

**Jéssica Alves de Cena**

**Presença do domínio *Archaea* em Biofilmes associados à Cárie  
Dentária**

Brasília  
2020



**Jéssica Alves de Cena**

**Presença do domínio *Archaea* em biofilmes associados à cárie  
dentária**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao  
Departamento de Odontologia da Faculdade de  
Ciências da Saúde da Universidade de Brasília,  
como requisito parcial para a conclusão do curso  
de Graduação em Odontologia.

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Nailê Damé-Teixeira

Co-Orientador: Msc. Aline Belmok Dias

Brasília

2020



Dedico esse trabalho aos meus pais,  
Maria e Raimundo Cena, por me oferecerem  
Amor e apoio incondicional.



## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que é quem me sustenta todos os dias e tem me dado forças e sabedoria para chegar até aqui. A Ele, pois, seja dada a honra, a glória, o poder e a majestade para sempre.

Aos meus pais Maria e Raimundo Cena, por terem empenhado suas vidas em favor de realizar os meus sonhos e de meu irmão, por serem meus financiadores (de novo!), por me cederem os ombros para eu chorar nos momentos de tensão e angústia, por não permitir que eu desistisse. Amo vocês!

Ao meu irmão Thiago Cena, ainda que de maneira distorcida sempre me apoia e me encoraja a seguir em frente quando penso em desistir de algo. “É ‘nóis’ Thica!”

Ao meu parceiro de guerra diária ao longo desses anos, Yuri Sivestre, só Deus sabe a paciência que ele teve ao longo desses anos, formamos uma bela equipe que extrapola os muros da universidade.

As minhas amigas Juliana Amorim, Carina Paiva, Thaís Carvalho e Daiane Ribeiro, por compartilhar comigo momentos de alegria, reclamações, por me ajudarem a me tornar um ser humano melhor.

Ao Fred e Caetano por cada auxílio nos momentos de desespero no laboratório de prótese.

Aos professores André Leite, Paulo Tadeu, Carla, Aline e Liliana por terem sido parceiros mais próximos de meu aprendizado.

A cada paciente que tive o prazer de atender todos esses anos, cada um deles me ensinou a como ser uma profissional em constante aprendizagem e formaram a base da minha futura carreira.

Às minhas orientadoras Nailê Damé-Teixeira e Aline Belmok, que foram parte fundamental para que este trabalho

acontecesse, pela paciência em ensinar os conceitos da biologia molecular e entenderem minhas limitações.

A Débora Cortez, aluna do curso de biotecnologia, que foi minha parceira de bancada, sem a disponibilidade dela em complementar meus horários no laboratório não conseguiria ter obtido meus resultados.

À universidade de Brasília, por ter me recebido uma segunda vez e permitido que eu amadurecesse em todas as áreas da minha vida.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Fundação de Apoio a Pesquisa do Distrito Federal (FAP-DF), pelo financiamento de minhas pesquisas e disponibilização de bolsas que me permitiram me manter durante esses 5 anos, além de permitir que eu divulgasse minha produção científica em congressos fora do DF.

Aos participantes do Projeto Diabetes (Departamento de Odontologia, Universidade de Brasília) que me auxiliaram na coleta de amostras.

A professora Cynthia Maria Kyaw, por ter aberto as portas de seu laboratório para a realização de nossos experimentos, assim como ao Laboratório de Computação de Alto Desempenho (LAD / PUCRS) por permitir a realização das análises de sequências de alto rendimento.



## EPÍGRAFE

“Ninguém caminha sem aprender a caminhar, sem aprender a fazer o caminho caminhando, refazendo e retocando o sonho pelo qual se pôs a caminhar.”

Paulo Freire



## RESUMO

CENA, Jéssica Alves. Presença do domínio Archaea em biofilmes associados à cárie dentária. 2020. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia) – Departamento de Odontologia da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

1) Objetivo: Avaliar a presença do domínio Archaea em biofilmes associados à cárie a partir do sequenciamento do gene 16S rRNA de Archaea. (2) Materiais e métodos: Para detectar a presença de *Archaea* na cárie dentária, foram coletadas três amostras de dentina cariada e duas amostra controle de biofilmes supragengivais, o DNA microbiano total foi extraído e a composição da microbiota investigada de duas formas. Primeiro fez-se a amplificação do gene 16S rRNA utilizando iniciadores procarióticos universais; os *amplicons* foram sequenciados por sequenciamento de DNA de alto rendimento. Como segunda estratégia para detectar sequências de *Archaea*, uma amostra representativa de cárie foi escolhida e outras reações de PCR foram realizadas usando iniciadores específicos visando o gene 16S rRNA de archaeas; amplicons foram clonados e sequenciados. A anotação das sequências foi realizada usando o banco de dados SILVA e a abundância relativa de unidades taxonômicas operacionais (OTUs) em nível de gênero foi calculada. (3) Resultados: O método de sequenciamento de alto rendimento detectou sequências de archaeas em todas as amostras (identificadas como grupo I.1c do filo Thaumarchaeota), embora em abundância muito baixa ( $\leq 0,03\%$  do total de sequências). Com a segunda estratégia, foram detectados nove sequências de archaea, com uma OTU afiliada ao clado *Methanocella* e outra afiliada ao grupo I.1b do filo Thaumarchaeota. (4) Conclusões: Sequências de archaeas foram detectadas em cárie dentária e biofilmes de superfícies

sem lesões de cárie. Sequências de DNA de Thaumarchaeota também foram identificadas, mostrando que a diversidade global de archaeas na cavidade oral humana pode estar atualmente subestimada e não restrita a metanogênicos.

**Palavras-chave:** Archaea, Cárie dentária, Microbiota, Análise de sequência, Sequenciamento de DNA de alto rendimento

## ABSTRACT

CENA, Jéssica Alves. Presence of Archaea in Dental Caries Biofilms. 2020. Undergraduate Course Final Monograph (Undergraduate Course in Dentistry) – Department of Dentistry, School of Health Sciences, University of Brasília.

(1) Objective: To evaluate the presence of the Archaea domain in biofilms associated with caries based on the sequencing of the 16S rRNA gene from Archaea. (2) Design: To detect the presence of *Archaea* in dental caries, a triplicate of carious dentine samples and duplicate of supragingival biofilms were collected, total microbial DNA was extracted and the composition of the microbiota was investigated. Total DNA was submitted to 16S rRNA gene amplification using universal prokaryotic primers; amplicons were sequenced by high-throughput DNA sequencing. As a second strategy to detect *Archaea*, a representative sample of caries was chosen and other PCR reactions were performed using specific primers targeting the archaeal 16S rRNA gene; amplicons were cloned and sequenced. Annotation of sequences was performed using SILVA database and the relative abundance of genus level OTUs was calculated. (3) Results: The high-throughput sequencing method detected archaeal sequences in all samples (identified as group I.1c of the phylum Thaumarchaeota), although in a very low abundance ( $\leq 0.03\%$  of the total sequences). For the second strategy, nine archaeal sequences were detected, with an OTU affiliated to *Methanocella* clade, and another one affiliated to group I.1b of the phylum Thaumarchaeota. (4) Conclusions: Archaeal sequences were detected in dental caries and biofilms from surfaces without caries lesions. DNA sequences of Thaumarchaeota were also identified, showing that overall archaeal diversity in the human oral cavity could be currently underestimated and not restricted to methanogens.

**Keywords:** Archaea, Dental caries, Microbiota, Sequence analysis, High-Throughput DNA Sequencing

## SUMÁRIO

ARTIGO CIENTÍFICO .....	17
FOLHA DE TÍTULO .....	19
RESUMO .....	20
RELEVÂNCIA CLÍNICA .....	21
ABSTRACT .....	22
INTRODUÇÃO .....	24
MATERIAIS E MÉTODOS .....	26
RESULTADOS .....	30
DISCUSSÃO .....	36
CONCLUSÃO .....	41
REFERÊNCIAS .....	42
ANEXOS .....	47
NORMAS DA REVISTA .....	47





## ARTIGO CIENTÍFICO

Este trabalho de Conclusão de Curso é baseado no artigo científico: Dame-Teixeira, N., de Cena, J. A., Côrtes, D. A., Belmok, A., dos Anjos Borges, L. G., Marconatto, L., & Kyaw, C. M. (2020). Presence of Archaea in dental caries biofilms. *Archives of oral biology*, 110, 104606.

Apresentado sob as normas de publicação do **Revista Archives of Oral Biology**.



## FOLHA DE TÍTULO

### **Presença do domínio *Archaea* em biofilmes associados à cárie dentária**

*Presence of Archaea in dental caries biofilms*

Jéssica Alves de Cena<sup>1</sup>

Nailê Damé-Teixeiral<sup>2</sup>

Aline Belmok<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Aluna de Graduação em Odontologia da Universidade de Brasília.

<sup>2</sup> Professor Adjunto de Dentística da Universidade de Brasília (UnB).

<sup>3</sup> Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular da Universidade de Brasília

Correspondência: Prof. Dr<sup>a</sup>. Nailê Damé-Teixeiral

Campus Universitário Darcy Ribeiro - UnB - Faculdade de Ciências da Saúde - Departamento de Odontologia - 70910-900 - Asa Norte - Brasília - DF

E-mail: nailedame@hotmail.com / Telefone: (61) 3107 1802.

## RESUMO

### **Presença do domínio *Archaea* em biofilmes associados à cárie dentária**

#### **Resumo**

1) Objetivo: Avaliar a presença do domínio *Archaea* em biofilmes associados à cárie a partir do sequenciamento do gene 16S rRNA de *Archaea*. (2) Materiais e métodos: Para detectar a presença de *Archaea* na cárie dentária, foram coletadas três amostras de dentina cariada e duas amostra controle de biofilmes supragengivais, o DNA microbiano total foi extraído e a composição da microbiota investigada de duas formas. Primeiro fez se a amplificação do gene 16S rRNA utilizando iniciadores procarióticos universais; os amplicons foram sequenciados por sequenciamento de DNA de alto rendimento. Como segunda estratégia para detectar *Archaea*, uma amostra representativa de cárie foi escolhida e outras reações de PCR foram realizadas usando iniciadores específicos visando o gene 16S rRNA archaeal; amplicons foram clonados e sequenciados. A anotação das seqüências foi realizada usando o banco de dados SILVA e a abundância relativa de unidades taxonomicas operacionais (OTUs) em nível de gênero foi calculada. (3) Resultados: O método de sequenciamento de alto rendimento detectou seqüências archaeais em todas as amostras (identificadas como grupo I.1c do filo Thaumarchaeota), embora em abundância muito baixa ( $\leq 0,03\%$  do total de seqüências). Para a segunda estratégia, foram detectados nove seqüências de archaeas, com uma OTU afiliada ao clado *Methanocella* e outra afiliada ao grupo I.1b do filo Thaumarchaeota. (4) Conclusões: Seqüências de archaeas foram detectadas em cárie dentária e biofilmes de superfícies sem lesões de cárie. As seqüências de DNA de Thaumarchaeota também foram identificadas, mostrando que a

diversidade global de archaeas na cavidade oral humana pode estar atualmente subestimada e não restrita a metanogênios.

**Palavras-chave:** Archaea, Cárie dentária, Microbiota, Análise de sequência, Sequenciamento de DNA de alto rendimento

## RELEVÂNCIA CLÍNICA

Apesar de constantes ações preventivas a cárie ainda é a condição mais prevalente em todo o mundo. Com base na hipótese de que a microbiota associada à cárie dentária é mais complexa do que a conhecida atualmente e que a atividade da comunidade microbiana como um todo pode ser a causa da doença, é importante entender e conhecer além do papel das bactérias.

## ABSTRACT

### *Presence of Archaea in dental caries biofilms*

#### **Abstract**

(1) Objective: To evaluate the presence of the Archaea domain in biofilms associated with caries based on the sequencing of the 16S rRNA gene from Archaea. (2) Design: To detect the presence of *Archaea* in dental caries, a triplicate of carious dentine samples and duplicate of supragingival biofilms were collected, total microbial DNA was extracted and the composition of the microbiota was investigated. Total DNA was submitted to 16S rRNA gene amplification using universal prokaryotic primers; amplicons were sequenced by high-throughput DNA sequencing. As a second strategy to detect Archaea, a representative sample of caries was chosen and other PCR reactions were performed using specific primers targeting the archaeal 16S rRNA gene; amplicons were cloned and sequenced. Annotation of sequences was performed using SILVA database and the relative abundance of genus level OTUs was calculated. (3) Results: The high-throughput sequencing method detected archaeal sequences in all samples (identified as group I.1c of the phylum Thaumarchaeota), although in a very low abundance ( $\leq 0.03\%$  of the total sequences). For the second strategy, nine archaeal sequences were detected, with an OTU affiliated to Methanocella clade, and another one affiliated to group I.1b of the phylum Thaumarchaeota. (4) Conclusions: Archaeal sequences were detected in dental caries and biofilms from surfaces without caries lesions. DNA sequences of Thaumarchaeota were also identified, showing that overall archaeal diversity in the human oral cavity could be currently underestimated and not restricted to methanogens.

**Keywords:** Archaea, Dental caries, Microbiota, Sequence analysis, High-Throughput DNA Sequencing

## INTRODUÇÃO

Durante a evolução do *Homo sapiens*, o microbioma residente coevoluiu e coexistiu em simbiose, desempenhando um papel significativo na fisiologia e na saúde humana. A cavidade oral humana abriga a segunda maior microbiota humana, superada apenas pela microbiota do trato gastrointestinal (Kilian et al., 2016; Verma, Garg & Dubey, 2018). Os diversos sítios da cavidade oral (dentes, sulco gengival, gengiva, língua, bochecha, lábio e palato duro e mole) oferecem condição para a formação de um sistema ecológico altamente heterogêneo, que quando em homeostase age inclusive como uma barreira para agentes patogênicos oportunistas. (Bik et al., 2006; Blaser, 2014; Kilian et al., 2016; Schlafer & Meyer, 2017). Todavia, a disbiose dessa microbiota dá origem a agravos bucais, um deles é a cárie dentária (Philip D Marsh, 1994).

Apesar das constantes ações preventivas, a cárie não tratada ainda é a condição bucal mais prevalente no mundo (Kassebaum et al., 2015; Taqi, et al., 2019). O desequilíbrio ecológico no biofilme dental é desencadeado pelo consumo excessivo de carboidratos fermentáveis, que levam os membros acidogênicos / acidúricos da microbiota oral residente obterem uma vantagem ecológica seletiva em relação a outras espécies (Philip D Marsh, 1994).

Sabe-se que o biofilme oral é complexo, contudo, os estudos exaustivamente apresentam organismos do domínio *Bactéria*, e em menor quantidade alguns organismos eucariotos, especialmente fungos. Mesmo que ainda pouco entendido, o domínio *Archaea* tem sido identificado em biofilmes orais. Espécies do gênero *Methanobrevibacter* foram detectadas na microbiota oral, principalmente em biofilmes subgengivais (Horz, Robertz, Vianna, Henne e Conrads, 2015; Matarazzo, Ribeiro,



Feres, Faveri e Mayer, 2011); e biofilmes de canais radiculares (Vianna, Conrads, Gomes e Horz, 2006). Alguns estudos sugeriram o potencial de archaeas metanogênicas serem espécie chave, uma vez que podem ser grandes condutores de processos metabólicos em doenças periodontais (Koskinen et al., 2017). No entanto, pouca atenção tem sido dada ao papel das archaeas nestes biofilmes, e não existem dados sobre a presença desses organismos em cárie dentária.

Archaeas compreendem o terceiro domínio da vida, composto por membros com propriedades genótípicas e fenotípicas únicas. Eles são caracterizados por diferenças significativas nos RNAs ribossômicos, proteínas ribossômicas, membrana celular e estruturas de superfície, quando comparados às bactérias ou eucariotos (Forterre, Brochier & Philippe, 2002). No passado, os organismos pertencentes a esse domínio eram considerados extremófilos, prosperando apenas em ambientes hiper salinos, ácidos ou anaeróbicos. Com o advento das técnicas moleculares, foi demonstrado que os membros do domínio *Archaea* também estão presentes em ambientes não extremos, incluindo o corpo humano (Weber, Lehtovirta-Morley, Prosser e Gubry-Rangin, 2015).

As detecções de archaeas no microbioma humano geralmente envolvem amplificação do gene 16S rRNA com iniciadores universais procarióticos, em estudos que buscam principalmente sequências de DNA bacterianos ou análises metagenômicas, assim fornecem resultados genéricos sem as devidas análises (Ding & Schloss, 2014; Kim, Oh, Park, & Chun, 2014). Tentando romper com este paradigma e tendo como base a hipótese de que a microbiota associada à cárie dentária é mais complexa do que a conhecida atualmente, e que a atividade da comunidade microbiana como um todo pode ser a causa da doença, este estudo piloto teve como objetivo avaliar a presença

de *Archaea* em cinco amostras clínicas coletadas de lesões de cárie dentária e biofilmes de superfícies sem lesões de cárie.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Os pacientes foram selecionados entre os sujeitos examinados no projeto de extensão "Tratamento Periodontal em Pacientes com Diabetes Mellitus Tipo 1 e 2", realizado no Hospital Universitário de Brasília (HUB). Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília (processo número 87962818.4.0000.0030) e todos os pacientes foram informados dos objetivos do estudo e assinaram um termo de consentimento formal para participação. Ao todo, cinco pacientes (n=5) participaram voluntariamente.

Nossa análise abrangeu uma triplicata clínica com amostras de dentina cariada em dentes permanentes e dois controles de biofilmes supragengivais de pacientes sem atividade de cárie e em tratamento para periodontite. O diagnóstico de cárie foi realizado de acordo com os critérios de atividade, por meio do exame visual-tátil (Nyvad & Baelum, 2018).

Os participantes recrutados para o grupo de cárie dentária tinham uma lesão inicial de cárie cavitada (n = 1 lesão de cárie cervical; n = 1 lesão de cárie proximal; n = 1 lesão de cárie oclusal). Amostras de dentina cariada foram coletadas durante o tratamento restaurador e cada paciente doou apenas uma amostra e o tecido cariado foi coletado apenas em um local e todas as lesões apresentaram características de atividade (dentina mole e amarela). Já as amostras de placa supragengival foram coletadas durante raspagem e alisamento radicular, e cada paciente doou apenas uma amostra (pool de esmalte hígido). Todas as amostras foram coletadas durante a

manhã e os voluntários foram solicitados a não escovar os dentes, comer e beber duas horas antes da consulta. Tanto o biofilme como a dentina cariada (tecido mole e infectado) foram coletados usando uma cureta estéril (SSWhiteDuflex, Rio de Janeiro, Brasil). Após a coleta, as amostras foram imediatamente colocadas em um microtubo isento de nuclease e armazenadas a -20°C até o processamento posterior.

A extração total de DNA foi realizada conforme descrito por Smalla et al. (Smalla, Cresswell, Mendonca-Hagler, Wolters e van Elsas, 1993). Resumidamente, as amostras foram suspensas em tampão TE suplementado com Proteinase K (20mg / mL) e dodecil sulfato de sódio a 20% (SDS) e incubadas a 37°C por 1h. Após a incubação, o mesmo volume de clorofano foi adicionado e a suspensão foi então centrifugada a 7000 g, a 4°C por 3 min. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e precipitado usando etanol a 100%.

Após verificação do DNA por gel de agarose 1% corado com brometo de etídio, foram realizadas duas técnicas de sequenciamento de DNA para este estudo piloto:

### **1. Reação PCR do gene 16S rRNA com primer universal e sequenciamento de alto rendimento (Ion Torrent):**

Todas as amostras (n = 5) foram submetidas à amplificação da região V4 do gene 16S rRNA usando os primers universais F515 ( 5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3' ) e R806 (5'-GGACTACVSGGGTATCTAAT-3'), dirigido a *Bactérias* e *Archaea*, descritos por Bates et al. (Bates et al., 2011) sob a seguinte condição: mistura de 50 µL, consistindo em 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 µM de cada iniciador, 0,2 mM de cada dNTP, 1U Platinum Taq DNA polimerase, 1X tampão de reação PCR e aproximadamente 10 ng de DNA genômico. As condições de

PCR utilizadas foram uma etapa inicial de desnaturação a 95°C/ 3 min, 25 ciclos incluindo desnaturação a 95°C / 30s, anelamento a 52°C / 1min e extensão a 72°C / 1min, com um passo final de extensão a 72°C / 7min. Após purificação dos *amplicons* de PCR usando Agencount AMPure Beads (Beckman Coulter), a construção da biblioteca foi realizada conforme descrito na Ion Plus Fragment Library a partir de uma quantidade inicial de 100 ng de DNA. O sequenciamento foi realizado em um sistema Ion PGM (Thermo Fisher) usando um Ion chip 316, seguindo as instruções do fabricante.

As leituras do rRNA 16S foram submetidas a análises de qualidade no Prinseq (Schmieder & Edwards, 2011). As bases de baixa qualidade (pontuação mínima Phred de 20) e as sequências menores que 100 bp foram removidas da análise. Singletons foram excluídos usando USEARCH v8.0.1623 (R. C. Edgar, 2010). As sequências quiméricas foram removidas usando o banco de dados de referência RDP para 16S rRNA (Cole et al., 2014). As sequências foram divididas em clusters usando o algoritmo UCLUST (Caporaso et al., 2010) para uma identidade mínima de 97%. As OTUs foram selecionadas com base na similaridade de 97% das sequências e os dados taxonômicos do 16S rRNA foram obtidos usando o banco de dados Silva 132 (Quast et al., 2013) no QIIME v1.9. As sequências foram depositadas no National Biotechnology Information Center (NCBI) no BioProject PRJNA558499.

## **2. Reação PCR do gene 16S rRNA direcionado para Archaea, clonagem e sequenciamento de Sanger:**

Uma amostra representativa de cárie foi escolhida aleatoriamente para realizar essa segunda técnica (cc19). Os genes 16S rRNA foram amplificados por PCR usando um par de iniciadores específicos para *Archaea*, denominados F109 (5

'ACKGCTCAGTAACACGT 3') (Grosskopf, Janssen, & Liesack, 1998) e R915 (5 'GTGCTCCCCCGCCAATTCCT 3') (Stahl & Amann, 1998) nas seguintes condições: mistura de 30 µL, consistindo em 1X tampão de reação, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,5 µM de cada primer, 0,2 mM de cada dNTP, 1,25 U/µL de Taq DNA polimerase, 400 ng/µL de albumina sérica bovina (BSA), 2 µL de aproximadamente 300 ng/µL do DNA genômico. As condições de PCR utilizadas foram uma etapa inicial de desnaturação a 94°C/ 2 min, seguida de 29 ciclos de desnaturação a 94°C/ 1 min, anelamento a 57°C / 1 min, extensão a 72°C / 2 min, com uma etapa final de extensão de 5 min a 72°C. Os ensaios de PCR foram realizados em um termociclador Bio-Rad PTC-100® (Peltier Thermal Cycler). As sequências foram depositadas no National Biotechnology Information Center (NCBI) no GenBank MN309779-MN309787.

Os fragmentos de DNA amplificados foram visualizados por eletroforese em gel de agarose a 1% corada com brometo de etídio (10 mg/mL). Os *amplicons* foram então clonados no vetor pGEM-T Easy® (Promega) de acordo com as instruções do fabricante e transformados em células competentes de *Escherichia coli* DH5α por choque térmico. O DNA plasmidial dos clones recombinantes foi extraído com fenol-clorofórmio- álcool isoamílico a 25:24:1 (vol/vol/vol) e sequenciado (analisador genético ABI-Prism-3500, ACTGene Análises Moleculares, Brasil).

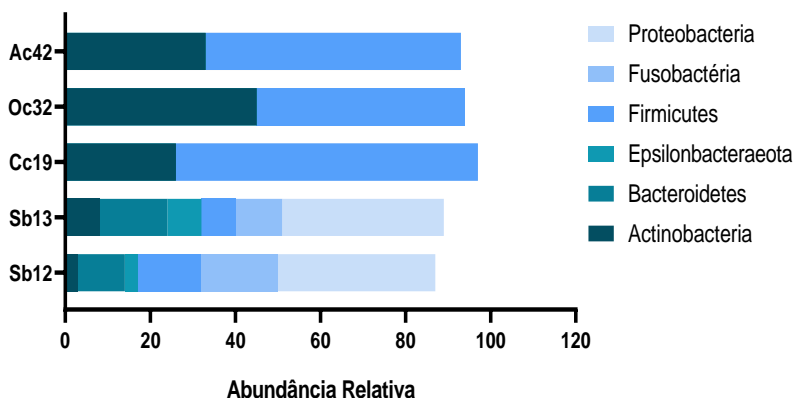
Todas as sequências foram ajustadas de acordo com o índice *Phred quality* para 20 em mais de 400 nucleotídeos (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>). As sequências quiméricas foram verificadas com Uchime2 (Edgar, 2016). A classificação taxonômica das sequências de alta qualidade foi realizada com o banco de dados SILVA (release 132) (Quast et al., 2012) usando Mothur v.1.35.1 (Schloss et al., 2009) com um

limite de identidade de 90% ou superior. As sequências foram alinhadas com o ClustalX (Larkin et al.) e agrupados com um limite de identidade de sequência de 97%. Uma árvore filogenética foi construída com o software MEGA7 incluindo as OTUs representativas, bem como sequências do gene 16S rRNA de isolados de diferentes filos de archaeas incluindo archaeas ainda não cultivadas encontradas no banco de dados do GenBank (Kumar et al., 2016). Uma sequência de *Streptococcus salivarius* (NR042776.1) foi usada como grupo externo. A árvore foi construída usando o método da máxima verossimilhança, um valor *bootstrap* de 1.000 e o modelo de substituição de nucleotídeos Tamura.

## RESULTADOS

### **Sequenciamento De Alto Rendimento Do Gene 16S rRNA (ION PGM):**

Após remoção das bases de baixa qualidade e retirar as leituras curtas, o sequenciamento resultou em 144,568 sequências de boa qualidade do gene 16S. Uma média de 28,914 sequências de 16S por amostra foram empregadas na análise. As OTUs bacterianas e de archaeas foram distribuídas em 25 filos, 54 classes, 96 ordens, 127 famílias e 156 gêneros (ou respectivas OTUs). Desse modo, observou-se a ocorrência de um filo de *Archaea*, Thaumarchaeota, com abundância inferior a 0,01% em todas as amostras analisadas. Os filos bacterianos com abundância superior a 1% do total de sequências em pelo menos uma das amostras são mostrados na Figura 1. Os filos mais abundantes nas amostras de cárie foram predominantemente Actinobactérias e Firmicutes, enquanto nas amostras de biofilme supra gengivais foram Bacteroidetes, Epsilonbacteraeota, Firmicutes, Fusobacteria e Proteobactérias.



**Figura 1.** Abundância relativa de filos bacterianos, apresentando mais de 1% do total de sequências em cárie dentária [cervical (amostra Cc19); oclusal (amostra Oc32); proximal (amostra Ac42)] e biofilmes supragengival (amostras Sb12 e Sb13) usando o sequenciamento do gene 16S rRNA de alta eficiência.

No nível de gênero, uma OTU afiliada ao grupo I.1c do filo Thaumarchaeota foi identificado em amostras de biofilme supra gengivais e lesões cariosas, embora em baixa abundância ( $\leq 0,035\%$  do total de sequências). Nas amostras de cárie, os gêneros mais abundantes foram *Lactobacillus*, *Olsenella* (exceto na amostra Ac42) e uma OTU pertencente à família *Bifidobacteriaceae* (Tabela 1). Os gêneros bacterianos mais abundantes nas amostras supra gengivais de biofilme foram *Haemophilus*, *Fusobacterium*, *Neisseria*, *Capnocytophaga*, *Campylobacter* e *Corynebacterium* (Tabela 1).

Domínio	Gênero ou OTU	Abundância Relativa (%)				
		Cc19	Oc32	Ac42	Sb12	Sb13
Archaea	Group I.1c (uncultured OTU)*	0.005	0.035	0.020	0.015	0.009
Bactéria	<i>Actinomyces</i>	1.47	1.84	21.05	1.29	2.64
	<i>Bifidobacterium</i>	1.74	0.02	1.87	0.01	≤ 0.01
	uncultured OTU	7.48	3.08	4.94	0.01	0.01
	<i>Rothia</i>	0.15	0.71	4.92	0.95	2.36
	<i>Olsenella</i>	15.96	39.90	0.33	0.04	0.02
	<i>Corynebacterium</i>	0	0.12	0.29	1.35	3.17
	F0058 OTU	0.01	0.01	0	1.32	0.30
	<i>Porphyromonas</i>	0	0.05	0.02	3.17	1.31
	<i>Prevotella</i>	0.14	0.60	0.78	0.99	4.25
	<i>Capnocytophaga</i>	0	0.01	0.01	4.47	10.64
	<i>Bergeyella</i>	0	0.01	0.01	1.57	0.45
	<i>Campylobacter</i>	0.01	0.09	0.29	3.37	8.11
	<i>Gemella</i>	≤ 0.01	0.07	0.04	1.30	0.23
	<i>Lactobacillus</i>	60.82	8.30	1.14	0.03	0.01
	<i>Streptococcus</i>	6.56	2.64	38.95	12.31	3.64
	uncultured OTU	0.52	36.00	1.38	0.02	0.04
	<i>Parvimonas</i>	0	0.02	0.02	1.05	0.19
	<i>Lachnoanaerobaculum</i>	0	0.01	0.01	0.02	1.15
	<i>Dialister</i>	0.02	0.03	0.03	0.59	1.18
	uncultured OTU	2.01	0.05	0.60	≤ 0.01	0.18
	<i>Veillonella</i>	1.43	2.29	18.32	0.18	2.20
	<i>Fusobacterium</i>	0.13	0.36	0.11	17.53	9.74
	<i>Leptotrichia</i>	0.34	0.05	0.37	0.99	1.31
	<i>Neisseria</i>	0	0.15	0.10	11.09	11.67
	uncultured OTU	0.11	0.03	0.13	4.13	15.86
	<i>Cardiobacterium</i>	0	0.01	≤ 0.01	0.13	1.94
	<i>Haemophilus</i>	0	0.61	0.10	22.43	9.10

**Tabela 1.** Abundância relativa das sequências de archaea e dos gêneros bacterianos(ou respectivas OTUs) apresentando mais de 1% do total de sequências em cárie [cervical (amostra Cc19); oclusais (amostra Oc32) e proximal (amostra Ac42)] e biofilmes supragengival (amostras Sb12 e Sb13) usando o sequenciamento do gene 16S rRNA de alto rendimento.

\*classificação de classe.



## Clonagem Do Gene 16S rRNA Específico Da *Archaea* E Sequenciamento De Sanger:

O perfil eletroforético obtido no gel de agarose 1% corado com brometo de etídio em duplicata da amostra revelou fragmentos com o tamanho esperado para os primers 109f/915r do gene rRNA 16S amplificados por PCR, como mostra a Figura 2.



**Figura 2.** Perfil eletroforético em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio revelando fragmentos do tamanho esperado amplificados por PCR com os iniciadores F109-R915, específicos para o gene rRNA 16S de archaeas. ((M = marcador; HV+ = controle positivo; - = controle negativo)

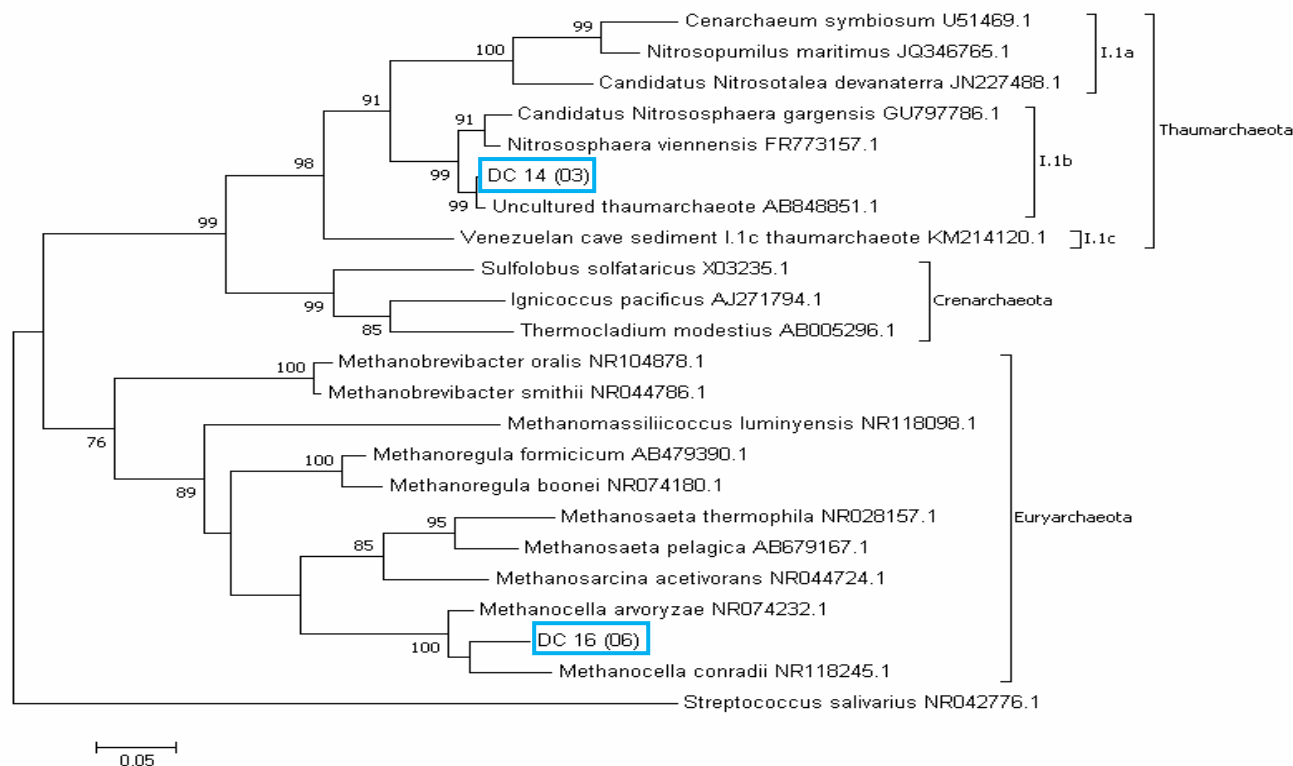
A abordagem de clonagem realizada na amostra de cárie cervical Cc19 resultou em 14 sequências de DNA de alta qualidade (PHRED  $\geq$  20 e maior que 400 bp). A partir disso,

cinco foram detectadas como sequências quiméricas pelo Uchime2 e descartadas. As 9 sequências restantes foram agrupadas em duas OTUs a 97% de similaridade, sendo a OTU1, representada pela sequência DC16, correspondente a seis sequências e OTU2, representados pela sequência DC14, compostas de três sequências.

A classificação taxonômica com base no banco de dados SILVA resultou na seguinte identificação:

- DC16 (OTU1): *Archaea* (100% of similarity); *Euryarchaeota* (100%); *Methanomicrobia* (100%); *Methanocellales* (100%); *Methanocellaceae* (100%); *Rice\_Cluster\_I* (100%);
- DC14 (OTU2): *Archaea* (100%); *Thaumarchaeota* (100%); *Nitrososphaeria* (100%); *Nitrososphaerales* (100%); *Nitrososphaeraceae* (100%); *Nitrososphaeraceae\_genus* (100%).

O resultado da árvore filogenética corroborou com tais achados, demonstrando que a OTU representada pela sequência DC16 foi afiliada ao clado *Methanocella*, enquanto a OTU representada pela sequência DC14 foi afiliada ao grupo I.1b do filo Thaumarchaeota. (Fig. 3)



**Figura 3.** Árvore filogenética de probabilidade máxima de OTUs do gene rRNA 16S de archaea (similaridade de sequência de 98%) obtida a partir de amostra de cárie de dentina (DC). O número de sequências representadas por cada OTU é mostrado entre parênteses. A árvore foi construída usando o MEGA7, com 1000 *bootstrap tests*. Valores abaixo de 70% não são mostrados. (Damé-Teixeira, 2020)

## DISCUSSÃO

Os biofilmes dentários possuem estruturas complexas, com organismos envolvidos em uma ampla gama de interações metabólicas e moleculares essenciais para o crescimento e a sobrevivência (P. D. Marsh, 2003). Por vezes, a homeostase destas interações é interrompida, resultando em doenças orais, tais como cáries e doenças periodontais (P. D. Marsh, 2010). Mesmo com um pequeno número de amostras (triplicata), o sequenciamento de DNA de alto rendimento foi capaz de identificar um grupo específico de archaeas (Thaumarchaeota) associado a amostras coletadas em sítios com superfície hígida e não hígida (Tabela 1). Alguns estudos anteriores discutiram o papel das archaeas em biofilmes e suas possíveis interações com bactérias (Horz et al., 2015; Vianna, Holtgraewe, Seyfarth, Conrads & Horz, 2008). Entretanto o presente estudo é o primeiro a descrever a detecção e classificação taxonômica de sequências de archaeas em cárie dentária, revelando a presença de sequências afiliadas ao filo Thaumarchaeota e a ordem *Methanocellales* nesses locais.

Os membros do domínio *Archaea* foram identificados pela primeira vez na cavidade oral em 1987 (Brusa et al. 1987). Desde então, o uso de métodos moleculares expandiu muito nosso conhecimento sobre a composição e a função do archeoma oral na saúde e na doença. No entanto, poucos estudos foram publicados correlacionando a cavidade oral com esses microrganismos e nenhum os descreveu em cárie dentária. A maioria dos estudos utilizaram amostras coletadas em sítios periodontais, seja na doença ou na saúde, amostras endodônticas, de saliva e cálculo dentário arqueológicos também foram pesquisados quanto à diversidade de archaeas (Efenberger, Agier, Pawzowska & Brzezińska-Blaszczyk, 2015; Huynh, Verneau, Levasseur, Drancourt, & Aboudharam, 2016; Li

et al., 2014; Li et al., 2009; Matarazzo et al., 2012; Matarazzo et al., 2011; Siqueira & Rocas, 2009; Vianna et al., 2006; Vianna, Conrads, Gomes e Horz, 2009).

Foi demonstrada uma dominância de archaeas metanogênicas em sítios orais, principalmente do gênero *Methanobrevibacter*, mas esses resultados devem ser interpretados com cautela devido à falta de um banco de dados mais robusto para sequências de archaeas, uma vez que muitos estudos se concentram em metanogênicos. Apenas dois estudos com amostras orais detectaram archaeas não metanogênicas (ordem *Thermoplasmatales*) (Horz, 2012; Li, 2014).

Embora não haja estudos descrevendo a *Methanocellales* em amostras coletadas em sítios humanos, detectamos uma sequência de DNA dessa ordem metanogênica em nossa amostra de tecido cariado. A OTU representada pela sequência DC16 está relacionada a *Methanocella*, compartilhando o mesmo ponto de ramificação. Esse grupo microbiano foi isolado de um solo de plantação de arroz e sabe-se que produz metano exclusivamente a partir de  $H_2 / CO_2$  (Lü & Lu, 2012) e que o acetato é necessário para o seu crescimento. Essa sequência de DNA foi encontrada em conjunto com uma alta abundância de sequências de DNA associadas às bactérias fermentadoras de ácido láctico -*Lactobacillus* -, um gênero extremamente acidogênico e acidúrico, confirmando a acidez do ambiente durante a amostragem. É importante ressaltar que essa amostra representativa foi coletada a partir de uma única lesão de um paciente com alta atividade de cárie.

A presença de metanogênicos na cavidade oral é bem conhecida e acredita-se que esses microrganismos interajam com parceiros sintróficos, gerando nichos para a subsequente colonização de outros microrganismos. Desta forma, as archaeas

metanogênicas poderiam reduzir os níveis inibidores de  $H_2$ , estabelecendo assim um ambiente ideal para o desenvolvimento bacteriano. Essa sintrofia caracteriza as archaeas como potencialmente patogênicas para doenças periodontais. Usando sequenciamento de alto rendimento, encontramos bactérias fermentadoras (*S. mutans*, *lactobacilos*, *bifidobactérias*, *Actinomyces* e *Scardovia*) em lesões de cárie com características de atividade (amolecidas, amareladas). Essas bactérias fermentadoras extraem energia dos carboidratos, produzindo pequenos ácidos orgânicos e álcoois que podem ser oxidados ainda mais por metanogênicos, acetogênicos e pelos microrganismos concorrentes redutores de sulfato (Vianna et al., 2008) em microambientes anaeróbicos no biofilme. Com base em nossos achados, as archaeas metanogênicas também podem estar presentes em biofilmes de tecidos dentários deteriorados, usando os ácidos orgânicos como fonte de energia e atuando como um sumidouro de ácido. Eles poderiam permitir níveis ótimos de pH para a manutenção dos microrganismos envolvidos na doença, preservando a homeostase do pH. A remoção de produtos finais da fermentação por metanogênicos favorece o crescimento de bactérias cariogênicas e aumenta a eficiência da fermentação (Matarazzo et al., 2012). No entanto, mais estudos são necessários para analisar as interações e proporções entre archaeas metanogênicas e bactérias em cárie dentária.

Foi sugerido anteriormente que a diversidade geral de archaeas na cavidade oral humana parece estar restrita a poucas espécies de *Methanobrevibacter* (Vianna et al., 2008). No entanto, nosso estudo revelou a ocorrência de sequências de DNA classificadas no grupo I.1b *Thaumarchaeota*, cujos representantes oxidam amônia em nitrito (Tournai et al., 2011). A amônia na cavidade oral inibe a desmineralização dentária, neutralizando o efeito dos ácidos e criando um ambiente nos

biofilmes orais mais favoráveis à persistência de uma microbiota alcalinogênica compatível com a saúde bucal. O metabolismo da arginina pelo sistema de arginina deiminase (ADS) das bactérias orais é considerado um dos principais contribuintes para o conteúdo de amônia nos biofilmes que contribui para o aumento do pH após a ingestão de carboidratos e durante períodos de jejum (M. Nascimento et al., 2013; M. M. Nascimento & Burne, 2014). Membros de Thaumarchaeota oxidantes de amônia podem estar perturbando um sistema tampão natural que pode influenciar o sistema de desmineralização / remineralização. Por outro lado, a modulação das concentrações de nitrito na cavidade oral foi proposta como um agente anticáries (Scofield et al., 2019). A desnitrificação baseada em nitrito oral é realizada em condições aeróbias e leva à formação biológica e química de óxido nítrico, considerado um mediador inflamatório de doenças periodontais (Lima et al., 2008; Schreiber et al., 2010).

Em uma etapa preliminar, testamos a eficiência de um par de primers adequado para a abordagem de sequenciamento de DNA de alto rendimento (comprimento de leitura curta), ou seja, 515F / 816R. Também detectou sequências de archaeas em todas as amostras (identificadas como *grupo 1.1c* do filo Thaumarchaeota), embora com abundâncias muito pequenas. Organismos que não são capazes de oxidar amônia compõem esse grupo, geralmente encontrado em ambientes ácidos (pH 5) (Lehtovirta, Prosser & Nicol, 2009; Weber et al., 2015). Uma hipótese de contaminação ou artefato foi debatida, mas parece improvável, pois, sequências de Thaumarchaeota não foram encontradas em outras amostras orais (saliva de pacientes com doenças periodontais) que foram manipuladas concomitantemente (dados não mostrados). Estes iniciadores tendem a não identificar sequências de archaeas do filo Euryarchaeota que foram identificadas com os iniciadores 109F / 915R na mesma amostra. Embora a estratégia de clonagem

tenha resultado na detecção de mais organismos em cárie dentária, deve-se escolher um par de primers mais apropriado para identificar o DNA de archaeas por sequenciamento de alto rendimento, evitando o viés de diversidade adicionado pelo método de clonagem. O uso de tecnologias de sequenciamento de última geração para sequenciar os *amplicons* do gene 16S rRNA, como a plataforma Ion PGM, pode fornecer ainda mais informações sobre a diversidade de *Archaea*. A detecção de *Archaea* é altamente dependente da seleção de primers e do *pipeline* de processamento de sequências usado (Koskinen et al., 2017). Assim, um par mais seletivo de *primers* para o domínio *Archaea* deve ser usado no futuro.

Proporções das sequências de archaeas estavam em todos os casos abaixo de 0,1% da microbiota total. Vianna et al. sugeriram que o tamanho da população de qualquer espécie não é uma medida apropriada para avaliar seu impacto ecológico e que algumas espécies “chave” em ambientes específicos podem ser relevantes para levá-lo à doença (Vianna et al., 2008). No entanto, este estudo piloto não pode afirmar que *Archaea* está envolvido em disbiose causando cárie dentária, mas nossos resultados indicam que membros desse domínio podem ser detectados nesse ambiente.



## CONCLUSÃO

Em conclusão, nossos dados atenderam ao objetivo principal desse estudo ao detectar que membros do domínio *Archaea* em amostras de cárie dentária, visto que conseguimos identificar sequências do gene rRNA 16S associadas a membros do grupo 1.1b do filo Thaumarchaeota e archaeas metanogênicas, quando o par de iniciadores 109F / 915R foi usado. Níveis detectáveis de sequências do grupo 1.1c de Thaumarchaeota foram encontrados em amostras cariosas e em amostras de biofilme coletadas em superfície hígida, com proporções semelhantes, usando o par de iniciadores 515F / 806R. A detecção de sequências afiliadas a Thaumarchaeota sugere que a diversidade global de archaeas na cavidade oral humana poderia estar atualmente subestimada e não restrita a metanogênicos. Embora os dados sejam preliminares, nossos resultados sugerem que archaeas estão presentes na cárie dentária, sendo necessário ampliar a quantidade de amostras analisadas para maior validação de nossa descoberta. A integração da taxonomia e do perfil funcional de *Archaea* na cárie dentária, antes despercebida, pode ajudar a revelar a contribuição de vários táxons para importantes vias metabólicas específicas da saúde ou da doença.

## REFERÊNCIAS

- Bates, S. T., Berg-Lyons, D., Caporaso, J. G., Walters, W. A., Knight, R., & Fierer, N. (2011). Examining the global distribution of dominant archaeal populations in soil. *ISME J*, 5(5), 908-917.
- Bik, E. M., Eckburg, P. B., Gill, S. R., Nelson, K. E., Purdom, E. A., Francois, F., . . . Relman, D. A. (2006). Molecular analysis of the bacterial microbiota in the human stomach. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(3), 732-737.
- Blaser, M. J. (2014). The microbiome revolution. *The Journal of clinical investigation*, 124(10), 4162-4165.
- Caporaso, J. G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F. D., Costello, E. K., . . . Knight, R. (2010). QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods*, 7(5), 335-336.
- Cole, J. R., Wang, Q., Fish, J. A., Chai, B., McGarrell, D. M., Sun, Y., . . . Tiedje, J. M. (2014). Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Res*, 42(Database issue), D633-642.
- Ding, T., & Schloss, P. D. (2014). Dynamics and associations of microbial community types across the human body. *Nature*, 509(7500), 357.
- Edgar, R. (2016). UCHIME2: improved chimera prediction for amplicon sequencing. *bioRxiv*.
- Edgar, R. C. (2010). Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics*, 26(19), 2460-2461.
- Efenberger, M., Agier, J., Pawzowska, E., & Brzezińska-Blaszczyk, E. (2015). Archaea prevalence in inflamed pulp tissues. *Central European Journal of Immunology*, 40(2), 194-200.
- Forterre, P., Brochier, C., & Philippe, H. (2002). Evolution of the Archaea. *Theoretical population biology*, 61(4), 409-422.
- Grosskopf, R., Janssen, P. H., & Liesack, W. (1998). Diversity and structure of the methanogenic community in anoxic rice paddy soil microcosms as examined by cultivation and direct 16S rRNA gene sequence retrieval. *Appl Environ Microbiol*, 64(3), 960-969.

- Horz, H. P., Robertz, N., Vianna, M. E., Henne, K., & Conrads, G. (2015). Relationship between methanogenic archaea and subgingival microbial complexes in human periodontitis. *Anaerobe*, 35(Pt A), 10-12.
- Huynh, H. T. T., Verneau, J., Levasseur, A., Drancourt, M., & Aboudharam, G. (2016). Bacteria and archaea paleomicrobiology of the dental calculus: a review. *Mol Oral Microbiol*, 31(3), 234-242.
- Kassebaum, N., Bernabé, E., Dahiya, M., Bhandari, B., Murray, C., & Marcenes, W. (2015). Global burden of untreated caries: a systematic review and metaregression. *Journal of dental research*, 94(5), 650-658.
- Kilian, M., Chapple, I., Hannig, M., Marsh, P., Meuric, V., Pedersen, A., . . . Zaura, E. (2016). The oral microbiome—an update for oral healthcare professionals. *British Dental Journal*, 221(10), 657.
- Kim, M., Oh, H.-S., Park, S.-C., & Chun, J. (2014). Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 64(2), 346-351.
- Koskinen, K., Pausan, M. R., Perras, A. K., Beck, M., Bang, C., Mora, M., . . . Moissl-Eichinger, C. (2017). First Insights into the Diverse Human Archaeome: Specific Detection of Archaea in the Gastrointestinal Tract, Lung, and Nose and on Skin. 8(6).
- Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol*, 33(7), 1870-1874.
- Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., . . . Higgins, D. G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23(21), 2947-2948.
- Lehtovirta, L. E., Prosser, J. I., & Nicol, G. W. (2009). Soil pH regulates the abundance and diversity of Group 1.1c Crenarchaeota. *FEMS Microbiol Ecol*, 70(3), 367-376.
- Li, C. L., Jiang, Y. T., Liu, D. L., Qian, J., Liang, J. P., & Shu, R. (2014). Prevalence and quantification of the uncommon Archaea phylotype Thermoplasmata in chronic periodontitis. *Arch Oral Biol*, 59(8), 822-828.

- Li, C. L., Liu, D. L., Jiang, Y. T., Zhou, Y. B., Zhang, M. Z., Jiang, W., . . . Liang, J. P. (2009). Prevalence and molecular diversity of Archaea in subgingival pockets of periodontitis patients. *Oral Microbiol Immunol*, 24(4), 343-346.
- Lima, V., Bezerra, M. M., Leitão, R. F. d. C., Brito, G. A. d. C., Rocha, F. A. C. d., & Ribeiro, R. d. A. (2008). Principais mediadores inflamatórios envolvidos na fisiopatologia da Periodontite—Papel de Moduladores Farmacológicos. *R Periodontia*, 18(3), 7-19.
- Lü, Z., & Lu, Y. (2012). *Methanocella conradii* sp. nov., a thermophilic, obligate hydrogenotrophic methanogen, isolated from Chinese rice field soil. *PloS one*, 7(4), e35279.
- Marsh, P. D. (1994). Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. *Advances in dental research*, 8(2), 263-271.
- Marsh, P. D. (2003). Are dental diseases examples of ecological catastrophes? *Microbiology*, 149(Pt 2), 279-294.
- Marsh, P. D. (2010). Microbiology of dental plaque biofilms and their role in oral health and caries. *Dent Clin North Am*, 54(3), 441-454.
- Matarazzo, F., Ribeiro, A. C., Faveri, M., Taddei, C., Martinez, M. B., & Mayer, M. P. A. (2012). The domain Archaea in human mucosal surfaces. *Clin Microbiol Infect*, 18(9), 834-840.
- Matarazzo, F., Ribeiro, A. C., Feres, M., Faveri, M., & Mayer, M. P. (2011). Diversity and quantitative analysis of Archaea in aggressive periodontitis and periodontally healthy subjects. *J Clin Periodontol*, 38(7), 621-627.
- Nascimento, M., Liu, Y., Kalra, R., Perry, S., Adewumi, A., Xu, X., . . . Burne, R. (2013). Oral arginine metabolism may decrease the risk for dental caries in children. *Journal of dental research*, 92(7), 604-608.
- Nascimento, M. M., & Burne, R. A. (2014). Caries prevention by arginine metabolism in oral biofilms: translating science into clinical success. *Current Oral Health Reports*, 1(1), 79-85.
- Nyvad, B., & Baelum, V. (2018). Nyvad Criteria for Caries Lesion Activity and Severity Assessment: A Validated Approach for Clinical Management and Research. *Caries Res*, 52(5), 397-405.

- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., . . . Glöckner, F. O. (2013). The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res*, 41(Database issue), D590-596.
- Schlafer, S., & Meyer, R. L. (2017). Confocal microscopy imaging of the biofilm matrix. *Journal of microbiological methods*, 138, 50-59.
- Schloss, P. D., Westcott, S. L., Ryabin, T., Hall, J. R., Hartmann, M., Hollister, E. B., . . . Weber, C. F. (2009). Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol*, 75(23), 7537-7541.
- Schmieder, R., & Edwards, R. (2011). Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. *Bioinformatics*, 27(6), 863-864.
- Schreiber, F., Stief, P., Gieseke, A., Heisterkamp, I. M., Verstraete, W., de Beer, D., & Stoodley, P. (2010). Denitrification in human dental plaque. *BMC biology*, 8(1), 24.
- Scofield, J., Michalek, S., Harber, G., Eipers, P., Morrow, C., & Wu, H. (2019). Dietary Nitrite Drives Disease Outcomes in Oral Polymicrobial Infections. *J Dent Res*, 98(9), 1020-1026.
- Siqueira, J. F., Jr., & Rocas, I. N. (2009). Distinctive features of the microbiota associated with different forms of apical periodontitis. *J Oral Microbiol*, 1.
- Smalla, K., Cresswell, N., Mendonca-Hagler, L., Wolters, A., & van Elsas, J. (1993). Rapid DNA extraction protocol from soil for polymerase chain reaction-mediated amplification. *Journal of Applied Bacteriology*, 74(1), 78-85.
- Stahl, D., & Amann, R. (1998). *Development and application of nucleic acid probes in bacterial systematics*. In *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. Stackebrandt E. and Goodfellow M. (pp. 205–248). New York, NY, USA: John Wiley and Sons
- Taqi, Muhammad, Ishak Abdul Razak, and AB-Murat Norintan. "Comparing dental caries status using Modified International Caries Detection and Assessment System (ICDAS) and World Health Organization (WHO) indices

- among school children of Bhakkar, Pakistan." *JPM* (2019).
- Tourna, M., Stieglmeier, M., Spang, A., Könneke, M., Schintlmeister, A., Urich, T., . . . Richter, A. (2011). Nitrososphaera viennensis, an ammonia oxidizing archaeon from soil. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(20), 8420-8425.
- Verma, D., Garg, P. K., & Dubey, A. K. (2018). Insights into the human oral microbiome. *Arch Microbiol*, 200(4), 525-540.
- Vianna, M. E., Conrads, G., Gomes, B. P., & Horz, H. P. (2006). Identification and quantification of archaea involved in primary endodontic infections. *J Clin Microbiol*, 44(4), 1274-1282.
- Vianna, M. E., Conrads, G., Gomes, B. P. F. A., & Horz, H. P. (2009). T-RFLP-based mcrA gene analysis of methanogenic archaea in association with oral infections and evidence of a novel Methanobrevibacter phylotype. *Oral Microbiology and Immunology*, 24(5), 417-422.
- Vianna, M. E., Holtgraewe, S., Seyfarth, I., Conrads, G., & Horz, H. P. (2008). Quantitative analysis of three hydrogenotrophic microbial groups, methanogenic archaea, sulfate-reducing bacteria, and acetogenic bacteria, within plaque biofilms associated with human periodontal disease. *J Bacteriol*, 190(10), 3779-3785.
- Weber, E. B., Lehtovirta-Morley, L. E., Prosser, J. I., & Gubry-Rangin, C. (2015). Ammonia oxidation is not required for growth of Group 1.1 c soil Thaumarchaeota. *FEMS microbiology ecology*, 91(3), fiv001.

## ANEXOS

## NORMAS DA REVISTA

Article structure Manuscript Structure Follow this order when typing manuscripts: Title, Authors, Affiliations, Abstract, Keywords, Main text (Introduction, Materials & Methods, Results, Discussion for an original paper), Acknowledgments, Appendix, References, Figure Captions and then Tables. Do not import the Figures or Tables into your text. The corresponding author should be identified with an asterisk and footnote. All other footnotes (except for table footnotes) should be identified with superscript Arabic numbers.

**Introduction** This should be a succinct statement of the problem investigated within the context of a brief review of the relevant literature. Literature directly relevant to any inferences or argument presented in the Discussion should in general be reserved for that section. The introduction may conclude with the reason for doing the work but should not state what was done nor the findings.

**Materials and Methods** Enough detail must be given here so that another worker can repeat the procedures exactly. Where the materials and methods were exactly as in a previous paper, it is not necessary to repeat all the details but sufficient information must be given for the reader to comprehend what was done without having to consult the earlier work. Authors are requested to make plain that the conditions of animal and human experimentation are as outlined in the "Ethics" and

"Studies on Animals" sections above Results or Findings  
 These should be given clearly and concisely. Care should be taken to avoid drawing inferences that belong to the Discussion. Data may be presented in various forms such as histograms or tables but, in view of pressure on space, presentation of the same data in more than one form is unacceptable. Discussion This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is occasionally appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature. Conclusions The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion section.

Essential title page information

- Title. Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- Author names and affiliations. Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lowercase superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- Corresponding author. Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of



refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author. • Present/permanent address. If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes. As titles frequently stand alone in indexes, bibliographic journals etc., and indexing of papers is, to an increasing extent, becoming computerized from key words in the titles, it is important that titles should be as concise and informative as possible. Thus the animal species to which the observations refer should always be given and it is desirable to indicate the type of method on which the observations are based, e.g. chemical, bacteriological, electron-microscopic, histochemical, etc. A "running title" of not more than 40 letters and spaces must also be supplied. A keyword index must be supplied for each paper. Highlights Highlights are mandatory for this journal as they help increase the discoverability of your article via search engines. They consist of a short collection of bullet points that capture the novel results of your research as well as new methods that were used during the study (if any). Please have a look at the examples here: [example Highlights](#). Highlights should be submitted

in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). Structured abstract

The paper should be prefaced by an abstract aimed at giving the entire paper in miniature. Abstracts should be no longer than 250 words and should be structured as per the guidelines published in the Journal of the American Medical Association (JAMA 1995; 273: 27-34). In brief, the abstract should be divided into the following sections: (1) Objective; (2) Design - if clinical, to include setting, selection of patients, details on the intervention, outcome measures, etc.; if laboratory research, to include details on methods; (3) Results; (4) Conclusions.

**Keywords** Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using British spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

**Abbreviations** As Archives of Oral Biology is a journal with a multidisciplinary readership, abbreviations, except those universally understood such as mm, g, min. u.v., w/v and those listed below, should be avoided if possible. Examples of abbreviations which may be used without definition are: ADP, AMP, ATP, DEAEcellulose, DNA, RNA, EDTA, EMG, tris.

**AUTHOR** Other abbreviations used to improve legibility should be listed as a footnote on the title page as well as being defined in both the abstract and the main text on first

usage. Chemical symbols may be used for elements, groups and simple compounds, but excessive use should be avoided. Abbreviations other than the above should not be used in titles and even these should be avoided if possible.

**Acknowledgements** Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.) but who did not meet all the criteria for authorship (see Authorship section above).

**Formatting of funding sources** List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements: Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa]. It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding. If no funding has been provided for the research, please include the following sentence: This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

**Bacterial nomenclature** Organisms should be referred to by their scientific names according to the binomial system. When

first mentioned the name should be spelt in full and in italics. Afterwards the genus should be abbreviated to its initial letter, e.g. '*S. aureus*' not 'Staph. aureus'. If abbreviation is likely to cause confusion or render the intended meaning unclear, the names of microbes should be spelt in full. Only those names which were included in the Approved List of Bacterial Names, Int J Syst Bacteriol 1980; 30: 225-420 and those which have been validly published in the Int J Syst Bacteriol since 1 January 1980 have standing in nomenclature. If there is good reason to use a name that does not have standing in nomenclature, the names should be enclosed in quotation marks and an appropriate statement concerning the nomenclatural status of the name should be made in the text (for an example see Int J Syst Bacteriol 1980; 30: 547-556). When the genus alone is used as a noun or adjective, use lower case Roman not italic, e.g. 'organisms were staphylococci' and 'streptococcal infection'. If the genus is specifically referred to use italics e.g. 'organisms of the genus *Staphylococcus*'. For genus in plural, use lower case roman e.g. '*salmonellae*'; plurals may be anglicized e.g. '*salmonellas*'. For trivial names, use lower case Roman e.g. '*meningococcus*'

Artwork Image manipulation

Whilst it is accepted that authors sometimes need to manipulate images for clarity, manipulation for purposes of deception or fraud will be seen as scientific ethical abuse and will be dealt with accordingly. For graphical images, this journal is applying the following policy: no specific feature within an image may be enhanced, obscured, moved, removed, or introduced. Adjustments

of brightness, contrast, or color balance are acceptable if and as long as they do not obscure or eliminate any information present in the original. Nonlinear adjustments (e.g. changes to gamma settings) must be disclosed in the figure legend.

Electronic artwork General points • Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork. • Embed the used fonts if the application provides that option. • Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar. • Number the illustrations according to their sequence in the text.

- Use a logical naming convention for your artwork files. • Provide captions to illustrations separately. • Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version. • Submit each illustration as a separate file. A detailed guide on electronic artwork is available. You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format. Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below): EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts. TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi. TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of

1000 dpi. TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi. Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Illustration services Elsevier's Author Services offers Illustration Services to authors preparing to submit a manuscript but concerned about the quality of the images accompanying their article. Elsevier's expert illustrators can produce scientific, technical and medical-style images, as well as a full range of charts, tables and graphs. Image 'polishing' is also available, where our illustrators take your image(s) and improve them to a professional standard. Please visit the website to find out more.

Tables Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

Data references This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data

repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

**Reference management software** Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support Citation Style Language styles, such as Mendeley. Using citation plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide.

If you use reference management software, please ensure that you remove all field codes before submitting the electronic manuscript. More information on how to remove field codes from different reference management software.

**Reference style** Text: Citations in the text should follow the referencing style used by the American Psychological Association. You are referred to the Publication Manual of the American Psychological Association, Sixth Edition, ISBN 978-1-4338-0561-5, copies of which may be ordered online or APA Order Dept., P.O.B. 2710, Hyattsville, MD 20784, USA or APA, 3 Henrietta Street, London, WC3E 8LU, UK. List: references should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More

than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples: Reference to a journal publication: Van der Geer, J., Hanraads, J. A. J., & Lupton, R. A. (2010). The art of writing a scientific article. *Journal of Scientific Communications*, 163, 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.Sc.2010.00372>. Reference to a journal publication with an article numb