cariogenic species, but is not active against other commensal *Streptococcus* species such as *S. sanguinis*, *S. oralis* and *S. salivarius* [Xu, et al., 2018]. However, only a tiny fraction of phages and their lysines have been explorers so far, some phages as phages for *Actinomyces naeslundii*, *Enterococcus faecalis*, *Aggregatibacter*

actinomycetemcomitans, Veillonella spp., Lactobacillus spp., Neisseria spp., Streptococcus spp. and Fusobacterium nucleatum were isolated and characterized [Xu, et al., 2018; Ribeiro, Paster, 2023]. Lysines are stable, safe, and relatively easy to produce; they are active at low concentrations in biofilm and mucosal surfaces, can be more effective than antibiotics, and act synergistically with them. The chance of developing resistance is low by using bacterial components essential for viability as the receptor and projected lysines exhibit a more comprehensive range of hosts. A single lysine could attack up to 10 different species of Streptococcus [Szafranski, Winkel, Stiesch, 2017; Garcia, et al., 2014]. In the future, Phages can be used as precise tools for microbiome engineering and microbiota-based therapy, as they usually have a narrow host range; that is, they are specific to a set of strains of the same species, and exceptions may occur, but in most cases is limited to closely related species, rarely to higher taxonomic units. Phages must be able to eliminate pathogens without affecting the indigenous flora, unlike broad-spectrum antibiotics. Alternatively, phages can be genetically modified to extend their host range [Szafranski, Winkel, Stiesch, 2017]. More studies on this topic are needed until clinical trials are conducted.

Conclusion

We know that viruses are found in oral biofilms and that most are phages, which may be associated with the health process or host disease. The genes expressed in this study are primarily parts of the structure of the phage (plate base proteins, capsid, tail proteins, and DNA polymerase), Lysine, and hypothetical proteins without defined function. In this study, there was a higher gene expression of phages in patients with active caries lesions, suggesting that these phages may be associated with the emergence and maintenance of this disease. Further studies are needed to confirm the association of phages with caries disease and better understand phages and their functions within the human oral microbiome.

REFERENCES

Abril AG, Carrera M, Böhme K, Barros-Velázquez J, Cañas B, Rama JLR, Villa TG, Calo-Mata P. Characterization of Bacteriophage Peptides of Pathogenic *Streptococcus* by LC-ESI-MS/MS: Bacteriophage Phylogenomics and Their Relationship to Their Host. *Front Microbiol.* 2020 Jun 9;11:1241.

Baker JL, Bor B, Agnello M, Shi W, He X. Ecology of the Oral Microbiome: Beyond Bacteria. *Trends Microbiol.* 2017 May;25(5):362-374.

Bashiardes S, Zilberman-Schapira G, Elinav E. Use of Metatranscriptomics in Microbiome Research. *Bioinform Biol Insights.* 2016 Apr 20;10:19-25.

Beck J. The epidemiology of root surface caries. *J Dent Res.* 1990 May;69(5):1216-21.

Benítez-Páez A, Belda-Ferre P, Simón-Soro A, Mira A. Microbiota diversity and gene expression dynamics in human oral biofilms. *BMC Genomics.* 2014 Apr 27;15:311.

Buchfink B, Xie C, Huson DH. Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND. *Nat Methods.* 2015 Jan;12(1):59-60. Epub 2014 Nov 17

Büttner CR, Wu Y, Maxwell KL, Davidson AR. Baseplate assembly of phage Mu: Defining the conserved core components of contractile-tailed phages and related bacterial systems. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016 Sep 6;113(36):10174-9. doi: 10.1073/pnas.1607966113. Epub 2016 Aug 23.

Caselli E, Fabbri C, D'Accolti M, Soffritti I, Bassi C, Mazzacane S, Franchi M. Defining the oral microbiome by whole-genome sequencing and resistome analysis: the complexity of the healthy picture. *BMC Microbiol.* 2020 May 18;20(1):120.

Casey E, Mahony J, Neve H, Noben JP, Dal Bello F, van Sinderen D. Novel phage group infecting *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*, as revealed by genomic and proteomic analysis of bacteriophage Ldl1. *Appl Environ Microbiol.* 2015 Feb;81(4):1319-26.

Dalmasso M, de Haas E, Neve H, Strain R, Cousin FJ, Stockdale SR, Ross RP, Hill C. Isolation of a Novel Phage with Activity against *Streptococcus mutans* Biofilms. *PLoS One.* 2015 Sep 23;10(9):e0138651.

Damé-Teixeira N, Parolo CCF, Maltz M, Rup AG, Devine DA, Do T. Gene expression of bacterial collagenolytic proteases in root caries. *J Oral Microbiol.* 2018 Jan 18;10(1):1424475.

Dame-Teixeira N, Parolo CC, Maltz M, Tugnait A, Devine D, Do T. Actinomyces spp. gene expression in root caries lesions. *J Oral Microbiol*. 2016 Sep 16;8:32383.

Delisle AL, Guo M, Chalmers NI, Barcak GJ, Rousseau GM, Moineau S. Biology and genome sequence of Streptococcus mutans phage M102AD. *Appl Environ Microbiol*. 2012 Apr;78(7):2264-71. doi: 10.1128/AEM.07726-11. Epub 2012 Jan 27.

Denou E, Pridmore RD, Ventura M, Pittet AC, Zwahlen MC, Berger B, Barretto C, Panoff JM, Brüssow H. The role of prophage for genome diversification within a clonal lineage of Lactobacillus johnsonii: characterization of the defective prophage LJ771. *J Bacteriol*. 2008 Sep;190(17):5806-13.

Durmaz E, Miller MJ, Azcarate-Peril MA, Toon SP, Klaenhammer TR. Genome sequence and characteristics of Lrm1, a prophage from industrial Lactobacillus rhamnosus strain M1. *Appl Environ Microbiol*. 2008 Aug;74(15):4601-9.

Hashimoto K, Yoshinari M, Matsuzaka K, Shiba K, Inoue T. Identification of peptide motif that binds to the surface of zirconia. *Dent Mater J*. 2011;30(6):935-40. doi: 10.4012/dmj.2011-161. Epub 2011 Nov 25.

Fejerskov O, Luan WM, Nyvad B, Budtz-Jørgensen E, Holm-Pedersen P. Active and inactive root surface caries lesions in a selected group of 60- to 80-year-old Danes. *Caries Res*. 1991;25(5):385-91.

Figueiredo CM, Malvezzi Karwowski MS, da Silva Ramos RCP, de Oliveira NS, Peña LC, Carneiro E, Freitas de Macedo RE, Rosa EAR. Bacteriophages as tools for biofilm biocontrol in different fields. *Biofouling*. 2021 Jul;37(6):689-709.. Epub 2021 Jul 26.

Fischetti VA. Bacteriophage lysins as effective antibacterials. *Curr Opin Microbiol*. 2008 Oct;11(5):393-400. doi: 10.1016/j.mib.2008.09.012. Epub 2008 Oct 14.

Garcia, G.P., Mendez, F.M., Garcia, L.E., Diez, M.R., De, P.A.Z.F.H., Bustamante, S.N., 2014. Improved bactericidal enzybiotics against pneumococcus and other bacteria. Patent WO2014191598A1.

Greiner T, Moroni A, Van Etten JL, Thiel G. Genes for Membrane Transport Proteins: Not So Rare in Viruses. *Viruses*. 2018 Aug 26;10(9):456..

Hellyer P. Root caries. *Br Dent J*. 2021 Jul;231(1):32.

Huang Y, Zhao X, Cui L, Huang S. Metagenomic and Metatranscriptomic Insight Into Oral Biofilms in Periodontitis and Related Systemic Diseases. *Front Microbiol.* 2021 Oct 13;12:728585.

Ju F, Xia Y, Guo F, Wang Z, Zhang T. Taxonomic relatedness shapes bacterial assembly in activated sludge of globally distributed wastewater treatment plants. *Environ Microbiol.* 2014 Aug;16(8):2421-32.

Lawrence D, Baldrige MT, Handley SA. Phages and Human Health: More Than Idle Hitchhikers. *Viruses.* 2019 Jun 27;11(7):587.

Li D, Liu CM, Luo R, Sadakane K, Lam TW. MEGAHIT: an ultra-fast single-node solution for large and complex metagenomics assembly via succinct de Bruijn graph. *Bioinformatics.* 2015 May 15;31(10):1674-6.

Li GJ, Jiang DY, Zong XL, Xu X. Keratinocyte growth factor phage model peptides can promote human oral mucosal epithelial cell proliferation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2013 Aug;116(2):e92-7.

Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 2014;15(12):550.

Ly M, Abeles SR, Boehm TK, Robles-Sikisaka R, Naidu M, Santiago-Rodriguez T, Pride DT. Altered oral viral ecology in association with periodontal disease. *mBio.* 2014 May 20;5(3):e01133-14.

Mahony, J., Alqarni, M., Stockdale, S. *et al.* Functional and structural dissection of the tape measure protein of lactococcal phage TP901-1. *Sci Rep* 6, 36667 (2016).

Mahony J, Martel B, Tremblay DM, Neve H, Heller KJ, Moineau S, van Sinderen D. Identification of a new P335 subgroup through molecular analysis of lactococcal phages Q33 and BM13. *Appl Environ Microbiol.* 2013 Jul;79(14):4401-9. Epub 2013 May 10.

Martin M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing 627 reads. *EMBnet journal.* 2011;17(1).

Marsh PD. Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. *Adv Dent Res.* 1994 Jul;8(2):263-71.

Marsh PD, Zaura E. Dental biofilm: ecological interactions in health and disease. *J Clin Periodontol.* 2017 Mar;44 Suppl 18:S12-S22.

Mira A, Artacho A, Camelo-Castillo A, Garcia-Esteban S, Simon-Soro A. Salivary Immune and Metabolic Marker Analysis (SIMMA): A Diagnostic Test to Predict Caries Risk. *Diagnostics (Basel)*. 2017 Jun 27;7(3):38.

Morcinek-Orłowska J, Zdrojewska K, Węgrzyn A. Bacteriophage-Encoded DNA Polymerases-Beyond the Traditional View of Polymerase Activities. *Int J Mol Sci*. 2022 Jan 7;23(2):635.

Naidu M, Robles-Sikisaka R, Abeles SR, Boehm TK, Pride DT. Characterization of bacteriophage communities and CRISPR profiles from dental plaque. *BMC Microbiol*. 2014 Jun 30;14:175.

Novik, G.; Ladutska, A.; Rakhuba, D. Bacteriophage taxonomy and classification. In *Antimicrobial Research: Novel Bioknowledge and Educational Programs; Microbiology Book Series N° 6; Formatex: Badajoz, Spain, 2017; pp. 251–259*

Olszak T, Latka A, Roszniowski B, Valvano MA, Drulis-Kawa Z. Phage Life Cycles Behind Bacterial Biodiversity. *Curr Med Chem*. 2017 Nov 24;24(36):3987-4001.

Paisano AF, Spira B, Cai S, Bombana AC. In vitro antimicrobial effect of bacteriophages on human dentin infected with *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. *Oral Microbiol Immunol*. 2004 Oct;19(5):327-30.

Paris S, Banerjee A, Bottenberg P, Breschi L, Campus G, Doméjean S, Ekstrand K, Giacaman RA, Haak R, Hannig M, Hickel R, Juric H, Lussi A, Machiulskiene V, Manton D, Jablonski-Momeni A, Santamaria R, Schwendicke F, Splieth CH, Tassery H, Zandona A, Zero D, Zimmer S, Opdam N. How to Intervene in the Caries Process in Older Adults: A Joint ORCA and EFCD Expert Delphi Consensus Statement. *Caries Res*. 2020 Dec 8;54(5-6):1-7.

Peres MA, Macpherson LMD, Weyant RJ, Daly B, Venturelli R, Mathur MR, Listl S, Celeste RK, Guarnizo-Herreño CC, Kearns C, Benzi H, Allison P, Watt RG. Oral diseases: a global public health challenge. *Lancet*. 2019 Jul 20;394(10194):249-260. Erratum in: *Lancet*. 2019 Sep 21;394(10203):1010.

Price A, Caciula A, Guo C, Lee B, Morrison J, Rasmussen A, et al. DEvis: an R package for aggregation and visualization of differential expression data. *BMC Bioinformatics*. 2019;20(1):110.

Pride DT, Salzman J, Haynes M, Rohwer F, Davis-Long C, White RA 3rd, Loomer P, Armitage GC, Relman DA. Evidence of a robust resident bacteriophage population revealed through analysis of the human salivary virome. *ISME J*. 2012 May;6(5):915-26. doi: 10.1038/ismej.2011.169. Epub 2011 Dec 8.

Rosier BT, De Jager M, Zaura E, Krom BP. Historical and contemporary hypotheses on the development of oral diseases: are we there yet? *Front Cell Infect Microbiol*. 2014 Jul 16;4:92. doi: 10.3389/fcimb.2014.00092.

Ribeiro AA, Paster BJ. Dental caries and their microbiomes in children: what do we do now? *J Oral Microbiol*. 2023 Apr 10;15(1):2198433.

Santiago-Rodriguez TM, Naidu M, Abeles SR, Boehm TK, Ly M, Pride DT. Transcriptome analysis of bacteriophage communities in periodontal health and disease. *BMC Genomics*. 2015 Jul 28;16(1):549.

Santos HSB, Damé-Teixeira N, Nagano MH, Do T, Parolo CCF, Maltz M, Arthur RA. Acid tolerance of *Lactobacillus* spp. on root carious lesions: A complex and multifaceted response. *Arch Oral Biol*. 2023 Dec;156:105820.

Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, Amin N, Schwikowski B, Ideker T. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res*. 2003 Nov;13(11):2498-504.

Shellis RP. Formation of caries-like lesions in vitro on the root surfaces of human teeth in solutions simulating plaque fluid. *Caries Res*. 2010;44(4):380-9.

Shen M, Yang Y, Shen W, Cen L, McLean JS, Shi W, Le S, He X. A Linear Plasmid-Like Prophage of *Actinomyces odontolyticus* Promotes Biofilm Assembly. *Appl Environ Microbiol*. 2018 Aug 17;84(17):e01263-18.

Simón-Soro A, Belda-Ferre P, Cabrera-Rubio R, Alcaraz LD, Mira A. A tissue-dependent hypothesis of dental caries. *Caries Res*. 2013;47(6):591-600.

Steier L, de Oliveira SD, de Figueiredo JAP. Bacteriophages in Dentistry-State of the Art and Perspectives. *Dent J (Basel)*. 2019 Jan 9;7(1):6. doi: 10.3390/dj7010006.

Szafrański SP, Slots J, Stiesch M. The human oral phageome. *Periodontol* 2000. 2021 Jun;86(1):79-96. doi: 10.1111/prd.12363. Epub 2021 Mar 10.

Szafrański SP, Winkel A, Stiesch M. The use of bacteriophages to biocontrol oral biofilms. *J Biotechnol*. 2017 May 20;250:29-44. doi: 10.1016/j.jbiotec.2017.01.002. Epub 2017 Jan 17.

Tinoco JM, Buttaro B, Zhang H, Liss N, Sassone L, Stevens R. Effect of a genetically engineered bacteriophage on *Enterococcus faecalis* biofilms. *Arch Oral Biol*. 2016 Nov;71:80-86. Epub 2016 Jul 6.

Takahashi N, Nyvad B. Ecological Hypothesis of Dentin and Root Caries. *Caries Res.* 2016;50(4):422-31. doi: 10.1159/000447309. Epub 2016 Jul 27.

UniProt Consortium. UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. *Nucleic Acids Res.* 2019 Jan 8;47(D1):D506-D515. doi: 10.1093/nar/gky1049.

Villion M, Moineau S. Bacteriophages of lactobacillus. *Front Biosci (Landmark Ed).* 2009 Jan 1;14(5):1661-83. doi: 10.2741/3332.

Xu J, Yang H, Bi Y, Li W, Wei H, Li Y. Activity of the Chimeric Lysin ClyR against Common Gram-Positive Oral Microbes and Its Anticaries Efficacy in Rat Models. *Viruses.* 2018 Jul 20;10(7):380.

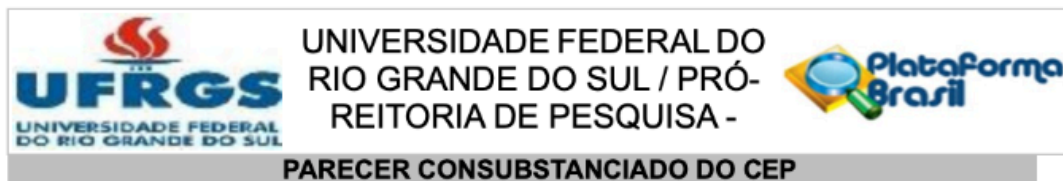
Wang J, Qi J, Zhao H, He S, Zhang Y, Wei S, Zhao F. Metagenomic sequencing reveals microbiota and its functional potential associated with periodontal disease. *Sci Rep.* 2013;3:1843.

Wang J, Gao Y, Zhao F. Phage-bacteria interaction network in human oral microbiome. *Environ Microbiol.* 2016 Jul;18(7):2143-58. doi: 10.1111/1462-2920.12923. Epub 2015 Jul 21.

White HE, Sherman MB, Brasilès S, Jacquet E, Seavers P, Tavares P, Orlova EV. Capsid structure and its stability at the late stages of bacteriophage SPP1 assembly. *J Virol.* 2012 Jun;86(12):6768-77.

Zago M, Scaltriti E, Rossetti L, Guffanti A, Armiento A, Fornasari ME, Grolli S, Carminati D, Brini E, Pavan P, Felsani A, D'Urzo A, Moles A, Claude JB, Grandori R, Ramoni R, Giraffa G. Characterization of the genome of the dairy *Lactobacillus helveticus* bacteriophage {Phi}AQ113. *Appl Environ Microbiol.* 2013 Aug;79(15):4712-8.

Anexo 1 - Parecer CEP UFRGS

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: ESTUDO DA MICROBIOTA DO BIOFILME E LESÕES DE CÁRIE DE SUPERFÍCIES RADICULARES

Pesquisador: Marisa Maltz Turkienicz

Área Temática: Pesquisas com coordenação e/ou patrocínio originados fora do Brasil, excetuadas aquelas com copatrocínio do Governo Brasileiro;

Versão: 2

CAAE: 20131713.7.0000.5347

Instituição Proponente: Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

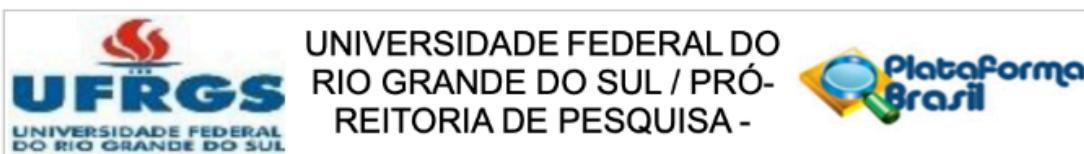
Número do Parecer: 427.168

Data da Relatoria: 10/10/2013

Apresentação do Projeto:

O objetivo deste estudo é investigar as funções da microbiota de lesões de cárie em superfícies radiculares. Para isto será realizado um estudo clínico transversal, onde serão coletadas amostras de biofilme em pacientes (grupo controle; n=20) com superfície radicular exposta hígida e de dentina cariada em pacientes (grupo teste; n=20) com superfície radicular com lesão de cárie cavitada ativa. Estas amostras serão analisadas pela técnica RNA-Seq, a qual extrai e sequencia o mRNA da comunidade microbiana para observar os genes que são expressos. A técnica de RNA-Seq será aplicada em Leeds, Reino Unido, em amostras clínicas coletadas e armazenadas durante a abordagem terapêutica para o tratamento de cárie radicular em adultos e idosos de Porto Alegre, Brasil. A análise dos dados será realizada através do CLC Bio software Workbench Genomic. A leitura do mapeamento será comparada aos genomas bacterianos e suas análises funcionais. Será feita uma análise descritiva dos genes de virulência das principais bactérias orais nos grupos teste e controle. Serão comparadas médias do nível de expressão gênica entre os grupos teste e controle. Os dados serão testados quanto à normalidade através da análise do histograma e do teste Komogorov-Smirnov. Se a normalidade da amostra for confirmada, o teste t para amostras independentes será utilizado a fim de avaliar as diferenças entre os grupos. Caso não haja normalidade na amostra, o teste não paramétrico de

Endereço: Av. Paulo Gama, 110 - 2º andar do Prédio da Reitoria - Campus Centro			
Bairro: Farroupilha		CEP: 90.040-060	
UF: RS	Município: PORTO ALEGRE		
Telefone: (51)3308-3738	Fax: (51)3308-4085	E-mail: etica@propesq.ufrgs.br	



Continuação do Parecer: 427.168

Friedman será utilizado. O nível de significância a ser considerado será de 5%.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo geral é compreender a fisiologia da microbiota associada à cárie radicular. Seus objetivos específicos são: avaliar a expressão gênica do biofilme bacteriano em superfícies radiculares expostas hígidas; avaliar a expressão gênica da dentina cariada de lesões de cárie ativa em superfícies radiculares; comparar a expressão gênica do biofilme bacteriano em superfícies radiculares expostas hígidas com expressão gênica da dentina cariada de lesões de cárie ativa em superfícies radiculares; identificar biomarcadores potenciais que poderiam ser utilizados para identificar indivíduos com risco aumentado de desenvolver a doença.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

A descrição dos benefícios diretos e indiretos está explicitada de forma adequada. O pesquisador apresenta a descrição dos riscos e as medidas adotadas pela equipe no caso de ocorrência de efeitos adversos relativos ao tratamento restaurador: " Os riscos associados são os mesmos referentes ao tratamento restaurador, que podem ser desconforto durante o tratamento ou após o tratamento. Para evitar esses riscos, os pacientes receberão se necessário anestesia prévia ao tratamento e, em casos de sensibilidade pós operatória o paciente será atendido pela equipe".

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O estudo possui mérito científico, visto que tem aprovação da Compesq Odontologia. A revisão de literatura embasa do forma sólida o objeto de estudo, sendo que o pesquisador apresenta cálculo de tamanho de amostra, cronograma de atividades exequível e orçamento adequado.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Adequados.

Recomendações:

O projeto está em condições de aprovação.

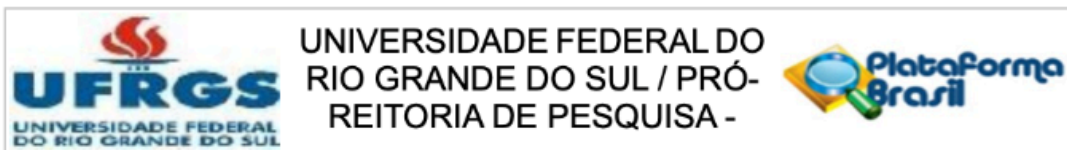
Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto está em condições de aprovação.

Situação do Parecer:

Aprovado

Endereço: Av. Paulo Gama, 110 - 2º andar do Prédio da Reitoria - Campus Centro			
Bairro: Farroupilha		CEP: 90.040-060	
UF: RS	Município: PORTO ALEGRE		
Telefone: (51)3308-3738	Fax: (51)3308-4085	E-mail: etica@propesq.ufrgs.br	



Continuação do Parecer: 427.168

Necessita Apreciação da CONEP:

Sim

Considerações Finais a critério do CEP:

Aprovado.

O presente projeto, seguiu nesta data para análise da CONEP e só tem o seu início autorizado após a aprovação pela mesma.

PORTO ALEGRE, 17 de Outubro de 2013

Assinador por:
José Artur Bogo Chies
(Coordenador)

Endereço: Av. Paulo Gama, 110 - 2º andar do Prédio da Reitoria - Campus Centro
Bairro: Farroupilha **CEP:** 90.040-060
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3308-3738 **Fax:** (51)3308-4085 **E-mail:** etica@propesq.ufrgs.br

Anexo 2 - Parecer CONEP - Comissão nacional de Ética em Pesquisa

COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA



PARECER CONSUBSTANCIADO DA CONEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ESTUDO DA MICROBIOTA DO BIOFILME E LESÕES DE CÁRIE DE SUPERFÍCIES RADICULARES

Pesquisador: Marisa Maltz Turkienicz

Área Temática: Pesquisas com coordenação e/ou patrocínio originados fora do Brasil, excetuadas aquelas com copatrocínio do Governo Brasileiro;

Versão: 3

CAAE: 20131713.7.0000.5347

Instituição Proponente: Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 507.373

Data da Relatoria: 25/11/2013

Apresentação do Projeto:

O presente protocolo foi enquadrado como pertencente à(s) seguinte(s) Área(s) Temática(s) Especial(is) "Pesquisas com coordenação e/ou patrocínio originados fora do Brasil, excetuadas aquelas com copatrocínio do Governo Brasileiro".

No documento intitulado "PB_RELATORIO_PESQUISA_201317.pdf", item resumo, lê-se: "Estudos recentes têm mostrado que a composição do biofilme bacteriano associado com lesões de cárie radicular é diferente entre as lesões. No entanto, a função do biofilme deve ser semelhante: para causar lesões de cárie radicular, as bactérias devem ser capazes de produzir ácido, sobreviver e se proliferar em ambiente ácido. Através de novas técnicas de sequenciamento de RNA vem sendo possível determinar quais funções estão sendo expressas no biofilme bacteriano. Nesse estudo é proposta a utilização do método RNA-seq para comparar o nível de expressão gênica de mais de 100 espécies bacterianas encontradas no biofilme de superfícies radiculares expostas hígidas e de dentina cariada de lesões de cárie radicular. Este projeto de pesquisa irá ajudar a estabelecer o conhecimento do meta-transcriptoma da microbiota de cárie radicular e contribuir substancialmente para a compreensão da biologia funcional deste agravo, o que se torna fundamental para o desenvolvimento de estratégias preventivas. Além disso, esse estudo irá

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 1º SUBSOLO, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.750-521
UF: DF **Município:** BRASÍLIA
Telefone: (61)3315-5878 **E-mail:** conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 507.373

permitir o desenvolvimento de novos estudos de efeitos terapêuticos que possibilitem a redução da produção de ácido pelas bactérias orais, ou da aderência bacteriana e seus efeitos subsequentes. A determinação da regulação da expressão gênica também pode levar à descoberta de biomarcadores de risco de cárie radicular, que podem ser usados como marcadores de diagnóstico e para esquemas preventivos. O objetivo deste estudo é investigar as funções da microbiota de lesões de cárie em superfícies radiculares. Para isto será realizado um estudo clínico transversal, onde serão coletadas amostras de biofilme em pacientes (grupo controle; n=20) com superfície radicular exposta hígida e de dentina cariada em pacientes (grupo teste; n=20) com superfície radicular com lesão de cárie cavitada ativa. Estas amostras serão analisadas pela técnica RNA-Seq, a qual extrai e sequencia o mRNA da comunidade microbiana para observar os genes que são expressos. A técnica de RNA-Seq será aplicada em Leeds, Reino Unido, em amostras clínicas coletadas e armazenadas durante a abordagem terapêutica para o tratamento de cárie radicular em adultos e idosos de Porto Alegre, Brasil. A análise dos dados será realizada através do CLC Biosoftware Workbench Genomic. A leitura do mapeamento será comparada aos genomas bacterianos e suas análises funcionais. 4 Será feita uma análise descritiva dos genes de virulência das principais bactérias orais nos grupos teste e controle. Serão comparadas médias do nível de expressão gênica entre os grupos teste e controle. Os dados serão testados quanto à normalidade através da análise do histograma e do teste Komogorov-Smirnov. Se a normalidade da amostra for confirmada, o teste t para amostras independentes será utilizado a fim de avaliar as diferenças entre os grupos. Caso não haja normalidade na amostra, o teste não paramétrico de Friedman será utilizado. O nível de significância a ser considerado será de 5%."

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

O objetivo deste estudo é compreender a fisiologia da microbiota associada à cárie radicular.

Objetivo Secundário:

- Avaliar a expressão gênica do biofilme bacteriano em superfícies radiculares expostas hígidas; - Avaliar a expressão gênica da dentina cariada de lesões de cárie ativa em superfícies radiculares; - Comparar a expressão gênica do biofilme bacteriano em superfícies radiculares expostas hígidas com expressão gênica da dentina cariada de lesões de cárie ativa em superfícies radiculares. - Identificar biomarcadores potenciais que poderiam ser utilizados para identificar indivíduos com risco aumentado de desenvolver a doença.

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 1º SUBSOLO, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.750-521
UF: DF **Município:** BRASILIA
Telefone: (61)3315-5878 **E-mail:** conep@saude.gov.br

**COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA**

Continuação do Parecer: 507.373

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Conteúdo não analisado pela CONEP.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto foi enquadrado de acordo com a Resolução CNS 466/12 como "Pesquisas com coordenação e/ou patrocínio originados fora do Brasil, excetuadas aquelas com copatrocínio do Governo Brasileiro", no entanto, o projeto não tem nem coordenação e nem patrocínio estrangeiros. O estudo tem uma parceria com a Faculdade de odontologia de Leeds no Reino Unido, mas seu financiamento e sua coordenação são brasileiros. Dessa forma, esse projeto não se caracteriza como área de apreciação da CONEP.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Não se aplica.

Recomendações:

Não se aplica.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Diante do exposto, a CONEP entende que o protocolo de pesquisa em tela, não se enquadra na Área Temática Especial "Pesquisas com coordenação e/ou patrocínio originados fora do Brasil, excetuadas aquelas com copatrocínio do Governo Brasileiro" (considerando as informações do item IX.4 da Resolução CNS nº 466/2012), não cabendo a sua análise ética à CONEP, mas sim delegada somente ao CEP.

Situação do Parecer:

Devolvido

Considerações Finais a critério da CONEP:

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP - delibera pela devolução do protocolo de pesquisa ao Comitê de Ética em Pesquisa - CEP, por não se enquadrar em nenhuma das áreas temáticas descritas no item IX.4 da Resolução CNS nº 466/2012.

Endereço: SEP 510 NORTE, BLOCO A 1º SUBSOLO, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde**Bairro:** Asa Norte**CEP:** 70.750-521**UF:** DF**Município:** BRASILIA**Telefone:** (61)3315-5878**E-mail:** conep@saude.gov.br

RESOLUÇÃO

**COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA**

Continuação do Parecer: 507.373

BRASILIA, 07 de Janeiro de 2014

Assinador por:
Jorge Alves de Almeida Venancio
(Coordenador)

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 1º SUBSOLO, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.750-521
UF: DF **Município:** BRASILIA
Telefone: (61)3315-5878 **E-mail:** conep@saude.gov.br