

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
DOUTORADO EM ODONTOLOGIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM CLÍNICA ODONTOLÓGICA

Clarissa Cavalcanti Fatturi Parolo

ESTUDO DOS LACTOBACILOS NO BIOFILME DENTAL

Porto Alegre (RS), dezembro de 2009.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
DOUTORADO EM ODONTOLOGIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM CLÍNICA ODONTOLÓGICA

Clarissa Cavalcanti Fatturi Parolo

ESTUDO DOS LACTOBACILOS NO BIOFILME DENTAL

Tese apresentada como parte dos
requisitos obrigatórios para a obtenção do
Título de Doutor em Odontologia

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Marisa Maltz

Linha de Pesquisa: Diagnóstico das Afecções Buco-faciais

Porto Alegre, dezembro de 2009.

Those who hope in the LORD
will renew their strength.
They will soar on wings like eagles;
they will run and not grow weary,
they will walk and not be faint.

Isaiah 40:31

AGRADECIMENTOS

Ao meu marido, Edino Parolo, por me fazer muito feliz. Ele é um presente de Deus para mim.

Ao nosso filinho Filipe que está para chegar trazendo ainda mais alegria à nossa família.

Aos meus pais, Elias e Raquel, pelo amor e carinho. Às minhas queridas irmãs Letícia e Camila pelo ânimo em todas as etapas da minha vida. Às minhas sobrinhas Júlia, Rafaela, Gabriela e Vivian pela alegria. Aos meus cunhados Timóteo e Fabrício pelo apoio e amizade.

À Vó Irene por ser tão especial, e à família Cavalcanti pelo incentivo.

A Sandra, Enio, Keila, Eni e à família Cardoso pelo amor e por me receberem como filha, cunhada, sobrinha e prima.

À Prof^a. Dr^a. Marisa Maltz pela amizade e orientação, não só no Doutorado, mas durante toda minha jornada acadêmica e profissional. Sou privilegiada por ter uma orientadora competente, inteligente e incentivadora. Tais qualidades têm permeado toda a tua carreira docente, deixando um exemplo a ser seguido. Muito obrigada pelo ensino e pela amizade.

À Profa. Dra. Gertrudes Corção pela co-orientação e pelo ensino desde o mestrado.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul e à Faculdade de Odontologia pela oportunidade e auxílio financeiro, e pelo apoio na minha qualificação desde a graduação.

À CAPES e ao CNPQ pelo auxílio financeiro durante o doutorado.

Ao Prof. Dr. David Beighton pela oportunidade de estudar no King's College em Londres e de contar com sua amizade, sua orientação e sua generosidade.

Ao King's College London por ter me acolhido e financiado a pesquisa durante o período de bolsa PDEE.

Aos voluntários que demonstraram seu amor à Ciência e a mim, utilizando por vários dias o aparelho mandibular. Sem eles esta pesquisa não existiria.

Aos colegas professores e funcionários do Departamento de Odontologia Preventiva e Social pelo suporte durante o Doutorado.

Ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Odontologia pelo ensino.

Aos colegas do doutorado pela amizade.

À colega e amiga Juliana Jobim Jardim pela amizade tão próxima que nos faz como irmãs.

Fernanda Cristina Mendes Giongo pela grande ajuda no desenvolvimento da tese, e principalmente pela amizade tão valiosa.

A Luana Severo Alves pelo auxílio no desenvolvimento da tese, e principalmente pela amizade tão valiosa.

Às colegas professoras Dr^a. Berenice Barbachan e Silva, Dr^a. Lina Naomi Hashizume e Dr^a. Sandra Liana Henz por todo o incentivo e companheirismo.

Às colegas professoras Dr^a. Dalva Maria Padilha e Dr^a. Cláides Abbeg pelo apoio e pelas valiosas dicas londrinas.

Aos queridos amigos do laboratório de Microbiologia do King's College London Kazuko, Thuy, Steven, Uta, Maria, Poppy, Susmita, Douglas, Sadia, Lynette pelo carinho com que me receberam em Londres.

Aos professores substitutos Gaziela de Carli, Samuel Corso por me substituírem durante o período de licença.

A Daniela Correa Cavalcanti pela amizade.

Aos queridos alunos e ex-alunos da equipe LABIM: Maurício Moura, Paula Frassetto, Alessandra Damo, Caroline Weber, Morjana Edelweiss, Juliana Rosa, Bruna Muá, Nélio Dornelles, Lucelen Bastos Fontoura, Camilla Nascimento pelo trabalho em equipe e colaboração até mesmo nos finais de semana e férias!

À técnica Tânia Peres e às novas mestrandas do LABIM Luciana Bitello Firmino, Roberta Garcia e Nailê Damé Teixeira pelo apoio na fase final da tese e pela amizade.

RESUMO

Estudo dos Lactobacilos no Biofilme Dental

Clarissa Cavalcanti Fatturi Parolo

Faculdade de Odontologia, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil.

Lactobacilos são um grupo de bactérias relacionadas com cárie dental. Há falta de estudos sobre a biologia populacional dos lactobacilos na cárie dental. O objetivo do estudo foi avaliar o efeito das modificações ambientais na composição, diversidade genética dos lactobacilos e Identificar a filogenia dos *Lactobacillus paracasei* isolados do biofilme. Lactobacilos foram isolados em um modelo de formação de biofilme *in situ* antes e depois de 28 dias de exposição à solução de sacarose 20%. As colônias foram randomicamente selecionadas do meio Rogosa Ágar e subcultivadas (n=222, 31 antes e 191 após período de exposição à sacarose). Os isolados foram identificados usando o seqüenciamento parcial dos genes *pheS* ou *rpoA*. As espécies de lactobacilos predominantes encontradas foram *L. paracasei*, *L. fermentum* e *L. rhamnosus*. A diferença na composição e na diversidade genética de lactobacilos associada às modificações ambientais no biofilme foi analisada através de PCR utilizando palíndromes repetitivos extragênicos (REP-PCR). Após a fase com sacarose, um maior número de lactobacilos pode ser encontrado no biofilme (p=0,001). A prevalência de *L. fermentum* foi similar na fase sem sacarose (6/11 indivíduos colonizados) e na fase com sacarose (8/11 indivíduos colonizados) (p=0,721). A prevalência de *L. rhamnosus* e *L. paracasei* aumentou no biofilme de 2/11 para 8/11 indivíduos (p= 0,028) e de 2/11 para 7/11 indivíduos colonizados (p=0,012) após exposição a sacarose, respectivamente. A prevalência de *L. gasseri* foi baixa e em ambas as fases (p=1,00). As espécies de Lactobacilos apresentaram maior diversidade na fase com sacarose (2 a 3 espécies por indivíduo) do que na

fase sem sacarose (0 a 2 espécies por indivíduo) ($p=0,045$). Na maioria dos casos, diferentes genótipos estavam presentes na fase sem sacarose em comparação à fase com sacarose ($p=0,01$). Aqueles lactobacilos identificados como *L. paracasei* foram também submetidos à tipificação através do seqüenciamento de múltiplos *loci* (MLST). No MLST, foi obtida a seqüência parcial de 7 genes de referência: *fusA*, *ileS*, *lepA*, *leuS*, *pyrG*, *recA*, e *recG*. Sete indivíduos apresentavam *L. paracasei* ($n=75$) e 14 seqüências de tipificação (ST) foram encontradas. Verificou-se que indivíduos não relacionados podem apresentar uma mesma ST e que múltiplas STs estão presentes por indivíduo. Três indivíduos apresentavam STs previamente isoladas de produtos alimentícios lácteos. Resultados conflitantes na comparação entre REP-PCR e MLST foram observados na genotipagem de *L. paracasei*. Diferentes números de padrões foram obtidos para os *L. paracasei* de acordo com o método molecular utilizado (14 com MLST versus 25 com REP-PCR). Para algumas cepas, REP-PCR foi mais discriminatório do que MLST. Em outros casos, cepas pertencentes a diferentes STs foram agrupadas pelo REP-PCR, mostrando que o MLST foi mais discriminatório do que o REP-PCR. Em poucos casos, MLST e REP-PCR apresentaram o mesmo poder discriminatório. Em geral, REP-PCR mostrou um maior poder discriminatório em comparação ao MLST, mas pouca concordância foi apresentada entre os dois métodos. Assim, MLST pode contribuir na identificação da diversidade genética obtida pelo REP-PCR em alguns casos. Os dados obtidos permitiram concluir que após exposição a sacarose observa-se (a) aumento no número de lactobacilos e de superfícies colonizadas; e (b) aumento na diversidade genética e de espécies. Além disso, observou-se que (c) alguns lactobacilos orais podem apresentar origem exógena, e que

(d) a combinação dos métodos MLST e REP-PCR aumenta o poder discriminatório quanto à diversidade genética de *L. paracasei*.

Palavras–Chave: *Lactobacillus*, Cárie dentária, Biofilme dentário, Diversidade genética

ABSTRACT

Study of lactobacillus in Oral Biofilm

Clarissa Cavalcanti Fatturi Parolo

Dentistry Faculty, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil.

Lactobacilli are a group of bacteria related to dental caries. There is a lack of studies on the population biology of these organisms in dental caries. The aim of the study was to evaluate the effect of the environmental changes in the composition, genetic diversity and identify the filogeny of *Lactobacillus paracasei* isolated from biofilm. Lactobacilli were isolated from a biofilm model, formed *in situ* prior to and during a 28-day period of exposure to 20% sucrose solution. The lactobacillus colonies were randomly selected from Rogosa Agar medium and subcultured (n=222, 31 prior to and 191 following a sucrose exposure period). The isolates were identified using *pheS* or *rpoA* gene sequence analysis. The predominant lactobacilli were *L. paracasei*, *L. fermentum* and *L. rhamnosus*. The difference in composition and genetic diversity of lactobacilli related to environmental changes in biofilm was analysed by repetitive extragenic palindromic PCR (REP-PCR). After the sucrose phase, a higher number of lactobacilli could be found in dental biofilm ($p=0.001$). The prevalence of *L. fermentum* was similar in the non-sucrose (6/11 subjects) compared to the sucrose phase (8/11 subjects) ($p=0.721$). Prevalence of *L. rhamnosus* and *L. paracasei* increased in biofilm from 2/11 to 8/11 subjects ($p=0.028$) and from 2/11 to 7/11 subjects ($p=0.012$) after sucrose exposure, respectively. *L. gasseri* prevalence was low in both phases ($p=1.00$). Lactobacilli exhibited greater species diversity (2 or 3 species per subject) in the sucrose phase, than those isolated from the non-sucrose phase (0-2 species per subject) ($p=0.045$). In most of the cases different genotypes were present in the non-sucrose phase in comparison to the

sucrose phase. Those lactobacilli identified as *L. paracasei* were subjected to multi-locus sequencing typing (MLST). In MLST, partial sequences of seven housekeeping genes *fusA*, *ileS*, *lepA*, *leuS*, *pyrG*, *recA*, and *recG* was obtained. Seven subjects harboured *L. paracasei* (n=75) and these represented 14 sequence types (ST). Comparison of the STs showed that unrelated subjects may harbour the same ST and that individuals harbour multiple STs. Three subjects harboured STs previously isolated from dairy products. There were mixed results among REP-PCR patterns compared with the MLST in the *L. paracasei* genotyping. Different numbers of patterns were obtained for *L. paracasei* according to the molecular technique used (14 MLST versus 25 REP-PCR patterns). For some strains, REP-PCR was more discriminatory than MLST. In other cases, strains belonging to different ST were grouped together by REP-PCR, showing that MLST was more discriminatory than REP-PCR. In few cases MLST and REP-PCR presented the same discriminatory power. REP-PCR showed a greater discriminatory power in comparison to MLST, but little agreement was observed between this two methods. Therefore, MLST could enhance the genetic diversity obtained by REP-PCR. The present data support that after sucrose exposure there is (a) an increase in the number of lactobacilli and colonized surfaces; and (b) increase in lactobacilli species and genetic diversity. Also it was found that (c) some oral lactobacilli may be of exogenous origin; and (d) the combination of MLST and REP-PCR increased the discriminatory power in genotyping *L. paracasei*.

Keywords: *Lactobacillus*, Dental caries, Biofilms, Genetic diversity

APRESENTAÇÃO

Esta tese consiste de três artigos que serão submetidos a publicação, referidos durante o texto em números romanos conforme lista abaixo. A íntegra de cada um encontra-se anexa ao fim deste documento.

- I. Effect of the Environment on the Composition and Genotypic Diversity of Lactobacilli from Oral Biofilm

- II. Food-borne *Lactobacillus paracasei* isolated from the human oral biofilm

- II. Correspondence of Repetitive-element PCR and Multilocus Sequence Typing for subtyping *L.paracasei* from human oral biofilm

SUMÁRIO

RESUMO.....	7
ABSTRACT.....	10
APRESENTAÇÃO.....	12
ÍNDICE DE FIGURAS.....	15
LISTA DE ABREVIATURAS.....	18
1. REFERENCIAL TEÓRICO.....	18
1.1 Características dos Lactobacilos.....	18
1.2 Distribuição dos Lactobacilos na Cavidade Bucal.....	21
1.3 Lactobacilos no Binômio Saúde/doença.....	24
1.4 Taxonomia dos <i>Lactobacillus</i>	29
1.5 Técnicas Moleculares Aplicadas ao Estudo dos <i>Lactobacillus</i>	31
2. OBJETIVOS.....	45
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	46
3.1 Aspectos Éticos.....	46
3.2 Desenho Experimental.....	46
3.3 Coleta e Processamento do Biofilme.....	47
3.4 Extração do DNA Cromossomal.....	48
3.5 Identificação das Espécies de <i>Lactobacillus</i>	48
3.6 REP-PCR.....	50
3.7 MLST.....	51
3.8 Análise Estatística.....	54

4. RESULTADOS.....	55
4.1 Composição do Biofilme.....	55
4.2 Diversidade Genética de <i>Lactobacillus</i> no Biofilme Oral.....	58
4.3 Diversidade Genética de <i>L. paracasei</i> no Biofilme Oral.....	61
4.4 Comparação entre REP-PCR e MLST.....	69
5. DISCUSSÃO.....	74
5.1 Modificação do Biofilme Dental da Saúde para Doença.....	74
5.2 Baixa Recuperação de <i>Lactobacillus</i>	75
5.3 Identificação das Espécies de <i>Lactobacillus</i>	77
5.4 Composição e Diversidade Genotípica de <i>Lactobacillus</i>	78
5.5 Origem dos <i>Lactobacillus</i> Bucais.....	81
5.6 REP-PCR <i>versus</i> MLST.....	82
6. CONCLUSÕES.....	84
7. REFERÊNCIAS.....	85
8. ANEXOS.....	94

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Diferentes tipos morfológicos de lactobacilos. (A) *L. johnsonii* ATCC 33200, (B) *L. rhamnosus* GG, (C) *L. murinus* 35020, (D) *L. reuteri* 53608.

Figura 2: Modelo de estrutura secundária do 16S rRNA em procariotos. As regiões nas quais a seqüência de nucleotídeos é mais variada estão identificadas de V1 a V9.

Figura 3: Modelo genérico do operon rRNA em procariotos. P1 e P2 indicam os promotores. T1 e T2 indicam as seqüências de término.

Figura 4: Exemplificação dos métodos moleculares utilizados para caracterização de bactérias.

Figura 5: Frequência de distribuição (%) das espécies de lactobacilos nas fases com e sem sacarose por paciente. Diferentes letras iniciais representam diferentes indivíduos. Letras iniciais seguidas de S identificam a fase com sacarose.

Figura 6: Mediana e variação inter-quartil (25-75%) do número de *Lactobacillus spp.* encontrados nas duas fases experimentais com e sem sacarose. *L. paracasei* (p=0,012), *L. fermentum* (p=0,721), *L. rhamnosus* (p=0,028) e *L. gasseri* (p=1,00). (○= valores outliers e *= valores extremos).

Figura 7: Dendograma construído a partir da seqüência concatenada dos sete *loci* gênicos, mostrando a relação entre os isolados. O teste Phi mostrou evidencia de recombinação ($p = 5.22 \times 10^{-6}$).

Figura 8: Dendograma criado a partir das seqüências concatenadas dos 7 loci de *L. paracasei*. A numeração refere-se aos STs: STs 1-32 já haviam sido identificadas por Diancourt *et al* [1] e STs 33-44 foram identificadas no presente estudo. STs provenientes de fontes humanas são identificadas com o símbolo ● e aquelas provenientes de alimentos com ○ e aquelas isoladas de alimentos e humanos com ▼.

Figura 9: Comparação entre o padrão de REP-PCR (repTC – letras minúsculas) e seqüência no MLST (ST-números) para os 75 *L. paracasei* de diferentes indivíduos/origem (Letras iniciais diferentes identificam diferentes indivíduos e letras iniciais seguidas pela letra S identificam a fase com sacarose).

Figura 10: Comparação entre duas linhas do gel de eletroforese de cepas de diferentes STs (37 e 35) com o mesmo padrão (I) no rep-PCR.

LISTA DE ABREVIATURAS

ARDRA	= Análise de Restrição do DNA Ribossomal Amplificado
BHI	= Caldo de Infusão de Cérebro e Coração
CCUG	= Coleção de Culturas da Universidade de Gotemburgo
DGEE	= Eletroforese com Gradiente de Desnaturação
DSM	= Coleção Alemã de Microrganismos e Culturas Celulares
EGM	= Estreptococos do Grupo Mutans
ERIC	= Consenso repetitivo intergênico em Enterobactérias
G+C	= Guanina + Citosina
MLST	= Sequenciamento de Múltiplos <i>Loci</i>
pb	= Pares de Bases
PCR	= Reação em Cadeia da Polimerase
PFGE	= Eletroforese em Gel de Campo Pulsado
RAPD	= Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso
rep-PCR	= Amplificação de Elementos Repetitivos do Genoma
repTC	= Complexo de Tipificação por <i>rep-PCR</i>
RFLP	= Polimorfismo dos Fragmentos de Restrição
rRNA	= RNA Ribossomal
RTF	= Meio Reduzido de Transporte
ST	= Sequência de Tipificação
TGEE	= Eletroforese com Gradiente de Temperatura e
tRNA	= RNA Transportador

1. REFERENCIAL TEÓRICO

Os lactobacilos formam um grupo heterogêneo de bactérias que pode ser encontrado em diversos nichos ecológicos como alimentos, animais e humanos. Em humanos, os lactobacilos colonizam a cavidade bucal, os tratos gastrointestinal e geniturinário. Em geral, sua presença é considerada benéfica ao hospedeiro. Entretanto, quando há desequilíbrio ecológico os lactobacilos da cavidade bucal podem estar relacionados à cárie. A identificação dos lactobacilos associados com saúde e doença é crucial. Se for constatada a implicação de determinadas espécies de lactobacilos na doença, sua contribuição na etiologia da cárie poderia ser mais bem caracterizada. Esse conhecimento tem o potencial de melhorar o diagnóstico, a prevenção e o tratamento da cárie. Os métodos bioquímicos e genotípicos comumente utilizados na identificação das espécies de lactobacilos apresentam sérias limitações, tais como baixo poder discriminatório e baixa reprodutibilidade. Por isso, é necessário o estudo de técnicas moleculares aplicadas à identificação e de caracterização dessa bactéria na cavidade bucal.

1.1 Características dos Lactobacilos

Os lactobacilos pertencem ao grupo das bactérias produtoras de ácido láctico que são acidogênicas e acidúricas [2]. O seu crescimento pode ser favorecido através de cultivo em meio sólido acidificado [2]. Em relação à fermentação, os lactobacilos são classificados em homolácticos (quando o ácido láctico é o principal produto da fermentação da glicose) e heterolácticos fermentativos (quando lactato, dióxido de carbono e etanol são produzidos em igual proporção a partir da

fermentação das hexoses) [2, 3]. Podem ainda ser subdivididos em: (i) homofermentativos obrigatórios, (ii) heterofermentativos facultativos, e (iii) heterofermentativos obrigatórios [4, 5]. Os lactobacilos são geneticamente diversos, apresentando grande variação na percentagem de Guaninas e Citosinas em seu genoma (33 a 52% G+C %mol) [3]. O gênero *Lactobacillus* pertence à classe *Bacilli*. São microrganismos anaeróbicos facultativos e catalase-negativos da ordem dos *Lactobacillales* e da família *Lactobacillaceae* [2, 5, 6].

Para os lactobacilos, a temperatura ideal de crescimento situa-se entre 30° e 40°C. O pH ideal de crescimento é de 4,5 a 6,4 embora existam cepas capazes de suportar pH inferiores ou iguais a 4,0 [7-9]. À microscopia óptica, os lactobacilos apresentam-se como bacilos gram-positivos, não-móveis e não-esporulados [2, 6]. Sua morfologia pode variar de coco-bacilo a bacilo longo de acordo com a espécie estudada [2, 10] (Figura 1).

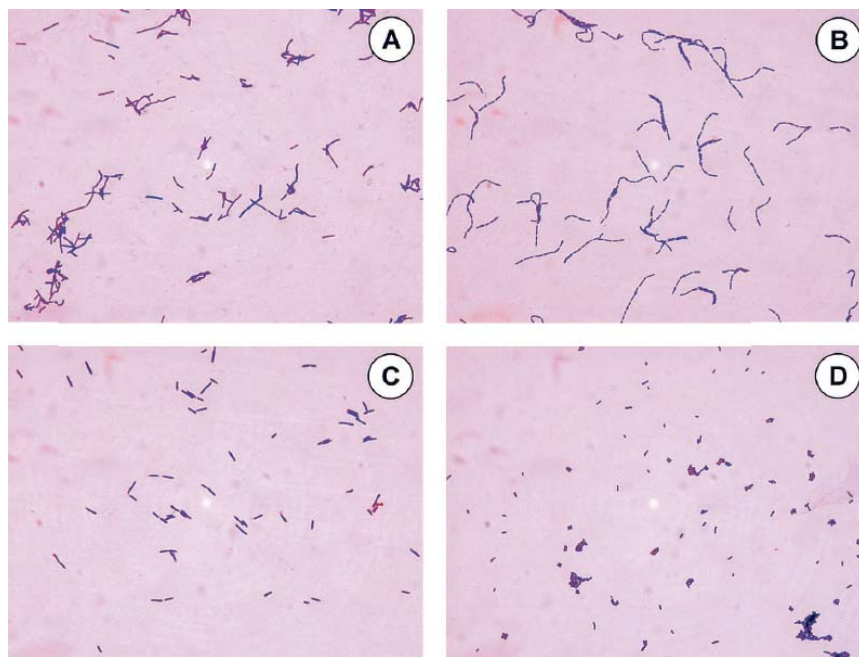


Figura 1: Diferentes tipos morfológicos de lactobacilos. (A) *L. johnsonii* ATCC 33200, (B) *L. rhamnosus* GG, (C) *L. murinus* 35020, (D) *L. reuteri* 53608 [10].

O gênero *Lactobacillus* é bastante heterogêneo. O número de espécies está continuamente sendo modificado devido à descrição de novas espécies e/ou à reclassificação de outras [11]. Alguns membros do gênero *Lactobacillus* foram reclassificados em *Carnobacterium* [12], *Atopobium* [13], *Weissella* [14] e *Paralactobacillus* [15]. No início de 2007, 120 espécies compunham o gênero *Lactobacillus* [11], em 2008, mais de 145 espécies tinham sido identificadas [16]. Dados de 2009 identificam 155 espécies de *Lactobacillus* (www.bacterio.cict.fr). Dentro do gênero *Lactobacillus*, alguns grupos podem ser diferenciados [5] (Tabela 1).

Tabela 1: Principais grupos filogenéticos de *Lactobacillus**.

Principais grupos de *Lactobacillus*

Grupo *L. delbrueckii*

Grupo *L. salivarius*

Grupo *L. reuteri*

Grupo *L. buchneri*

Grupo *L. alimentaris/L. farciminis*

Grupo *L. casei*

Grupo *L. sakei*

Grupo *L. fructivorans*

Grupo *L. coryniformis*

Grupo *L. plantarum*

Grupo *L. perolens*

Grupo *L. brevis*

*Adaptado de Felis e Dellaglio (2007)[5].

1.2 Distribuição dos Lactobacilos na Cavidade Bucal

Os lactobacilos apresentam ampla distribuição na natureza, ocupando nichos ecológicos bastante diversificados como plantas, alimentos, animais e humanos [3, 6, 17]. Eles podem estar naturalmente presentes em alimentos ou serem adicionados a eles [18-24]. Juntamente com outras bactérias produtoras de ácido láctico, os lactobacilos apresentam grande importância econômica na indústria

alimentícia, na qual são utilizados como iniciadores do processo fermentativo ou como promotores da maturação de produtos lácteos [4, 19, 21, 23, 25, 26]. Além disso, algumas cepas de lactobacilos têm sido utilizadas como probióticos em humanos e animais [18, 24]. Nos humanos, a cavidade bucal, o trato gastrointestinal e geniturinário são os *habitats* mais frequentemente colonizados por essa bactéria [3, 6].

Os lactobacilos são transitórios ou ausentes na cavidade bucal de recém nascidos [27-29], mas podem vir a colonizar esse nicho a partir do primeiro ano de vida [30]. Além da transmissão de lactobacilos durante o parto [27-29], eles também podem ser transmitidos pelo leite materno [31]. De acordo com Carlsson *et al.* (1975) a presença regular de lactobacilos na cavidade bucal ocorre apenas após os dois anos de idade [32]. A prevalência de colonização por lactobacilos em crianças e adultos varia conforme a população estudada. Quarenta a cem por cento das crianças apresentam lactobacilos em amostras de saliva ou biofilme dental [30, 33-35]. Alaluusua *et al.* (1989) avaliaram a colonização por lactobacilos em pais e filhos e observaram que mais de 87% dos adolescentes (13-17 anos) e de seus pais (36-50 anos) apresentavam lactobacilos na saliva. Nesse estudo não houve diferença no padrão de colonização em relação à faixa etária [36]. Entretanto, idosos podem apresentar aumento do número de lactobacilos na saliva [37, 38], provavelmente favorecido pela utilização de próteses parciais ou totais [38].

Nem todas as superfícies da cavidade bucal são colonizadas de igual forma pelas bactérias bucais [39]. Cada nicho ecológico, como mucosa, língua e dente, apresenta suas peculiaridades. A proporção de lactobacilos em relação à microbiota anaeróbica total é variada nos sítios bucais: saliva (0,48%), mucosas (0,21%), língua (0,36%), palato (0,23%) e biofilme dental (0,005%) [40]. A baixa proporção de

lactobacilos no biofilme mostra a dificuldade de adesão desse gênero em superfícies dentárias lisas. Grande parte dos lactobacilos não apresenta capacidade de adesão à superfície dental, necessitando de sítios retentivos para sua colonização. Aparelhos ortodônticos, próteses parciais e totais, dentes em erupção e cavidades cariosas são exemplos de nichos retentivos para lactobacilos [38, 41, 42]. Polissacarídeos extracelulares insolúveis facilitariam a adesão estável às superfícies dentais não retentivas, mas não são produzidos pelos lactobacilos [43]. Por outro lado, lactobacilos possuem capacidade de aderirem às mucosas, o que os faz ser encontrados no dorso de língua e nas mucosas orais [44]. A agregação dos lactobacilos com outras bactérias orais pode favorecer também a sua colonização na cavidade bucal [45].

Recentemente passou a discutir-se se os lactobacilos são realmente autóctones da cavidade bucal e ou transitórios [46]. Caufield *et al.* (2007) justificam essa hipótese baseados na observação de que: (i) lactobacilos não são encontrados com freqüência em crianças; (ii) há uma redução drástica do número de lactobacilos após o selamento das cavidades cariosas; e (iii) há uma grande diversidade genotípica dos lactobacilos na cavidade bucal [46]. Tais afirmações são controversas na medida em que indivíduos livres de cárie ou sem cavidades de cárie também são colonizados por lactobacilos [47, 48]. Além disso, outro estudo demonstrou a presença de lactobacilos em crianças [30]. A transitoriedade dos lactobacilos na cavidade bucal deveria ser fundamentada em estudos que permitissem avaliar tanto a sua origem como a estabilidade da colonização. No estudo de Caufield *et al.* (2007) além da amostra pequena, apenas a saliva foi analisada, o método molecular escolhido foi muito discriminatório fazendo com que cada clone analisado fosse único e sem acompanhamento longitudinal da colonização [46].

1.3 Lactobacilos no Binômio Saúde-Doença

Historicamente, os lactobacilos foram um dos primeiros microrganismos a serem associados com a cárie dentária. Em 1915, lactobacilos foram isolados de biofilme sobre lesões cariosas [46]. Em 1938, *L. acidophilus* foi relacionado com atividade de cárie e o consumo de carboidratos em pacientes [49]. Em 1948, a contagem de lactobacilos na saliva foi correlacionada com o pH mínimo na placa dental após bochecho com glicose [50]. A partir desse momento, outros estudos foram delineados com o objetivo de estudar a relação entre os lactobacilos e a doença cárie. As principais características cariogênicas apresentadas pelos lactobacilos são a acidurogenicidade (capacidade de sobreviver em meio ácido) e a acidogenicidade (capacidade de produzir ácido) [2]. Os lactobacilos, principalmente os homofermentativos, apresentam a mais acentuada queda de pH em presença de carboidratos entre as bactérias orais [7]. Cepas de lactobacilos podem iniciar o crescimento em pH ácidos próximos de 4,0 [7]. A lesão de cárie ocorre a partir da desmineralização dental ocasionada pela produção de ácidos por bactérias do biofilme dental [7, 50, 51]. Se o pH ácido, resultante do metabolismo bacteriano, for inferior a 5,2-5,7 ocorre a subsaturação de cálcio e fosfato no biofilme e, conseqüentemente, saída de íons do dente [7]. Quando sucessivas quedas de pH acontecem no biofilme dental, a formação da lesão de cárie é provável [7, 51].

Em condição de saúde, os lactobacilos são encontrados em pequenas proporções no biofilme dental [40]. Mudanças na ingestão de carboidratos causam alterações da composição do biofilme dental tanto pela produção de ácido quanto pela modificação da espessura do biofilme [7, 52]. A produção mais freqüente de

ácidos pelas bactérias do biofilme leva a um aumento das cepas acidogênicas e acidúricas, como lactobacilos, estreptococos do grupo mutans e leveduras [7].

Os lactobacilos aumentam de número com a progressão da lesão cariosa [53]. A presença de cavidade cariosa está relacionada ao aumento da quantidade de lactobacilos no biofilme [54]. Tal fato leva muitos pesquisadores a afirmarem que os lactobacilos são bactérias associadas à progressão da lesão cariosa e não ao seu desenvolvimento [7, 42]. A afinidade dos lactobacilos por lesões cavitadas de cárie pode ser explicada por sua adesão ao colágeno tipo I presente na dentina [55, 56], além da própria retenção mecânica do sítio.

A relação entre lactobacilos e a atividade de cárie é controversa. Estudos longitudinais avaliaram a relação da contagem de lactobacilos no biofilme e na saliva com a incidência de cárie [33, 47, 48]. Krasse (1954) demonstrou que a presença de lactobacilos em níveis elevados no biofilme correlaciona-se com o aumento da incidência de cárie em indivíduos submetidos a dieta cariogênica [47]. Crossner (1984) relatou que indivíduos com contagem elevada de lactobacilos na saliva ($>10^5$ UFC/mL) apresentaram maior incidência de cárie durante o acompanhamento [48]. Em outro estudo longitudinal, a maioria (87%) das crianças com contagem de lactobacilos acima de 4×10^3 UFC/mL de saliva apresentou novas lesões de cárie, e somente 15% das crianças com contagem abaixo de 4×10^3 UFC/mL de saliva desenvolveram cárie [33]. Apesar da relação estabelecida entre contagens elevadas de lactobacilos na saliva/biofilme e o desenvolvimento de lesões de cárie, observa-se também que alguns indivíduos desenvolvem cárie sem a presença detectável de lactobacilos [33, 47, 48] e outros, apesar de altas contagens, não desenvolvem lesões de cárie [47, 48].

A quantidade de lactobacilos aumenta com a progressão da lesão cariosa [53, 57]. Sob lesões cariosas sem cavidade, a presença de lactobacilos é maior do que sob o biofilme hígido [57]. Ikeda (1973) demonstrou que o aumento do número de lactobacilos só ocorre na presença de lesão já estabelecida e não como preditor de lesão [53]. Já Sigurjóns *et al.* (1995) mostraram haver maior risco de cárie quando a contagem de lactobacilos era alta ou aumentava no biofilme dental antes do aparecimento da lesão cariosa proximal [58].

Apesar da sua associação com a doença cárie [46, 59, 60], os lactobacilos têm função bioprotetora, participando do equilíbrio ecológico que protege contra infecções orais, gastrointestinais e geniturinárias. Pelo menos um estudo *in vitro* demonstrou que alguns lactobacilos apresentam atividade antimicrobiana contra periodonto-patógenos como *Porphyromonas gingivalis* [61]. A caracterização das espécies de lactobacilos presentes na saliva de pacientes com e sem doença periodontal crônica mostrou que *L. gasseri* e *L. fermentum* predominam na saúde e *L. plantarum* na doença [62]. A maioria dos lactobacilos nesse estudo foi capaz de inibir o crescimento *in vitro* de bactérias cariogênicas e periodonto-patógenas [62]. Assim, há diferença na composição e no perfil antimicrobiano de lactobacilos presentes na saliva em relação ao estado periodontal do paciente.

Os lactobacilos estão presentes nos alimentos [4, 19, 20, 22, 23, 26, 63]. Podem ocorrer naturalmente ou serem adicionados aos alimentos a fim de beneficiar a saúde do hospedeiro (ação probiótica) [64]. Os probióticos no trato gastrointestinal interferem no balanço da microbiota, na imuno-modulação e na diminuição da permeabilidade da mucosa [24, 65]. Apesar do uso de alimentos probióticos na prevenção e tratamento de doenças do aparelho digestivo já ser documentado, pouco se sabe a respeito de sua repercussão na cavidade bucal. Estudos *in vitro*

mostram que algumas espécies de *Lactobacillus* são capazes de produzir substâncias antimicrobianas de amplo espectro sobre bactérias e leveduras [44, 61, 62, 66-68]. O uso de queijo contendo probióticos em população idosa foi capaz de reduzir a prevalência de contagem alta de levedura na saliva após 16 semanas de intervenção [69]. O potencial antimicrobiano dos lactobacilos é exercido pela produção de diferentes agentes como peróxido de hidrogênio, ácidos láctico e piroglutâmico, bacteriocinas e peptídeos. O peróxido de hidrogênio é uma substância oxidante com potencial antimicrobiano [70]. Os ácidos produzidos durante o metabolismo bacteriano geram um ambiente ecológico de baixo pH que pode interferir no crescimento de microrganismos vizinhos [71, 72]. Bacteriocinas são peptídeos anti-bacterianos que atuam pela formação de poros na membrana citoplasmática [73-75]. Bacteriocinas de classe II como salivacina 140, acidocina J1229, planctaricina 423, foram isoladas de *L. salivarius*, *L. acidophilus* e *L. plantarum* [75-77]. Peptídeos cíclicos (L-Phe-L-Pro e L-Phe-trans-4-OH-L-Pro) com propriedades antifúngicas foram isolados de *L. plantarum* [68].

Vários estudos já foram conduzidos relacionando a ação dos lactobacilos sobre bactérias cariogênicas [44, 61, 62, 66, 78, 79]. Sabe-se que *L. fermentum* tem capacidade de inibir a produção de polissacarídeos extracelulares insolúveis por *Streptococcus mutans* [78], podendo interferir na colonização dos estreptococos do grupo mutans (EGM) na cavidade bucal. Além disso, indivíduos livres de cárie possuem naturalmente espécies de lactobacilos orais com potencial inibidor do crescimento de *S. mutans in vitro* [79]. Mais da metade dos lactobacilos isolados da cavidade bucal de pacientes com e sem doença periodontal apresentavam ação antimicrobiana sobre *S. mutans* [62]. Lactobacilos capazes de inibir *S. mutans* também foram encontrados em pacientes com boa higiene bucal [61]. Lactobacilos

isolados de pacientes sem lesões cavitadas foram capazes de inibir o crescimento *in vitro* de *S. mutans*, *S. sanguis II* e *S. mitis* [44]. No entanto, pacientes que apresentavam várias lesões cariosas possuíam lactobacilos com atividade antimicrobiana para um espectro mais amplo de estreptococos orais [44]. A ação antimicrobiana também foi observada em estudo com animais no qual *L. casei* presente no biofilme dental inibiu o crescimento de *S. mutans* em ratos [66].

O potencial anticariogênico de produtos probióticos contendo *Lactobacillus* tem sido pouco estudado [80-83]. Esses estudos apresentam baixo grau de evidência científica e sinalizam que: (i) os lactobacilos presentes em alimentos probióticos têm dificuldade em colonizar a cavidade bucal, sendo sua presença limitada ao período de uso do produto [82]; (ii) há uma pequena redução na contagem de estreptococos do grupo mutans na saliva de indivíduos que expostos a probióticos, cujo significado clínico não foi avaliado [81, 83]; (iii) há possível redução do risco de cárie em crianças de algumas faixas etárias após consumo de probióticos [80]. São necessários mais estudos clínicos que avaliem adequadamente a estabilidade de colonização de *Lactobacillus* orais, a interação de cepas probióticas com a microbiota bucal residente, e ação de *Lactobacillus* probióticos sobre a incidência de cárie e doença periodontal. Contudo, visto que algumas cepas de lactobacilos probióticos são acidogênicas *in vitro* [84], a segurança dessa intervenção também é questionável. Assim, há necessidade de se avaliar de forma acurada o papel das diferentes espécies ou subtipos de lactobacilos e de sua função protetora ou patogênica. Para tanto a identificação taxonômica dos lactobacilos é primordial.

1.4 Taxonomia dos *Lactobacillus*

Antes do desenvolvimento da biologia molecular, a identificação de espécies se dava essencialmente pela análise fenotípica dos isolados. As principais características utilizadas incluíam: morfologia, fermentação de glicose e outros carboidratos, configuração do ácido láctico e crescimento em diferentes temperaturas [4, 85]. A identificação de espécies apenas através de testes fenotípicos é limitada, pois muitas espécies diferentes apresentam exigências nutricionais e condições de crescimento semelhantes [86]. Além disso, as condições ambientais no cultivo dos isolados influenciam o resultado dos testes [87]. Os métodos bioquímicos, apesar de laboriosos, são limitados na diferenciação de *Lactobacillus* [4, 46, 87-90]. Por exemplo: *L. acidophilus*, *L. casei* e *L. paracasei* não são passíveis de diferenciação por métodos bioquímicos [90]. A fermentação de carboidratos (API 50 CH – API Biomérieux) identifica erroneamente espécies de *Lactobacillus*: *L. jensenii* e *L. gasseri* são classificados como *L. acidophilus*, e *L. vaginalis* é identificado como *L. fermentum* [89]. Além disso, a taxonomia baseada em critérios fenotípicos não está relacionada à Filogenia das espécies [13]. Baixa reprodutibilidade, laboriosidade e baixo poder discriminatório são, portanto, limitações da análise fenotípica na identificação das bactérias [87].

Em contrapartida, métodos moleculares têm possibilitado a identificação de espécies bacterianas e diferenciação de isolados com maior precisão [88]. Diferentes técnicas moleculares podem ser utilizadas para esse fim. Em geral, os métodos aplicados na análise dos ácidos nucléicos apresentam bom poder discriminatório e aplicabilidade universal. Algumas das técnicas moleculares utilizadas na tipificação de *Lactobacillus* são: Sequenciamento de Genes, Análise do Polimorfismo dos Fragmentos de Restrição (RFLP), Eletroforese em Gel de Campo

Pulsado (PFGE), Ribotipificação, PCR Multiplex, Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso (RAPD), Análise de Restrição do DNA Ribossomal Amplificado (ARDRA), Eletroforese com Gradiente de Desnaturação/Eletroforese com Gradiente de Temperatura (DGEE/TGEE) e Amplificação de Elementos Repetitivos do Genoma (REP-PCR). Recentemente, a técnica de tipificação através do Sequenciamento de Múltiplos *loci* (MLST) está sendo utilizada para análise de *Lactobacillus* spp. [1, 17]. Os métodos moleculares se baseiam na detecção de polimorfismos de DNA entre espécies ou isolados e variam em seu poder discriminatório, reprodutibilidade, facilidade de interpretação e de padronização [91]. Uma breve descrição das técnicas bem como de sua aplicação na tipificação dos lactobacilos será apresentada a seguir.

1.5 Técnicas Moleculares Aplicadas ao Estudo de *Lactobacillus*

Seqüenciamento de Genes: DNA ribossomal e outros genes

RNA ribossomal (rRNA), em especial a região 16S, é um marcador geralmente aceito na análise das relações filogenéticas. Em bactérias, o seqüenciamento dessa região é comumente utilizado por ser bastante conservada, pouco sujeita a pressões ambientais e de tamanho adequado [87]. O seqüenciamento da região do DNA que codifica para a subunidade 16S do rRNA tem sido usado na identificação de bactérias lácticas e na construção de árvores filogenéticas [46, 92-97]. O gene 16S rRNA apresenta nove regiões variadas (V1 a V9) [2] (Figura 2).

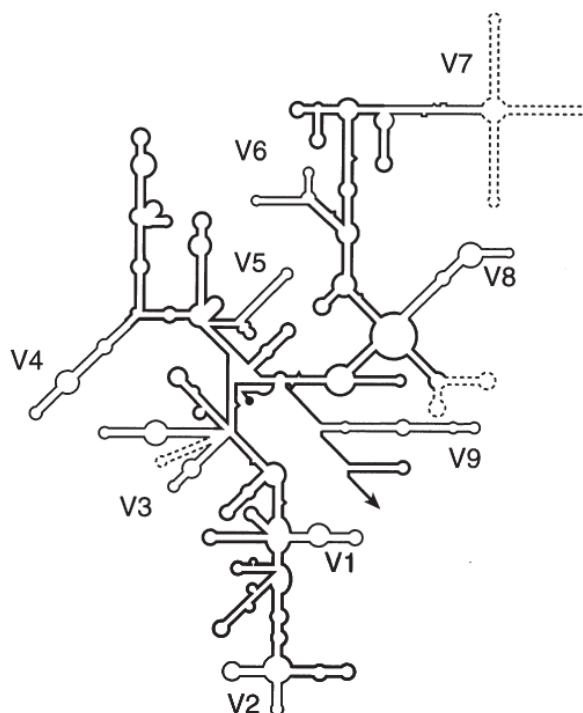


Figura 2: Modelo de estrutura secundária do 16S rRNA em procariotos. As regiões nas quais a seqüência de nucleotídeos é mais variada estão identificadas de V1 a V9 [98].

Dentre essas regiões, o seqüenciamento das regiões V1, V2 e V3 tem sido mais comumente utilizado [93, 99, 100]. O seqüenciamento parcial ou total do gene pode ser utilizado como marcador filogenético de bactérias. No entanto, as características de conservação e de estabilidade, que pareciam ser vantajosas, apresentam limitações. Por ser um gene muito conservado, o seqüenciamento do 16S rRNA pode ter baixo poder discriminatório em espécies filogeneticamente próximas [87, 101]. Além disso, diferentes espécies bacterianas apresentam número variado de cópias do gene, o que pode levar a sub- ou super-representação de espécies nas amostras estudadas [87]. A identificação das espécies de lactobacilos através do sequenciamento do 16S rRNA é problemática. Múltiplas cópias do gene 16S rRNA com diferentes polimorfismos já foram descritas em *L. paracasei/casei*, *L. rhamnosus* e *L. zae* por Vasquez et al. (2005). Nesse mesmo estudo, espécies relacionadas como *L. casei* e *L. zae* apresentavam grande similaridade em algumas cópias do gene 16S rRNA [102]. A presença de polimorfismos e de múltiplas cópias do 16S rRNA pode explicar o baixo poder discriminatório do sequenciamento desse gene no gênero *Lactobacillus* [102]. Existe uma correlação entre a seqüência do DNA genômico e a seqüência do 16S rRNA. Em geral, se dois organismos compartilham similaridade inferior a 97% na seqüência do 16S rRNA, pode-se dizer que eles são pouco relacionados no nível genômico e, portanto, de espécies diferentes. Por outro lado, quando o sequenciamento desses genes apresenta similaridade igual ou superior a 97%, indica serem de espécies muito próximas [5].

Os genes 16S, 23S e 5S rRNA formam um *operon* no cromossomo bacteriano (Figura 3). Além do gene 16S, o seqüenciamento do gene 23S pode ser utilizado como marcador filogenético [25]. Alguns estudos utilizaram o seqüenciamento das

regiões intergênicas 16S-23S [10, 25, 103, 104] e 23S-5S [105, 106] para a identificação de espécies bacterianas.

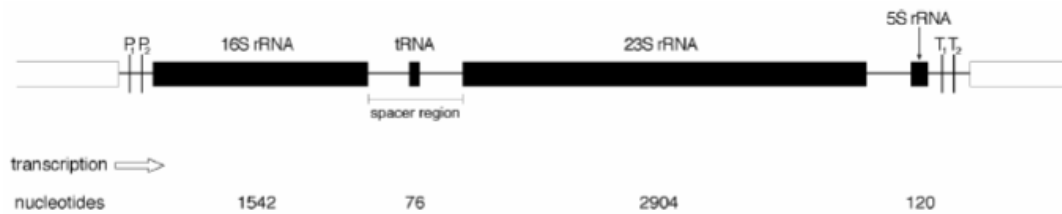


Figura 3: Modelo genérico do operon rRNA em procariotos. P1 e P2 indicam os promotores. T1 e T2 indicam as seqüências de término. [107]

Apenas os dados de hibridização DNA-DNA e/ou análise de genes mais discriminatórios são conclusivos na identificação no nível de espécie [5, 108]. Como alternativa ao rRNA, o seqüenciamento de *housekeeping genes* (genes conservados responsáveis pelo metabolismo bacteriano) tem se apresentado como método filogenético mais robusto na diferenciação de *Lactobacillus* [16, 109]. Nesses genes, a presença de seqüências únicas e conservadas em diferentes espécies bacterianas tem levado a melhor resolução filogenética [87]. Diferentes genes já foram testados como marcadores filogenéticos em *Lactobacillus* (Tabela 2).

Tabela 2: Genes alternativos ao rRNA na identificação de *Lactobacillus*.

Estudo	Espécies testadas	gene	Nome	Resultado
[101]	17 espécies de <i>Lactobacillus</i>	<i>tuf</i>	Fator de elongação TU	Diferenciação interespécies e distinção no grupo <i>L. casei</i>
[110]	<i>L. casei</i> <i>L. paracasei</i> <i>L. zeae</i> <i>L. rhamnosus</i>	<i>recA</i>	Recombinase A	Diferença entre as espécies do grupo <i>L. casei</i>
[111]	<i>L. plantarum</i> , <i>L. pentosus</i> , <i>L. paraplantarum</i>			Diferença entre as espécies do Grupo <i>L. plantarum</i>
[109].	98 espécies / 17 subespécies de <i>Lactobacillus</i>	<i>pheS e rpoA</i>	Subunidade alfa tRNA fenilalanila sintetase/subunidade alfa RNA polimerase	Identificação de todas as espécies estudadas
[112]	13 cepas de bactérias ácido lácticas incluindo <i>Lactobacillus</i>	<i>mle</i>	Enzima malolática	Diferenciação entre <i>Pedicoccus</i> e <i>Lactobacillus</i>
[113]	96 cepas de <i>Lactobacillus</i> 37 espécies	<i>tuf</i>	Fator de elongação	Identificação das espécies estudadas
[105]	27 <i>L. plantarum</i> ssp. 11 <i>L. paraplantarum</i> 5 cepas relacionadas aos <i>L. casei</i>	<i>ISLp1</i>	Seqüência de inserção p1	Identificação infra-espécie, correlação com alimento origem da cepa
[11]	30 espécies de <i>Lactobacillus</i>	<i>Hsp60</i>	groEL que codifica proteína de choque de 60-kDa	RFLP -hsp60 mostrou-se capaz de diferenciar espécies relacionadas

A escolha do gene a ser usado depende de sua validação como bom marcador filogenético após ser testado em um número suficiente de *Lactobacillus* de diferentes origens [11]. Os genes *pheS/rpoA* já foram testados para um bom número de espécies de *Lactobacillus* provenientes de diferentes origens e podem, assim, ser considerados bons marcadores filogenéticos para esse gênero [109].

RFLP – Restriction Fragment Length Polymorphism

(Análise do Polimorfismo dos Fragmentos de Restrição)

RFLP é uma técnica rápida que envolve a amplificação de um gene de interesse através de PCR (reação em cadeia da polimerase). Após, o produto da PCR é clivado por meio de enzimas de restrição, selecionadas de acordo com o tipo de microrganismo em estudo. Os fragmentos obtidos são separados por tamanho através de eletroforese em gel de agarose, obtendo-se um padrão de restrição característico. O poder discriminatório é geralmente baixo embora altamente reprodutível [114] (Figura 5). Quando combinado a outras técnicas moleculares, o RFLP pode ser útil na caracterização e identificação de isolados. Blaiotta *et al.* (2008) conseguiram identificar *Lactobacillus* através do uso de RFLP associado à amplificação do gene *Hsp60* [11]. Uma modificação da técnica, denominada de T-RFLP, utiliza oligonucleotídeos marcados com fluoróforos durante a PCR. Após a clivagem dos produtos da PCR, a marcação fluorescente terminal dos fragmentos é detectada através de seqüenciamento, e os fragmentos não marcados não são analisados. *Lactobacillus* spp. de amostras vaginais [115, 116] e gastrointestinais [117] já foram caracterizados através da técnica T-RFLP.

PFGE - Pulsed Field Gel Electrophoresis

(Eletroforese em Gel de Campo Pulsado)

A PFGE permite a separação de grandes fragmentos de DNA e pode ser utilizada na detecção de deleções, inserções e recombinações. O DNA total do

microrganismo é clivado por enzimas de restrição de corte raro em poucos fragmentos (5-50) que serão separados através da eletroforese. Como os fragmentos de DNA são muito grandes, não podem ser manipulados em solução. A extração do DNA e a clivagem são realizadas na matriz do gel de agarose. Os fragmentos obtidos na matriz são transferidos para uma canaleta no gel e são separados por eletroforese. Nessa técnica a direção da corrente elétrica da eletroforese é alternada com intervalos regulares de tempo. Durante a corrida do gel, pela mudança de direção do campo elétrico, fragmentos menores mudam de orientação mais rapidamente que fragmentos maiores [114]. É uma das técnicas de maior poder discriminatório e bastante reproduzível. Em estudos com *Lactobacillus*, a PFGE mostrou melhor poder discriminatório na tipificação dos isolados em comparação com as técnicas ARDRA, RAPD, e Ribotipificação [4]. Entretanto, nesse mesmo estudo, a PFGE não foi adequada para a identificação entre as espécies de *Lactobacillus* [4] (Figura 5).

Ribotyping

(Ribotipificação)

A Ribotipificação consiste da clivagem do DNA cromossomal com enzimas de restrição, seguida pela hibridização com sonda marcada para o rRNA [118]. As sondas utilizadas podem abranger seqüências parciais e até mesmo a totalidade do *operon* do rRNA [91]. A Ribotipificação apresenta bom poder discriminatório nos níveis de espécie e subespécie, mas com pouca resolução na análise de clonalidade [91]. Kongo et al. (2007) analisaram 6 cepas de *Lactobacillus* provenientes de queijo através de Ribotipificação automatizada, conseguindo

diferenciar *L. paracasei* do *L. plantarum* e detectar polimorfismos entre os isolados de *L. paracasei* [119]. Em outro estudo que comparou diferentes técnicas moleculares na tipificação de *Lactobacillus* provenientes de vinhos os resultados foram semelhantes [4]. Os dados da Ribotipificação possibilitaram a diferenciação taxonômica de algumas cepas não distinguíveis pela técnica de RAPD. A Ribotipificação foi capaz de discriminar adequadamente as cepas padrões de diferentes espécies de *Lactobacillus* [4] (Figura 4).

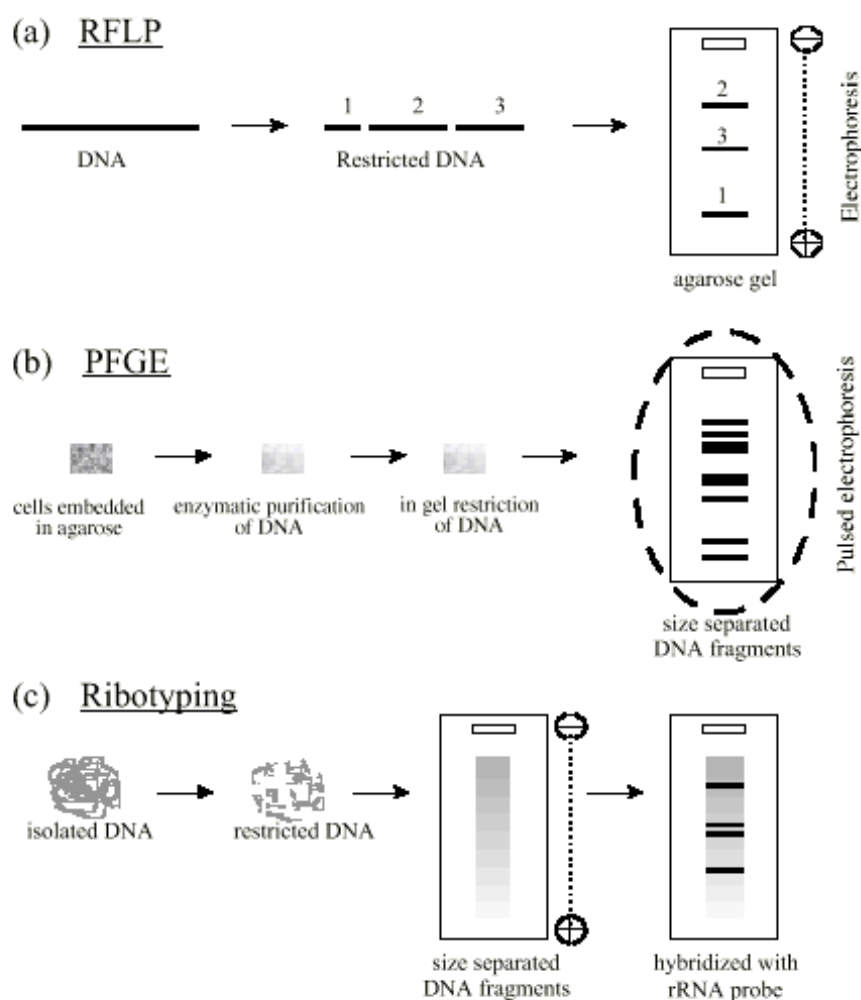


Figura 4: exemplificação dos métodos moleculares utilizados para caracterização de bactérias. Adaptado de [114]

Multiplex PCR

Multiplex PCR é uma variante da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Permite a amplificação simultânea de mais de um alvo de interesse na mesma reação pelo uso de mais de um par de seqüências iniciadoras [120]. A técnica tem sido usada tanto em estudos de tipificação quanto na detecção de patógenos. A confiabilidade do método está relacionada ao número de seqüências-alvo amplificadas. O conhecimento prévio da seqüência-alvo e a otimização das condições da reação são imprescindíveis para a utilização da técnica [114]. Através de Multiplex PCR, *Lactobacillus* de origem humana já foram caracterizados no nível de espécie [121].

RAPD - Randomly Amplified Polymorphic DNA

(Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso)

O RAPD (também chamado de AP-PCR) é um método de genotipificação considerado de fácil execução e confiável, e utiliza seqüências iniciadoras randômicas para caracterização do genoma bacteriano em condições de baixa estringência [91]. Catzeddu *et al.*(2006) avaliaram a diversidade de *Lactobacillus* em produção de pães através de RAPD e verificaram uma reprodutibilidade 0,89 com a formação de uma a oito bandas durante a eletroforese [23]. A habilidade de classificação do RAPD-PCR com um único oligonucleotídeo apresenta baixo poder discriminatório. Vários agrupamentos (*clusters*) incluíam mais de uma espécie de bactérias produtoras de ácido láctico (LAB) [23]. Da mesma forma, Vuyst *et al.* (2002) foram incapazes de obter a diferenciação de espécies de bactérias produtoras de

ácido láctico por essa técnica [122]. Assim, RAPD-PCR com um único oligonucleotídeo é útil apenas como uma ferramenta de rastreamento preliminar na seleção de cepas a serem estudadas [23] e não na diferenciação de espécies ou clones. Quando dois oligonucleotídeos são utilizados na reação, a capacidade de diferenciação dos isolados aumenta [22]. Ao utilizar RAPD com quatro oligonucleotídeos foi possível a diferenciação dos *Lactobacillus* presentes em carnes [123]. O RAPD pode ter uma baixa reprodutibilidade e por isso as condições do experimento devem ser muito controladas. A técnica pode também ser utilizada na caracterização e identificação de isolados de diferentes fontes, dependendo do número e seqüência de oligonucleotídeos empregados.

Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis – ARDRA

(Análise de Restrição do DNA Ribossomal Amplificado por PCR)

ARDRA consiste na amplificação do rRNA dos isolados, seguida da clivagem do produto da PCR e da análise do padrão de bandas em eletroforese [124]. A sua em relação à RAPD é ser menos dependente das condições da reação e ser mais acessível na interpretação de resultados [4]. A técnica pode ser usada na diferenciação de espécies, mas não para a tipificação de isolados [4]. A combinação de ARDRA e do seqüenciamento do 16S rRNA foram utilizadas na identificação das espécies de *Lactobacillus* presentes em queijos [63].

DGGE/TGGE - Denaturing Gradient Gel Electrophoresis/Temperature Gradient Gel

Eletroporesis

(Eletroforese com Gradiente de Desnaturação/Eletroforese com Gradiente de Temperatura)

A Reação em Cadeia da Polimerase seguida de Eletroforese em Gradiente de Temperatura (TGGE) ou Desnaturação (DGEE) permite a separação de seqüências de DNA que diferem por uma única base [125]. O gene do 16S rRNA bacteriano é inicialmente amplificado com uso de seqüências iniciadoras que flanqueiam regiões hipervariáveis. O produto da PCR apresentará fragmentos de igual tamanho, mas com seqüências diferentes. Com DGGE, uréia e formamida são usadas para gerar um gradiente de desnaturação no gel da eletroforese. No TGGE utiliza-se um gradiente de temperatura. O princípio do DGGE/TGGE é baseado na desnaturação específica do DNA dependente da seqüência do fragmento ou gene que está sendo separado na eletroforese. Quando a molécula inicia sua degradação, a migração no gel fica retardada. Com isso, é possível separar e diferenciar o DNA de acordo com sua seqüência, fazendo com que um padrão de bandas característico seja visualizado no gel. Ambas as técnicas podem ser utilizadas no acompanhamento longitudinal da microbiota de um determinado ecossistema, bem como na detecção de novos isolados [87, 114]. A técnica pode ser utilizada sem cultivo prévio dos isolados [87], o que é uma vantagem no estudo de populações microbianas. Alguns estudos já utilizaram DGGE para detectar a presença de microorganismos não cultiváveis [26, 100, 123].

Rep-PCR - Repetitive Extragenic Palindromic-PCR

(PCR Utilizando Palíndromes Repetitivos Extragênicos)

A rep-PCR [126] utiliza seqüências iniciadoras complementares às regiões conservadas, multi-cópias e repetitivas do genoma bacteriano, gerando padrões capazes de diferenciação entre espécies e cepas. Existem três famílias de regiões repetitivas no genoma bacteriano: a) REP (*repetitive extragenic palindromic*) com 35 a 40 pb; b) ERIC (*enterobacterial repetitive intergenic consensus*) com 124-127 pb; e c) BOX com 154 pb. As regiões situadas entre os elementos repetitivos são amplificadas e separadas em gel de eletroforese. Um padrão de bandas é gerado para cada isolado analisado. Algumas características do rep-PCR incluem bom poder discriminatório, baixo custo e amplo espectro de abrangência bacteriana [127]. Além disso, é bastante simples e reprodutível e pode ser utilizado na diferenciação de cepas proximamente relacionadas. O REP-PCR foi utilizado na diferenciação da cepa probiótica de *L. crispatus* CTV-05 de outros *Lactobacillus* vaginais [128], e também foi capaz de identificar as diferentes espécies e origem de lactobacilos presentes em alimentos [63]. No entanto, a diversidade dos isolados identificada por REP-PCR apresentou-se variável de acordo com a espécie de *Lactobacillus* analisada, sendo *L. fermentum* mais diverso que *L. delbrueckii* por exemplo [63]. Outros estudos também utilizaram REP-PCR para a tipificação de *Lactobacillus* [26, 129].

(Nota: No presente texto, *rep-PCR* refere-se à técnica em geral, enquanto que *REP-PCR* refere-se à família específica de seqüências repetidas REP.)

MLST - Multilocus Sequence Typing

(Tipificação Através do Seqüenciamento de Múltiplos *Loc*i)

A MLST surgiu como proposta universal para caracterização de bactérias patogênicas, como a *Neisseria meningitidis* [130]. Nessa técnica, a seqüência parcial de nucleotídeos de sete a oito *housekeeping genes* é utilizada na diferenciação dos isolados em nível gênico. MLST tem se mostrado como uma ferramenta genética adequada para o estudo de populações, tipificação de isolados, caracterização de patógenos e genética evolutiva [1, 130]. Também apresenta alto poder discriminatório [131]. Além disso, é possível comparar os dados das seqüências obtidas em novas amostras com aquelas já disponíveis em bancos de seqüências de acesso eletrônico público pela *internet* [1, 130]. Por isso a MLST está sendo amplamente utilizada no rastreamento de isolados em nível mundial e no estudo da biologia populacional de patógenos [1, 17, 131]. Com essa técnica, dados sobre a origem e reservatório natural dos *Lactobacillus* poderiam ser mais adequadamente estudados. Dois estudos caracterizaram *Lactobacillus* do grupo *L. casei* por MLST [1, 17]. No estudo de Cai *et al.* (2007), quarenta *L. casei* de diferentes origens (alimentos, sangue e trato gastrointestinal de humanos) foram genotipicamente caracterizados [17]. Diancourt *et al.* (2007) também estudou cinqüenta e dois *L. casei* de diferentes origens incluindo seis cepas de humanos [1]. Até o presente momento, não temos conhecimento de nenhum estudo com MLST para análise de lactobacilos orais

A identificação de *Lactobacillus* no nível de espécie é importante devido à sua grande relevância tanto na indústria alimentícia como na área de saúde. Havendo diferentes espécies de *Lactobacillus* presentes no microambiente bucal, é importante identificá-las a fim de avaliar seu possível efeito protetor ou patogênico nos diferentes nichos bucais. A capacidade dos lactobacilos em promover doença ou preveni-la depende de características exclusivas de cada cepa ou espécie e do nicho ecológico colonizado. Todavia, identificação precisa dos *Lactobacillus* é complexa [87]. No estudo da tipificação genotípica das diferentes espécies de *Lactobacillus* o método a ser utilizado precisa apresentar bom desempenho para um número amplo de espécies, bom poder discriminatório, boa reprodutibilidade e custo viável. A técnica de PFGE apresenta ótimo poder discriminatório em comparação aos métodos de RAPD, TGGE, ARDRA, Ribotipificação e rep-PCR [4, 17]. RAPD, apesar de ser comumente utilizada na tipificação de *Lactobacillus*, apresenta problemas de reprodutibilidade e seu poder discriminatório pode ser inferior ao rep-PCR. Por outro lado, PFGE e TGGE são mais laboriosas e requerem equipamentos específicos para seu uso, o que aumentaria custo, principalmente em laboratórios que não as utilizam rotineiramente. A técnica de rep-PCR, por sua vez, apresenta bom poder discriminatório, facilidade de execução, facilidade de interpretação de dados, baixo custo e aplicabilidade já testada na tipificação de diferentes espécies de *Lactobacillus*. [127]. Tais características a tornam uma opção apropriada na tipificação de um grande número de isolados de diferentes espécies de *Lactobacillus*, como o no presente estudo. Além disso, a experiência prévia no uso do rep-PCR auxilia no refinamento da metodologia a ser utilizada [132]. Já para a caracterização de isolados pertencentes a uma mesma espécie um método de maior poder discriminatório deveria ser utilizado na comparação dos

isolados. Nesse caso o método molecular de escolha seria o MLST. Atualmente, acredita-se que a MLST apresenta o maior poder discriminatório dentre todos os métodos citados acima. Também tem aplicabilidade universal uma vez que os dados são disponibilizados via internet e podem ser acessados por pesquisadores em todo o mundo. A portabilidade do MLST associada a sua alta reprodutibilidade e ao alto poder discriminatório o tornam o método de escolha em estudos de biologia populacional, patogenicidade, evolução bacteriana e diversidade genética [130].

2. OBJETIVOS

Os principais objetivos deste estudo são:

- Avaliar o efeito das modificações ambientais na composição de espécies de *Lactobacillus* isolados do biofilme dentário (Artigo I);
- Avaliar o efeito das modificações ambientais na diversidade genética de *Lactobacillus* isolados do biofilme dentário (Artigo I);
- Identificar a filogenia dos *Lactobacillus paracasei* isolados do biofilme (Artigo II);
- Comparar os métodos genotípicos quanto a sua capacidade de identificação e tipificação de *Lactobacillus paracasei* (Artigo III);

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Aspectos Éticos

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (processo n°61/05). O consentimento informado foi obtido de todos os voluntários participantes.

3.2 Desenho Experimental

O estudo (Artigos I, II e III) envolve um modelo de formação de biofilme *in situ* com uma fase sem sacarose e outra com sacarose. Blocos de esmalte dental humano (3 x 3 x 2 mm) foram cortados a partir de terceiros molares não erupcionados e armazenados em solução de formalina 2% e pH 7,0 por pelo menos 30 dias [52]. Quatro blocos de esmalte, obtidos do mesmo dente, foram fixados em aparelho mandibular removível. O flanco vestibular direito conteve dois blocos e o flanco vestibular esquerdo, outros dois blocos. Um espaço de um milímetro foi mantido entre a superfície do aparelho e o esmalte dental para acúmulo do biofilme. Os voluntários foram instruídos a utilizar o aparelho durante o dia e noite e a removê-lo apenas durante as refeições e a higiene bucal. Onze dentistas ou estudantes de Odontologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul participaram do estudo (8 mulheres e 3 homens com idades entre 20 e 32 anos). Os voluntários apresentavam boa saúde geral e odontológica, sem presença de lesões ativas de cárie ou baixo fluxo salivar. Nenhum dos participantes fez uso de antibióticos antes ou durante o período experimental. Os voluntários são residentes de Porto Alegre, tendo acesso a água fluoretada de abastecimento (0,7-1,0 ppmF⁻). A formação de um biofilme dental não cariogênico foi

obtida a partir do gotejamento de água destilada estéril nos blocos de esmalte dental 8 vezes por dia, por seis dias. A formação do biofilme dental cariogênico foi obtida a partir do gotejamento de solução de sacarose 20% nos blocos de esmalte por 28 dias. Em ambas as fases, o aparelho mandibular era removido da cavidade bucal dos participantes no momento do tratamento dos blocos com água ou solução de sacarose.

3.3 Coleta e Processamento do Biofilme (Artigos I, II e III)

Após cada período experimental, o biofilme formado sobre os blocos era coletado e homogeneizado com o auxílio de um escavador de dentina estéril. O biofilme foi armazenado em frasco estéril contendo um mililitro de meio reduzido de transporte (RTF) [46, 133] e pérolas de vidro (diâmetro 3,5-4,5 mm). A amostra foi agitada em aparelho Vortex (Phoenix – AP56) por 30 segundos para dispersão dos agregados bacterianos. A amostra foi diluída serialmente em RTF, e alíquotas de 100 µL de cada diluição foram cultivadas em meio Rogosa SL Ágar (Himedia) a 37°C por 72 horas através da técnica de *pour plate* em aerobiose [8]. Após o crescimento bacteriano, até 30 colônias presumidas de lactobacilos foram aleatoriamente selecionadas: uma grade numerada com 50 áreas era colocada abaixo da placa de Petri, e sorteio determinava o número da área de onde as colônias seriam coletadas. Outros números eram sorteados até que se completasse a amostra necessária. A pureza das culturas foi analisada em microscopia óptica através do método de coloração de Gram. Bacilos gram-positivos que apresentavam crescimento no meio seletivo foram considerados como lactobacilos. Culturas puras foram armazenadas a -70°C em caldo de infusão de cérebro e coração (BHI, Difco) com 15% (v/v) de glicerol.

3.4 Extração do DNA cromossomal (Artigos I, II e III)

A extração do DNA cromossomal dos *Lactobacillus* baseou-se no método descrito por Mantzourani *et al* (2009) [134]. Após crescimento em Rogosa SL Ágar por 24 horas, ¼ de alça contendo a cultura pura de *Lactobacillus* foi suspensa em 50 µL de solução [1:1] composta por TE 50 mM (10 mM Tris-HCL, 1 mM EDTA, pH 8,0) e Tween 20 0,5% (pH 8,0), acrescida de 1 µL de proteinase K (200 µg/mL). Após agitação em aparelho Vortex por 10 s, a mistura foi aquecida em banho seco Microtherm (Camlab Microtherm) sob agitação (50 rpm) durante 2 h a 55°C. Então, a mistura foi aquecida por 5 minutos a 95°C em 50 rpm no mesmo banho seco para inativar a proteinase K. Seguiram-se resfriamento em gelo por 10 minutos e centrifugação dos tubos por 10 s a 13000 rpm para a separação das fases. O sobrenadante, contendo o DNA, foi cuidadosamente removido e separado do precipitado através de pipetagem e transferido para novo frasco previamente identificado que foi, então, armazenado a -70°C.

3.5 Identificação das Espécies de *Lactobacillus* (Artigos I, II e III)

A identificação das espécies de *Lactobacillus* foi realizada através da amplificação e seqüenciamento dos genes *pheS* (subunidade α da phenillalanila) ou *rpoA* (subunidade α da RNA polimerase)[135]. Inicialmente, as sequências iniciadoras para o gene *pheS* eram utilizadas e, se não houvesse amplificação, o gene *rpoA* era amplificado. Os genes *pheS* [pheS21F: 5'-CA(CT)CC(AGCT)GC(ACT)CG(CT)GA(CT)ATG C-3' e

pheS23R: 5'-GG(AG)TG(AG)ACCAT(AGC)CC(AGCT)GC(ACT)CC-3'] e *rpoA*
[*rpoA*21F: 5'-ATGAT(CT)GA(AG)TTTGAAAAACC-3' e *rpoA*23R:
5'-AC(ACT)GT(AG)TT(AG)AT(AGT)CC(AGT)GC(AG)CG-3'] foram amplificados através de PCR em termociclador Flexigene Thermocycler (Flexigene; Techne, Cambridge, United Kingdom). Para a reação da PCR utilizou-se 2,5 µL de tampão 10X; 1,5 µL MgCl₂ 25mM; 1 µL dNTP (3,125 mM); 0,5 µL *Taq polymerase* (AB-gene, Epsom, UK); 1 µL de cada oligonucleotídeo pheS21F e pheS23R ou *rpoA*21F e *rpoA*23R; e 1 µL de DNA alvo em 16,5 µL de água ultra-purificada estéril. Volume final da reação foi de 25 µL. O programa de amplificação para pheS21F/23R foi: desnaturação inicial do DNA por 5 min a 95 °C; 5 ciclos de 1 min a 95°C; 2min15s a 57 °C e 1min15s a 72°C; 15 ciclos de 35s a 95°C, 1min15s a 56°C e 1min15s a 72°C; 10 ciclos de 35s a 95°C; 1min15s a 55°C e 1min15s a 72°C; e extensão final de 7 min a 72°C. O programa de amplificação para *rpoA*21F/23R foi de desnaturação inicial do DNA por 5 min a 95°C; 5 ciclos de 1min a 95°C; 2min15s a 55°C e 1min15s a 72°C; 15 ciclos de 35s a 95°C; 1min15s a 50°C e 1min15s a 72°C; 10 ciclos de 35s a 95°C, 1min15s a 48°C e 1min15s. Os produtos da PCR foram separados em gel de agarose 1% contendo GelRed™ (Biotium, Inc) através de eletroforese com 50 volts por 10 minutos. A visualização do produto da PCR foi realizada através de transiluminador UV com aquisição digital da imagem. Havendo um único fragmento, o produto da PCR era purificado através de precipitação em polietilenoglicol e sequenciado em reação contendo 2 µL do produto da PCR, mais 0,5 µL de BigDye v3.0 (Applied Biosystems, Warrington, UK); 1,75 µL de solução tampão (Applied Biosystems, Warrington, UK); 1,75 µL de água estéril ultra pura e 4 µL de oligonucleotídeo iniciador (3pmol) [134]. Nessa análise apenas uma das fitas de DNA era sequenciada. O protocolo de ciclagem e purificação

seguiu as orientações do fabricante. O sequenciamento foi realizado utilizando-se o sequenciador ABI 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems, Warrington, UK). Após, as seqüências de nucleotídeos obtidas foram manualmente editadas utilizando o programa BioEdit (version 7.0.8, Ibis Biosciences, Isis Pharmaceuticals [<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>]). As seqüências foram identificadas através da comparação da homologia com seqüências de nucleotídeos do banco de dados do Centro Nacional de Informação Biotecnológica (NCBI) dos Estados Unidos (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Definiu-se que similaridades iguais ou superiores a 98% seriam necessárias para classificação das espécies. As espécies de *Lactobacillus* foram identificadas e posteriormente submetidas à análise genotípica.

3.6 REP- PCR (Artigos I e III)

A tipificação genotípica dos *Lactobacillus* foi realizada através de Amplificação de Elementos Repetitivos do Genoma (rep-PCR) [136]. As seqüências de iniciação utilizadas neste estudo foram REP1R (5'-IIINCGNCGNCATCNGCC-3') e REP2 (5'-NCGNCTTATCNGGCCTAC-3'). A amplificação dos fragmentos de DNA foi realizada através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em termociclador Flexigene Termocycler (Flexigene; Techne, Cambridge, United Kingdom) com 2,5 µL de tampão 10X; 3,75 µL MgCl₂ 25mM; 1 µL dNTP (3,125 mM); 0,5 µL *Taq polymerase* (AB-gene, Epsom, UK); 2,75 µL de cada seqüência iniciadora *sense* e *antisense*; 3 µL de DNA alvo em 8,75 µL de água ultra-pura estéril, com volume final de 25 µL. O programa de amplificação utilizado foi: desnaturação inicial por 7 min a 95°C; 32 ciclos de 30s a 94°C; 1 min a 40°C e 8 min a 65°C e extensão final por 16 min a 65°C. Os produtos da PCR foram submetidos a eletroforese em gel de

Metaphor/metasieve agarose 2% contendo GelRed™ (Biotium, Inc). Em cada gel, três canaletas foram utilizados para eletroforese dos marcadores de peso molecular (pGEM DNA markers-Promega), uma canaleta foi preenchida com água ultra-pura estéril (controle negativo) e as outras 12 canaletas com as amostras a serem estudadas. Para a eletroforese, foram aplicados 100 volts por 120 min. A visualização das bandas foi realizada através de transiluminador UV. As imagens dos géis foram digitalizadas e armazenadas para análise posterior. Para comparação dos géis, foi utilizado o programa GelCompar II. Cepas da Coleção Alemã de Microrganismos e Culturas Celulares (DSM): 2649 *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, 4905 *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, 5622 *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, 8741 *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, 20011 *Lactobacillus casei*, 20012 *Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans*, 20052 *Lactobacillus fermentum*, 20178 *Lactobacillus zae*, 20243 *Lactobacillus gasseri*, 20258 *Lactobacillus paracasei* subsp. *Tolerans*, e cepas da Coleção de Culturas da Universidade de Gotemburgo (CCUG): 21452T *Lactobacillus rhamnosus*, 27333 *Lactobacillus rhamnosus*, 27772 *Lactobacillus rhamnosus* foram igualmente submetidas a REP-PCR para controle da reação e comparação dos isolados.

3.7 MLST (Artigos II e III)

As cepas de *L. paracasei* identificadas no biofilme foram caracterizadas genotipicamente através da técnica MLST. Os genes selecionados para o sequenciamento foram *fusA*, *ileS*, *lepA*, *leuS*, *pyrG*, *recA* e *recG*. Essa escolha baseou-se em estudo prévio de Diancourt *et al.* (2007) [1]. As condições para

amplificação dos genes foram: 94°C por 5 min; 30 ciclos de 94°C por 30s, 55°C por 30s, e 72°C por 30s; com extensão final de 72°C por 5 min. Os produtos da PCR foram sequenciados conforme descrito acima. Para todos os genes, a sequência parcial de nucleotídeos de ambas as fitas de DNA foram manualmente editadas com o programa BioEdit. Através da comparação entre as sequências *sense* e *antisense*, uma sequência consensual foi obtida para cada gene de cada um dos isolados. Cada nova sequência de nucleotídeo (que diferia em pelo menos um nucleotídeo) de cada alelo era designada com um diferente número arbitrário. Para cada cepa, a combinação única dos sete alelos definia um perfil alélico que era designado como sequência de tipificação (ST). O alinhamento das sequências foi realizado com auxílio do programa Bioedit. As análises descritivas da evolução, como tamanho de fragmento, conteúdo de % GC, razão d_n/d_s (em que d_s é o número de substituições silenciosas por sítio e d_n o número das mutações não silenciosas por sítio), número de sítios e alelos polimórficos, diversidade de nucleotídeos e teste D de Tajima, foram obtidos através do programa DnaSP (versão 4.90.1; Universitat de Barcelona [<http://www.ub.edu/dnasp/>]). A sequência de cada alelo para cada *locus* gênico foi analisada através do programa SplitsTree (versão 4.0, Algorithms in Bioinformatics, University of Tübingen [<http://www.splitstree.org/>]). O Programa para Detecção de Recombinação (RDP) foi utilizado na análise da taxa de recombinação na população estudada (versão 2.0, Microbiology Department, University of Cape Town [<http://Darwin.uvigo.es/ddp/rdp.html>]). O programa ClonalFrame (versão 1.0, Departamento de Estatística, Universidade de Warwick [<http://bacteria.stats.ox.ac.uk>]) foi utilizado para analisar a relação clonal entre isolados através da criação de uma árvore filogenética consenso a partir de seis repetições. Evidência de recombinação também foi avaliada através da construção

de árvore filogenética baseada em máxima verossimilhança através do programa PAUP [version 4 beta 10; [137]]. Para cada um dos 7 genes uma árvore filogenética era computada e comparada com as demais através do teste Shimodaira-Hasegawa (S-H) para identificar diferenças entre as topologias das diferentes árvores (diferenças log likelihood, $\Delta\text{-ln L}$). Em uma população clonal, cada árvore filogenética deve ser congruente e não deve haver diferenças no teste de verossimilhança [138, 139]. A fim de acessar a extensão de congruência entre as árvores filogenéticas baseadas na verossimilhança testes de randomização foram conduzidos, nos quais o valor $\Delta\text{-ln L}$ para cada gene foi comparado a valores equivalentes computados de 200 árvores randômicas criadas para cada gene.

3.8 Análise Estatística

Testes não paramétricos foram utilizados na comparação da recuperação de *Lactobacillus spp.* após ambas as fases experimentais: o teste de Friedman foi seguido do teste de Wilcoxon nas comparações individuais. O teste de Wilcoxon foi aplicado na comparação do número de cepas, número de genótipos e número de espécies de *Lactobacillus* em ambas as fases experimentais. Considerou-se significância estatística quando erro α foi $<0,05$.

4. RESULTADOS

Um total de 222 amostras de *Lactobacillus* foram estudados, sendo 31 *Lactobacillus* provenientes da fase sem sacarose e 191 *Lactobacillus* da fase com sacarose (Artigos I, II e III). Ocorreu maior recuperação de lactobacilos após a exposição a sacarose (Wilcoxon, $p=0.001$).

Para a identificação das espécies de *Lactobacillus spp.* no biofilme oral, os genes *pheS/rpoA* foram sequenciados. O gene *pheS* foi amplificado em quase todas as amostras estudadas com exceção de algumas espécies (que foram posteriormente identificadas como *L. rhamnosus* pelo sequenciamento do gene *rpoA*). As cepas que apresentavam sequência parcial do gene *pheS* semelhante à sequência da cepa ATCC 334 foram referidas na tese e nos artigos como *L. paracasei*. As espécies de *Lactobacillus* encontradas foram *L. paracasei* (n=75), *L. fermentum* (n=70), *L. rhamnosus* (n=69), e *L. gasei* (n=8).

4.1 Composição do Biofilme

A diversidade de espécies de *Lactobacillus* foi maior na fase cariogênica do que na fase não-cariogênica ($p=0,045$). Uma média 0-2 espécies de *Lactobacillus* por indivíduo foi encontrada na fase não-cariogênica em comparação à média 2-3 espécies na fase cariogênica. A prevalência de *L. fermentum* foi similar em ambas as fases experimentais, nas quais 6/11 indivíduos apresentavam-se colonizados na fase sem sacarose em comparação a 8/11 indivíduos após o período de desafio cariogênico ($p=0.721$) (Figura 5). Um indivíduo que apresentava colonização por *L. fermentum* no biofilme na fase sem sacarose deixou de apresentá-la após o período de exposição à sacarose (Figura 5). A prevalência de

L. rhamnosus aumentou no biofilme após o período experimental com sacarose de 2/11 para 8/11 indivíduos colonizados ($p= 0.028$). *L. paracasei* foi associado ao ambiente cariogênico uma vez que sua recuperação no período de sacarose (7/11 indivíduos, $n=73$ cepas) foi mais abundante do que no biofilme sem sacarose (2/11 indivíduos, $n=2$ cepas) ($p=0,012$) (Figura 5). A prevalência de *L. gasseri* foi baixa em ambas as fases experimentais ($p=1.00$) (Figura 5). Dois indivíduos apresentavam *L. gasseri* no biofilme após a fase sem sacarose e apenas um deles permaneceu colonizado após a fase com sacarose.

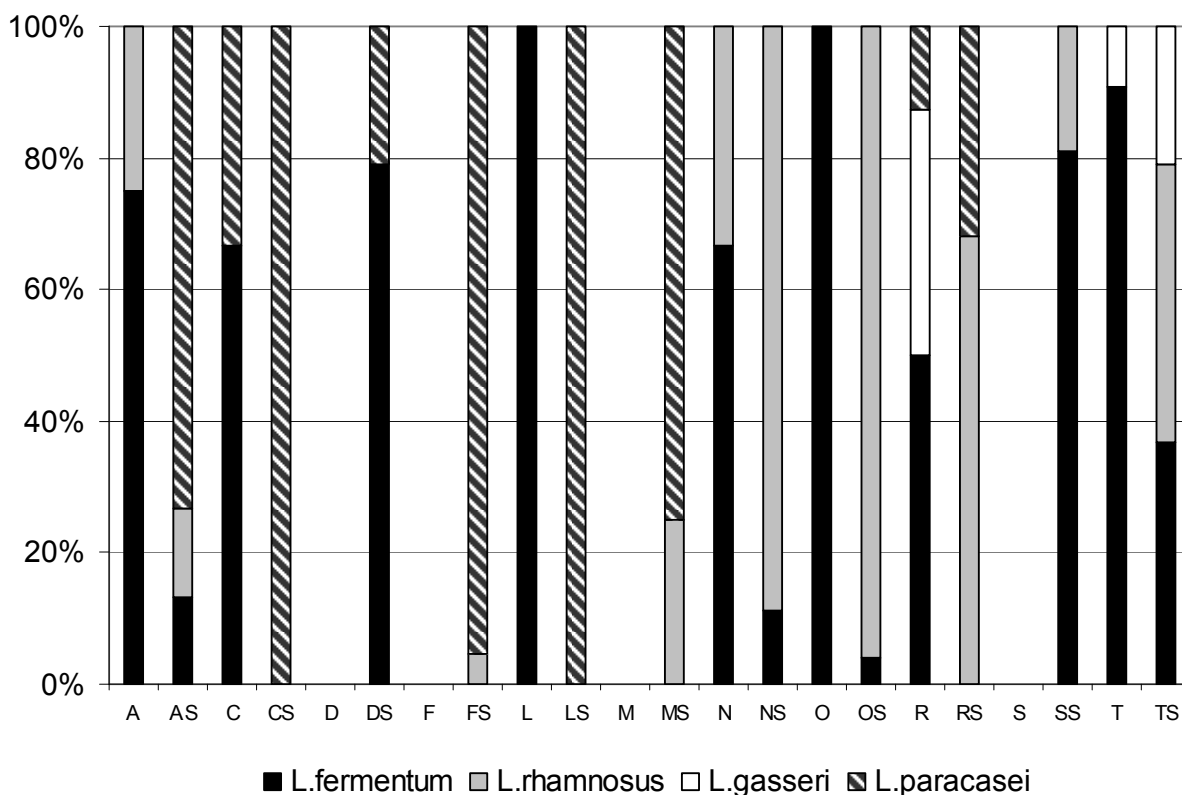


Figura 5: Frequência de distribuição (%) das espécies de lactobacilos nas fases com e sem sacarose por paciente. Diferentes letras iniciais representam diferentes indivíduos. Letras iniciais seguidas de S identificam a fase com sacarose.

O número de biofilmes colonizados por indivíduo aumentou de 7 para 11 após exposição a sacarose. Quatro indivíduos (D, F, M, e S) não apresentavam *Lactobacillus* no biofilme na fase sem sacarose, mas tornaram-se colonizados após a exposição a sacarose (Figura 6).

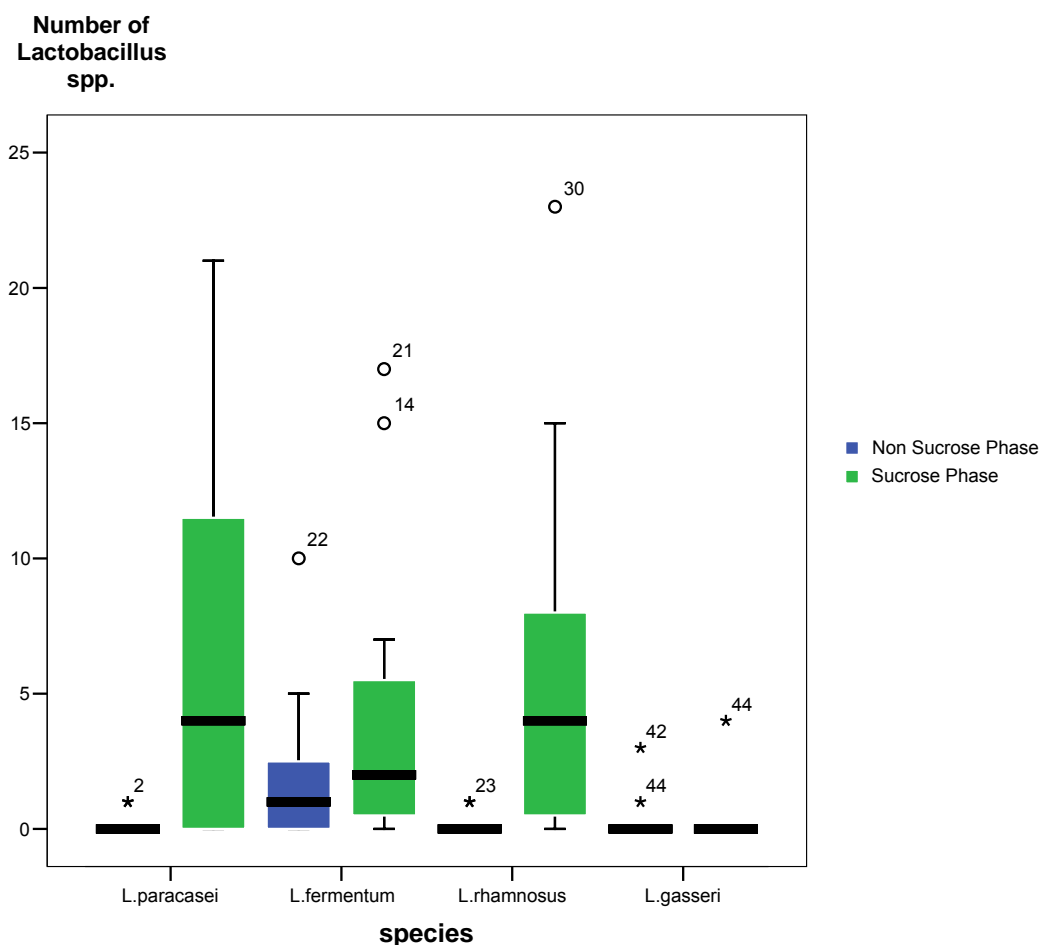


Figura 6: Mediana e variação inter-quartil (25-75%) do número de *Lactobacillus spp.* encontrados nas duas fases experimentais com e sem sacarose. *L.paracasei* ($p=0.012$), *L.fermentum* ($p=0.721$), *L.rhamnosus* ($p=0.028$) and *L.gasseri* ($p=1.00$).

(○= valores outliers e *= valores extremos).

4.2 Diversidade Genética de *Lactobacillus* no Biofilme Oral

Foi avaliada a diferença na diversidade genética de *Lactobacillus* relacionada a alterações ambientais como a exposição frequente a sacarose. O método REP-PCR possibilitou agrupar os 235 *Lactobacillus* (222 isolados clínicos e 13 cepas de referência) em 103 grupos. Cada padrão de REP-PCR foi numerado de 1 a 103. Todas as cepas de referência foram agrupadas em diferentes subgrupos de acordo com sua designação taxonômica. O REP-PCR mostrou-se altamente reprodutível uma vez que o nível de similaridade apresentado pelos marcadores de peso molecular foi de 96,95% entre os diferentes géis. Os isolados clínicos (n=222) puderam ser agrupados em 90 padrões distintos de REP-PCR. A similaridade geral entre todos os isolados (n=235) foi de 70,29%.

Em 64 casos, uma única cepa estava relacionada a um único padrão de REP-PCR. Em 39 casos, múltiplas cepas (variação de 2 a 15 cepas) foram agrupadas em um mesmo perfil de REP-PCR. Em 19 casos, cepas de uma mesma espécie mas coletados de indivíduos diferentes foram agrupadas pelo REP-PCR. Em 20 casos, cepas da mesma espécie e provenientes do mesmo indivíduo foram agrupadas pelo REP-PCR.

Padrões distintos de REP-PCR foram observados entre as 4 diferentes espécies de *Lactobacillus* estudadas. O REP-PCR não agrupou cepas de diferentes espécies no mesmo agrupamento. Um alto poder discriminatório em nível de espécie foi observado neste estudo, uma vez que todas as cepas de *L. paracasei*, *L. fermentum*, *L. rhamnosus* e *L. gasseri* puderam ser diferenciadas umas das outras por terem menos de 89% de similaridade entre si. As cepas de *L. paracasei* puderam

ser subdivididas em 25 subgrupos, *L. fermentum* em 36, *L. rhamnosus* em 27, e *L. gasseri* em seis subgrupos.

O efeito da modificação ambiental na diversidade genética dos *Lactobacillus* pode ser observado na tabela 3. Na maioria dos casos diferentes genótipos estavam presentes na fase sem sacarose em comparação à fase com sacarose. Apenas o genótipo 96 de *L. fermentum* do indivíduo T se manteve presente em ambas as fases experimentais.

O número de genótipos variou de 0 a 14 por indivíduo. A tabela 3 mostra o número e o padrão de REP-PCR categorizado por espécies (n=4) nos 11 indivíduos participantes do estudo. Em 2/44 casos uma determinada espécie de *Lactobacillus* estava presente na fase sem sacarose, mas ausente após a fase com sacarose. Em 14/44 uma determinada espécie de *Lactobacillus* foi observada somente após exposição a sacarose. Em 18/44 não havia presença de *Lactobacillus* nem antes nem depois da exposição a sacarose. Em 10/44 casos, *Lactobacillus* da mesma espécie estavam presentes e em ambas as fases experimentais, sendo que: um caso apresentou igual número de genótipos recuperados (Indivíduo C - *L. paracasei*); cinco casos apresentaram aumento da diversidade genética (indivíduo A - *L. rhamnosus*, indivíduo R- *L. paracasei*, indivíduo L - *L. fermentum*, indivíduo N - *L. rhamnosus*, indivíduo T- *L. gasseri*) e quatro casos apresentaram redução da diversidade genética (indivíduos A, N, O, T - *L. fermentum*) após exposição a sacarose. (Tabela 3).

Tabela 3: Genótipos de *Lactobacillus spp.* (números 1 a 103) identificados no biofilme através de rep-PCR sem e com a presença de sacarose em 11 indivíduos, sendo 90 cepas isoladas do biofilme e 13 cepas de referência.

Espécies por indivíduo	Genótipos recuperados do biofilme sem sacarose	Genótipos recuperados do biofilme com sacarose
<i>L. paracasei</i>		
Indivíduo A	-	66, 80, 82
Indivíduo C	99	55
Indivíduo D	-	50, 70, 79, 101
Indivíduo F	-	51, 66, 68, 75, 77, 78
Indivíduo L	-	4, 70, 103
Indivíduo M	-	7, 8, 58, 69, 72
Indivíduo N	-	-
Indivíduo O	-	-
Indivíduo R	61	52, 64, 71,
Indivíduo S	-	-
Indivíduo T	-	-
<i>L. fermentum</i>		
Indivíduo A	1, 16, 25	62, 63
Indivíduo C	27, 16	-
Indivíduo D	-	88, 89, 90, 91, 92, 93, 97
Indivíduo F	-	-
Indivíduo L	13	1, 91
Indivíduo M	-	-
Indivíduo N	1, 57	16
Indivíduo O	18, 25, 26	96
Indivíduo R	-	94, 95
Indivíduo S	-	1, 11, 12, 13, 15, 24
Indivíduo T	5, 14, 15, 17, 20, 21, 86, 96	6, 23, 85, 87, 96, 98
<i>L. rhamnosus</i>		
Indivíduo A	42	73, 49
Indivíduo C	-	-
Indivíduo D	-	-
Indivíduo F	-	44
Indivíduo L	-	-
Indivíduo M	-	22, 28, 39, 46
Indivíduo N	22	30, 32, 40, 44, 46
Indivíduo O	-	22, 28, 32, 33, 34, 39, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 59
Indivíduo R	-	30, 31, 32, 35, 36, 46, 53
Indivíduo S	-	32, 33, 44, 100
Indivíduo T	-	30, 33, 39, 42, 56, 59
<i>L. gasseri</i>		
Indivíduo A	-	-
Indivíduo C	-	-
Indivíduo D	-	-
Indivíduo F	-	-
Indivíduo L	-	-
Indivíduo M	-	-
Indivíduo N	-	-
Indivíduo O	-	-
Indivíduo R	84	-
Indivíduo S	-	-
Indivíduo T	37	2, 19, 29, 81

4.3 Diversidade Genética de *L. paracasei* no Biofilme Oral

A espécie de *Lactobacillus* mais prevalente (*L. paracasei*, $n=75$) foi submetida a análise genotípica. Os *L. paracasei* provenientes do biofilme dental de sete participantes, em ambos os períodos experimentais, foram submetidos a tipificação pela técnica MLST. Para fins de comparação, os dados de Diancourt *et al.* [1] foram adicionados aos resultados deste estudo. As características dos *housekeeping genes* analisados são apresentadas na Tabela 4. O conteúdo de GC% observado em todos os alelos variou de 46,9 a 50,4 e foi semelhante à média de GC% (46,6) do genoma completo da cepa ATCC 334. O número de alelos por gene variou de 4 (*pyrG*) a 14 (*leuS*). O número de sítios polimórficos variou entre 3 (*pyrG*) e 21 (*leuS*). A diversidade de nucleotídeos por sítio (π) nos sete genes variou de 0,00310 no gene *fusA* a 0,01124 no *recG*. A proporção de modificações nos nucleotídeos que alterou a sequência de aminoácidos (d_n) e a proporção de alterações silenciosas (d_s) foram calculadas para cada gene, e a relação d_n/d_s foi menor que 1 (um), indicando seleção contrária à modificação de aminoácidos e excluindo seleção positiva na diversidade dos alelos estudados. Tal fato já seria esperado em genes conservados. Dois genes (*lepA* e *leuS*) apresentaram valores positivos no teste de Tajima, o que indica um equilíbrio no potencial de seleção desses genes, o que também é consistente com o maior número de polimorfismos observados (14 e 21, respectivamente) (Tabela 4).

Tabela 4: Características dos loci gênicos incluídos no MLST. Dados combinados do presente estudo (n=75) com os de Diancourt *et al* [1] (n=52).

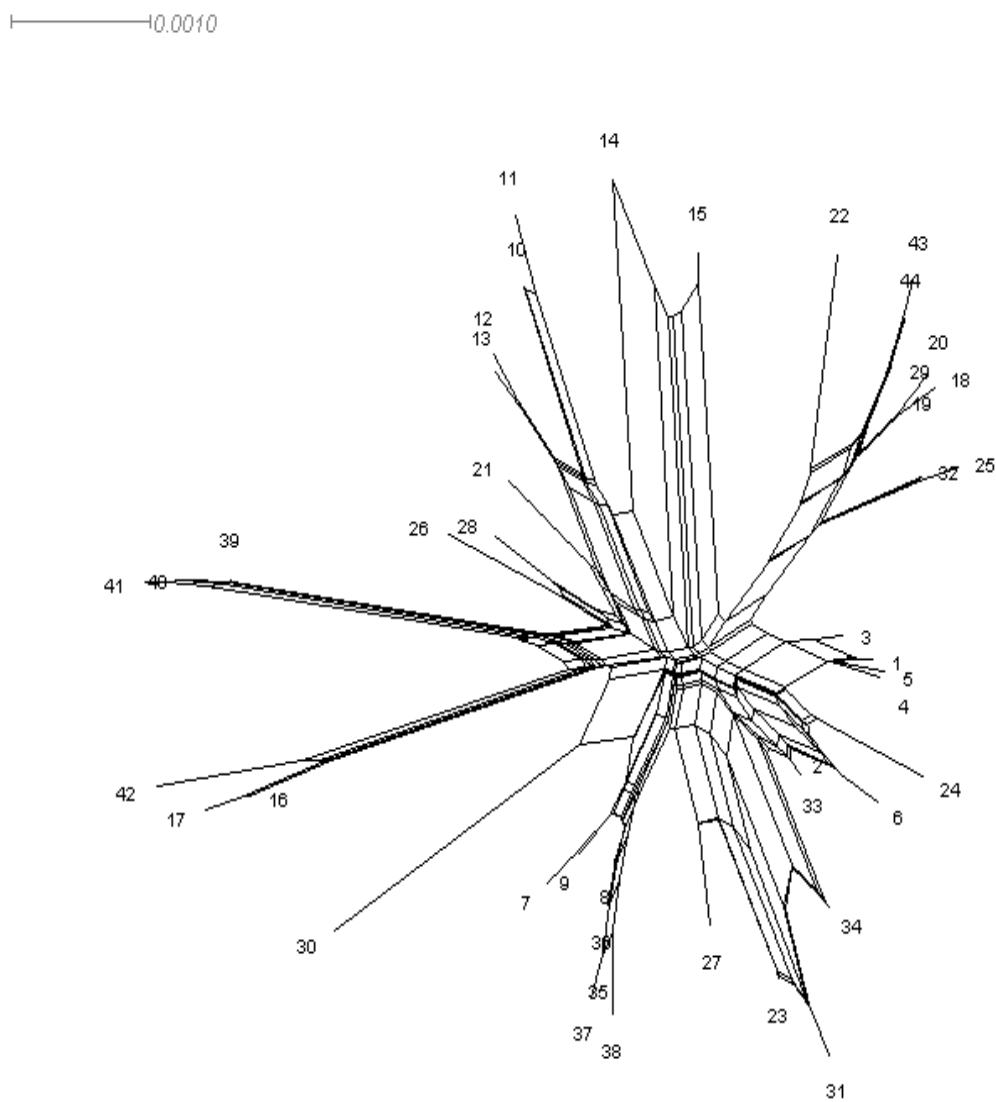
Gene	Tamanho (bp)	G+C (mol%)	Alelos	Sítios Polimórficos	π	θ	dN/dS	Tajima's D
<i>fusA</i>	663	49.4	9	8	0.00310	0.00242	0.034	-1.70921
<i>ileS</i>	360	46.9	12	11	0.00728	0.00666	0.106	-0.73996
<i>lepA</i>	549	50.4	13	14	0.00682	0.00509	0.079	0.02913
<i>leuS</i>	642	48.4	14	21	0.00688	0.00649	0.089	0.37442
<i>pyrG</i>	345	46.9	4	3	0.00435	0.00176	0.148	-0.19469
<i>recA</i>	315	48.0	6	6	0.00635	0.00386	0.161	-1.02551
<i>recG</i>	342	48.5	10	14	0.01124	0.00818	0.017	-0.17992

dN/dS = Média de substituições não silenciosas/silenciosas; π = diversidade de nucleotídeos por sítio;

θ = número médio de diferenças de nucleotídeos por sítio.

Através da análise do programa RDP, nenhum sinal evidente de recombinação para cada um dos genes analisados individualmente foi observado. No entanto, o gráfico criado a partir de uma matrix de distâncias de todos os alelos dos sete *loci* gênicos utilizando o método NeighborNet no programa Splitstree 4.0 mostrou uma estrutura de rede indicativa de incompatibilidades significativas resultantes de recombinação (Teste Phi, $p = 5.22 \times 10^{-6}$). (Figura 7).

Figura 7: Dendograma construído a partir da seqüência concatenada dos sete *loci* gênicos, mostrando a relação entre os isolados. O teste Phi mostrou evidencia de recombinação ($p = 5.22 \times 10^{-6}$). Os números representam os diferentes STs. Dados combinados do presente estudo (n=75) com os de Diancourt *et al* [1] (n=52)



A razão r/m foi de 2,66 com 95% de credibilidade no intervalo de 1,47-4,37 e teste S-H de congruência demonstrando que todas as árvores filogenéticas baseadas na máxima verossimilhança geradas para cada *loci* gênico do MLST foram significativamente não-congruentes (Tabela 5). A comparação dos valores de $\Delta -lnL$ para as árvores filogenéticas baseadas na máxima verossimilhança indicam que não há diferença significativa entre elas e as árvores randomicamente geradas.

Tabela 5: Teste da congruência entre a árvore gênica baseada na verossimilhança e árvores randômicas.

Locus	- lnL	$\Delta -lnL$	$\Delta -lnL$ de árvores randômicas
<i>fusA</i>	979.312	69.406 – 76.946	60.176 – 77.888
<i>ileS</i>	587.394	51.148 – 89.128	67.974 – 91.232
<i>lepA</i>	881.891	63.512 – 110.261	88.153 – 116.557
<i>leuS</i>	1046.010	147.011 – 272.294	215.342 – 280.560
<i>pyrG</i>	497.204	2.980 – 4.638	1.888 – 4.802
<i>recA</i>	477.317	12.700 – 15.743	8.475 – 16.034
<i>recG</i>	582.620	100.070 – 213.692	153.945 – 223.997

($p < 0.05$ para todos os valores $-lnL$)

Através da análise dos sete *loci* nos 75 isolados de *L. paracasei* provenientes desses indivíduos, 14 genótipos foram encontrados. O número de genótipos foi variado: 5 (indivíduo R), 3 (indivíduos L e F) e 2 (indivíduos A, C, D, M). Alguns genótipos de *L. paracasei* foram compartilhados por diferentes indivíduos. ST 40 foi dominante na amostra e foi observado em isolados provenientes dos indivíduos A, C e F. Além desse genótipo, os genótipos ST 33 (indivíduos M e R) e

ST 41 (indivíduos F e A) também foram comuns entre indivíduos não relacionados. Os genótipos de *L. paracasei* provenientes do biofilme formado sem sacarose (indivíduos C e R) foram diferentes dos genótipos de *L. paracasei* recuperados nos mesmos indivíduos no biofilme submetido à exposição freqüente a sacarose. Apesar disso, um mesmo genótipo (ST 9) foi comum tanto ao biofilme formado com sacarose como ao formado sem sacarose (Indivíduos C e R). Três voluntários (R, C, D) apresentaram *L. paracasei* que já haviam sido isolados de produtos alimentícios lácteos (ST 9 e 16) [1] (Tabela 6).

Tabela 6. Perfil alélico e STs das cepas de *L. paracasei* (n=75) analisadas no presente estudo. STs 1-32 já haviam sido identificadas por Diancourt *et al* [1] e STs 33-44 foram identificados no presente estudo.

Indivíduos ^a	No. de isolados	Alelos						ST	
		<i>fusA</i>	<i>ileS</i>	<i>lepA</i>	<i>leuS</i>	<i>pyrG</i>	<i>recA</i>		<i>recG</i>
RS	1	4	2	3	3	1	1	3	9
C	1	4	2	3	3	1	1	3	9
DS	2	4	5	6	6	1	1	5	16
MS	2	1	2	1	1	1	1	2	33
RS	1	1	2	1	1	1	1	2	33
R	1	1	3	7	5	1	1	2	34
LS	16	4	2	3	13*	1	5*	3	35
LS	1	4	2	3	13*	1	1	3	36
DS	1	4	2	3	13*	4*	5*	3	37
LS	1	4	2	12*	13*	1	5*	3	38
FS	1	4	10*	11*	14*	1	1	9	39
AS	9	4	10*	11*	14*	4*	1	9	40
CS	1	4	10*	11*	14*	4*	1	9	40
FS	18	4	10*	11*	14*	4*	1	9	40
AS	2	4	11*	11*	14*	4*	1	9	41
FS	2	4	11*	11*	14*	4*	1	9	41
MS	10	4	12*	13*	6	1	6*	5	42
RS	1	9*	8	7	8	1	1	10*	43
RS	4	9*	8	7	8	1	1	1	44

^a Letras iniciais diferentes identificam diferentes indivíduos e letras iniciais seguidas pela letra S identificam a fase com sacarose. Novos alelos apresentam-se identificados com asterisco.

Para avaliar a relação entre os *L. paracasei* selecionados do biofilme, um dendograma baseado no perfil alélico dos genes *fusA*, *ileS*, *lepA*, *leuS*, *pyrG*, *recA* e *recG* foi criado (Figura 8). STs 1 a 32 referem-se aos isolados provenientes de Diancourt. *et al.* (2007) [1] e STs 33 a 44 foram isolados neste estudo. STs 9 e 16 foram comuns a ambos os estudos. É possível observar quatro agrupamentos de *L. paracasei* no dendograma criado. Os *L. paracasei* isolados de humanos e aqueles isolados de produtos alimentícios foram encontrados dispersos pelo dendograma.

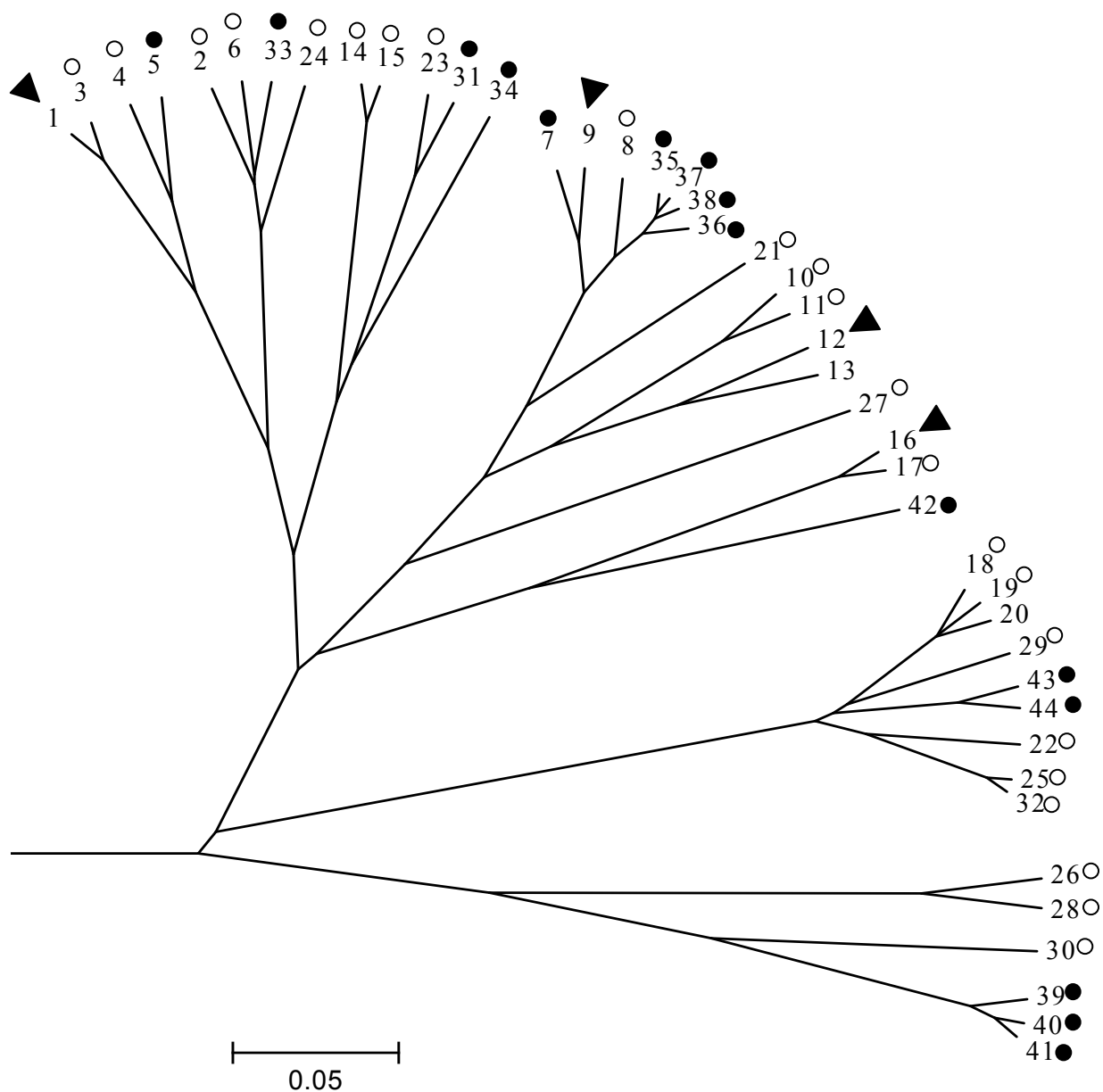


Figura 8. Dendrograma criado a partir das seqüência concatenadas dos 7 loci de *Lactobacillus paracasei*. A numeração refere-se aos STs: STs 1-32 já haviam sido identificadas por Diancourt *et al* [1] e STs 33-44 foram identificadas no presente estudo. STs provenientes de fontes humanas são identificadas com o símbolo ● e aquelas provenientes de alimentos com ○ e aquelas isoladas de alimentos e humanos com ▼.

4.4 Comparação entre REP-PCR e MLST na Tipificação de *L. paracasei*

O dendograma obtido a partir da análise REP-PCR agrupou os 75 *L. paracasei* em 25 subgrupos classificados a partir de letras minúsculas de **a** a **z**. Nove dos subgrupos de REP-PCR (**a, d, h, j, k, l, n, r, s**) eram compostos por um número variável de isolados contendo de 2 a 15 isolados. Os subgrupos com maior número de isolados foram o **j** (n=15) e o **l** (n=9). Para 16 cepas de *L. paracasei* um padrão único de REP-PCR foi observado (**b, c, e, f, g, i, m, o, p, q, t, u, v, x, y, z**). O mesmo subgrupo de REP-PCR (**j** e **l**) foi compartilhado por cepas de diferentes origens/indivíduos. Em todos os demais subgrupos, apenas cepas obtidos da mesma origem/indivíduo foram agrupadas pelo REP-PCR (Figura 9).

A técnica MLST, com o seqüenciamento parcial de sete genes conservados, revelou 14 tipos sequenciais (STs) entre os *L. paracasei* estudados. STs 35 (n=16) e 40 (n=28) foram os mais prevalentes na amostra. Os demais STs apresentaram número variado de isolados: ST 9 (n=2) ST 16 (n=2), ST 33 (n=3), STs 41 (n=4) e ST 44 (n=4), ST 42 (n=10). Alguns STs (34, 36, 37, 38, 39, e 43) possuíam apenas um isolado de *L. paracasei* cada (Figura 9).

Diferentes números de genótipos foram obtidos para as mesmas 75 cepas de *L. paracasei* de acordo com o método molecular escolhido (14 genótipos por MLST versus 25 genótipos por REP-PCR) (Figura 9).

Em alguns exemplos o REP-PCR foi mais discriminatório que o MLST. Cepas com o mesmo ST apresentavam diferentes padrões de REP-PCR, variando de 2 a 8 subgrupos. ST 9 foi subdividida pelo REP-PCR em repTC **q** e **x**;

ST16 em repTC **o** e **y**; ST 33 em repTC **s** e **m**; ST 35 em repTC **d**, **e** e **l**; ST 42 em repTC **i**, **k**, **r**, **u**; e St 40 em repTC **a**, **b**, **c**, **f**, **h**, **j**, **t**, **v**. (Figura 9)

Por outro lado, houve também exemplos em que o MLST foi mais discriminatório que o REP-PCR. Cepas pertencentes a diferentes STs foram agrupadas pelo REP-PCR: STs 37 e 35 (repTC **l**), 38 e 35 (repTC **d**), 39 e 40 (repTC **a**), 41 e 40 (repTC **j**) e 43 e 44 (repTC **n**) (Figura 10). A Figura 10 exemplifica um desses casos em que o MLST foi mais discriminatório que o REP-PCR: cepas pertencentes a diferentes STs (35 e 37) não puderam ser diferenciadas pelo REP-PCR apresentando 97.62% de similaridade na comparação pareada.

MLST e REP-PCR apresentaram correspondência em 2 casos. STs 34 e 36, foram agrupados apenas com cepas de mesmo perfil de MLST pela técnica de REP-PCR (Figura 9). ST 34 foi agrupada no repTC **g** e ST 36 foi agrupada no repTC **z**, respectivamente.

Quando ambos os métodos genotípicos foram combinados, ao invés de 25 genótipos (técnica de REP-PCR) ou 14 genótipos (técnica de MLST) foi possível identificar 30 diferentes genótipos entre os 75 isolados de *L. paracasei*.

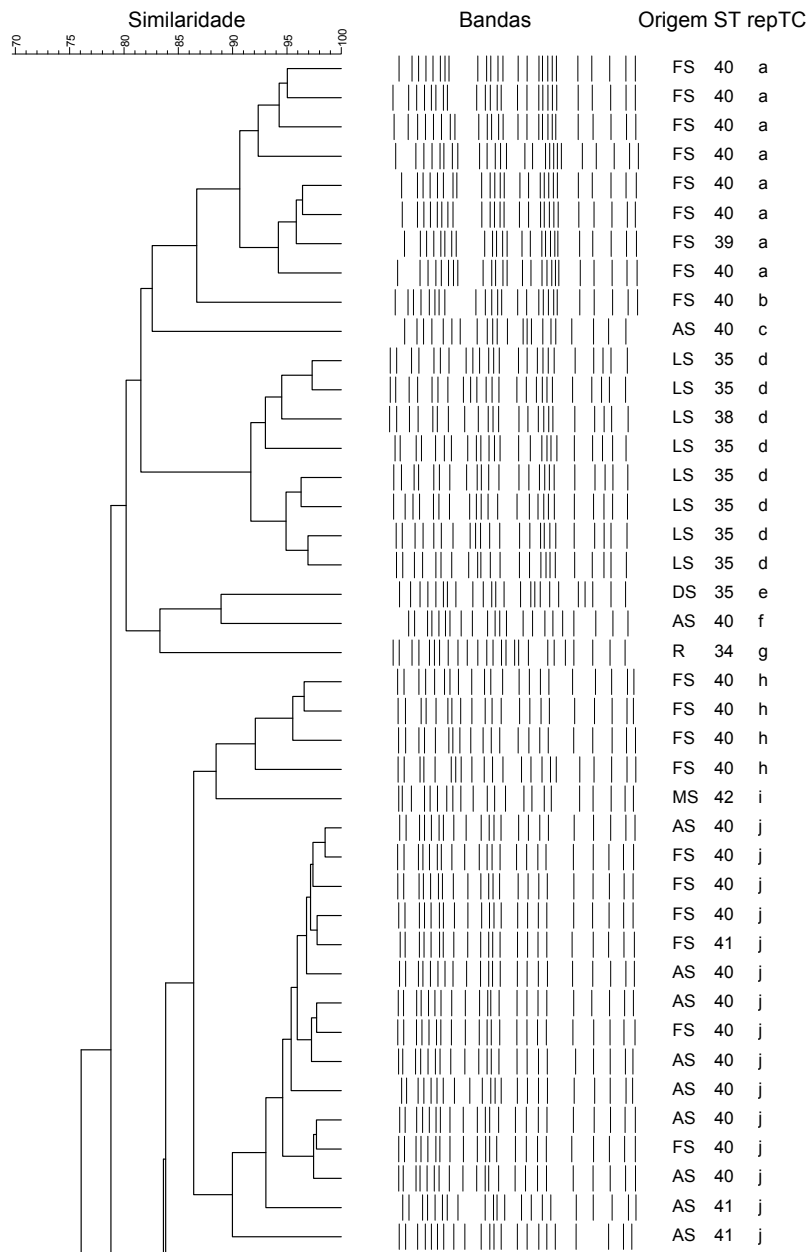


Figura 9: Comparação entre o padrão de REP-PCR (repTC – letras minúsculas) e seqüência no MLST (ST-números) para os 75 *L.paracasei* de diferentes indivíduos/origem (Letras iniciais diferentes identificam diferentes indivíduos e letras iniciais seguidas pela letra S identificam a fase com sacarose).

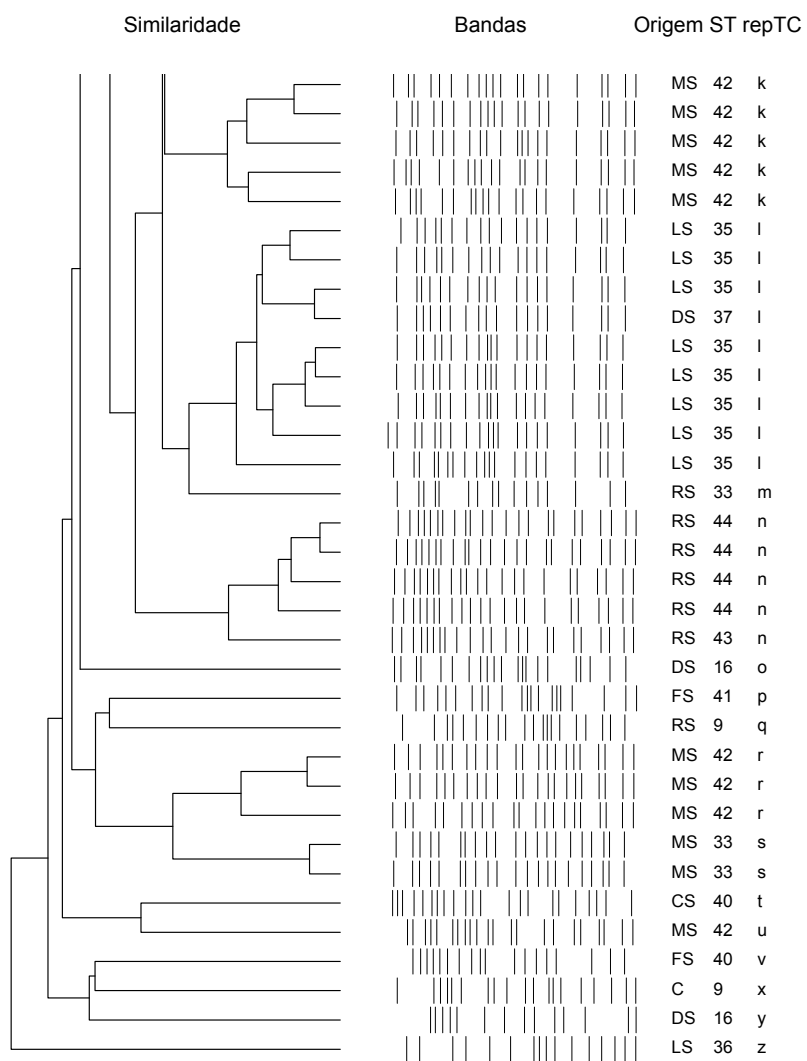


Figura 9 – Continuação

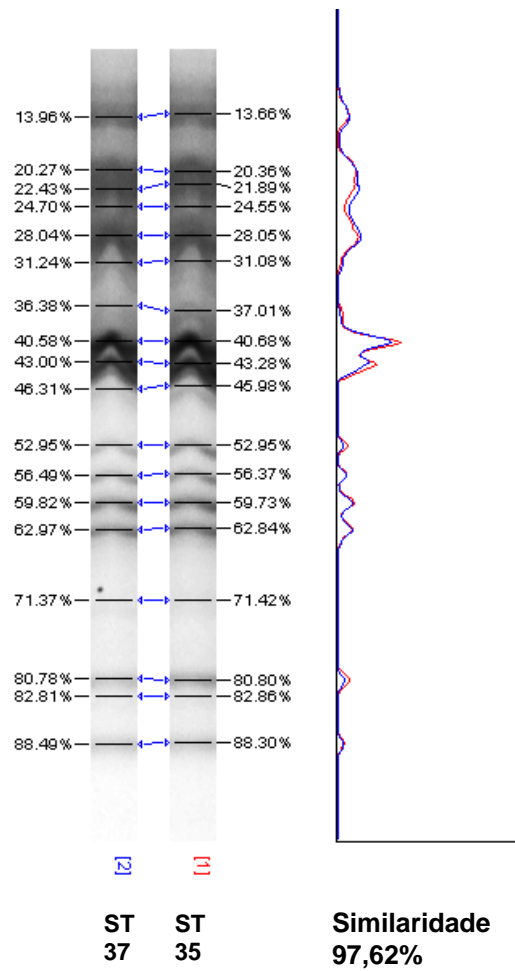


Figura 10: Comparação entre duas canaletas do gel de eletroforese de cepas de diferentes STs (37 e 35) com o mesmo padrão (I) no rep-PCR

5. DISCUSSÃO

5.1 Modificação do Biofilme Dental da Saúde para a Doença

A metodologia empregada permitiu a análise do biofilme na saúde (fase não cariogênica) e na doença (fase cariogênica). O mesmo bloco de esmalte foi utilizado em ambas as fases. Por essa razão, o estudo não foi cruzado e a fase não cariogênica precedeu a fase cariogênica. Como a formação do biofilme dental é sitio-específica, foi importante planejar a metodologia a fim de que a mesma superfície dental servisse de base para a formação do biofilme nas duas fases experimentais. O mesmo dente foi utilizado para o preparo dos quatro blocos de esmalte utilizados em cada aparelho mandibular removível a fim de reduzir a variabilidade entre os substratos dentários utilizados. Além disso, nenhum polimento foi realizado nos blocos para não alterar a superfície do esmalte dental.

Diferentes nichos bucais já foram utilizados para pesquisa dos aspectos microbiológicos da cárie dental. Alguns estudos utilizam a coleta da saliva estimulada na análise da quantificação de *S. mutans* e de *Lactobacillus*. Os testes microbiológicos salivares têm sido empregados como parâmetros no tratamento de pacientes com atividade de cárie. A escolha do sítio de coleta interfere nos resultados, visto que a colonização bacteriana na superfície dental varia de acordo com o sítio. Assim, a coleta do biofilme sobre a lesão cariosa parece ser o mais correto para a análise da microbiologia da cárie, e a análise do perfil microbiano do biofilme parece representar melhor o papel dos diferentes microrganismos na cárie dental. O estudo da transição do biofilme dental hígido para o cariogênico torna-se bastante difícil em estudos clínicos por razões éticas. As pesquisas clínicas que

avaliam a relação do biofilme na saúde e na doença o fazem comparando os microrganismos provenientes de biofilme de: (a) sítios saudáveis *versus* sítios cariados no mesmo indivíduo [140], (b) sítios hígidos de indivíduos livres de cárie *versus* sítios cariados de indivíduo cárie-ativos [141] e, (c) sítios hígidos provenientes de indivíduos cárie-ativos *versus* sítios hígidos de indivíduos livres de cárie [140, 142]. Muitos estudos avaliam as diferenças na composição dos microrganismos presentes na saliva ao invés de analisar o biofilme dental [143]. Outros, no entanto, avaliam a presença dos microrganismos em múltiplos nichos bucais como saliva, língua e biofilme [141]. Até o presente momento, este é o primeiro estudo que avalia *Lactobacillus* no biofilme dental na transição da saúde para a doença tentando reproduzir a formação da lesão de cárie em humanos.

5.2 Baixa Recuperação de *Lactobacillus*

Um total de 222 *Lactobacillus* foi isolado do biofilme dental, sendo 31 provenientes da fase experimental sem sacarose e 191 da fase experimental com sacarose. Foi observada baixa recuperação de *Lactobacillus*, especialmente, no biofilme formado sem sacarose. Dados de outro trabalho *in situ* corroboram os achados de que o biofilme submetido a desafio cariogênico apresenta maior proporção de *Lactobacillus* [144]. Sabe-se que a proporção de *Lactobacillus* no biofilme dental hígido é pequena [40] e que ocorre um aumento de sua frequência com a progressão da lesão cariosa [57, 145].

Na confecção dos dispositivos mandibulares removíveis um espaço de 1 mm (um milímetro) foi deixado entre a superfície do bloco de esmalte e a resina acrílica a fim de favorecer o acúmulo de biofilme no local. A presença desse nicho retentivo

nos modelos *in situ* pode favorecer o crescimento de leveduras. Muitas das colônias que cresceram no meio Rogosa nesse estudo eram leveduras. O biofilme desenvolvido em modelos *in situ* pode necessitar de maior seletividade para impedir o crescimento de outros microrganismos e possibilitar maior recuperação de *Lactobacillus* à semelhança do estudo de Llena *et al.* (2007) [146]. Todavia, outros estudos que avaliaram a composição do biofilme dental utilizando modelos *in situ* não relatam a adição de antibióticos ou outros agentes antimicrobianos ao meio Rogosa [52, 144]. Além de leveduras, cocos Gram-positivos também foram encontrados no meio Rogosa SL Agar no presente estudo. A presença de *Streptococcus* no meio Rogosa SL Agar contendo verde bromocresol já foi relatada em estudo com *Lactobacillus* provenientes da saliva e fezes de humanos em condições de microanaerofilia a 30 °C [147]. Uma taxa alta de recuperação (176 bacilos em 180 colônias isoladas) de *Lactobacillus* de saliva já foi relatada com uso do meio Rogosa SL Agar [46]. Parece que o meio Rogosa, apesar de possibilitar boa recuperação de *Lactobacillus* [46], não pode ser considerado totalmente seletivo uma vez que outros microrganismos como leveduras e *Streptococcus* [147] puderam também ser isolados. A caracterização através de coloração de Gram auxilia na triagem inicial dos isolados e deve sempre ser realizada mesmo após cultivo em meio seletivo.

Por outro lado, a população participante da pesquisa foi composta por estudantes de Odontologia e cirurgiões-dentistas que apresentavam boa saúde geral e bucal e, como consequência, provável prevalência baixa de bactérias cariogênicas na saliva. Nenhum critério de seleção em relação à quantidade mínima de *Lactobacillus* na saliva foi utilizado para a seleção dos voluntários participantes.

Apesar disso, o uso de sacarose aumentou a recuperação de *Lactobacillus* indicando uma vantagem ecológica dessa bactéria em nichos cariogênicos.

5.3 Identificação das Espécies de *Lactobacillus*

A identificação das espécies de *Lactobacillus* pelo sequenciamento dos genes *pheS* e *rpoA* já havia sido proposta por Naser *et al.* (2007) [109]. Todos os isolados puderam ser identificados através da amplificação desses genes. Os isolados pertencentes à espécie dos *L. rhamnosus* foram mais facilmente identificados através do sequenciamento do gene *rpoA* do que do *pheS*. Assim, inicialmente tentou-se fazer a amplificação do gene *pheS*. Quando não foi possível a obtenção de um produto de PCR adequado, mesmo após otimização da reação, o gene *rpoA* foi amplificado e sequenciado. O poder discriminatório do sequenciamento dos genes *pheS* e *rpoA* foi superior ao sequenciamento do gene 16S rRNA na caracterização de espécies de *Lactobacillus* [109]. Outros genes já foram testados na análise das espécies de *Lactobacillus* como *mle*, *tuf*, *ISLpl1*, *Hsp60*, *recA* e *rplB* [1, 11, 101, 105, 110, 112, 113]. Um bom marcador filogenético deve ser passível de aplicação ao maior número possível de espécies do gênero *Lactobacillus* preferencialmente de origens variadas. Os genes *pheS/rpoA* já foram utilizados na identificação de um bom número de espécies de *Lactobacillus* provenientes de diferentes origens e podem, assim, ser considerados bons marcadores filogenéticos para o gênero *Lactobacillus* [109]. Portanto no presente estudo o uso adequado do sequenciamento dos genes *pheS/rpoA* na Taxonomia dos *Lactobacillus* possibilitou a caracterização das espécies de maneira confiável.

5.4 Composição e Diversidade Genotípica de *Lactobacillus*

Métodos moleculares são necessários para a correta identificação de espécies e para a tipificação de *Lactobacillus*. A decisão de usar o método rep-PCR neste estudo baseou-se em sua provada confiabilidade para tipificar *Lactobacillus*, e em sua capacidade de gerar padrões de restrição reprodutíveis [127]. Rep-PCR tem sido utilizado na genotipagem de *Lactobacillus* de diferentes origens apresentando bom poder discriminatório em nível de espécie e de isolado [26, 128, 132]. Outro método a ser considerado foi a eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE), mas este demonstrou ser mais caro, trabalhoso e demorado [148, 149]. A tipificação pelo sequenciamento de múltiplos *loci* (MLST) poderia também ter sido utilizada como alternativa, mas mostrou menor poder discriminatório em relação ao rep-PCR em *Lactobacillus paracasei* (dados não publicados, Artigo II) e não é indicado para estudos epidemiológicos com grande número de isolados [150]. Para o propósito do presente estudo, o rep-PCR apresenta poder discriminatório suficiente e adequado para a amostra de *Lactobacillus* em análise. Além disso, todas as cepas isoladas foram passíveis de tipificação através desse método.

Estudos *in situ* trazem boas contribuições à pesquisa da formação de biofilmes dentais. Este é o primeiro estudo a apresentar um acompanhamento longitudinal de *Lactobacillus* do biofilme oral após modificação ambiental utilizando o mesmo nicho oral. Com este modelo é possível controlar as condições nas quais o biofilme está sendo formado a fim de se estudar sua modificação da saúde para a doença, o que não poderia ter sido feito em modelos *in vivo*.

Quatro diferentes espécies de *Lactobacillus* (*L. paracasei*, *L. fermentum*, *L. rhamnosus* e *L. gasseri*) estavam presentes no biofilme dos 11 indivíduos

estudados. Outros trabalhos também identificaram espécies de *Lactobacillus* em biofilme dental e encontraram entre cinco e seis espécies por indivíduo [32, 151]. Todavia, nesses estudos a identificação das espécies baseou-se em características metabólicas dos isolados, o que não é considerado suficiente para tal [4, 89]. Na dentina, pelo menos três diferentes espécies de *Lactobacillus* estavam presentes na maioria das amostras [59]. No presente estudo, *Lactobacillus* apresentaram maior diversidade de espécies na fase com sacarose em relação à fase sem sacarose. *L. paracasei* e *L. rhamnosus* puderam ser relacionadas a um ambiente cariogênico uma vez que sua recuperação na fase com sacarose foi mais abundante do que na fase sem sacarose. Tal fato concorda com dados da literatura que associaram *Lactobacillus* do grupo dos *L. casei* a lesões de cárie em diferentes estágios de desenvolvimento [152]. A composição de espécies de *Lactobacillus* no biofilme oral pode ter aumentado por ser o biofilme dental um nicho aberto suscetível à contaminação pela saliva e por fontes alimentares.

Quantidades variadas de genótipos de *Lactobacillus* já foram descritas em diferentes nichos da cavidade bucal [46, 132]. O número de genótipos de *Lactobacillus* (por ERIC-PCR) em diferentes pacientes com cárie rampante variou de um a sete [132], enquanto na saliva, dois a oito genótipos distintos de *Lactobacillus* estavam presentes por indivíduo [46]. No presente estudo, zero a 14 genótipos foram encontrados no biofilme oral. Embora diferentes métodos de tipificação molecular tenham sido utilizados (ERIC-PCR, rep-PCR e RFLP) múltiplos genótipos estavam presentes na cavidade oral nos diferentes sítios estudados.

Os genótipos de *Lactobacillus* do biofilme dental em um mesmo indivíduo tendem a ser diferentes após a exposição à sacarose. Neste estudo, apenas um genótipo foi mantido, em ambas as fases experimentais e em um mesmo indivíduo.

Em outro estudo longitudinal sem modificações ambientais, os genótipos de *Lactobacillus* foram comparados em duas amostragens de saliva ao longo de 3 meses. Em 2 de 3 indivíduos (2 genótipos de *L. fermentum* e 1 genótipo de *L. vaginalis*) o mesmo genótipo foi recuperado, mostrando maior estabilidade de recuperação dos genótipos em relação ao presente estudo. Apesar disso, alguns genótipos de *Lactobacillus* na saliva desapareceram, e novos surgiram sem que houvesse ocorrido qualquer alteração ambiental proposital [147]. Tal fato também foi observado em cáries rampantes em que diferentes lesões de um mesmo indivíduo apresentavam genótipos distintos no mesmo momento de coleta [132]. A presença de diferentes genótipos de *Lactobacillus* após exposição a sacarose sugere sinergismo e antagonismo entre as bactérias, o que poderia explicar tais modificações de diversidade no biofilme dental cariogênico.

5.5 Origem dos Lactobacilos Bucais (Artigo II)

Pode-se observar que *Lactobacillus* provenientes do biofilme bucal apresentaram mesmo genótipo de *Lactobacillus* previamente isolados de produtos alimentares lácteos (Artigo II). Parece que *Lactobacillus* de alimentos podem colonizar a cavidade bucal de humanos. Devido à grande diversidade e variabilidade dos *Lactobacillus* que colonizam a cavidade bucal em humanos, é difícil dizer qual espécie é autóctone. Será que realmente existem espécies de *Lactobacillus* exclusivamente bucais? Ou será que se pode afirmar que todos os *Lactobacillus* presentes na cavidade bucal são apenas colonizadores transitórios? A colonização por *Lactobacillus* ocorre a partir do parto e da amamentação [31, 153]. *Lactobacillus* do trato vaginal das mães foram encontrados na cavidade bucal de recém-nascidos nos primeiros dias de vida [153]. Além disso, o aleitamento materno pode também ser fonte de *Lactobacillus* para o trato gastrointestinal [31]. A colonização da cavidade bucal por *Lactobacillus* tem relação direta com a colonização de *Lactobacillus* nos demais segmentos do trato gastrointestinal [147]. A mesma cepa de *Lactobacillus* foi encontrada tanto na cavidade bucal como no reto de indivíduos adultos [147]. Apesar disso, algumas cepas foram encontradas especificamente na cavidade bucal ou trato gastrointestinal. Para Dal Bello e Hertel (2006), o fato de (a) *L. gasseri* e *L. vaginalis* apresentarem uma colonização estável por três meses em três indivíduos e (b) serem isolados somente em humanos e animais os torna possíveis autóctones da cavidade bucal [147]. As espécies de *Lactobacillus* mais encontradas por esses autores na saliva foram *L. gasseri*, *L. paracasei*, *L. rhamnosus* e *L. vaginalis* [147]. Apesar de *L. paracasei* e *L. rhamnosus* terem também sido detectados na saliva, os autores os consideram

transitórios na cavidade bucal por serem comumente encontrados nos alimentos. É possível que as características específicas de cada meio permitam que determinada espécie ou cepa seja capaz de passar de transitória a estável.

O aumento da diversidade genética de *Lactobacillus* associado à presença de *Lactobacillus* de origem alimentar sugere origem exógena para os *Lactobacillus* da cavidade bucal. Entretanto, ainda é necessário que a estabilidade da colonização por *Lactobacillus* provenientes de alimentos seja mais bem avaliada.

5.6 REP-PCR versus MLST (Artigo III)

No presente estudo, as técnicas de REP-PCR e MLST foram utilizadas na tipificação de *L. paracasei* provenientes do biofilme dental formado *in situ* em sete indivíduos. Houve resultados distintos na comparação das duas técnicas quanto à diferenciação genotípica dos isolados. REP-PCR mostrou melhor poder discriminatório em comparação ao MLST. Pouca concordância foi observada entre os dois métodos. Em um estudo com *Campylobacter jejuni*, rep-PCR (combinação de REP-, ERIC- e BOX-PCR) também mostrou maior poder discriminatório do que o PFGE e MLST [154]. A diferença dos resultados obtidos pode refletir as diferenças nos métodos de aferição da diversidade genética de cada técnica [155]. Por ter como alvo o genoma essencial no metabolismo bacteriano, MLST é mais útil para estudos de longitudinais em epidemiologia bacteriana [131], apesar de não ter sido tão bom quanto o REP-PCR em refletir pequenas diferenças no genoma dos *L. paracasei* estudados. Alguns autores utilizaram o MLST como padrão ouro na comparação e otimização dos parâmetros analíticos do REP-PCR em *E. coli* [150]. No entanto, quando REP-PCR, MLST, PFGE, perfil de plasmídeos e perfil de suscetibilidade foram comparados na diferenciação de *Salmonella enterica* os três

primeiros métodos demonstraram melhor poder discriminatório para os isolados [155]. Apesar disso, nenhuma correlação aparente foi observada entre os métodos moleculares utilizados. Para algumas cepas o PFGE foi mais discriminatório que o MLST, e para outras o MLST foi melhor [155]. Em outro estudo com *Lactobacillus*, PFGE foi capaz de diferenciar cepas que não diferenciáveis pelo MLST [17]. Embora em geral tenha ocorrido uma boa concordância entre MLST e REP-PCR em estudo com *Streptococcus oralis*, em um indivíduo o mesmo perfil de rep-PCR foi associado a diferentes STs e diferentes perfis de REP-PCR estavam presentes no mesmo ST (ST-21) [156]. Para *E. coli*, MLST apresentou pouco poder discriminatório, uma vez que o mesmo ST (ST 10) pode ser subdividido em 10 perfis de rep-PCR [157]. No MLST, isolados que apresentem genótipos similares ou iguais podem ser considerados como próximos, podendo ter-se originado de um ancestral comum. Isso não significa que cepas pertencentes a um mesmo ST não possam ser diferentes em relação a outras características clinicamente importantes atribuídas a outros genes ou elementos acessórios. [158]. No presente estudo, MLST e REP-PCR foram capazes de evidenciar diferentes características dos isolados de *L. paracasei* e, por isso, podem obter informações complementares na sua tipificação. Os resultados demonstram que a combinação dos métodos é útil, aumentando o poder discriminatório dos métodos de algumas cepas.

6. CONCLUSÕES

Esta série de trabalhos demonstra que:

- Os lactobacilos no biofilme dental aumentam em número e diversidade de espécies após exposição à sacarose;
- Novos genótipos de lactobacilos podem ser encontrados no biofilme dental após exposição à sacarose ;
- Alguns lactobacilos que colonizam a cavidade bucal são também encontrados em produtos alimentícios.

7. REFERÊNCIAS

1. Diancourt, L., et al., *Multilocus sequence typing of Lactobacillus casei reveals a clonal population structure with low levels of homologous recombination*. Appl Environ Microbiol, 2007. **73**(20): p. 6601-11.
2. Tannock, G.W., *Identification of lactobacilli and bifidobacteria*. Curr Issues Mol Biol, 1999. **1**(1-2): p. 53-64.
3. London, J., *The ecology and taxonomic status of the lactobacilli*. Annu Rev Microbiol, 1976. **30**: p. 279-301.
4. Rodas, A.M., S. Ferrer, and I. Pardo, *Polyphasic study of wine Lactobacillus strains: taxonomic implications*. Int J Syst Evol Microbiol, 2005. **55**(Pt 1): p. 197-207.
5. Felis, G.E. and F. Dellaglio, *Taxonomy of Lactobacilli and Bifidobacteria*. Curr Issues Intest Microbiol, 2007. **8**(2): p. 44-61.
6. Nikolaitchouk, N., et al., *Lactobacillus coleohominis sp. nov., isolated from human sources*. Int J Syst Evol Microbiol, 2001. **51**(Pt 6): p. 2081-5.
7. van Houte, J., *Bacterial specificity in the etiology of dental caries*. Int Dent J, 1980. **30**(4): p. 305-26.
8. Svensater, G., et al., *The acid-tolerant microbiota associated with plaque from initial caries and healthy tooth surfaces*. Caries Res, 2003. **37**(6): p. 395-403.
9. Rosebury, T., *Acid Production and Tolerance of Lactobacilli from Dental Caries and other Sources as Measured by the Glass Electrode*. J Bacteriol, 1932. **24**(4): p. 321-34.
10. Pena, J.A., et al., *Genotypic and phenotypic studies of murine intestinal lactobacilli: species differences in mice with and without colitis*. Appl Environ Microbiol, 2004. **70**(1): p. 558-68.
11. Blaiotta, G., et al., *Lactobacillus strain diversity based on partial hsp60 gene sequences and design of PCR-restriction fragment length polymorphism assays for species identification and differentiation*. Appl Environ Microbiol, 2008. **74**(1): p. 208-15.
12. Mora, D., et al., *Reclassification of Lactobacillus maltaromicus (Miller et al. 1974) DSM 20342(T) and DSM 20344 and Carnobacterium piscicola (Collins et al. 1987) DSM 20730(T) and DSM 20722 as Carnobacterium maltaromaticum comb. nov.* Int J Syst Evol Microbiol, 2003. **53**(Pt 3): p. 675-8.
13. Collins, M.D. and S. Wallbanks, *Comparative sequence analyses of the 16S rRNA genes of Lactobacillus minutus, Lactobacillus rimaie and Streptococcus parvulus: proposal for the creation of a new genus Atopobium*. FEMS Microbiol Lett, 1992. **74**(2-3): p. 235-40.
14. Collins, M.D., et al., *Taxonomic studies on some leuconostoc-like organisms from fermented sausages: description of a new genus Weissella for the Leuconostoc paramesenteroides group of species*. J Appl Bacteriol, 1993. **75**(6): p. 595-603.
15. Leisner, J.J., et al., *Description of Paralactobacillus selangorensis gen. nov., sp. nov., a new lactic acid bacterium isolated from chili bo, a Malaysian food ingredient*. Int J Syst Evol Microbiol, 2000. **50 Pt 1**: p. 19-24.
16. Claesson, M.J., D. van Sinderen, and P.W. O'Toole, *Lactobacillus phylogenomics--towards a reclassification of the genus*. Int J Syst Evol Microbiol, 2008. **58**(Pt 12): p. 2945-54.

17. Cai, H., et al., *Genotypic and phenotypic characterization of Lactobacillus casei strains isolated from different ecological niches suggests frequent recombination and niche specificity*. Microbiology, 2007. **153**(Pt 8): p. 2655-65.
18. Bouhnik, Y., P. Marteau, and J.C. Rambaud, [*The use of probiotics in humans*]. Ann Gastroenterol Hepatol (Paris), 1993. **29**(5): p. 241-9.
19. de Candia, S., et al., *Molecular identification and typing of natural whey starter cultures and microbiological and compositional properties of related traditional Mozzarella cheeses*. Int J Food Microbiol, 2007. **119**(3): p. 182-91.
20. Coeuret, V., M. Gueguen, and J.P. Vernoux, *Numbers and strains of lactobacilli in some probiotic products*. Int J Food Microbiol, 2004. **97**(2): p. 147-56.
21. Adams, M.R. and P. Marteau, *On the safety of lactic acid bacteria from food*. Int J Food Microbiol, 1995. **27**(2-3): p. 263-4.
22. Aymerich, T., et al., *Safety properties and molecular strain typing of lactic acid bacteria from slightly fermented sausages*. J Appl Microbiol, 2006. **100**(1): p. 40-9.
23. Catzeddu, P., et al., *Molecular characterization of lactic acid bacteria from sourdough breads produced in Sardinia (Italy) and multivariate statistical analyses of results*. Syst Appl Microbiol, 2006. **29**(2): p. 138-44.
24. Borchers, A.T., et al., *Probiotics and immunity*. J Gastroenterol, 2009. **44**(1): p. 26-46.
25. Settanni, L., et al., *Rapid differentiation and in situ detection of 16 sourdough lactobacillus species by multiplex PCR*. Appl Environ Microbiol, 2005. **71**(6): p. 3049-59.
26. Nikolic, M., et al., *Characterization of lactic acid bacteria isolated from Bukuljac, a homemade goat's milk cheese*. Int J Food Microbiol, 2008. **122**(1-2): p. 162-70.
27. Carlsson, J. and L. Gothefors, *Transmission of Lactobacillus jensenii and Lactobacillus acidophilus from mother to child at time of delivery*. J Clin Microbiol, 1975. **1**(2): p. 124-8.
28. Hegde, S. and A.K. Munshi, *Influence of the maternal vaginal microbiota on the oral microbiota of the newborn*. J Clin Pediatr Dent, 1998. **22**(4): p. 317-21.
29. Ross, J.M. and J.R. Needham, *Genital flora during pregnancy and colonization of the newborn*. J R Soc Med, 1980. **73**(2): p. 105-10.
30. McCarthy, C., M.L. Snyder, and R.B. Parker, *The Indigenous Oral Flora of Man. I. the Newborn to the 1-Year-Old Infant*. Arch Oral Biol, 1965. **10**: p. 61-70.
31. Martin, R., et al., *Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut*. J Pediatr, 2003. **143**(6): p. 754-8.
32. Carlsson, J., H. Grahnen, and G. Jonsson, *Lactobacilli and streptococci in the mouth of children*. Caries Res, 1975. **9**(5): p. 333-9.
33. Kohler, B., I. Andreen, and B. Jonsson, *The effect of caries-preventive measures in mothers on dental caries and the oral presence of the bacteria Streptococcus mutans and lactobacilli in their children*. Arch Oral Biol, 1984. **29**(11): p. 879-83.
34. Kailis, D.G., *Carnarvon studies. V. Oral lactobacillus estimations of 390 caucasian school children exposed to increased fluoride content of the town water supply in Carnarvon, Western Australia (August, 1965)*. Aust Dent J, 1970. **15**(6): p. 487-94.
35. Klock, B. and B. Krasse, *Microbial and salivary conditions in 9- to 12-year-old children*. Scand J Dent Res, 1977. **85**(1): p. 56-63.
36. Alaluusua, S., et al., *Caries-related microbiological findings in a group of teenagers and their parents*. Caries Res, 1989. **23**(1): p. 49-54.
37. Lundgren, M., et al., *Dental caries and related factors in 88- and 92-year-olds. Cross-sectional and longitudinal comparisons*. Acta Odontol Scand, 1997. **55**(5): p. 282-91.

38. Narhi, T.O., N. Kurki, and A. Ainamo, *Saliva, salivary micro-organisms, and oral health in the home-dwelling old elderly--a five-year longitudinal study*. J Dent Res, 1999. **78**(10): p. 1640-6.
39. Marsh, P.D. and R.S. Percival, *The oral microflora--friend or foe? Can we decide?* Int Dent J, 2006. **56**(4 Suppl 1): p. 233-9.
40. Van Houte, J., R.J. Gibbons, and A.J. Pulkkinen, *Ecology of human oral lactobacilli*. Infect Immun, 1972. **6**(5): p. 723-9.
41. Meurman, J.H., et al., *Erupting third molars and salivary lactobacilli and Streptococcus mutans counts*. Scand J Dent Res, 1987. **95**(1): p. 32-6.
42. Tanzer, J.M., J. Livingston, and A.M. Thompson, *The microbiology of primary dental caries in humans*. J Dent Educ, 2001. **65**(10): p. 1028-37.
43. Fitzgerald, R.J., et al., *Cariogenicity of human oral lactobacilli in hamsters*. J Dent Res, 1980. **59**(5): p. 832-7.
44. Ahumada Mdel, C., et al., *Evaluation and comparison of lactobacilli characteristics in the mouths of patients with or without cavities*. J Oral Sci, 2003. **45**(1): p. 1-9.
45. Shen, S., L.P. Samaranayake, and H.K. Yip, *Coaggregation profiles of the microflora from root surface caries lesions*. Arch Oral Biol, 2005. **50**(1): p. 23-32.
46. Caufield, P.W., et al., *Diversity of lactobacilli in the oral cavities of young women with dental caries*. Caries Res, 2007. **41**(1): p. 2-8.
47. Krasse, B., *Relationship between caries activity and the number of lactobacilli in the oral cavity*. Acta Odontol Scand, 1954. **12**(2): p. 157-72.
48. Crossner, C.G., *Variation in human oral lactobacilli following a change in sugar intake*. Scand J Dent Res, 1984. **92**(3): p. 204-10.
49. Jay, P., *Lactobacillus Acidophilus and Dental Caries*. Am J Public Health Nations Health, 1938. **28**(6): p. 759-61.
50. Stralfors, A., *Studies of the microbiology of caries; the acid fermentation in the dental plaques in situ compared with lactobacillus count*. J Dent Res, 1948. **27**(5): p. 576-86.
51. Manji, F. and O. Fejerskov, *Dental caries in developing countries in relation to the appropriate use of fluoride*. J Dent Res, 1990. **69 Spec No**: p. 733-41; discussion 820-3.
52. Cury, J.A., et al., *Biochemical composition and cariogenicity of dental plaque formed in the presence of sucrose or glucose and fructose*. Caries Res, 2000. **34**(6): p. 491-7.
53. Ikeda, T., H.J. Sandham, and E.L. Bradley, Jr., *Changes in Streptococcus mutans and lactobacilli in plaque in relation to the initiation of dental caries in Negro children*. Arch Oral Biol, 1973. **18**(4): p. 555-66.
54. Matee, M.I., et al., *Mutans streptococci and lactobacilli in breast-fed children with rampant caries*. Caries Res, 1992. **26**(3): p. 183-7.
55. McGrady, J.A., et al., *Specific and charge interactions mediate collagen recognition by oral lactobacilli*. J Dent Res, 1995. **74**(2): p. 649-57.
56. Harty, D.W., et al., *Pathogenic potential of lactobacilli*. Int J Food Microbiol, 1994. **24**(1-2): p. 179-89.
57. Aas, J.A., et al., *Bacteria of dental caries in primary and permanent teeth in children and young adults*. J Clin Microbiol, 2008. **46**(4): p. 1407-17.
58. Sigurjons, H., M.O. Magnusdottir, and W.P. Holbrook, *Cariogenic bacteria in a longitudinal study of approximal caries*. Caries Res, 1995. **29**(1): p. 42-5.
59. Byun, R., et al., *Quantitative analysis of diverse Lactobacillus species present in advanced dental caries*. J Clin Microbiol, 2004. **42**(7): p. 3128-36.
60. Coogan, M.M., et al., *Microbiological impressions of teeth, saliva and dietary fibre can predict caries activity*. J Dent, 2008. **36**(11): p. 892-9.

61. Sookkhee, S., M. Chulasiri, and W. Prachyabrued, *Lactic acid bacteria from healthy oral cavity of Thai volunteers: inhibition of oral pathogens*. J Appl Microbiol, 2001. **90**(2): p. 172-9.
62. Koll-Klais, P., et al., *Oral lactobacilli in chronic periodontitis and periodontal health: species composition and antimicrobial activity*. Oral Microbiol Immunol, 2005. **20**(6): p. 354-61.
63. Devirgiliis, C., et al., *Antibiotic resistance and microbial composition along the manufacturing process of Mozzarella di Bufala Campana*. Int J Food Microbiol, 2008. **128**(2): p. 378-84.
64. Salminen, S., et al., *Demonstration of safety of probiotics -- a review*. Int J Food Microbiol, 1998. **44**(1-2): p. 93-106.
65. Meurman, J.H., *Probiotics: do they have a role in oral medicine and dentistry?* Eur J Oral Sci, 2005. **113**(3): p. 188-96.
66. Michalek, S.M., et al., *Oral ecology and virulence of Lactobacillus casei and Streptococcus mutans in gnotobiotic rats*. Infect Immun, 1981. **33**(3): p. 690-6.
67. Strus, M., et al., *The in vitro activity of vaginal Lactobacillus with probiotic properties against Candida*. Infect Dis Obstet Gynecol, 2005. **13**(2): p. 69-75.
68. Strom, K., et al., *Lactobacillus plantarum MiLAB 393 produces the antifungal cyclic dipeptides cyclo(L-Phe-L-Pro) and cyclo(L-Phe-trans-4-OH-L-Pro) and 3-phenyllactic acid*. Appl Environ Microbiol, 2002. **68**(9): p. 4322-7.
69. Hatakka, K., et al., *Probiotics reduce the prevalence of oral candida in the elderly--a randomized controlled trial*. J Dent Res, 2007. **86**(2): p. 125-30.
70. McGroarty, J.A., et al., *Hydrogen peroxide production by Lactobacillus species: correlation with susceptibility to the spermicidal compound nonoxynol-9*. J Infect Dis, 1992. **165**(6): p. 1142-4.
71. Bradshaw, D.J., A.S. McKee, and P.D. Marsh, *Effects of carbohydrate pulses and pH on population shifts within oral microbial communities in vitro*. J Dent Res, 1989. **68**(9): p. 1298-302.
72. Bradshaw, D.J. and P.D. Marsh, *Analysis of pH-driven disruption of oral microbial communities in vitro*. Caries Res, 1998. **32**(6): p. 456-62.
73. Klaenhammer, T.R., *Bacteriocins of lactic acid bacteria*. Biochimie, 1988. **70**(3): p. 337-49.
74. Ojcius, D.M. and J.D. Young, *Cytolytic pore-forming proteins and peptides: is there a common structural motif?* Trends Biochem Sci, 1991. **16**(6): p. 225-9.
75. Tahara, T. and K. Kanatani, *Isolation, partial characterization and mode of action of acidocin J1229, a bacteriocin produced by Lactobacillus acidophilus JCM 1229*. J Appl Bacteriol, 1996. **81**(6): p. 669-77.
76. Arihara, K., et al., *Salivacin 140, a novel bacteriocin from Lactobacillus salivarius subsp. salicinius T140 active against pathogenic bacteria*. Lett Appl Microbiol, 1996. **22**(6): p. 420-4.
77. van Reenen, C.A., L.M. Dicks, and M.L. Chikindas, *Isolation, purification and partial characterization of plantaricin 423, a bacteriocin produced by Lactobacillus plantarum*. J Appl Microbiol, 1998. **84**(6): p. 1131-7.
78. Chung, J., et al., *Isolation and characterization of Lactobacillus species inhibiting the formation of Streptococcus mutans biofilm*. Oral Microbiol Immunol, 2004. **19**(3): p. 214-6.
79. Simark-Mattsson, C., et al., *Lactobacillus-mediated interference of mutans streptococci in caries-free vs. caries-active subjects*. Eur J Oral Sci, 2007. **115**(4): p. 308-14.

80. Nase, L., et al., *Effect of long-term consumption of a probiotic bacterium, Lactobacillus rhamnosus GG, in milk on dental caries and caries risk in children.* Caries Res, 2001. **35**(6): p. 412-20.
81. Petti, S., G. Tarsitani, and A.S. D'Arca, *A randomized clinical trial of the effect of yoghurt on the human salivary microflora.* Arch Oral Biol, 2001. **46**(8): p. 705-12.
82. Yli-Knuutila, H., et al., *Colonization of Lactobacillus rhamnosus GG in the oral cavity.* Oral Microbiol Immunol, 2006. **21**(2): p. 129-31.
83. Ahola, A.J., et al., *Short-term consumption of probiotic-containing cheese and its effect on dental caries risk factors.* Arch Oral Biol, 2002. **47**(11): p. 799-804.
84. Haukioja, A., E. Soderling, and J. Tenovuo, *Acid production from sugars and sugar alcohols by probiotic lactobacilli and bifidobacteria in vitro.* Caries Res, 2008. **42**(6): p. 449-53.
85. Klein, G., et al., *Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria.* Int J Food Microbiol, 1998. **41**(2): p. 103-25.
86. Vandamme, P., et al., *Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics.* Microbiol Rev, 1996. **60**(2): p. 407-38.
87. Mohania, D., et al., *Molecular approaches for identification and characterization of lactic acid bacteria.* J Dig Dis, 2008. **9**(4): p. 190-8.
88. Huys, G., et al., *Accuracy of species identity of commercial bacterial cultures intended for probiotic or nutritional use.* Res Microbiol, 2006. **157**(9): p. 803-10.
89. Boyd, M.A., M.A. Antonio, and S.L. Hillier, *Comparison of API 50 CH strips to whole-chromosomal DNA probes for identification of Lactobacillus species.* J Clin Microbiol, 2005. **43**(10): p. 5309-11.
90. Holzapfel, W.H., et al., *Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition.* Am J Clin Nutr, 2001. **73**(2 Suppl): p. 365S-373S.
91. Ben Amor, K., E.E. Vaughan, and W.M. de Vos, *Advanced molecular tools for the identification of lactic acid bacteria.* J Nutr, 2007. **137**(3 Suppl 2): p. 741S-7S.
92. Higuchi, W., et al., *Identification of probiotic lactobacilli used for animal feeds on the basis of 16S ribosomal RNA gene sequence.* Microbiol Immunol, 2008. **52**(11): p. 559-63.
93. Jakobsson, T. and U. Forsum, *Changes in the predominant human Lactobacillus flora during in vitro fertilisation.* Ann Clin Microbiol Antimicrob, 2008. **7**: p. 14.
94. Morita, H., et al., *Lactobacillus hayakitensis sp. nov., isolated from intestines of healthy thoroughbreds.* Int J Syst Evol Microbiol, 2007. **57**(Pt 12): p. 2836-9.
95. Chhour, K.L., et al., *Molecular analysis of microbial diversity in advanced caries.* J Clin Microbiol, 2005. **43**(2): p. 843-9.
96. Greetham, H.L., et al., *Bacteriology of the Labrador dog gut: a cultural and genotypic approach.* J Appl Microbiol, 2002. **93**(4): p. 640-6.
97. Morotomi, M., et al., *Lactobacillus equi sp. nov., a predominant intestinal Lactobacillus species of the horse isolated from faeces of healthy horses.* Int J Syst Evol Microbiol, 2002. **52**(Pt 1): p. 211-4.
98. Neefs, J.M., et al., *Compilation of small ribosomal subunit RNA structures.* Nucleic Acids Res, 1993. **21**(13): p. 3025-49.
99. Strahinic, I., et al., *Molecular and biochemical characterizations of human oral lactobacilli as putative probiotic candidates.* Oral Microbiol Immunol, 2007. **22**(2): p. 111-7.
100. Vanhoutte, T., et al., *Molecular monitoring and characterization of the faecal microbiota of healthy dogs during fructan supplementation.* FEMS Microbiol Lett, 2005. **249**(1): p. 65-71.

101. Ventura, M., et al., *Analysis, characterization, and loci of the tuf genes in lactobacillus and bifidobacterium species and their direct application for species identification*. Appl Environ Microbiol, 2003. **69**(11): p. 6908-22.
102. Vasquez, A., et al., *DNA-based classification and sequence heterogeneities in the 16S rRNA genes of Lactobacillus casei/paracasei and related species*. Syst Appl Microbiol, 2005. **28**(5): p. 430-41.
103. Valcheva, R., et al., *A rapid PCR procedure for the specific identification of Lactobacillus sanfranciscensis, based on the 16S-23S intergenic spacer regions*. J Appl Microbiol, 2007. **102**(1): p. 290-302.
104. Delfederico, L., et al., *Molecular identification and typing of lactobacilli isolated from kefir grains*. J Dairy Res, 2006. **73**(1): p. 20-7.
105. Petrovic, T., M. Niksic, and F. Bringel, *Strain typing with ISLp11 in lactobacilli*. FEMS Microbiol Lett, 2006. **255**(1): p. 1-10.
106. Chen, H., et al., *Comparative analysis of the genes encoding 23S-5S rRNA intergenic spacer regions of Lactobacillus casei-related strains*. Int J Syst Evol Microbiol, 2000. **50 Pt 2**: p. 471-8.
107. Gurtler, V. and V.A. Stanisich, *New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region*. Microbiology, 1996. **142 (Pt 1)**: p. 3-16.
108. Fox, G.E., J.D. Wisotzkey, and P. Jurtshuk, Jr., *How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity*. Int J Syst Bacteriol, 1992. **42**(1): p. 166-70.
109. Naser, S.M., et al., *Identification of lactobacilli by pheS and rpoA gene sequence analyses*. Int J Syst Evol Microbiol, 2007. **57**(Pt 12): p. 2777-89.
110. Felis, G.E., et al., *Comparative sequence analysis of a recA gene fragment brings new evidence for a change in the taxonomy of the Lactobacillus casei group*. Int J Syst Evol Microbiol, 2001. **51**(Pt 6): p. 2113-7.
111. Torriani, S., G.E. Felis, and F. Dellaglio, *Differentiation of Lactobacillus plantarum, L. pentosus, and L. paraplantarum by recA gene sequence analysis and multiplex PCR assay with recA gene-derived primers*. Appl Environ Microbiol, 2001. **67**(8): p. 3450-4.
112. Groisillier, A. and A. Lonvaud-Funel, *Comparison of partial malolactic enzyme gene sequences for phylogenetic analysis of some lactic acid bacteria species and relationships with the malic enzyme*. Int J Syst Bacteriol, 1999. **49 Pt 4**: p. 1417-28.
113. Chavagnat, F., et al., *Comparison of partial tuf gene sequences for the identification of lactobacilli*. FEMS Microbiol Lett, 2002. **217**(2): p. 177-83.
114. O'Sullivan, D.J., *Methods for analysis of the intestinal microflora*. Curr Issues Intest Microbiol, 2000. **1**(2): p. 39-50.
115. Thies, F.L., W. Konig, and B. Konig, *Rapid characterization of the normal and disturbed vaginal microbiota by application of 16S rRNA gene terminal RFLP fingerprinting*. J Med Microbiol, 2007. **56**(Pt 6): p. 755-61.
116. Coolen, M.J., et al., *Characterization of microbial communities found in the human vagina by analysis of terminal restriction fragment length polymorphisms of 16S rRNA genes*. Appl Environ Microbiol, 2005. **71**(12): p. 8729-37.
117. Andoh, A., et al., *Terminal restriction fragment length polymorphism analysis of the diversity of fecal microbiota in patients with ulcerative colitis*. Inflamm Bowel Dis, 2007. **13**(8): p. 955-62.
118. Wiedmann, M., *Subtyping of bacterial foodborne pathogens*. Nutr Rev, 2002. **60**(7 Pt 1): p. 201-8.

119. Kongo, J.M., et al., *Characterization of dominant lactic acid bacteria isolated from Sao Jorge cheese, using biochemical and ribotyping methods*. J Appl Microbiol, 2007. **103**(5): p. 1838-44.
120. Henegariu, O., et al., *Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol*. Biotechniques, 1997. **23**(3): p. 504-11.
121. Song, Y., et al., *Rapid identification of 11 human intestinal Lactobacillus species by multiplex PCR assays using group- and species-specific primers derived from the 16S-23S rRNA intergenic spacer region and its flanking 23S rRNA*. FEMS Microbiol Lett, 2000. **187**(2): p. 167-73.
122. De Vuyst, L., et al., *The biodiversity of lactic acid bacteria in Greek traditional wheat sourdoughs is reflected in both composition and metabolite formation*. Appl Environ Microbiol, 2002. **68**(12): p. 6059-69.
123. Fontana, C., P. Sandro Coconcelli, and G. Vignolo, *Monitoring the bacterial population dynamics during fermentation of artisanal Argentinean sausages*. Int J Food Microbiol, 2005. **103**(2): p. 131-42.
124. Ventura, M., et al., *Rapid amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) identification of Lactobacillus spp. isolated from fecal and vaginal samples*. Syst Appl Microbiol, 2000. **23**(4): p. 504-9.
125. Myers, R.M., T. Maniatis, and L.S. Lerman, *Detection and localization of single base changes by denaturing gradient gel electrophoresis*. Methods Enzymol, 1987. **155**: p. 501-27.
126. Versalovic, J., T. Koeuth, and J.R. Lupski, *Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes*. Nucleic Acids Res, 1991. **19**(24): p. 6823-31.
127. Gevers, D., G. Huys, and J. Swings, *Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of Lactobacillus species*. FEMS Microbiol Lett, 2001. **205**(1): p. 31-6.
128. Antonio, M.A. and S.L. Hillier, *DNA fingerprinting of Lactobacillus crispatus strain CTV-05 by repetitive element sequence-based PCR analysis in a pilot study of vaginal colonization*. J Clin Microbiol, 2003. **41**(5): p. 1881-7.
129. Veljovic, K., et al., *Preliminary characterization of lactic acid bacteria isolated from Zlatar cheese*. J Appl Microbiol, 2007. **103**(6): p. 2142-52.
130. Maiden, M.C., *Multilocus sequence typing of bacteria*. Annu Rev Microbiol, 2006. **60**: p. 561-88.
131. Maiden, M.C., et al., *Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(6): p. 3140-5.
132. Marchant, S., et al., *The predominant microflora of nursing caries lesions*. Caries Res, 2001. **35**(6): p. 397-406.
133. Syed, S.A. and W.J. Loesche, *Survival of human dental plaque flora in various transport media*. Appl Microbiol, 1972. **24**(4): p. 638-44.
134. Mantzourani, M., M. Fenlon, and D. Beighton, *Association between Bifidobacteriaceae and the clinical severity of root caries lesions*. Oral Microbiol Immunol, 2009. **24**(1): p. 32-7.
135. Naser, S.M., et al., *Application of multilocus sequence analysis (MLSA) for rapid identification of Enterococcus species based on rpoA and pheS genes*. Microbiology, 2005. **151**(Pt 7): p. 2141-50.
136. Alam, S., et al., *PCR-Based methods for genotyping viridans group streptococci*. J Clin Microbiol, 1999. **37**(9): p. 2772-6.
137. Wilgenbusch, J.C. and D. Swofford, *Inferring evolutionary trees with PAUP**. Curr Protoc Bioinformatics, 2003. **Chapter 6**: p. Unit 6 4.

138. Coffey, T.J., et al., *First insights into the evolution of Streptococcus uberis: a multilocus sequence typing scheme that enables investigation of its population biology*. Appl Environ Microbiol, 2006. **72**(2): p. 1420-8.
139. Feil, E.J. and M.C. Enright, *Analyses of clonality and the evolution of bacterial pathogens*. Curr Opin Microbiol, 2004. **7**(3): p. 308-13.
140. Corby, P.M., et al., *Microbial risk indicators of early childhood caries*. J Clin Microbiol, 2005. **43**(11): p. 5753-9.
141. Lembo, F.L., et al., *Genotypic and phenotypic analysis of Streptococcus mutans from different oral cavity sites of caries-free and caries-active children*. Oral Microbiol Immunol, 2007. **22**(5): p. 313-9.
142. Paddick, J.S., et al., *Effect of the environment on genotypic diversity of Actinomyces naeslundii and Streptococcus oralis in the oral biofilm*. Appl Environ Microbiol, 2003. **69**(11): p. 6475-80.
143. Li, Y., et al., *Survey of oral microbial diversity using PCR-based denaturing gradient gel electrophoresis*. J Dent Res, 2005. **84**(6): p. 559-64.
144. Cury, J.A., M.A. Rebello, and A.A. Del Bel Cury, *In situ relationship between sucrose exposure and the composition of dental plaque*. Caries Res, 1997. **31**(5): p. 356-60.
145. Preza, D., et al., *Bacterial profiles of root caries in elderly patients*. J Clin Microbiol, 2008. **46**(6): p. 2015-21.
146. Llana, M.C., et al., *New culture media for the isolation of Streptococcus mutans and Lactobacillus in the saliva of head- and neck-irradiated patients*. Oral Health Prev Dent, 2007. **5**(4): p. 285-9.
147. Dal Bello, F. and C. Hertel, *Oral cavity as natural reservoir for intestinal lactobacilli*. Syst Appl Microbiol, 2006. **29**(1): p. 69-76.
148. Satokari, R.M., et al., *Molecular approaches for the detection and identification of bifidobacteria and lactobacilli in the human gastrointestinal tract*. Syst Appl Microbiol, 2003. **26**(4): p. 572-84.
149. Louie, M., et al., *Comparison of ribotyping, arbitrarily primed PCR, and pulsed-field gel electrophoresis for molecular typing of Listeria monocytogenes*. J Clin Microbiol, 1996. **34**(1): p. 15-9.
150. Goldberg, T.L., T.R. Gillespie, and R.S. Singer, *Optimization of analytical parameters for inferring relationships among Escherichia coli isolates from repetitive-element PCR by maximizing correspondence with multilocus sequence typing data*. Appl Environ Microbiol, 2006. **72**(9): p. 6049-52.
151. Milnes, A.R. and G.H. Bowden, *The microflora associated with developing lesions of nursing caries*. Caries Res, 1985. **19**(4): p. 289-97.
152. Badet, C. and N.B. Thebaud, *Ecology of lactobacilli in the oral cavity: a review of literature*. Open Microbiol J, 2008. **2**: p. 38-48.
153. Matsumiya, Y., et al., *Molecular epidemiological study of vertical transmission of vaginal Lactobacillus species from mothers to newborn infants in Japanese, by arbitrarily primed polymerase chain reaction*. J Infect Chemother, 2002. **8**(1): p. 43-9.
154. Wilson, M.K., et al., *Analysis of the Pan Genome of Campylobacter jejuni Isolates Recovered from Poultry by Pulsed-Field Gel Electrophoresis, Multilocus Sequence Typing (MLST), and Repetitive Sequence Polymerase Chain Reaction (rep-PCR) Reveals Different Discriminatory Capabilities*. Microb Ecol, 2009.
155. Foley, S.L., et al., *Comparison of subtyping methods for differentiating Salmonella enterica serovar Typhimurium isolates obtained from food animal sources*. J Clin Microbiol, 2006. **44**(10): p. 3569-77.
156. Do, T., et al., *Population structure of Streptococcus oralis*. Microbiology, 2009. **155**(Pt 8): p. 2593-602.

157. Bonacorsi, S., et al., *Semi-automated rep-PCR for rapid differentiation of major clonal groups of Escherichia coli meningitis strains*. Int J Med Microbiol, 2009. **299**(6): p. 402-9.
158. Turner, K.M. and E.J. Feil, *The secret life of the multilocus sequence type*. Int J Antimicrob Agents, 2007. **29**(2): p. 129-35.

8. ANEXOS

ARTIGO I

Effect of the Environment on the Composition and Genotypic Diversity of Lactobacilli
from Oral Biofilm

Composition and Genotypic Diversity of Oral Lactobacilli

Clarissa Cavalcanti Fatturi Parolo*

Department of Social and Preventive Dentistry, Faculty of Dentistry, Federal
University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

David Beighton

King's College London Dental Institute, Infection Research Group, London, UK

Steven C. Gilbert

King's College London Dental Institute, Infection Research Group, London, UK

Luana Severo Alves

Department of Social and Preventive Dentistry, Faculty of Dentistry, Federal
University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

Fernanda Cristina Mendes de Santana Giongo

Department of Social and Preventive Dentistry, Faculty of Dentistry, Federal
University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

Marisa Maltz

Department of Social and Preventive Dentistry, Faculty of Dentistry, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

Institutions Addresses

King's College London Dental Institute, Department of Microbiology, The Henry Wellcome Laboratories for Microbiology and Salivary Research, Infection Research Group, KCL Dental Institute, Floor 17, Guy's Tower, London Bridge, SE1 9RT, London, United Kingdom, david.beighton@kcl.ac.uk.

Department of Social and Preventive Dentistry, Faculty of Dentistry, Federal University of Rio Grande do Sul, Ramiro Barcelos 2492, Santana, 90035-003, Porto Alegre, Brazil,

Tel.+55 51 33085193, Fax.+55 51 33085189, clarissa.parolo@ufrgs.br

Correspondent footnote

Department of Social and Preventive Dentistry, Faculty of Dentistry, Federal University of Rio Grande do Sul, Ramiro Barcelos 2492, Santana, 90035-003, Porto Alegre, Brazil,

Tel.+55 51 33085193, Fax.+55 51 33085189, clarissa.parolo@ufrgs.br

ABSTRACT

The purpose of the present study was to determine the difference in composition and genetic diversity of lactobacilli related to environmental changes in biofilm by repetitive extragenic palindromic PCR (rep-PCR). The study involved an *in situ* biofilm model with non-sucrose and sucrose phases with 11 subjects. Lactobacillus colonies were randomly selected (n=222, 31 from non-sucrose and 191 from sucrose period), subcultured in Rogosa Agar and identified using *pheS/rpoA* gene sequence analysis. Lactobacilli species present in oral human biofilm were *L. paracasei* (n=75), *L. fermentum* (n=72), *L. rhamnosus* (n=67), and *L. gasseri* (n=8). After the sucrose phase, a higher number of lactobacilli could be found in dental biofilm (p=0.001). The prevalence of *L. fermentum* was similar in the non-sucrose (6/11 subjects) compared to the sucrose phase (8/11 subjects) (p=0.721). Prevalence of *L. rhamnosus* and *L. paracasei* increased in biofilm from 2/11 to 8/11 subjects (p= 0.028) and from 2/11 to 7/11 subjects (p=0.012) after sucrose exposure, respectively. *L. gasseri* prevalence was low in both phases (p=1.00). Lactobacilli exhibited greater species diversity (2 or 3 species per subject) in the sucrose phase, than those isolated from the non-sucrose phase (0-2 species per subject). In most of the cases different genotypes were present in the non-sucrose phase in comparison to the sucrose phase. The present data showed an increase in the number, colonized surfaces, species and genetic diversity in lactobacilli due to sucrose exposure.

INTRODUCTION

Lactobacilli were considered the prime cariogenic microorganisms until, mutans streptococci, were associated with caries [1, 2]. Today, lactobacilli are still considered as potential contributors to caries development [3-5].

Dissolution of the enamel by bacterial acids is considered to be the primary event in caries development [2]. Biofilm-mediated diseases result from imbalances in the resident microbiota resulting from pathogens enrichment within the bacterial community due to pH-driven disruption as a consequence of frequent consumption of fermentable Carbohydrates [6, 7]. Caries is associated with increases in the proportions of acidogenic and acid-tolerating bacteria such as mutans streptococci and lactobacilli in biofilm [1]. Local stress, as a result to sucrose exposure, is able to modify the biofilm characteristics by changing its microbial composition [4, 8], biochemical profile [9, 10] and genotypic diversity [8, 11].

The maintenance of the bacteria best able to proliferate was expected as a result of a less favourable environment in caries active biofilm [12]. Considering the whole microbial community, a significantly greater diversity of oral bacteria in saliva of caries-free individuals was found in comparison to caries-active individuals using culturing and molecular approaches [11]. In this study, a portion of oral microbiota of caries-active individuals was absent, suppressed, or replaced [11]. However, it is not clear that specific genotypes of a cariogenic bacteria, such as *Lactobacillus*, could be selected in the biofilm due to the stress induced by carbohydrates exposure [13]. Some investigations had studied the genotypic profile of lactobacilli in the oral cavity [14-17]. In saliva of caries-active subjects, 2 to 8 distinct genotypes of lactobacilli could be found [14]. In carious dentine, up to four lactobacilli genotypes were recovered from a single caries lesion and different genotypes were recovered from

different carious teeth in the same child with nursing caries [15]. In these studies, no comparison with the lactobacilli genotypes in healthy sites was carried out [14, 15]. Understanding the role of specific bacterial species and subspecies is important for creating a complete model of caries aetiology. Based on this fact, the purpose of the present study was to determine if there was a difference in the composition and genetic diversity of lactobacilli related to environmental changes in biofilm by rep-PCR.

MATERIAL AND METHODS

Ethics

The protocol of the current study was approved by the ethics committee of the Faculty of Dentistry from the Federal University of Rio Grande do Sul (process n°61/05). Informed and written consent was obtained from all individuals.

Sample preparation and Intraoral Procedures

The study involved an *in situ* biofilm model. Human enamel blocks were cut from unerupted third molars and fixed into a removable acrylic mandible appliance leaving a 1 mm space for biofilm accumulation. The volunteers received instructions to wear the appliances day and night and to remove them only during the meals and oral hygiene. Eleven Brazilian dental students or dentists took part in this study (8 females, 3 males; age 20-32 yr). None of the subjects took any antibiotics before or during the experiments. The participants were residents in a fluoridated water supply area (0.7-1.0 ppmF⁻) and used fluoridated dentifrice. Biofilm accumulation was performed: (a) without sucrose exposure by dropping sterile distilled water onto the enamel blocks 8 times/day during 6 days; (b) with sucrose exposure by dropping 20% sucrose solution onto the enamel blocks 8 times/day during 28 days. The appliances were removed from the mouth while providing the treatments. After each experimental phase, a biofilm pool from left and right sides of the appliance was collected, with the use of a sterile dental excavator. The subjects were identified by uppercase letters A, C, D, F, L, M, N, O, R, S and T.

Bacterial strains

Biofilm collected was placed in 1 mL of Reduced Transport Fluid (RTF) [18]. Sterile glass beads (3.5 - 4.5 mm in diameter) were added to each sample, which was vortexed for 30s to disperse bacterial aggregates. The dispersed samples were decimally diluted in RTF and 100 μ L aliquots of appropriate dilutions were inoculated onto Rogosa SL Agar (Himedia) at 37°C for 72 h employing the pour-plate technique [19]. After incubation, up to 30 presumptive *Lactobacillus spp.* colonies were picked at random from the Rogosa plates. Each isolate was Gram-stained, pure streaked onto Rogosa medium and a single isolated colony was picked and pure-cultured again. Stock cultures were stored in Brain Heart Infusion (BHI) (Difco) with 15% (v/v) glycerol at -80°C.

Isolation of DNA, Genetic identification and Sequencing

To confirm that the isolates were *Lactobacillus* and to identify them, genomic DNA was extracted by proteinase K method [20] and the extracts were stored at -20°C prior to use. Polymerase chain reaction primers were used to amplify the genes α -subunit of phenylalanyl-tRNA synthase (*pheS*) or α -subunit of RNA polymerase (*rpoA*) [21]. The *pheS* primers (*pheS21F/pheS22R*) were used first and if no amplicon was obtained, the *rpoA* primers (*rpoA21F/rpoA23R*) were used [21]. PCR products were visualized by electrophoresis on a 1% (w/v) agarose gel containing GelRed™ (Biotium, Inc), cleaned and sequenced with *pheS* or *rpoA* primers by the use of the BigDye v3.0 (Applied Biosystems, Warrington, UK) as previously described [20]. The cycling protocol and cleaning of sequencing reaction products were executed as described in the manufacturer's protocols. Sequencing was performed using an ABI 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems, Warrington, UK). The sequences were manually corrected and edited using BioEdit software (version

7.0.8, Ibis Biosciences, Isis Pharmaceuticals [<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>]). The sequences were identified using the National Center for Biotechnology Information (NCBI) database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) by the standard nucleotide-nucleotide homology search blast [22]. The isolates identified as *Lactobacilli* were stored at -80°C for genotyping.

REP-PCR genomic fingerprinting

The REP-PCR protocol used was adapted from Alam *et al.* (1999)[23]. The REP-PCR oligonucleotide primers used in this study were REP1R (5'-III NCG NCG NCA TCN GCC-3') and REP2 (5'-NCG NCT TAT CNG GCC TAC-3'), where N is A, G, C and T [23]. The 25µL PCR volume consisted of 2,5 µL 10X buffer, 3,75 µL MgCl₂ 25mM, 1 µL dNTP (3,125 mM), 0,5 µL *Taq* DNA polymerase (AB-gene, Epsom, UK), 2,75 µL forward primer, 2,75 µL reverse primer, 3 µL de DNA extract and 8,75 µL ultra high quality (UHQ) water. PCR amplifications were performed with a Flexigene termocicler (Flexigene; Techne, Cambridge, United Kingdom). The thermal cycling conditions were an initial denaturation at 95°C for 7 min, denaturation at 94°C for 30s, annealing at 40°C for 1 min, extension at 65°C for 8 min, repeated for 32 cycles and final extension at 65°C for 16 min [23]. A 17.5µL volume of each PCR sample was eletrophoresed in a 2% (wt/vol) Metasieve agarose gel (Flowgene, Staffordshire, England) for 2 h at a constant voltage of 100V in 1x TBE (Tris-borate-EDTA) buffer. Each gel was run with three 1-Kb ladder (pGEM DNA Marker, Promega), in three separate lanes, and one negative control with sterile UHQ water in the last lane of the gel. The REP-PCR profiles were visualized after staining with 5% GelRed™ (Biotium, Inc) under ultraviolet light, followed by digital image capturing. The resulting

fingerprints were analyzed by the GelCompare software package. Some strains, which represent some recognized species of *Lactobacillus*, were included in the REP-PCR analysis for comparison purposes (Table 1).

Statistical analysis

Non-parametric statistics were applied to compare *lactobacillus spp.* recovery after the two experimental phases: two-way analysis of ranks (Friedman test) was followed by Wilcoxon test for individual comparisons. The Wilcoxon test was applied to compare the number of genotypes recovered prior and after sucrose exposure. The Wilcoxon test was applied to compare the number of Lactobacilli recovered prior and after sucrose exposure. The Wilcoxon test was applied to compare the number of species of lactobacilli recovered prior and after sucrose exposure. The α -type error was set at <0.05 .

RESULTS

Composition of oral biofilm

A total of 222 lactobacilli were studied. A higher number of lactobacilli could be isolated in dental biofilm after the sucrose phase (n=191), in comparison with non-sucrose phase (n=31) (Wilcoxon, $p=0.001$). The lactobacilli species present in oral human biofilm in both phases were *L.paracasei* (n=75), *L.fermentum* (n=72), *L.rhamnosus* (n=67), and *L.gasseri* (n=8). The number of colonized biofilm per subject (n=11) increased from 7 to 11 after the sucrose exposure. Subjects D, F, M, and S were not colonized by lactobacilli in the beginning of the study but became colonized after the environmental change by sucrose (Figure 1). The prevalence of

L. fermentum was similar in the non-sucrose (6/11 subjects) compared to the sucrose phase (8/11 subjects) ($p=0.721$) (Figure 2). Subject C harboured *L. fermentum* in the non-sucrose phase but was not colonized by this specie after the sucrose exposure (Table 2). The isolation of *L. paracasei* was related to a cariogenic environment as its recovery from the sucrose phase (7/11 subjects, $n=73$ isolates) was more abundant in relation to a non-cariogenic environment (2/11 subjects, $n=2$ isolates) ($p=0.028$) (Figure 2). The prevalence of *L. rhamnosus* also increased in biofilm from 2/11 to 7/11 subjects colonized ($p=0.012$) after sucrose exposure. *L. gasseri* prevalence was low in both phases ($p=1.00$) (Figure 3). Two subjects (Subjects R and T) had their biofilm colonized by *L. gasseri* prior to sucrose exposure and, after the sucrose exposure, only one subject (Subject T) remained colonized.

In the sucrose phase, the lactobacilli exhibited a greater species diversity than those isolated from the non-sucrose phase. In most of the cases, multiple lactobacillus species were isolated from the biofilm from the sucrose phase with 2 or 3 species per subject, while from the non-sucrose phase 0-2 species were isolated ($p=0.045$)

Genetic diversity

The rep-PCR method gave complex PCR products, which enabled grouping of 235 lactobacilli (222 clinical isolates and 13 reference strains) into 103 groups. Each rep-PCR profile was numbered from 1 to 103. The rep-PCR method was found to be highly reproducible once the overall level of similarity of the DNA markers was 96.95%. Clinical isolates could be grouped in 90 rep-PCR profiles. The overall similarity amongst all isolates ($n=235$) was 70.29%.

A single strain was related to a unique rep-PCR profile in 64 cases. In 39 cases more than one strain (ranging from 2 to 15 strains) was present *per* rep-PCR cluster. In 19

cases, strains from the same specie but from different subjects were clustered together in the same rep-PCR profile. In 20 cases strains from the same specie and from the same subject were cluster together by the rep-PCR.

All reference strains clearly grouped in separate clusters according to their respective taxonomic designations. Distinct fingerprint pattern were observed amongst the 4 different lactobacilli species studied. The rep-PCR did not cluster lactobacilli from different species in the same rep profile. A high discriminatory power up to species level was found as all *L.paracasei*, *L.fermentum*, *L. rhamnosus* and *L. gasseri* could be differentiated from each other for having less than 89% similarity. All clinical isolates of *L. paracasei* could be sub-grouped in 25 rep-PCR profiles, *L.fermentum* in 36, *L. rhamnosus* in 27, and *L. gasseri* in 6.

The effect of the environmental changes in the genetic diversity of the isolates is observed in Table 2. Different genotypes were present in both non-sucrose and sucrose phases in the same subject. Only for Subject T, *L.fermentum* genotype 96 was present in both experimental phases.

Overall the number of recovered lactobacillus genotypes in biofilm varied from 0 to 14 and was more abundant in the sucrose phase (0.001). In Table 2 it is possible to observe the number and types of genotypes recovered from 11 subjects categorized by the 4 species found in the oral biofilm (n=44). In 2/44 cases lactobacilli were present in the biofilm before the sucrose phase but disappeared after sucrose exposure, 14/44 cases lactobacilli were recovered only after sucrose exposure, 18/44 had no lactobacilli either before or after the sucrose exposure.

However, in 10/44 cases the same lactobacilli specie was present in both experimental phases: 1 case presented equal number of genotypes (subject C - *L. paracasei*); 5 presented an increased genetic diversity (subject A - *L. rhamnosus*,

subject R - *L. paracasei*, subject L - *L. fermentum*, subject N - *L.rhamnosus*, subject T - *L .gasseri*) and 4 presented a decreased genetic diversity (subjects A, N, O, T - *L. fermentum*) after sucrose exposure. The effect of the environmental changes in the number of genotypes recovered in these cases showed no specific pattern being maintained, suppressed or increased (Table 2).

DISCUSSION

Genetic-based taxonomical methods are required for the correct species identification and genotyping in lactobacilli. The decision to use repetitive extragenic palindromic PCR (rep-PCR) DNA fingerprinting was based on the reported reliability of the method to type *Lactobacillus* strains and to generate reproducible fingerprints patterns [24]. Rep-PCR has been applied to lactobacilli from different human sources and food showing good discriminatory power at species or strain level [15, 25, 26]. Other strain typing method considered was pulsed-field eletrophoresis (PFGE) which has been shown to be more costly, labor-intensive and time-consuming [27, 28] than rep-PCR. Multi locus sequencing typing (MLST) is also considered an alternative typing method but had shown lower discriminatory power in comparison to rep-PCR in *L. paracasei* (unpublished data) and it is impractical for large-scale epidemiological studies [29]. For the purposes of this investigation, the rep-PCR was sufficiently discriminatory and suitable for a large scale typing of *Lactobacillus* isolates. All strains were typeable by this method.

This is the first study to present a longitudinal follow up of lactobacilli in oral biofilm from the same oral site after an environmental change. *In situ* studies can give a good insight on biofilm formation in the oral cavity. With this model, it is possible to control the conditions in which the biofilm is being form in order to study its composition from health to disease. This could not be done in patients for ethical reasons.

In the present study, 4 different species of lactobacillus (*L. paracasei*, *L. fermentum*, *L. rhamnosus* and *L. gasseri*) were present in the biofilm from 11 subjects. Other studies have also identified lactobacillus at species level in dental biofilm and 5 to 6 species were identified per subject [33, 34]. However, in these studies identification

was based on metabolic properties which are not necessarily reliable for lactobacillus identification [35, 36]. In dentin lesions at least 3 different species or phylotypes of lactobacilli were present in most of the samples [17]. In the present study, the lactobacilli exhibited greater species diversity (2 or 3 species per subject) in the sucrose phase, than those isolated from the non-sucrose phase (0-2 species per subject). *L. paracasei* and *L.rhamnosus* were related to a cariogenic environment as their recovery from the sucrose phase was more abundant in relation to a non-cariogenic environment. This is in agreement with the literature where *L. casei* group is associated with dental caries in different developmental stages [37]. The species composition in oral biofilm was increased once the dental biofilm is an open niche that is susceptible to random contamination from salivary and dietary sources.

There is a variable number of lactobacillus genotypes recovered from different sites in the human oral cavity [14, 15]. The number of lactobacillus genotypes recovered from different patient with nursing caries lesions by ERIC-PCR varied from 1 to 7 [15]. In saliva, 2 to 8 distinct genotypes of lactobacilli were present in each subject [14]. In this study, 0 to 14 genotypes were recovered from the oral biofilm. Although distinct typing methods were used (ERIC-PCR, rep-PCR and restriction enzymes DNA digestion) multiple genotypes were present in the oral cavity from different sites. Lactobacilli genotypes from biofilm in the same subject tended to be distinct after sucrose exposure. In this study only one genotype was recovered in both experimental phases in the same subject. In another longitudinal study without environmental changes, lactobacilli genotypes were compared in two distinct saliva samples spaced by three months and it was possible to observe that in 2 out of 3 subjects (2 *L.fermentum* genotypes and 1 *L.vaginalis* genotype) the same genotype was recovered showing a greater stability of genotypes in comparison to our data.

Nevertheless, some lactobacilli genotypes from saliva also disappeared or new one were acquired even without any supposed environmental change [30]. This was also observed in nursing caries where different individual lesions also harboured different genotypes of lactobacilli in the same child in the same time-point [15]. The presence of different genotypes of lactobacilli after sucrose exposure in biofilm suggests that synergistic and antagonistic interactions could count for this change in bacterial profile within the cariogenic biofilm.

CONCLUSIONS

The present data showed an increase in colonized subjects, species and genetic diversity in lactobacilli due to sucrose exposure.

ACKNOWLEDGMENTS

We gratefully acknowledge the support of the Brazilian Ministry of Science and Technology, through its National Council of Research (CNPq) agency (grant 480841/2007-1), the Dental Institute, King's College London and the Department of Health via the National Institute for Health Research (NIHR) Comprehensive Biomedical Research Centre award to Guy's & St Thomas' NHS Foundation Trust in partnership with King's College London and King's College Hospital NHS Foundation Trust. We are grateful to the Brazilian Federal Agency for Support and Evaluation of Graduate Education (CAPES) from whom the first author received a scholarship. We thank all volunteers for their dedication.

Table 1: Details of the *Lactobacillus* reference species and strains that were analysed in this study from culture collections.

Species name	Strain number	Other strain numbers	Source
<i>Lactobacillus casei</i>	DSM 20011	ATCC 393, NCDO 161	cheese
<i>Lactobacillus fermentum</i>	DSM 20052	ATCC 14931, NCDO 1750	Fermented beets
<i>Lactobacillus gasseri</i>	DSM 20243	ATCC 33323, NCDO 2233, NCIB 11718	Human
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	DSM 2649	-	Silage
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	DSM 4905	ATCC 11578	Oral Cavity
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	DSM 5622	ATCC 25302, NCDO 151	-
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	DSM 8741	NCFB 2976	Human blood
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>tolerans</i>	DSM 20012	NCDO 1974	Pasteurized milk
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>tolerans</i>	DSM 20258	ATCC 25599, NCIB 9709	Pasteurized milk
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	CCUG 21452T	NCIB 6375, ATCC 7469	-
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	CCUG 27333	ATCC 7469	human
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	CCUG 27772	-	Human blood
<i>Lactobacillus zeae</i>	DSM 20178	ATCC 15820, RIA 482	Corn steep liquor

Table 2: Lactobacillus spp. genotypes (numbers 1 to 103) by rep-PCR recovered from biofilm from a non-sucrose and sucrose phases in biofilm from 11 subjects.

Species	Genotypes recovered from non-sucrose phase	Genotypes recovered from sucrose phase
<i>L. paracasei</i>		
Subject A	-	66, 80, 82
Subject C	99	55
Subject D	-	50, 70, 79, 101
Subject F	-	51, 66, 68, 75, 77, 78
Subject L	-	4, 70, 103
Subject M	-	7, 8, 58, 69, 72
Subject N	-	-
Subject O	-	-
Subject R	61	52, 64, 71,
Subject S	-	-
Subject T	-	-
<i>L. fermentum</i>		
Subject A	1, 16, 25	62, 63
Subject C	27, 16	-
Subject D	-	88, 89, 90, 91, 92, 93, 97
Subject F	-	-
Subject L	13	1, 91
Subject M	-	-
Subject N	1, 57	16
Subject O	18, 25, 26	96
Subject R	-	94, 95
Subject S	-	1, 11, 12, 13, 15, 24
Subject T	5, 14, 15, 17, 20, 21, 86, 96	6, 23, 85, 87, 96, 98
<i>L. rhamnosus</i>		
Subject A	42	73, 49
Subject C	-	-
Subject D	-	-
Subject F	-	44
Subject L	-	-
Subject M	-	22, 28, 39, 46
Subject N	22	30, 32, 40, 44, 46
Subject O	-	22, 28, 32, 33, 34, 39, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 59
Subject R	-	30, 31, 32, 35, 36, 46, 53
Subject S	-	32, 33, 44, 100
Subject T	-	30, 33, 39, 42, 56, 59
<i>L. gasseri</i>		
Subject A	-	-
Subject C	-	-
Subject D	-	-

<i>Subject F</i>	-	-
<i>Subject L</i>	-	-
<i>Subject M</i>	-	-
<i>Subject N</i>	-	-
<i>Subject O</i>	-	-
<i>Subject R</i>	84	-
<i>Subject S</i>	-	-
<i>Subject T</i>	37	2, 19, 29, 81,

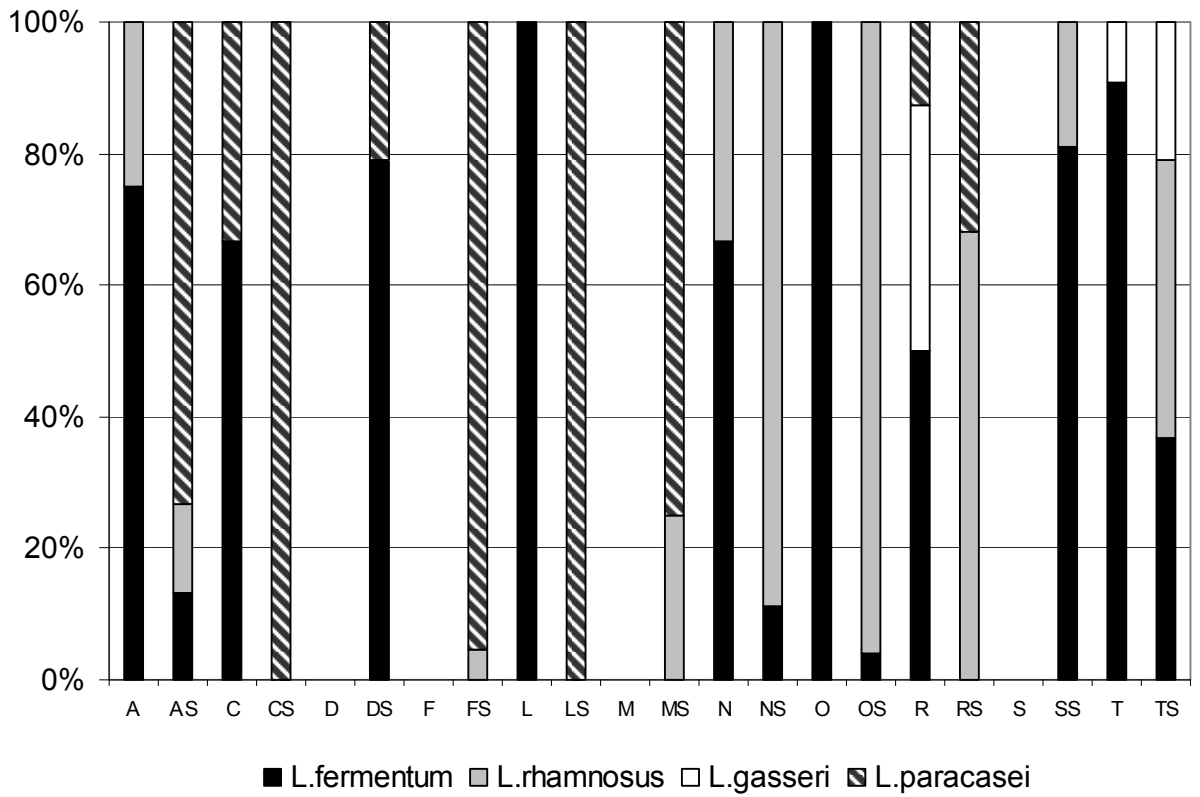


Figure 1: Frequency distribution (%) of lactobacilli species found in the non-sucrose and sucrose phases for each subject studied. Different initial letters identify different subjects. Initial letters followed by the S letter identify the sucrose phase.

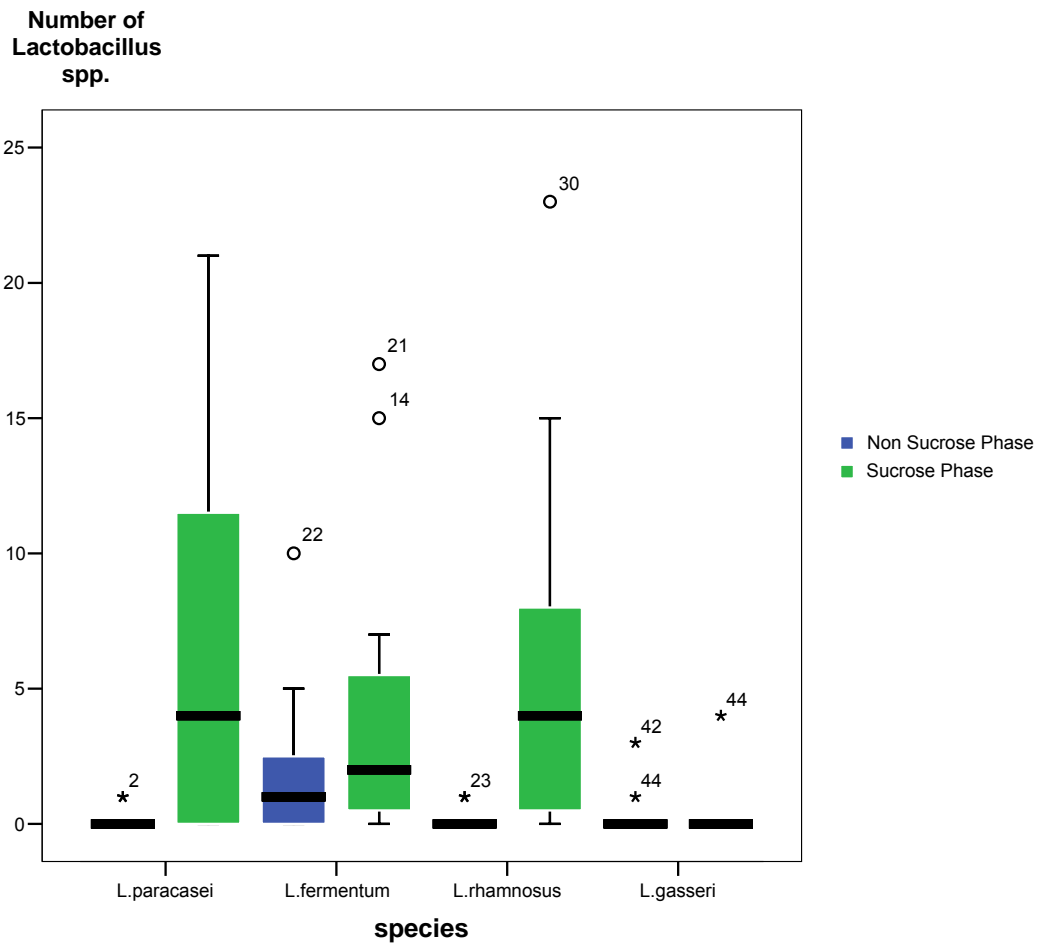


Figure 2: Boxplot of Median and inter-quartile range (25-75%) of the number of *Lactobacillus spp.* found in non-sucrose and sucrose phases (○= outliers and *= extremes). *L.paracasei* (p=0.012), *L.fermentum* (p=0.721), *L.rhamnosus* (p=0.028) and *L.gasseri* (p=1.00)

REFERENCES

1. van Houte, J., *Bacterial specificity in the etiology of dental caries*. Int Dent J, 1980. **30**(4): p. 305-26.
2. Tanzer, J.M., J. Livingston, and A.M. Thompson, *The microbiology of primary dental caries in humans*. J Dent Educ, 2001. **65**(10): p. 1028-37.
3. Aas, J.A., et al., *Bacteria of dental caries in primary and permanent teeth in children and young adults*. J Clin Microbiol, 2008. **46**(4): p. 1407-17.
4. Corby, P.M., et al., *Microbial risk indicators of early childhood caries*. J Clin Microbiol, 2005. **43**(11): p. 5753-9.
5. Preza, D., et al., *Bacterial profiles of root caries in elderly patients*. J Clin Microbiol, 2008. **46**(6): p. 2015-21.
6. Bradshaw, D.J. and P.D. Marsh, *Analysis of pH-driven disruption of oral microbial communities in vitro*. Caries Res, 1998. **32**(6): p. 456-62.
7. Bradshaw, D.J., A.S. McKee, and P.D. Marsh, *Effects of carbohydrate pulses and pH on population shifts within oral microbial communities in vitro*. J Dent Res, 1989. **68**(9): p. 1298-302.
8. Paddick, J.S., et al., *Effect of the environment on genotypic diversity of Actinomyces naeslundii and Streptococcus oralis in the oral biofilm*. Appl Environ Microbiol, 2003. **69**(11): p. 6475-80.
9. Cury, J.A., M.A. Rebello, and A.A. Del Bel Cury, *In situ relationship between sucrose exposure and the composition of dental plaque*. Caries Res, 1997. **31**(5): p. 356-60.
10. Cury, J.A., et al., *Biochemical composition and cariogenicity of dental plaque formed in the presence of sucrose or glucose and fructose*. Caries Res, 2000. **34**(6): p. 491-7.
11. Li, Y., et al., *Survey of oral microbial diversity using PCR-based denaturing gradient gel electrophoresis*. J Dent Res, 2005. **84**(6): p. 559-64.
12. Kreulen, C.M., et al., *Streptococcus mutans in children using nursing bottles*. ASDC J Dent Child, 1997. **64**(2): p. 107-11.
13. Arthur, R.A., et al., *Genotypic diversity of S. mutans in dental biofilm formed in situ under sugar stress exposure*. Braz Dent J, 2007. **18**(3): p. 185-91.
14. Caufield, P.W., et al., *Diversity of lactobacilli in the oral cavities of young women with dental caries*. Caries Res, 2007. **41**(1): p. 2-8.
15. Marchant, S., et al., *The predominant microflora of nursing caries lesions*. Caries Res, 2001. **35**(6): p. 397-406.
16. Chhour, K.L., et al., *Molecular analysis of microbial diversity in advanced caries*. J Clin Microbiol, 2005. **43**(2): p. 843-9.
17. Byun, R., et al., *Quantitative analysis of diverse Lactobacillus species present in advanced dental caries*. J Clin Microbiol, 2004. **42**(7): p. 3128-36.
18. Syed, S.A. and W.J. Loesche, *Survival of human dental plaque flora in various transport media*. Appl Microbiol, 1972. **24**(4): p. 638-44.
19. Svensater, G., et al., *The acid-tolerant microbiota associated with plaque from initial caries and healthy tooth surfaces*. Caries Res, 2003. **37**(6): p. 395-403.
20. Mantzourani, M., M. Fenlon, and D. Beighton, *Association between Bifidobacteriaceae and the clinical severity of root caries lesions*. Oral Microbiol Immunol, 2009. **24**(1): p. 32-7.
21. Naser, S.M., et al., *Application of multilocus sequence analysis (MLSA) for rapid identification of Enterococcus species based on rpoA and pheS genes*. Microbiology, 2005. **151**(Pt 7): p. 2141-50.
22. Altschul, S.F., et al., *Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs*. Nucleic Acids Res, 1997. **25**(17): p. 3389-402.

23. Alam, S., et al., *PCR-Based methods for genotyping viridans group streptococci*. J Clin Microbiol, 1999. **37**(9): p. 2772-6.
24. Gevers, D., G. Huys, and J. Swings, *Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of Lactobacillus species*. FEMS Microbiol Lett, 2001. **205**(1): p. 31-6.
25. Antonio, M.A. and S.L. Hillier, *DNA fingerprinting of Lactobacillus crispatus strain CTV-05 by repetitive element sequence-based PCR analysis in a pilot study of vaginal colonization*. J Clin Microbiol, 2003. **41**(5): p. 1881-7.
26. Nikolic, M., et al., *Characterization of lactic acid bacteria isolated from Bukuljac, a homemade goat's milk cheese*. Int J Food Microbiol, 2008. **122**(1-2): p. 162-70.
27. Satokari, R.M., et al., *Molecular approaches for the detection and identification of bifidobacteria and lactobacilli in the human gastrointestinal tract*. Syst Appl Microbiol, 2003. **26**(4): p. 572-84.
28. Louie, M., et al., *Comparison of ribotyping, arbitrarily primed PCR, and pulsed-field gel electrophoresis for molecular typing of Listeria monocytogenes*. J Clin Microbiol, 1996. **34**(1): p. 15-9.
29. Goldberg, T.L., T.R. Gillespie, and R.S. Singer, *Optimization of analytical parameters for inferring relationships among Escherichia coli isolates from repetitive-element PCR by maximizing correspondence with multilocus sequence typing data*. Appl Environ Microbiol, 2006. **72**(9): p. 6049-52.
30. Dal Bello, F. and C. Hertel, *Oral cavity as natural reservoir for intestinal lactobacilli*. Syst Appl Microbiol, 2006. **29**(1): p. 69-76.
31. Ahrne, S., et al., *The normal Lactobacillus flora of healthy human rectal and oral mucosa*. J Appl Microbiol, 1998. **85**(1): p. 88-94.
32. Martin, F.E., et al., *Quantitative microbiological study of human carious dentine by culture and real-time PCR: association of anaerobes with histopathological changes in chronic pulpitis*. J Clin Microbiol, 2002. **40**(5): p. 1698-704.
33. Carlsson, J., H. Grahnen, and G. Jonsson, *Lactobacilli and streptococci in the mouth of children*. Caries Res, 1975. **9**(5): p. 333-9.
34. Milnes, A.R. and G.H. Bowden, *The microflora associated with developing lesions of nursing caries*. Caries Res, 1985. **19**(4): p. 289-97.
35. Boyd, M.A., M.A. Antonio, and S.L. Hillier, *Comparison of API 50 CH strips to whole-chromosomal DNA probes for identification of Lactobacillus species*. J Clin Microbiol, 2005. **43**(10): p. 5309-11.
36. Rodas, A.M., S. Ferrer, and I. Pardo, *Polyphasic study of wine Lactobacillus strains: taxonomic implications*. Int J Syst Evol Microbiol, 2005. **55**(Pt 1): p. 197-207.
37. Badet, C. and N.B. Thebaud, *Ecology of lactobacilli in the oral cavity: a review of literature*. Open Microbiol J, 2008. **2**: p. 38-48.

ARTIGO II

Food-borne *Lactobacillus paracasei* isolated from the human oral biofilm

Lactobacillus paracasei from the human oral biofilm

Clarissa Cavalcanti Fatturi Parolo*

Department of Social and Preventive Dentistry, Faculty of Dentistry, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

Thuy Do

King's College London Dental Institute, Infection Research Group, London, UK

Uta Henssge

King's College London Dental Institute, Infection Research Group, London, UK

Luana Severo Alves

Department of Social and Preventive Dentistry, Faculty of Dentistry, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

Fernanda Cristina Mendes de Santana Giongo

Department of Social and Preventive Dentistry, Faculty of Dentistry, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

Gertrudes Corção

Department of Microbiology, Institute of Health Basic Science, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

Marisa Maltz

Department of Social and Preventive Dentistry, Faculty of Dentistry, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

David Beighton

King's College London Dental Institute, Infection Research Group, London, UK

Institutions Addresses

King's College London Dental Institute, Department of Microbiology, The Henry Wellcome Laboratories for Microbiology and Salivary Research, Infection Research Group, KCL Dental Institute, Floor 17, Guy's Tower, London Bridge, SE1 9RT, London, United Kingdom, david.beighton@kcl.ac.uk.

Department of Social and Preventive Dentistry, Faculty of Dentistry, Federal University of Rio Grande do Sul, Ramiro Barcelos 2492, Santana, 90035-003, Porto Alegre, Brazil, Tel. +55 51 33085193, Fax.+55 51 33085189, clarissa.parolo@ufrgs.br

Correspondent footnote

Department of Social and Preventive Dentistry, Faculty of Dentistry, Federal University of Rio Grande do Sul, Ramiro Barcelos 2492, Santana, 90035-003, Porto Alegre, Brazil, Tel. +55 51 33085193, Fax.+55 51 33085189, clarissa.parolo@ufrgs.br

ABSTRACT

Lactobacilli are members of oral biofilm and human gut microflora. They are also isolated from foods and widely used as probiotics. It has been suggested that the oral lactobacilli are likely exogenous and opportunists colonizers. We have investigated this hypothesis by isolating lactobacilli from a biofilm model, formed *in situ* prior to and during a period of exposure to 20% sucrose solution (28 days), using Rogosa Agar. The lactobacillus colonies were randomly selected (n=222, 31 prior to and 191 following a sucrose exposure period) and subcultured. The isolates were identified using *pheS* or *rpoA* gene sequence analysis. Those lactobacilli identified as *Lactobacillus paracasei* were subjected to multi-locus sequencing typing (MLST) analysis by determining partial sequences of seven housekeeping genes *fusA*, *ileS*, *lepA*, *leuS*, *pyrG*, *recA*, and *recG*. MLST is a highly discriminatory method for determining the epidemiological relationship between members of the same species. An increase recovery of lactobacilli after sucrose phase compared to non-sucrose period was observed. The predominant lactobacilli were *L. paracasei*, *L. fermentum* and *L. rhamnosus*. Seven subjects harboured *L. paracasei* (n=75) and these represented 14 sequence types (ST). Comparison of the STs showed that unrelated subjects may harbour the same ST and that individuals harbour multiple STs. Three subjects harboured STs previously isolated from dairy products. The present data support the hypothesis that some oral lactobacilli may be of exogenous origin.

INTRODUCTION

Dietary lactic acid bacteria (LAB) have been associated with only a few bacterial infections in severely immunocompromised subjects (3, 5, 39, 48). LAB are considered as non-pathogenic organisms (2) with a very long record of safe oral consumption. They are widely used as starter strains in food and feed fermentation technology, but also for the probiotic effect that certain species or strains may exert in humans or animals (23). Lactobacilli are able to colonise the mouth (51), the urogenital (26) and the gastrointestinal tracts in humans (15, 27). It is well established that some LAB play a critical role in maintaining a balanced normal microflora in the urogenital and the gastrointestinal tracts (7, 36). Certain lactobacillus strains have already been used, for example, to prevent or to reduce the incidence or recurrence of urinary or digestive tract infections (7, 23, 36).

On the other hand, lactobacilli found in the oral cavity have been associated with the progression of dental caries (1, 25, 28, 35, 40, 42). These organisms are acidogenic and aciduric (8, 43, 50, 51) and can be isolated from dental caries lesions (1, 28, 30). The number of lactobacilli increases in oral biofilm in the acidic oral environment necessary for tooth demineralisation and carious lesion formation (13, 42). Local retention factors, such as carious lesions, are believed to favour their colonization and proliferation (1). Increased mechanical retention together with an ecological advantage due to the often acidic conditions prevailing in the carious lesion, may explain why carious lesions are the main oral habitat of lactobacilli (50). For these reasons, lactobacilli are considered secondary invaders and late mediators of the caries process (46).

It had been suggested that lactobacilli found in the oral cavity may not be members of the normal indigenous biota of humans being derived exogenously from food (11). Previously it been shown that enterococci found in food products may colonize intraoral sites including carious lesions and unsealed necrotic root canals (41). However, there is no clear evidence

that lactobacilli from food products are the source of oral infection. There is only one case reported in the literature of permanent oral colonization by lactobacilli derived from probiotics in humans and that was detected by polymerase chain reaction (PCR) using species-specific primers (53). In order to trace the transmission and origin of oral lactobacilli the use of molecular/genetic markers seems to be a promising way forward (46). The reliable identification of members of the genus *Lactobacillus* is not possible with conventional 16S rRNA gene sequencing but *pheS* and *rpoA* sequence comparisons have sufficient discriminatory power enabling the identification lactobacilli (37). It is important to know if there are phylogenetically distinct groups of lactobacilli associated with dental caries in humans and to detect their origin but this will entail the use of molecular typing methods (11, 46). Multi-locus sequencing typing (MLST) is a highly discriminatory and standardized typing method used in the study of strain diversity at intra-species level and population genetics (29). This method enables bacterial isolates to be typed and compared to available nucleotide sequence data obtained at other laboratories (19). Therefore, the aim of the study was to identify the predominant lactobacillus species in dental biofilm, to determine the genetic diversity and possible origin of the most prevalent species, *Lactobacillus paracasei*, by MLST.

MATERIAL AND METHODS

Ethics

The protocol of the current study was approved by the ethics committee of the Faculty of Dentistry from the Federal University of Rio Grande do Sul (process n°61/05). Informed and written consent was obtained from all individuals.

Sample preparation and Intraoral Procedures

The study involved an *in situ* biofilm model. Human enamel blocks (3 x 3 x 2 mm) were cut from unerupted third molars and stored in 2% formaldehyde solution, pH 7.0, for at least 30

days (14). Four enamel blocks, obtained from the same tooth, were fixed into a removable acrylic mandible appliance (two rights and two left). A 3 mm deep space was created in the acrylic appliance, leaving a 1 mm space for biofilm accumulation. The volunteers received instructions to wear the appliances day and night and to remove them only during meal time and oral hygiene procedures. Eleven Brazilian dental students or dentists took part in this study (8 females, 3 males; age 20-32 yr). The volunteers were healthy, showed normal salivary flow, good oral hygiene and no active caries. None of the subjects took any antibiotics before or during the experiments. The participants were residents in a fluoridated water supply area (0.7-1.0 ppmF⁻) and used fluoridated dentifrice. Biofilm accumulation was performed: (a) without sucrose exposure by dropping sterile distilled water onto the enamel blocks 8 times/day for 6 days; (b) with sucrose exposure by dropping 20% sucrose solution onto the enamel blocks 8 times/day for 28 days. The appliances were removed from the mouth while applying the treatments. After each experimental phase, the biofilm from left and right sides of the appliance was collected with the use of a sterile dental excavator and pooled.

Bacterial strains

The biofilm collected was placed in 1 mL of Reduced Transport Fluid (RTF) (45). Sterile glass beads (3.5 - 4.5 mm in diameter) were added to each sample, which was vortexed for 30s to disperse bacterial aggregates. The dispersed samples were decimally diluted in RTF and 100 µL aliquots of appropriate dilutions were inoculated onto Rogosa SL Agar (Himedia) at 37°C for 72 h employing the pour-plate technique (43). After incubation, up to 30 presumptive *Lactobacillus* spp. colonies were picked at random from the Rogosa plates of each subject from both the non-sucrose and sucrose periods. Each isolate was Gram-stained and sub-cultured to purity on Rogosa medium and stored in Brain Heart Infusion (BHI) (Difco) with 15% (v/v) glycerol at -70°C.

Isolation of DNA, Genetic identification and Sequencing

To confirm that the isolates were *Lactobacillus* and to identify them, genomic DNA was extracted by proteinase K method (31) and the extracts were stored at -20°C prior to use. Polymerase chain reaction primers were used to amplify *pheS* or *rpoA* genes with the *pheS* primers were used first and if no amplicon was obtained, the *rpoA* primers were used (38). PCR products were visualized by electrophoresis on a 1% (w/v) agarose gel containing GelRed™ (Biotium, Inc), cleaned and sequenced with the same primers using BigDye v3.0 (Applied Biosystems, Warrington, UK) as previously described (31). The cleaning of sequencing reaction products was executed as described in the manufacturer. Sequencing was performed using an ABI 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems, Warrington, UK). The sequences were manually corrected and edited using BioEdit software (version 7.0.8, Ibis Biosciences, Isis Pharmaceuticals [<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>]). The sequences were identified using the National Center for Biotechnology Information (NCBI) database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) by the standard nucleotide-nucleotide homology search blast (4). The isolates identified as *Lactobacilli* were stored at -70°C for genotyping.

MLST analysis

The most prevalent lactobacilli isolated were identified as *L. paracasei* and these were subjected to MLST. Genes were used for the MLST analysis (Table 1) based on the results of a previous study on “*Lactobacillus casei*” (17). In order to provide a broader perspective, data from the previous study (17) were included in the MLST analysis of the *L. paracasei* isolated in this study. Partial sequences of seven housekeeping genes *fusA*, *ileS*, *lepA*, *leuS*, *pyrG*, *recA*, and *recG* were obtained for the 75 *L. paracasei* isolates (Table 2). PCR conditions for all amplification reaction were: 94°C for 5 min; 30 cycles at 94°C for 30s, 55°C for 30s, and 72°C for 30s; and final extension at 72°C for 5 min. Amplicons were sequenced as described above.

MLST data analysis

Multiple sequence alignments were performed using BioEdit. Descriptive analyses such as fragment size, mol % G+C content, dN/dS ratios (where dS is the rate of synonymous substitution per synonymous site, and dN is the rate of non-synonymous substitutions per non-synonymous site), number of polymorphic sites and alleles, π (nucleotide diversity per site), θ (average number of nucleotide difference per site) and Tajima's D were calculated using DnaSP software (version 4.90.1; Barcelona University [<http://www.ub.edu/dnasp/>]). Allele numbers and ST were assigned by using the MLST website (www.pasteur.fr/mlst). Novel allelic sequences (with at least one nucleotide difference) were assigned consecutive numbers above those in the existing *L. paracasei* allele sequences. On the basis of their allelic profile isolates were assigned to an ST which had already been described or to a new ST if the allelic profile was novel.

To assess the probability of recombination the allele sequences for each locus and for the concatenated sequences were analysed using phi method (9) implemented in the SplitsTree decomposition method (<http://www.splitstree.org/>) (24). Additionally we applied the algorithms employed in the Recombination Detection Program (RDP) (<http://Darwin.uvigo.es/ddp/rdphtml>)(33, 34) to detect evidence of recombination. Evidence for recombination was also sought by the construction of Maximum-likelihood (ML) phylogenetic trees using PAUP [version 4 beta 10; (44)]. ML trees for each of the 7 genes were computed and compared using the Shimodaira-Hasegawa (S-H) test to identify significant differences between the tree topologies (differences in log likelihood, $\Delta\text{-ln } L$). In a clonal population each phylogenetic tree should be congruent and there should no significant differences in likelihood (12, 20). To assess the extent of congruence among the ML trees, randomisation tests were performed (22), in which the $\Delta\text{-ln } L$ values for each of the 7 genes

were compared to the equivalent values computed for 200 random trees created from each gene.

ClonalFrame software (version 1.0, Department of Statistics, University of Warwick [<http://bacteria.stats.ox.ac.uk>]) was used to determine recombination/mutation (r/m) rate of *L. paracasei* and clonal relationships between STs, by generating a 50% majority-rule consensus tree from six program running repetitions (18, 52).

RESULTS

Species identification using pheS/rpoA genes

A total of 222 lactobacilli were identified and of these 31 were from the non-sucrose exposure period and 191 from the sucrose exposure period. The gene *pheS* was amplified in almost all study strains, except for some strains subsequently identified as *L. rhamnosus* by *rpoA* gene sequencing. Strains that had a *pheS/rpoA* sequence similar to that of ATCC 334 will be referred as *L. paracasei*. The predominant lactobacilli were *L. paracasei* (n=75), *L. fermentum* (n=72), *L. rhamnosus* (n=67), and *L. gasseri* (n=8).

Descriptive analysis of L. paracasei MLST

All *L. paracasei* identified from 7 subjects, from both experimental phases, were subjected to MLST analysis and combined with those reported previously by Diancourt *et al.* (2007) (17). The characteristics of the housekeeping genes are presented in the Table 1. The GC percentage observed in all alleles range between 46.9 and 50.4 and was close to the mean GC percent value (46.6) of the complete genome of strain ATCC 334. The number of alleles per gene ranged from 4 (*pyrG*) to 14 (*leuS*). The number of polymorphic sites per gene ranged from 3 (*pyrG*) to 21 (*leuS*). The nucleotide diversity per site (π) and θ (average number of nucleotide difference per site) of each of the 7 loci were very low indicating low levels of diversity. The dN/dS ratios were much < 1 for each locus, indicating selection against amino acid changes and excluding strong positive selection against the observed allelic diversity, as

is typically observed for housekeeping genes. Two genes (*lepA* and *leuS*) showed positive Tajima's D value, indicating potential balancing selection in these genes, which was consistent with higher number of polymorphism (14 and 21) respectively (Table 1). There was no significant ($P > 0.05$) evidence of intragenic recombination in any of the 7 housekeeping genes when examined using the programs within RDP. However, a combined split graph based on a distance matrix of pairwise distances of all alleles in the seven loci using the NeighborNet method in Splitstree4.0 displayed a network-like structure indicative of the presence of significant incompatibilities (Phi test, $p = 5.22 \times 10^{-6}$) resulting from recombination (Fig. 1). The r/m ratio was 2.66 with 95% credibility region of 1.47-4.37 and the S-H test for congruence demonstrated that all ML trees generated for each individual MLST loci were significantly incongruent (Table 2) and comparison of the $\Delta \ln L$ values for individual ML trees indicated that these were not significantly difference from randomly generated trees.

Here we identified 14 STs amongst the 75 study isolates. ST 33 and ST 34 represented new combinations of existing alleles (17) but ST 35-44 were identified which included a variable number of new alleles not previously identified (Table 3). Comparison of the STs showed that unrelated subjects may harbour the same ST and that individuals may harbour multiple STs. Thus ST 40 was dominant among our 75 study strains being isolated from subjects A, C and F. Other STs isolated from more than one subject were ST33 (Subject M and R) and ST 41 (subject F and A) and the number of STs per subject was variable: 5 (Subject R), 3 (Subjects L and F) and 2 genotypes (Subjects A, C, D, M) (Table 3).

Five subjects harbour *L. paracasei* only in the sucrose phase (A, D, F, L, M) while two subjects (C, R) were colonized in both non-sucrose and sucrose phases. The *L. paracasei* found in the non-sucrose phase (Subject C and R) differed from the *L. paracasei* from the sucrose phase in the same subjects. Three subjects (R, C, D) harboured STs (ST 9 and ST 16)

which had previously been described as being isolated from human foods products (17) (Table 3).

In order to evaluate the relationship between STs, an allelic profiled-based dendrogram was constructed using ClonalFrame and 4 distinct clusters were discernible (Fig. 2). The *L. paracasei* strains isolated from human sources and those isolated from dairy foods were dispersed throughout the tree.

DISCUSSION

Lactobacilli comprise a small fraction of the dental biofilm microbiota (51). Previous *in situ* study showed an increase recovery of lactobacilli after sucrose phase compared to non-sucrose period (13). Sucrose exposure creates an environmental stress in the oral biofilm that leads to the selection of aciduric bacteria best able to proliferate in this particular environment (50) which would explain the higher number of lactobacilli recovered from the sucrose phase biofilm.

The *recA* gene sequence has been used previously for the identification of lactobacilli (21, 49). However, in a recent study some lactobacilli species could not be correctly identified using *recA* sequence comparison (17). In the present study 75 *L. paracasei* could be identified as such using *pheS/rpoA* sequence comparison but not all could be identified using *pheS* sequence comparisons and these were identified using *rpoA* sequencing. Our data confirm that *pheS/rpoA* gene sequences are a reliable phylogenetic marker for lactobacilli as previously shown (37) though more recently it has been suggested that *groEL* may also be a good species marker (6).

The taxonomic status of the '*L. casei* group', comprising *L. zaeae*, *L. casei*, *L. paracasei* and *L. rhamnosus*, has been under debate (16). However, the decision of the Judicial Commission in 2008 rejects Dellaglio's proposal (16) and affirms that (a) typification of *Lactobacillus*

casei is based on ATCC 393 and; (b) ATCC 393 and ATCC 334 are members of distinct species (47). The strains subjected to MLST here had *pheS* sequences similar to that of ATCC 334 and are therefore referred as *L. paracasei* which is also the correct designation of the strains studied by Diancourt et al (17). In the present study a sequence-based multilocus analysis of housekeeping genes has been used to explore the relationship among the prevalent species of lactobacilli found in dental biofilm. MLST has been successfully used for strain tracking and population biology research in the '*L. casei*' group (17). Advantages in regard to reliability and reproducibility, as well as the convenience of data comparison between laboratories with this technique have solved some of the problems associated with conventional gel-based typing approaches. Furthermore, evolutionary relationships among various lactobacilli populations could be observed. This is the first known study to apply MLST to reveal the genetic diversity and possible origin of *L. paracasei* isolated from dental biofilm. Multiple STs (range 2-5) per subject were present. Two STs (ST 41 and ST 40) were present in unrelated subjects. Other studies had also reported the presence of variable genotypes of *Lactobacillus* from carious dentine (32) and saliva (11). In carious dentine, 1 to 4 genotypes of '*L. casei*' could be detected. Interestingly, different sites from the same subject harboured distinct genotypes (32) and common genotypes could be found in unrelated subjects. In saliva, an average of 5 genotypes of *Lactobacillus* per subject (range 2-11) were observed and no common genotypes could be found among subjects (11). The variation in the number and distribution of genotypes presented reflects the differences in the molecular typing methods employed in these studies: ERIC-PCR (32), RFLP (11) and MLST.

The *L. paracasei* isolated from the non-sucrose phase were different from the *L. paracasei* isolated from sucrose phase in the same subject which may be explained by the inability of the initial colonizing strain to survive in a stressful environment established upon exposure to sucrose. Three subjects harbored STs previously isolated from dairy products in Europe (17).

These data support the hypothesis that food products could act as a reservoir of lactobacilli which colonize the human oral cavity (11). Apart from the present data only one other study has shown a permanent oral colonization by lactobacilli (53). In that study *L. rhamnosus GG* was isolated from a woman with history of a probiotic milk consumption since childhood (53). Lactobacilli from human and dairy sources were dispersed throughout the dendrogram and suggests that isolates with different STs have a common ancestor strain (29).

Phylogenetic analysis of MLST data by split decomposition analysis indicated intra-species recombination (Phi test, $p = 5.22 \times 10^{-6}$) in the *L. paracasei* population analysed in this study. A clear evidence for homologous recombination during the diversification of 'L. casei' clones had been previously observed (10, 17) and this was confirmed here with the additional determination of the r/m ratio which indicated that recombination was the main driver of diversification. However, in one study the recombination was related to niche specificity and the strains from silage and cheese could be grouped in different clusters in the MLST phylogeny tree (10). The *L. paracasei* population analysed in the present study demonstrate some level of genotypic diversity that was not specific to the different ecological niches, human or food.

From the available data, it is not possible to state that all lactobacilli present in the oral cavity are exogenous colonizers (11) but the present data support the hypothesis that *L. paracasei* may have an exogenous origin.

ACKNOWLEDGMENTS

We gratefully acknowledge the support of the Brazilian Ministry of Science and Technology, through its National Council of Research (CNPq) agency (grant 480841/2007-1), the Dental Institute, King's College London and the Department of Health via the National Institute for Health Research (NIHR) Comprehensive Biomedical Research Centre award to Guy's & St Thomas' NHS Foundation Trust in partnership with King's College London and King's College Hospital NHS Foundation Trust.

We thank Farida Ali for help in PCR and sequencing of some isolates. Steven Gilbert is thanked for assistance during the molecular biology techniques at KCL. Juliana Jobim Jardim is thanked for her assistance during the sample preparation in Brazil. We are grateful to the Brazilian Federal Agency for Support and Evaluation of Graduate Education (CAPES) from whom the first author received a scholarship. We thank all volunteers for their dedication.

We gratefully acknowledge that the MLST scheme (www.pasteur.fr/mlst) developed by Laure Diancourt and Sylvain Brisse (Unit Biodiversity of Emerging Bacterial Pathogens, Institut Pasteur, Paris) was available online.

REFERENCES

1. **Aas, J. A., A. L. Griffen, S. R. Dardis, A. M. Lee, I. Olsen, F. E. Dewhirst, E. J. Leys, and B. J. Paster.** 2008. Bacteria of dental caries in primary and permanent teeth in children and young adults. *J Clin Microbiol* **46**:1407-17.
2. **Adams, M. R., and P. Marteau.** 1995. On the safety of lactic acid bacteria from food. *Int J Food Microbiol* **27**:263-4.
3. **Aguirre, M., and M. D. Collins.** 1993. Lactic acid bacteria and human clinical infection. *J Appl Bacteriol* **75**:95-107.
4. **Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, and D. J. Lipman.** 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**:3389-402.
5. **Antony, S. J., C. W. Stratton, and J. S. Dummer.** 1996. *Lactobacillus* bacteremia: description of the clinical course in adult patients without endocarditis. *Clin Infect Dis* **23**:773-8.
6. **Blaiotta, G., V. Fusco, D. Ercolini, M. Aponte, O. Pepe, and F. Villani.** 2008. *Lactobacillus* strain diversity based on partial hsp60 gene sequences and design of PCR-restriction fragment length polymorphism assays for species identification and differentiation. *Appl Environ Microbiol* **74**:208-15.
7. **Borchers, A. T., C. Selmi, F. J. Meyers, C. L. Keen, and M. E. Gershwin.** 2009. Probiotics and immunity. *J Gastroenterol* **44**:26-46.
8. **Brailsford, S. R., B. Shah, D. Simons, S. Gilbert, D. Clark, I. Ines, S. E. Adams, C. Allison, and D. Beighton.** 2001. The predominant aciduric microflora of root-caries lesions. *J Dent Res* **80**:1828-33.
9. **Bruen, T. C., H. Philippe, and D. Bryant.** 2006. A simple and robust statistical test for detecting the presence of recombination. *Genetics* **172**:2665-81.
10. **Cai, H., B. T. Rodriguez, W. Zhang, J. R. Broadbent, and J. L. Steele.** 2007. Genotypic and phenotypic characterization of *Lactobacillus casei* strains isolated from different ecological niches suggests frequent recombination and niche specificity. *Microbiology* **153**:2655-65.
11. **Caufield, P. W., Y. Li, A. Dasanayake, and D. Saxena.** 2007. Diversity of lactobacilli in the oral cavities of young women with dental caries. *Caries Res* **41**:2-8.
12. **Coffey, T. J., G. D. Pullinger, R. Urwin, K. A. Jolley, S. M. Wilson, M. C. Maiden, and J. A. Leigh.** 2006. First insights into the evolution of *Streptococcus uberis*: a multilocus sequence typing scheme that enables investigation of its population biology. *Appl Environ Microbiol* **72**:1420-8.
13. **Cury, J. A., M. A. Rebello, and A. A. Del Bel Cury.** 1997. In situ relationship between sucrose exposure and the composition of dental plaque. *Caries Res* **31**:356-60.
14. **Cury, J. A., M. A. Rebelo, A. A. Del Bel Cury, M. T. Derbyshire, and C. P. Tabchoury.** 2000. Biochemical composition and cariogenicity of dental plaque formed in the presence of sucrose or glucose and fructose. *Caries Res* **34**:491-7.
15. **Dal Bello, F., and C. Hertel.** 2006. Oral cavity as natural reservoir for intestinal lactobacilli. *Syst Appl Microbiol* **29**:69-76.
16. **Dellaglio, F., G. E. Felis, and S. Torriani.** 2002. The status of the species *Lactobacillus casei* (Orla-Jensen 1916) Hansen and Lessel 1971 and *Lactobacillus paracasei* Collins et al. 1989. Request for an opinion. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**:285-7.
17. **Diancourt, L., V. Passet, C. Chervaux, P. Garault, T. Smokvina, and S. Brisse.** 2007. Multilocus sequence typing of *Lactobacillus casei* reveals a clonal population

- structure with low levels of homologous recombination. *Appl Environ Microbiol* **73**:6601-11.
18. **Didelot, X., and D. Falush.** 2007. Inference of bacterial microevolution using multilocus sequence data. *Genetics* **175**:1251-66.
 19. **Feil, E. J., and M. C. Enright.** 2004. Analyses of clonality and the evolution of bacterial pathogens. *Curr Opin Microbiol* **7**:308-13.
 20. **Feil, E. J., and B. G. Spratt.** 2001. Recombination and the population structures of bacterial pathogens. *Annu Rev Microbiol* **55**:561-90.
 21. **Felis, G. E., F. Dellaglio, L. Mizzi, and S. Torriani.** 2001. Comparative sequence analysis of a *recA* gene fragment brings new evidence for a change in the taxonomy of the *Lactobacillus casei* group. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**:2113-7.
 22. **Holmes, E. C., R. Urwin, and M. C. Maiden.** 1999. The influence of recombination on the population structure and evolution of the human pathogen *Neisseria meningitidis*. *Mol Biol Evol* **16**:741-9.
 23. **Holzappel, W. H., P. Haberer, J. Snel, U. Schillinger, and J. H. Huis in't Veld.** 1998. Overview of gut flora and probiotics. *Int J Food Microbiol* **41**:85-101.
 24. **Huson, D. H., and D. Bryant.** 2006. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Mol Biol Evol* **23**:254-67.
 25. **Ikeda, T., H. J. Sandham, and E. L. Bradley, Jr.** 1973. Changes in *Streptococcus mutans* and lactobacilli in plaque in relation to the initiation of dental caries in Negro children. *Arch Oral Biol* **18**:555-66.
 26. **Jakobsson, T., and U. Forsum.** 2008. Changes in the predominant human *Lactobacillus* flora during in vitro fertilisation. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* **7**:14.
 27. **Kimura, K., A. L. McCartney, M. A. McConnell, and G. W. Tannock.** 1997. Analysis of fecal populations of bifidobacteria and lactobacilli and investigation of the immunological responses of their human hosts to the predominant strains. *Appl Environ Microbiol* **63**:3394-8.
 28. **Krasse, B.** 1954. Relationship between caries activity and the number of lactobacilli in the oral cavity. *Acta Odontol Scand* **12**:157-72.
 29. **Maiden, M. C., J. A. Bygraves, E. Feil, G. Morelli, J. E. Russell, R. Urwin, Q. Zhang, J. Zhou, K. Zurth, D. A. Caugant, I. M. Feavers, M. Achtman, and B. G. Spratt.** 1998. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:3140-5.
 30. **Maltz, M., E. F. de Oliveira, V. Fontanella, and R. Bianchi.** 2002. A clinical, microbiologic, and radiographic study of deep caries lesions after incomplete caries removal. *Quintessence Int* **33**:151-9.
 31. **Mantzourani, M., M. Fenlon, and D. Beighton.** 2009. Association between Bifidobacteriaceae and the clinical severity of root caries lesions. *Oral Microbiol Immunol* **24**:32-7.
 32. **Marchant, S., S. R. Brailsford, A. C. Twomey, G. J. Roberts, and D. Beighton.** 2001. The predominant microflora of nursing caries lesions. *Caries Res* **35**:397-406.
 33. **Martin, D., and E. Rybicki.** 2000. RDP: detection of recombination amongst aligned sequences. *Bioinformatics* **16**:562-3.
 34. **Martin, D. P., C. Williamson, and D. Posada.** 2005. RDP2: recombination detection and analysis from sequence alignments. *Bioinformatics* **21**:260-2.
 35. **Matee, M. I., F. H. Mikx, S. Y. Maselle, and W. H. Van Palenstein Helderman.** 1992. Mutans streptococci and lactobacilli in breast-fed children with rampant caries. *Caries Res* **26**:183-7.

36. **Meurman, J. H., and I. Stamatova.** 2007. Probiotics: contributions to oral health. *Oral Dis* **13**:443-51.
37. **Naser, S. M., P. Dawyndt, B. Hoste, D. Gevers, K. Vandemeulebroecke, I. Cleenwerck, M. Vancanneyt, and J. Swings.** 2007. Identification of lactobacilli by pheS and rpoA gene sequence analyses. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**:2777-89.
38. **Naser, S. M., F. L. Thompson, B. Hoste, D. Gevers, P. Dawyndt, M. Vancanneyt, and J. Swings.** 2005. Application of multilocus sequence analysis (MLSA) for rapid identification of *Enterococcus* species based on rpoA and pheS genes. *Microbiology* **151**:2141-50.
39. **Patel, R., F. R. Cockerill, M. K. Porayko, D. R. Osmon, D. M. Ilstrup, and M. R. Keating.** 1994. Lactobacillemia in liver transplant patients. *Clin Infect Dis* **18**:207-12.
40. **Preza, D., I. Olsen, J. A. Aas, T. Willumsen, B. Grinde, and B. J. Paster.** 2008. Bacterial profiles of root caries in elderly patients. *J Clin Microbiol* **46**:2015-21.
41. **Razavi, A., R. Gmur, T. Imfeld, and M. Zehnder.** 2007. Recovery of *Enterococcus faecalis* from cheese in the oral cavity of healthy subjects. *Oral Microbiol Immunol* **22**:248-51.
42. **Sigurjons, H., M. O. Magnusdottir, and W. P. Holbrook.** 1995. Cariogenic bacteria in a longitudinal study of approximal caries. *Caries Res* **29**:42-5.
43. **Svensater, G., M. Borgstrom, G. H. Bowden, and S. Edwardsson.** 2003. The acid-tolerant microbiota associated with plaque from initial caries and healthy tooth surfaces. *Caries Res* **37**:395-403.
44. **Swofford, D. L.** 2003. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Version 4 beta 10. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
45. **Syed, S. A., and W. J. Loesche.** 1972. Survival of human dental plaque flora in various transport media. *Appl Microbiol* **24**:638-44.
46. **Tanzer, J. M., J. Livingston, and A. M. Thompson.** 2001. The microbiology of primary dental caries in humans. *J Dent Educ* **65**:1028-37.
47. **Tindall, B.** 2008. The type strain of *Lactobacillus casei* is ATCC 393, ATCC 334 cannot serve as the type because it represents a different taxon, the name *Lactobacillus paracasei* and its subspecies names are not rejected and the revival of the name '*Lactobacillus zae*' contravenes Rules 51b (1) and (2) of the International Code of Nomenclature of Bacteria. Opinion 82, p. 1764-5, *Int J Syst Evol Microbiol*, vol. 58.
48. **Tommasi, C., F. Equitani, M. Masala, M. Ballardini, M. Favaro, M. Meledandri, C. Fontana, P. Narciso, and E. Nicastrì.** 2008. Diagnostic difficulties of *Lactobacillus casei* bacteraemia in immunocompetent patients: A case report. *J Med Case Reports* **2**:315.
49. **Torriani, S., G. E. Felis, and F. Dellaglio.** 2001. Differentiation of *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus*, and *L. paraplantarum* by recA gene sequence analysis and multiplex PCR assay with recA gene-derived primers. *Appl Environ Microbiol* **67**:3450-4.
50. **van Houte, J.** 1980. Bacterial specificity in the etiology of dental caries. *Int Dent J* **30**:305-26.
51. **Van Houte, J., R. J. Gibbons, and A. J. Pulkkinen.** 1972. Ecology of human oral lactobacilli. *Infect Immun* **6**:723-9.
52. **Vos, M., and X. Didelot.** 2009. A comparison of homologous recombination rates in bacteria and archaea. *Isme J* **3**:199-208.
53. **Yli-Knuutila, H., J. Snall, K. Kari, and J. H. Meurman.** 2006. Colonization of *Lactobacillus rhamnosus* GG in the oral cavity. *Oral Microbiol Immunol* **21**:129-31.

FIGURE LEGENDS

FIG. 1. Dendrogram constructed from the concatenated sequences of the 7 loci, showing the networked relationship between all isolates. The Phi test of recombination did find statistically significant evidence for recombination ($p = 5.22 \times 10^{-6}$).

FIG. 2. Dendrogram of the concatenated sequences of 7 loci of *Lactobacillus paracasei*. The numbering refers to the STs; STs 1-32 were reported by Diancourt *et al* (15) and STs 33-44 were identified in the present study. STs isolated from human sources are marked ● those from dairy and food sources are marked ○ and those isolated from both human and food sources are marked ▼.

Table 1. Characteristics of housekeeping gene loci included in the *L. paracasei* MLST scheme based on the combined data of the present study (n=75) and Diancourt *et al* (17) data (n=52).

Gene	Size (bp)	G+C (mol%)	Alleles	Polymorphic sites	π	θ	dN/dS	Tajima's D
<i>fusA</i>	663	49.4	9	8	0.00310	0.00242	0.034	-1.70921
<i>ileS</i>	360	46.9	12	11	0.00728	0.00666	0.106	-0.73996
<i>lepA</i>	549	50.4	13	14	0.00682	0.00509	0.079	0.02913
<i>leuS</i>	642	48.4	14	21	0.00688	0.00649	0.089	0.37442
<i>pyrG</i>	345	46.9	4	3	0.00435	0.00176	0.148	-0.19469
<i>recA</i>	315	48.0	6	6	0.00635	0.00386	0.161	-1.02551
<i>recG</i>	342	48.5	10	14	0.01124	0.00818	0.017	-0.17992

dN/dS = Mean non-synonymous substitutions per non-synonymous site (dN)/Mean synonymous substitutions per synonymous site (dS); π = nucleotide diversity per site and θ = average number of nucleotide difference per site.

Table 2. Tests for congruence among *L. paracasei* ML gene trees
and random trees.

Locus	- lnL	Δ-lnL	Δ-lnL of random trees
<i>fusA</i>	979.312	69.406 – 76.946	60.176 – 77.888
<i>ileS</i>	587.394	51.148 – 89.128	67.974 – 91.232
<i>lepA</i>	881.891	63.512 – 110.261	88.153 – 116.557
<i>leuS</i>	1046.010	147.011 – 272.294	215.342 – 280.560
<i>pyrG</i>	497.204	2.980 – 4.638	1.888 – 4.802
<i>recA</i>	477.317	12.700 – 15.743	8.475 – 16.034
<i>recG</i>	582.620	100.070 – 213.692	153.945 – 223.997

(with $p < 0.05$ for all $-lnL$ values)

Table 3. Allelic profile and ST of the *L. paracasei* strains (n=75) analysed in the present study. STs 1-32 were reported by Diancourt *et al* (17) and STs 33-44 were identified in the present study.

Subject ^a	No. of isolates	Allele							ST
		<i>fusA</i>	<i>ileS</i>	<i>lepA</i>	<i>leuS</i>	<i>pyrG</i>	<i>recA</i>	<i>recG</i>	
RS	1	4	2	3	3	1	1	3	9
C	1	4	2	3	3	1	1	3	9
DS	2	4	5	6	6	1	1	5	16
MS	2	1	2	1	1	1	1	2	33
RS	1	1	2	1	1	1	1	2	33
R	1	1	3	7	5	1	1	2	34
LS	16	4	2	3	13*	1	5*	3	35
LS	1	4	2	3	13*	1	1	3	36
DS	1	4	2	3	13*	4*	5*	3	37
LS	1	4	2	12*	13*	1	5*	3	38
FS	1	4	10*	11*	14*	1	1	9	39
AS	9	4	10*	11*	14*	4*	1	9	40
CS	1	4	10*	11*	14*	4*	1	9	40
FS	18	4	10*	11*	14*	4*	1	9	40
AS	2	4	11*	11*	14*	4*	1	9	41
FS	2	4	11*	11*	14*	4*	1	9	41
MS	10	4	12*	13*	6	1	6*	5	42
RS	1	9*	8	7	8	1	1	10*	43
RS	4	9*	8	7	8	1	1	1	44

^aDifferent initial letters identify different subjects and initial letters followed by the S letter identify the sucrose phase. New alleles are marked with an asterisk.

FIG. 1.

10,0010

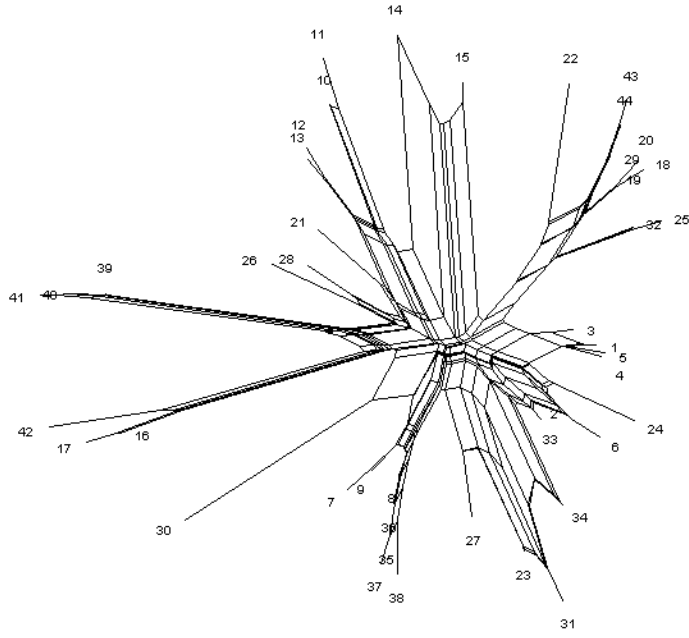
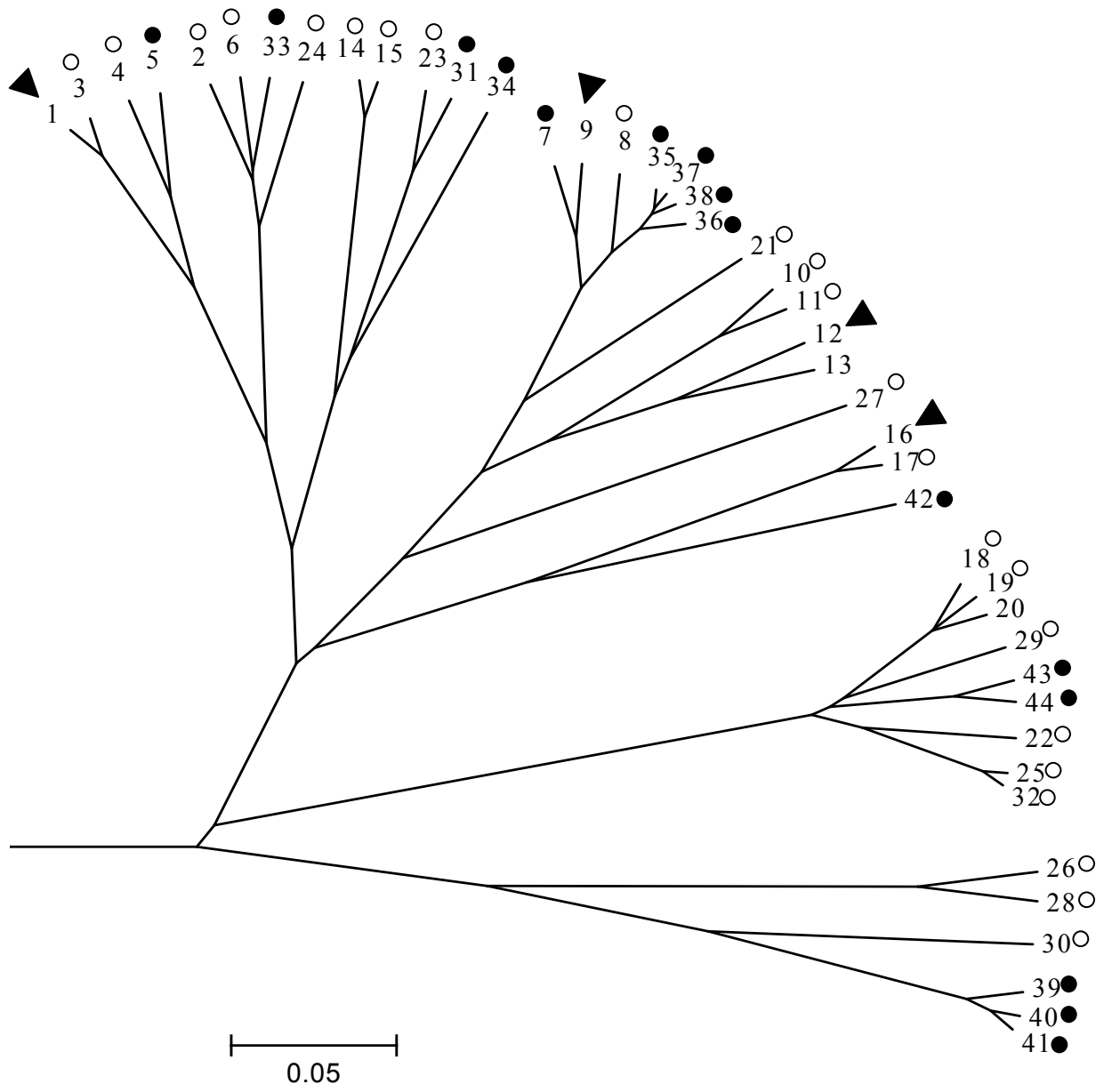


FIG. 2



ARTIGO III

Correspondence of Repetitive-element PCR and Multilocus Sequence Typing for subtyping *L.paracasei* from human oral biofilm

REP-PCR and MLST for *L. paracasei*

Clarissa Cavalcanti Fatturi Parolo*

Department of Social and Preventive Dentistry, Faculty of Dentistry, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

Marisa Maltz

Department of Social and Preventive Dentistry, Faculty of Dentistry, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

Steven Gilbert

King's College London Dental Institute, Infection Research Group, London, UK

Thuy Do

King's College London Dental Institute, Infection Research Group, London, UK

Luana Severo Alves

Department of Social and Preventive Dentistry, Faculty of Dentistry, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

Gertrudes Corção

Department of Microbiology, Institute of Health Basic Science, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

David Beighton

King's College London Dental Institute, Infection Research Group, London, UK

Institutions Addresses

Department of Social and Preventive Dentistry, Faculty of Dentistry, Federal University of Rio Grande do Sul, Ramiro Barcelos 2492, Santana, 90035-003, Porto Alegre, Brazil,

Tel.+55 51 33085193, Fax.+55 51 33085189, clarissa.parolo@ufrgs.br

King's College London Dental Institute, Department of Microbiology, The Henry Wellcome Laboratories for Microbiology and Salivary Research, Infection Research Group, KCL Dental Institute, Floor 17, Guy's Tower, London Bridge, SE1 9RT, London, United Kingdom, david.beighton@kcl.ac.uk.

Correspondent footnote

Department of Social and Preventive Dentistry, Faculty of Dentistry, Federal University of Rio Grande do Sul, Ramiro Barcelos 2492, Santana, 90035-003, Porto Alegre, Brazil,

Tel.+55 51 33085193, Fax.+55 51 33085189, clarissa.parolo@ufrgs.br

Abstract

Seventy five isolates of *L.paracasei* recovered from human dental biofilm formed *in situ* from 7 subjects were typed by repetitive-element PCR (REP-PCR) and characterized by means of multilocus sequence typing (MLST) by partial sequencing of seven housekeeping genes (*fusA*, *ileS*, *lepA*, *leuS*, *pyrG*, *recA* e *recG*). In this study, a comparison of these subtyping methods was used to distinguish isolates from human source. There were mixed results among REP-PCR patterns compared with the MLST. Different numbers of patterns were obtained for *L.paracasei* according to the molecular technique used (14 MLST versus 25 REP-PCR patterns). For some strains, REP-PCR was more discriminatory than MLST. In other cases, strains belonging to different sequence types (ST) by MLST were grouped together by REP-PCR, showing that MLST was more discriminatory than REP-PCR. In few cases MLST and REP-PCR presented the same discriminatory power. Differences in the results between the typing methods, MLST and REP-PCR, are likely dependent on the way that genetic diversity is measured. REP-PCR and MLST are considered reliable tools for identifying and discriminating clonal groups among lactobacillus strains. However, REP-PCR showed a greater discriminatory power in comparison to MLST, but little agreement was observed between this two methods. Therefore, MLST could enhance the genetic diversity obtained by REP-PCR. The combination of MLST and REP-PCR increased the discriminatory power in detecting the genetic diversity of *L. paracasei*.

Introduction

Lactobacilli comprise a diverse group of Gram-positive, rod-shaped, facultatively anaerobic, catalase-negative and lactic acid bacteria [1, 2]. They are widely distributed in nature, with different ecological habitats as plants, foods and animals [2]. Lactobacilli are medically and industrially important bacteria with pathological or beneficial effects for the host [3-7].

Molecular typing is crucial to show the relations of closely related strains, once fermentation profiles are not useful for identification purpose of the lactobacilli [2]. A method suitable for classification and identification of lactobacilli should be based on genetic profile [2]. Different methods have been used for lactobacilli genotyping including ribotyping [8], random amplified polymorphic DNA-PCR [9-11], pulsed-field gel electrophoresis [12, 13], microarrays [14], REP-PCR [15] and MLST [16-18]. Any method pertaining to assign isolates to types must clearly provide enough information to distinguish one type from another, but without being so discriminatory that every isolate is unique [19]. The repetitive-element PCR (REP-PCR) technique is a good method for rapid bacterial genotyping that relies on the amplification of repetitive sequences dispersed in bacterial chromosome [20]. This method is quick, reproducible and cost-effective and very useful for epidemiological studies where large number of bacterial isolates are characterized [21, 22]. REP-PCR is a reliable technique to type lactobacilli and to generate reproducible fingerprinting patterns [22]. However, analyses of REP-PCR data can represent some difficulties due to the complexity of electrophoretic patterns and subjectivity in selection of analytical parameters [21]. When 61 reference strains of lactobacilli were subjected to REP-PCR, they could be differentiated from each other on the basis of at least one band difference in their REP-PCR profile [22]. REP-PCR enabled *L. paracasei* isolates

(n=48) from food to be sub-grouped in two different groups [23]. Regarding lactobacilli, REP-PCR could be successfully used for differentiation at species and subspecies level. On the other hand, Multilocus Sequence typing (MLST) is a high discriminatory method based on partial sequence of housekeeping genes [24]. MLST have been highly successful for characterizing bacterial genetic variation and for developing evolutionary frameworks that interpret this diversity [25]. MLST is suitable for studies with small number of bacterial isolates, but impractical for large-scale epidemiological studies [21]. MLST discriminatory power can vary according to the bacteria specie and genes that are being studied [19]. MLST data is a portable technique that enables comparison of the genetic profiles of isolates obtained anywhere in the world [24]. MLST have been used to type lactobacilli with good discriminatory ability [16-18, 26]. So far, at least two MLST schemes were developed to differentiate *L.casei/paracasei* [17, 18]. The same MLST scheme used by Diancourt *et al.* (2007) [17] was applied in the analysis of *L.paracasei* (n=75) from human dental biofilm (Parolo *et al.* article 1) and revealed 14 sequence types.

Genotypic and phenotypic methods, including REP-PCR, PFGE, MLST, antimicrobial susceptibility profiling and plasmid profiling, were used to distinguish isolates of *Salmonella enterica serovar Typhimurium* from different sources [27]. In this study, no correlation was evident between the results of one molecular method and those of the others [27]. The lack of correlation amongst typing methods is also observed when PFGE, MLST and REP-PCR were tested for *Escherichia coli* O157:H7 [28]. Some authors suggest that a combination of multiple methods is needed to differentiate isolates that genetically cluster according to one particular typing method [27, 28]. Therefore, the capacity of REP-PCR to determine the genetic

relatedness of *L. paracasei* strains and to identify clonal groups in comparison to a multilocus sequence typing (MLST) scheme was evaluated.

Material and Methods

Ethics

The protocol of the current study was approved by the ethics committee of the Faculty of Dentistry from the Federal University of Rio Grande do Sul (process n°61/05). Informed and written consent was obtained from all individuals.

Bacterial strains

The study involved an *in situ* biofilm model. Human enamel blocks (3 x 3 x 2 mm) were cut from nonerupted third molars and stored in 2% formaldehyde solution, pH 7.0, for at least 30 days [29]. Four enamel blocks, obtained from the same tooth, were fixed into a removable acrylic mandible appliance (two rights and two left). A 3 mm deep space was created in the acrylic appliance, leaving a 1 mm space for biofilm accumulation. The volunteers received instructions to wear the appliances day and night and to remove them only during meal time and oral hygiene procedures. Brazilian dental students or dentists took part in this study. The volunteers were healthy, showed normal salivary flow, good oral hygiene and no active caries. None of the subjects took any antibiotics before or during the experiments. The participants were residents in a fluoridated water supply area (0.7-1.0 ppmF⁻) and used fluoridated dentifrice. Biofilm accumulation was performed: (a) without sucrose exposure by dropping sterile distilled water onto the enamel blocks 8 times/day for 6 days; (b) with sucrose exposure by dropping 20% sucrose solution onto the enamel blocks 8 times/day for 28 days. The appliances were removed from the mouth while

applying the treatments. After each experimental phase, the biofilm from left and right sides of the appliance was collected with the use of a sterile dental excavator and pooled. The biofilm collected was placed in 1 mL of Reduced Transport Fluid (RTF) [30]. Sterile glass beads (3.5 - 4.5 mm in diameter) were added to each sample, which was vortexed for 30s to disperse bacterial aggregates. The dispersed samples were decimally diluted in RTF and 100 µL aliquots of appropriate dilutions were inoculated onto Rogosa SL Agar (Himedia) at 37°C for 72 h employing the pour-plate technique [31]. After incubation, up to 30 presumptive *Lactobacillus* spp. colonies were picked at random from the Rogosa plates of each subject from both the non-sucrose and sucrose periods. Each isolate was Gram-stained and sub-cultured to purity on Rogosa medium and stored in Brain Heart Infusion (BHI) (Difco) with 15% (v/v) glycerol at -70°C.

REP-PCR

Template DNA was prepared by proteinase K method as described previously [32]. For REP-PCR analysis products were generated with primers REP1R (5'-III NCG NCG NCA TCN GCC -3') e REP2 (5'-NCG NCT TAT CNG GCC TAC -3')[33]. REP-PCR reactions were performed in 25 µL volumes containing 2.5 µL 10X buffer, 3.75 µL MgCl₂ 25mM, 1 µL dNTP (3,125 mM), 0,5 µL Taq polimerase (AB-gene, Epsom, UK), 2.75 µL of REP1R, 2.75 µL of REP2, 3 µL DNA extract and 8.75 µL sterile ultra high quality water (UHQ). The samples were amplified in Flexigene termocicler (Flexigene; Techne, Cambridge, United Kingdom) programmed as follows: initial denaturation at 95°C for 7 min, denaturation at 94°C for 30s, annealing at 40°C for 60s, extension at 65°C for 8 min, repeated for 32 cycles and final extension at 65°C for 16min [33]. Reaction products were separated in 2%

Metaphor/metasieve agarose gels (20 by 25cm) containing 0.5 µg of GelRed™ (Biotium, Inc) per mL. Following separation at 100V for 120 min in Tris-borate-EDTA (TBE) buffer, the DNA bands were visualized by UV transillumination. To all samples, 3 µL of tracking dye was added and a molecular size marker was included in all gels in three separate lanes, to facilitate comparison of tracks between gels [33]. REP-PCR results were analyzed using gelCompar II, and banding patterns were compared using Dice coefficients with a 5% band position tolerance. Isolate relatedness was determined by using the unweighted-pair group method using average linkages (UPGMA), and a dendrogram was prepared to display their associations. The REP-PCR type complex (repTC) was determined on an average similarity threshold of 89% between REP-PCR types.

MLST

L. paracasei were subjected to MLST analysis. Partial sequences of seven housekeeping genes *fusA*, *ileS*, *lepA*, *leuS*, *pyrG*, *recA*, and *recG* were obtained for the 75 *L. paracasei* isolates. Genes used for the MLST were based on the results of a previous study on “*Lactobacillus casei*” [17]. PCR conditions for all amplification reaction were: 94°C for 5 min; 30 cycles at 94°C for 30s, 55°C for 30s, and 72°C for 30s; and final extension at 72°C for 5 min. Amplicons were sequenced as previously described [32].

Results

The REP-PCR dendrogram clustered *L. paracasei* in 25 groups that were named with lowercase letters from a to z (Figure 1). Nine groupings of isolates based on REP-PCR (a, d, h, j, k, l, n, r and s) included variable number of isolates ranging from two to fifteen on each of them. The two largest groupings of isolates were REP-

PCR patterns j (n=15) and l (n=9). Sixteen *L.paracasei* strains possessed unique REP-PCR patterns with less than 89% similarities in comparison to the other strains (b, c, e, f, g, l, m, o, p, q, t, u, v, x, y, z) (Figure 1). The same REP-PCR pattern (j and l) was shared by strains from different subject/origin. In all other groups, REP-PCR patterns were able to group strains from the same subject/origin (Figure1).

For MLST, partial sequencing of seven housekeeping genes revealed 14 sequence types (STs). STs 35 (n=16) and 40 (n=28) were the most prevalent ones. Other STs presented different number of isolates: STs 9 and 16 (n=2), ST 33 (n=3), STs 41 and 44 (n=4), ST 42 (n=10). Some STs (34, 36, 37, 38, 39, and 43) had just one representative isolate of *L.paracasei* (Figure 1).

Different numbers of genotypes were obtained for the 75 *L.paracasei* according to the molecular typing used (14 MLST versus 25 REP-PCR patterns) (Figure 1). There were examples of REP-PCR being more discriminatory than MLST. REP-PCR could individualize different subgroups amongst the MLST profiles. Strains with the same MLST profile presented different repTC patterns ranging from 2 to 8 subgroups. It was possible to observe that ST 9 was subdivided in repTC q and x, ST16 in repTC o and y, ST 33 in repTC s and m, ST 35 in repTC d, e and l, ST 42 in repTC i, k, r, u and St 40 in repTC a, b, c, f, h, j, t, v (Figure 1). On the other hand, there were also examples of MLST being more discriminatory than REP-PCR. Strains belonging to different STs were grouped together by REP-PCR: STs 37 and 35 (repTC l), 38 and 35 (repTC d), 39 and 40 (repTC a), 41 and 40 (repTC j) 43 and 44 (repTC n) could not be distinguishable from each other (Figure 1). Figure 2 exemplifies one of those cases where MLST was more discriminatory than REP-PCR. In this figure, strains belonging to different STs (35 and 37) could not be distinguished by REP-PCR (repTC l) pair comparison, showing 97.62% similarity.

MLST and REP-PCR showed correspondence in 2 cases. For ST 34 and 36, only strains belonging to the same MLST profile were present in a REP-PCR cluster showing an agreement between the sequencing typing and the REP-PCR (Figure 1). ST 34 was related to repTC g and ST 36 was related to repTC z, respectively. When both genotypic methods are combined instead of 25 genotypes (by REP-PCR) or 14 genotypes (by MLST) it would be possible to identify 30 different genotypes of *L. paracasei* amongst the 75 isolates.

Discussion

Genotypic techniques are necessary for identification and typification of lactobacilli [34-36]. In this study, fingerprinting based on REP-PCR and MLST were used to distinguish *L. paracasei* from oral biofilm formed *in situ* from 7 subjects.

There were mixed results among REP-PCR patterns compared with the MLST STs. REP-PCR showed a greater discriminatory power in comparison to MLST once 25 versus 14 genotypes were identified, but little agreement was observed between these two methods. In the study of *Campylobacter jejuni* rep-PCR (combination of REP-, ERIC- and BOX-PCR) also showed a greater discriminatory power than PFGE and MLST [37]. The differences in the results between typing methods are likely dependent on the way that genetic diversity is measured [27]. In REP-PCR, interspersed repetitive DNA elements serve as primer sites for genomic DNA amplification [20]. REP sequences are located in distinct intergenic positions all around the chromosome. REP-PCR leads to the selective amplification of distinct genomic regions located between REP sequences. Amplified bands are size fractionated through a gel matrix to yield fingerprint patterns [38] and function as a signature for specific bacterial strains. MLST, on the other hand, relates bacteria

according to the variability in the sequences of particular housekeeping genes due to mutation or recombination. Housekeeping genes are most often sequenced because they are present in all isolates and are not subject to strong selective pressures that can lead to rapid sequence changes. Therefore, since MLST is a typing method that targets the core genome it is more useful for long-term epidemiology [24], even though it was not as good as REP-PCR in reflecting minor changes in the genome of *L. paracasei*. Some authors had used the MLST method as a “gold standard” to optimize the analytical parameters for REP-PCR in *Escherichia coli* isolates [21]. However, when REP-PCR, MLST, PFGE, plasmid profile and susceptibility profiles were compared for differentiating *Salmonella enterica* the first three methods demonstrated the best discriminatory power among the isolates [27]. However, no apparent correlation was evident between the results of one molecular typing method and those of the other. For some strains, PFGE was more discriminatory than MLST and for others REP-PCR was more discriminatory than PFGE [27]. In other study with lactobacilli, PFGE was also able to discriminate all strains, including those that could not be separated by MLST [18]. Although, overall, there was a high degree of concordance between MLST and REP-PCR in the study of *Streptococcus oralis*, in one subject the same REP-PCR was associated with different STs and also different REP-PCR pattern were present from the same ST-21 [39]. In *Escherichia coli* meningitis strains MLST had a poor resolving power in discriminating the phylogenetic group A strains since the same ST (ST10) could be subdivided in 10 rep-PCR complexes [40]. In MLST, isolates exhibiting similar or identical MLST genotypes are very closely related, having descended from a recent common ancestor. Therefore, It doesn't mean that strains belonging to the same STs can not be different in other clinical relevant characteristics that could be encoded on

accessory genes or elements [19]. In this study, MLST and REP-PCR showed different characteristics of the isolates and, therefore, both of them can give complementary information on the diversity screening of the isolates. The results demonstrate that the use of a combination of methods could increase the discriminatory power for some strains.

Conclusion

REP-PCR and MLST are considered reliable tools for identifying and discriminating clonal groups among lactobacillus strains. However, REP-PCR showed a greater discriminatory power in comparison to MLST, but little agreement was observed between this two methods. Therefore, MLST could enhance the genetic diversity obtained by REP-PCR. The combination of MLST and REP-PCR increased the genetic diversity of *L. paracasei*.

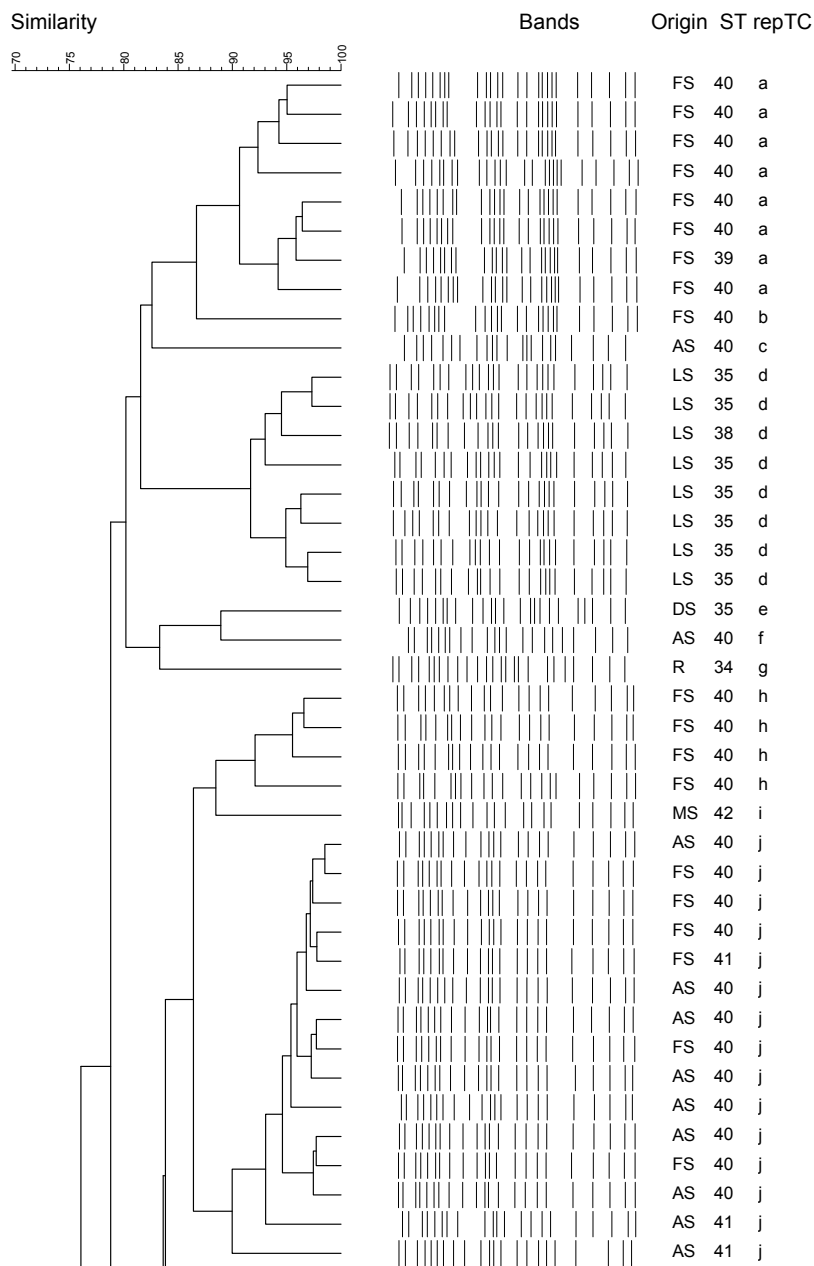


Figure1. Comparison of REP-PCR profiles (repTC – lowercase letters) and sequence types (ST-numbers) for 75 *L.paracasei* from different subject/origin (Different initial uppercase letters identify different subjects and letters followed by the S letter identify the sucrose phase).

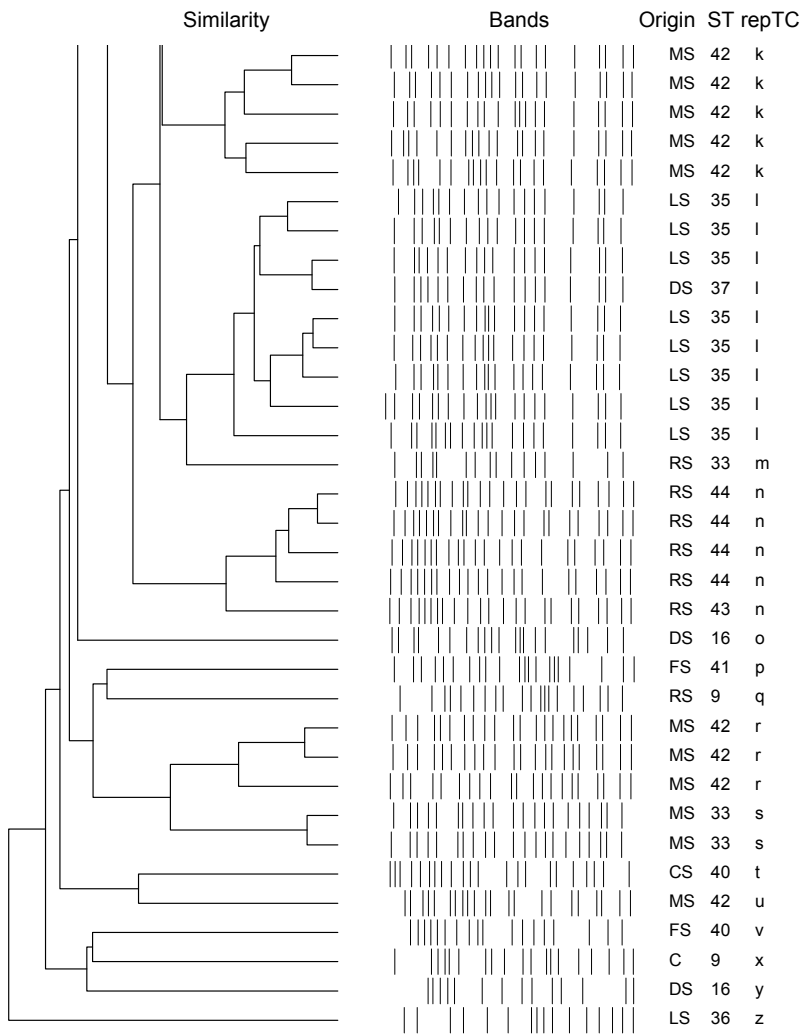


Figure 1 – Continued

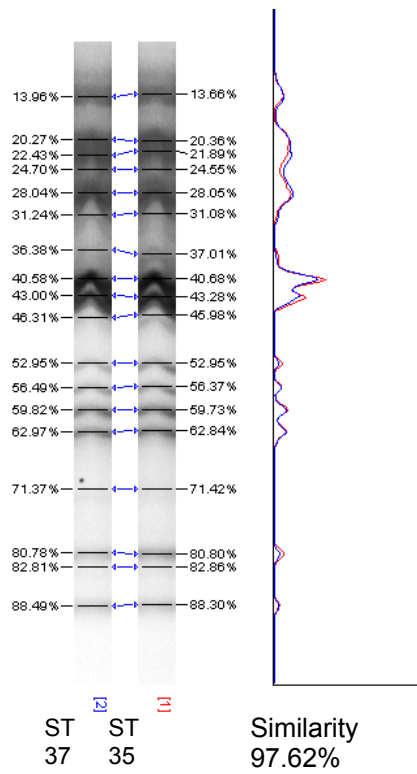


Figure 2: Pair comparison of two lanes of gels from different STs (37 and 35) with the same repTC profile (I)

REFERENCES

1. Klein, G., et al., *Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria*. Int J Food Microbiol, 1998. **41**(2): p. 103-25.
2. Felis, G.E. and F. Dellaglio, *Taxonomy of Lactobacilli and Bifidobacteria*. Curr Issues Intest Microbiol, 2007. **8**(2): p. 44-61.
3. Aas, J.A., et al., *Bacteria of dental caries in primary and permanent teeth in children and young adults*. J Clin Microbiol, 2008. **46**(4): p. 1407-17.
4. Corby, P.M., et al., *Microbial risk indicators of early childhood caries*. J Clin Microbiol, 2005. **43**(11): p. 5753-9.
5. Preza, D., et al., *Bacterial profiles of root caries in elderly patients*. J Clin Microbiol, 2008. **46**(6): p. 2015-21.
6. Bouhnik, Y., P. Marteau, and J.C. Rambaud, [*The use of probiotics in humans*]. Ann Gastroenterol Hepatol (Paris), 1993. **29**(5): p. 241-9.
7. Borchers, A.T., et al., *Probiotics and immunity*. J Gastroenterol, 2009. **44**(1): p. 26-46.
8. Moschetti, G., et al., *Genotyping of Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus and determination of the number and forms of rrn operons in L. delbrueckii and its subspecies*. Res Microbiol, 1997. **148**(6): p. 501-10.
9. Valcheva, R., et al., *Lactobacillus hammesii sp. nov., isolated from French sourdough*. Int J Syst Evol Microbiol, 2005. **55**(Pt 2): p. 763-7.
10. Teanpaisan, R., J. Hintao, and G. Dahlen, *Oral Lactobacillus species in type 2 diabetic patients living in southern Thailand*. Anaerobe, 2009. **15**(4): p. 160-3.
11. Delfederico, L., et al., *Molecular identification and typing of lactobacilli isolated from kefir grains*. J Dairy Res, 2006. **73**(1): p. 20-7.
12. Huch Nee Kostinek, M., et al., *Use of Lactobacillus strains to start cassava fermentations for Gari production*. Int J Food Microbiol, 2008. **128**(2): p. 258-67.
13. McLeod, A., et al., *Diversity of Lactobacillus sakei strains investigated by phenotypic and genotypic methods*. Syst Appl Microbiol, 2008. **31**(5): p. 393-403.
14. Molenaar, D., et al., *Exploring Lactobacillus plantarum genome diversity by using microarrays*. J Bacteriol, 2005. **187**(17): p. 6119-27.
15. Tamang, J.P., et al., *Identification of predominant lactic acid bacteria isolated from traditionally fermented vegetable products of the Eastern Himalayas*. Int J Food Microbiol, 2005. **105**(3): p. 347-56.
16. Tanganurat, W., et al., *Genotypic and phenotypic characterization of Lactobacillus plantarum strains isolated from Thai fermented fruits and vegetables*. J Basic Microbiol, 2009. **49**(4): p. 377-85.
17. Diancourt, L., et al., *Multilocus sequence typing of Lactobacillus casei reveals a clonal population structure with low levels of homologous recombination*. Appl Environ Microbiol, 2007. **73**(20): p. 6601-11.
18. Cai, H., et al., *Genotypic and phenotypic characterization of Lactobacillus casei strains isolated from different ecological niches suggests frequent recombination and niche specificity*. Microbiology, 2007. **153**(Pt 8): p. 2655-65.
19. Turner, K.M. and E.J. Feil, *The secret life of the multilocus sequence type*. Int J Antimicrob Agents, 2007. **29**(2): p. 129-35.
20. Versalovic, J., T. Koeuth, and J.R. Lupski, *Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes*. Nucleic Acids Res, 1991. **19**(24): p. 6823-31.

21. Goldberg, T.L., T.R. Gillespie, and R.S. Singer, *Optimization of analytical parameters for inferring relationships among Escherichia coli isolates from repetitive-element PCR by maximizing correspondence with multilocus sequence typing data*. Appl Environ Microbiol, 2006. **72**(9): p. 6049-52.
22. Gevers, D., G. Huys, and J. Swings, *Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of Lactobacillus species*. FEMS Microbiol Lett, 2001. **205**(1): p. 31-6.
23. Nikolic, M., et al., *Characterization of lactic acid bacteria isolated from Bukuljac, a homemade goat's milk cheese*. Int J Food Microbiol, 2008. **122**(1-2): p. 162-70.
24. Maiden, M.C., et al., *Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(6): p. 3140-5.
25. Urwin, R. and M.C. Maiden, *Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology*. Trends Microbiol, 2003. **11**(10): p. 479-87.
26. de Las Rivas, B., A. Marcobal, and R. Munoz, *Development of a multilocus sequence typing method for analysis of Lactobacillus plantarum strains*. Microbiology, 2006. **152**(Pt 1): p. 85-93.
27. Foley, S.L., et al., *Comparison of subtyping methods for differentiating Salmonella enterica serovar Typhimurium isolates obtained from food animal sources*. J Clin Microbiol, 2006. **44**(10): p. 3569-77.
28. Foley, S.L., et al., *Evaluation of molecular typing methods for Escherichia coli O157:H7 isolates from cattle, food, and humans*. J Food Prot, 2004. **67**(4): p. 651-7.
29. Cury, J.A., et al., *Biochemical composition and cariogenicity of dental plaque formed in the presence of sucrose or glucose and fructose*. Caries Res, 2000. **34**(6): p. 491-7.
30. Syed, S.A. and W.J. Loesche, *Survival of human dental plaque flora in various transport media*. Appl Microbiol, 1972. **24**(4): p. 638-44.
31. Svensater, G., et al., *The acid-tolerant microbiota associated with plaque from initial caries and healthy tooth surfaces*. Caries Res, 2003. **37**(6): p. 395-403.
32. Mantzourani, M., M. Fenlon, and D. Beighton, *Association between Bifidobacteriaceae and the clinical severity of root caries lesions*. Oral Microbiol Immunol, 2009. **24**(1): p. 32-7.
33. Alam, S., et al., *PCR-Based methods for genotyping viridans group streptococci*. J Clin Microbiol, 1999. **37**(9): p. 2772-6.
34. Holzapfel, W.H., et al., *Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition*. Am J Clin Nutr, 2001. **73**(2 Suppl): p. 365S-373S.
35. Bondarenko, V.M., *[Applied aspects of molecular biology of Bifidobacteria and Lactobacillus]*. Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol, 2006(2): p. 89-97.
36. Mohania, D., et al., *Molecular approaches for identification and characterization of lactic acid bacteria*. J Dig Dis, 2008. **9**(4): p. 190-8.
37. Wilson, M.K., et al., *Analysis of the Pan Genome of Campylobacter jejuni Isolates Recovered from Poultry by Pulsed-Field Gel Electrophoresis, Multilocus Sequence Typing (MLST), and Repetitive Sequence Polymerase Chain Reaction (rep-PCR) Reveals Different Discriminatory Capabilities*. Microb Ecol, 2009.
38. Lupski, J.R., *Molecular epidemiology and its clinical application*. Jama, 1993. **270**(11): p. 1363-4.
39. Do, T., et al., *Population structure of Streptococcus oralis*. Microbiology, 2009. **155**(Pt 8): p. 2593-602.
40. Bonacorsi, S., et al., *Semi-automated rep-PCR for rapid differentiation of major clonal groups of Escherichia coli meningitis strains*. Int J Med Microbiol, 2009. **299**(6): p. 402-9.

