

STREPTOCOCCUS MUTANS E SEU METABOLISMO A NÍVEL MOLECULAR NO CONTEXTO ECOLÓGICO DA DOENÇA CÁRIE

Streptococcus mutans and its metabolism at the molecular level in the ecological context of dental caries

 Patrícia Fernanda Silva Bittencourt^a
 Cecília de Brito Barbosa^a
 Nailê Damé-Teixeira^a

RESUMO

Objetivo: Durante décadas, o *Streptococcus mutans* foi considerado o principal agente etiológico da doença cárie. Esta revisão apresentará seu histórico e metabolismo a nível molecular. Ao entender as vias metabólicas do *S.mutans* envolvidas no desenvolvimento de lesões cárias, será possível desenvolver novos métodos de modulação de biofilmes no controle da doença cárie e elucidar a necessidade de continuar pesquisando essa bactéria. **Revisão de literatura:** Embora o *S. mutans* não constitua uma proporção significativa na colonização da microbiota bucal da dentição hígida, essa proporção aumenta quando há acidificação contínua do biofilme, associada ao excesso de carboidratos na dieta do hospedeiro. Isso ocorre devido a um conjunto de fatores de virulência, tais como, adesão, formação de biofilme, acidogenicidade, aciduricidade, atividades de proteases, produção de mutacinas e vias de transdução de sinal. Cada uma dessas propriedades, coordenadamente, alteram a ecologia do biofilme dental. **Discussão:** Ainda é relevante entender o metabolismo do *S. mutans* como microrganismo modelo em lesões cárias devido a seus inúmeros fatores de virulência. Porém, no contexto da doença cárie como uma disbiose, estratégias terapêuticas antimicrobianas, mais especificamente anti-*S. mutans*, voltadas para a eliminação do microrganismo, podem não ser a chave do controle da doença cárie, enquanto a modulação do microbioma poderá se tornar o futuro das clínicas odontológicas. **Conclusão:** Biofilmes associados a doença cárie compreendem um ecossistema diverso, sugerindo uma etiologia polimicrobiana, porém, estudos futuros que visem à prospecção, ao desenvolvimento e à inter-relação do *S. mutans* com outros microrganismos e

ABSTRACT

Aim: For decades, the *Streptococcus mutans* was considered the main agent of caries. This review will show its history and metabolism at the molecular level. By understanding its metabolic pathways involved in the development of carious lesions, it can be possible to develop new methods of modulating biofilms in the control of caries, as well as to elucidate the need to continue researching this bacterium. **Literature review:** Although *S. mutans* does not constitute a significant proportion in the colonization of the oral microbiota of the sound dentition, its proportion increases when there is continuous acidification of the biofilm, associated with excess carbohydrates in the host diet. This is due to a set of virulence factors, such as adhesion, biofilm formation, acidogenicity, aciduricity, proteases activity, mutacins production and signal transduction pathways. Each of these properties coordinately alters the ecology of the dental biofilm. **Discussion:** It is still relevant to understand the metabolism of *S. mutans* as a model microorganism in carious lesions due to its numerous virulence factors. However, in the context of caries as a dysbiosis, antimicrobial therapeutic strategies, more specifically anti-*S.mutans*, aiming to eliminate the microorganism, may not be the key to caries control, and the microbiome modulation may become the future of dental clinics. **Conclusion:** Biofilms associated with caries disease comprise a diverse ecosystem, suggesting a polymicrobial etiology, however, future studies aimed at the prospection, development and interrelationship of *S. mutans* with other microorganisms and with the human host are

^aSchool of Health Sciences, Department of Dentistry, UnB, Brasília, DF, Brazil

Autor de correspondência: Cecília de Brito Barbosa – E-mail: ceciliadebrito0509@gmail.com

Data de envio: 30/09/2021 | **Data de aceite:** 11/04/2022

com o hospedeiro humano ainda são justificados a fim de desvendar a transição 'homeostase-disbiose'.

still justified in order to unravel the 'homeostasis-dysbiosis' transition.

Palavras-chave: *Streptococcus mutans*. Metabolismo. Cárie dentária. Microbiota. Fatores de virulência.

Keywords: *Streptococcus mutans*. Metabolism. Dental caries. Microbiota. Virulence factors.

INTRODUÇÃO

O corpo humano e seu microbioma são capazes de conviver em equilíbrio e simbiose e, por isso, tem sido entendido como um "superorganismo". Porém, até pouco tempo, era atribuído ao microbioma humano uma percepção dualista de bem e mal, onde espécies específicas estariam envolvidas no desenvolvimento de doenças do hospedeiro humano. A detecção e a eliminação desses microrganismos específicos seriam essenciais para controle de tais doenças¹. Dentre esses microrganismos, o *Streptococcus mutans* se destacou como odontopatógeno e principal agente etiológico da cárie. Por esse motivo, diversas estratégias diagnósticas, preventivas e terapêuticas eram direcionadas contra essa bactéria no tratamento de doença cárie^{2,3}.

Porém, a microbiota associada a cárie é composta por um ecossistema extraordinariamente diverso, no qual outras bactérias também possuem potencial para causar a desmineralização da estrutura dentária⁴. O próprio *S. mutans* foi isolado em indivíduos saudáveis, tanto no biofilme quanto na saliva, apesar do seu enriquecimento estar associado a cárie⁵. Por esses motivos, em 1994, foi proposto que a doença cárie seria caracterizada como uma disbiose, ou seja, um desequilíbrio ecológico causado pelo consumo inadequado de açúcar. Essa é a teoria ecológica da cárie⁶, que explica que o biofilme em desequilíbrio, e não apenas a presença de um odontopatógeno, estaria envolvido no processo cariioso. Nesse novo contexto, estratégias de tratamentos individualizados deveriam ser projetadas com a finalidade de moldar o microbioma bucal para manutenção da homeostase, de forma a permitir que o hospedeiro viva com seus microrganismos uma relação de equilíbrio dinâmico⁷.

Contudo, os achados sobre os fatores de virulência do *S. mutans* reforçam a necessidade de entender seu metabolismo e elucidar os diversos mecanismos envolvidos em sua patogenicidade. Embora o *S. mutans* apresente vantagens competitivas dentro do biofilme cariogênico, entender sua interação com o restante da microbiota ainda pode ser essencial para o entendimento do processo cariioso. Nesta revisão, iremos narrar a história desse microrganismo e seu metabolismo a nível molecular. Talvez, ao entender suas vias metabólicas principais, envolvidas com o desenvolvimento de lesões cariosas, possa-se refletir sobre novos métodos de modulação de biofilmes ecológicos, como a partir do uso de prébióticos/probióticos no controle da doença cárie.

REVISÃO DA LITERATURA

O *Streptococcus mutans* foi isolado, em 1924, por J. Clarke⁸, que inicialmente o chamou de estreptococos mutantes, por suas células serem de forma ovalada e diferirem dos outros estreptococos já conhecidos⁹. Estudos taxonômicos revelaram que tratava-se de um microrganismo pertencente ao filo Firmicutes, em formato de coco, Gram-positivo, anaeróbio facultativo e catalase-negativo¹⁰. A maioria das cepas isoladas é α -hemolítica ou não-hemolítica e podem ser encontradas em quatro sorotipos: c, e, f e k^{10,11}. A classificação sorológica de *S. mutans* baseia-se na estrutura do polissacarídeo ramnose-glicose da parede celular bacteriana, com aproximadamente 75% das cepas isoladas da placa dentária pertencentes ao sorotipo c, 20% para o sorotipo e, e os 5% restantes classificados como sorotipos f ou k¹².

Embora abordagens bioquímicas e genéticas para dissecar a biologia de *S. mutans* sejam aplicadas há pelo menos quatro décadas, a publicação da sequência completa do genoma da cepa de *S. mutans* UA159¹³ forneceu informações mais completas sobre sua adaptação de sobrevivência no ambiente bucal, defesa contra fatores do hospedeiro e uso de produtos genéticos que mantêm seu nicho contra concorrentes microbianos. Sequências completas dos genomas de dezenas de cepas de *S. mutans* têm sido disponibilizadas em bancos de dados públicos, como o *National Center for Biotechnology Information* (NCBI)¹⁴. Esse influxo de sequências genômicas levou a um aumento de estudos genômicos comparativos focados em *S. mutans*¹⁵⁻¹⁸. Um dos primeiros estudos, baseado na sequência do genoma de 57 isolados clínicos de *S. mutans* geograficamente e temporalmente diversos, concluiu que o pan-genoma (conjunto de todos genes essenciais e dispensáveis disponíveis) de *S. mutans* contém aproximadamente 3.296 genes possíveis, enquanto cerca de 1.490 genes são comuns a todas as cepas¹⁹. Esse mesmo estudo demonstrou que a população de *S. mutans* aumentou 4,8 a 5,5 vezes desde a origem da agricultura, ao utilizar estratégias adaptativas por recombinação genética em 14 genes relacionados à seleção positiva, em sua maioria envolvida no metabolismo do açúcar ou na tolerância ácida¹⁹.

Em um estudo que avaliou a caracterização fenotípica, ou seja, baseada em descritores morfofisiológicos²⁰, foi encontrada uma grande variação relacionada à virulência, incluindo a capacidade de formar biofilme na presença de sacarose e a capacidade de tolerar baixo pH e estresse oxidativo. Sugere-se, então, que nem todas as cepas de *S. mutans* são igualmente virulentas. Por esse motivo, as tentativas de correlacionar certos genótipos (entende-se que genótipos iguais apresentam a mesma composição genética) de *S. mutans* com a incidência de doença cárie se mostraram tão difíceis¹⁵⁻²¹.

Fatores de Virulência de *Streptococcus mutans*

Um conjunto de fatores de virulência é conhecido para que o *S. mutans* se torne capaz de colonizar e de aumentar em proporção no biofilme cariogênico, os quais residem em três atributos principais: 1) a capacidade de sintetizar grandes quantidades de polímeros extracelulares de glucano; 2) a capacidade de transportar (internalização do açúcar para o interior da célula) e metabolizar uma ampla gama de carboidratos em ácidos orgânicos (acidogenicidade); e 3) a capacidade de crescer sob condições de estresse ambiental, particularmente baixo pH (aciduricidade)²². Há também outras menos estudadas, como as atividades de proteases, a produção de mutacinas e a via de transdução de sinal (sistema de transdução de sinal de dois componentes e *quorum sensing*). Cada uma dessas propriedades, coordenadamente, alteram a ecologia do biofilme dental¹⁴ e algumas podem estar associadas ao desenvolvimento da cárie radicular²³. As subseções a seguir descreverão cada um dos fatores de virulência identificados na literatura.

Adesão à Superfície Dentária e Formação de Biofilme

A adesão de *S. mutans* às superfícies dentárias constitui o passo inicial da colonização e subsequente formação de biofilme. Pode ser mediada por meios independentes de sacarose e sacarose-dependentes. A adesão independente da sacarose aos componentes salivares presentes na película adquirida pode iniciar o processo de fixação, envolvendo proteínas de superfície da família de adesinas *spaP*, também chamadas de antígenos I e II (AgI/II) ou de P1, as quais se ligam a componentes da película salivar, como por exemplo às aglutininas salivares, e a outras bactérias do biofilme²⁴. Porém, a adesão dependente da sacarose parece ser a principal responsável pelo estabelecimento da colonização do *S. mutans* na superfície dentária²⁵, a partir de glucosiltransferases (Gtfs). Essas enzimas hidrolisam a sacarose em glicose e frutose e polimerizam as moléculas de glicose liberadas, formando polissacarídeos extracelulares (PEC) denominados glucanos²⁶.

Diversos tipos de glucano são produzidos e variam na solubilidade em água, dependendo do tipo e da proporção das ligações entre as moléculas de glicose. Os glucanos insolúveis em água são aqueles em que prevalecem as ligações do tipo α -(1-3) e são considerados os mais importantes na formação de uma matriz extracelular insolúvel, essencial para o acúmulo de *S. mutans* no biofilme^{27,28}. Já os glucanos solúveis, ricos em ligações tipo α -(1-6), parecem funcionar como um reservatório extracelular de açúcares, sendo hidrolisado por outras exoenzimas, denominadas dextranases²⁹. A GtfB catalisa a síntese de glucanos ricos em ligações do tipo α -(1-3), também chamados de mutanos. A GtfC catalisa a síntese de glucanos com os dois tipos de ligações, α -(1-3) e α -(1-6). Por fim, a GtfD catalisa a síntese de glucanos com ligações α -(1-6), também chamados de dextranos³⁰.

A síntese de frutanos também ocorre extracelularmente a partir da ligação de moléculas de frutose liberadas pela hidrólise da sacarose. Os frutanos são sintetizados pela enzima frutossiltransferase (Ftf), a qual é codificada pelo gene *sacB*³⁰. Embora demonstre-se que o frutano possa contribuir para a formação de biofilme ao interagir com o glucano³¹, os frutanos são solúveis em água e, portanto, seu papel na formação da matriz extracelular de PEC é limitado. Acredita-se que o principal papel dos frutanos na virulência de *S. mutans* seja o fato de atuarem como reservatórios extracelulares de substratos, durante os períodos de escassez de nutrientes. Assim, exoenzimas do tipo frutanases, também sintetizadas por *S. mutans* e codificadas pelo gene *fruA*, hidrolisam estes polissacarídeos, para que os monossacarídeos de frutose sejam transportados para o interior das células e metabolizados³² (Figura 1A).

Outra importante proteína nesse processo de adesão chama-se proteína ligante de glucano (Gbp, de *glucan-binding protein*). O *S. mutans* produz pelo menos quatro tipos distintos de Gbps, sendo elas GbpA, GbpB, GbpC e GbpD. Por serem proteínas extracelulares, normalmente associadas à parede celular de *S. mutans*, acredita-se que as Gbps sejam importantes para o crescimento dessa bactéria na presença de sacarose, pois formam uma estrutura que liga as superfícies da célula à matriz extracelular de glucanos³³. Nesse cenário, a GbpB é considerada a mais associada à virulência de *S. mutans*³⁴.

O DNA extracelular (eDNA) que é gerado a partir de células lisadas de uma subpopulação da comunidade, demonstrou desempenhar um importante papel na manutenção de biofilmes maduros de *S. mutans*³⁵. Além dos polímeros de açúcar, o eDNA também exerce função importante no desenvolvimento do biofilme e acredita-se que esteja envolvido no fornecimento de substratos para as células adjacentes, na integridade e na manutenção da estrutura tridimensional de biofilmes e na troca de material genético. Parece que sua presença regula a expressão de adesinas e GbpB e C³⁶, conseqüentemente, influencia na capacidade de adesão do microrganismo.

Acidogenicidade

A espécie *S. mutans* é capaz de fermentar a maior variedade de carboidratos entre todas as espécies de bactérias Gram-positivas conhecidas até o momento. A velocidade de produção de ácido pelo *S. mutans*, quando testada em um pH na faixa de 7,0 a 5,0, excede a de outros estreptococos orais na maioria dos casos³⁷, podendo variar de um isolado para outro¹⁴. Portanto, a recuperação para um pH neutro é prolongada, favorecendo a alteração ecológica e conseqüente desmineralização da estrutura dentária³⁸.

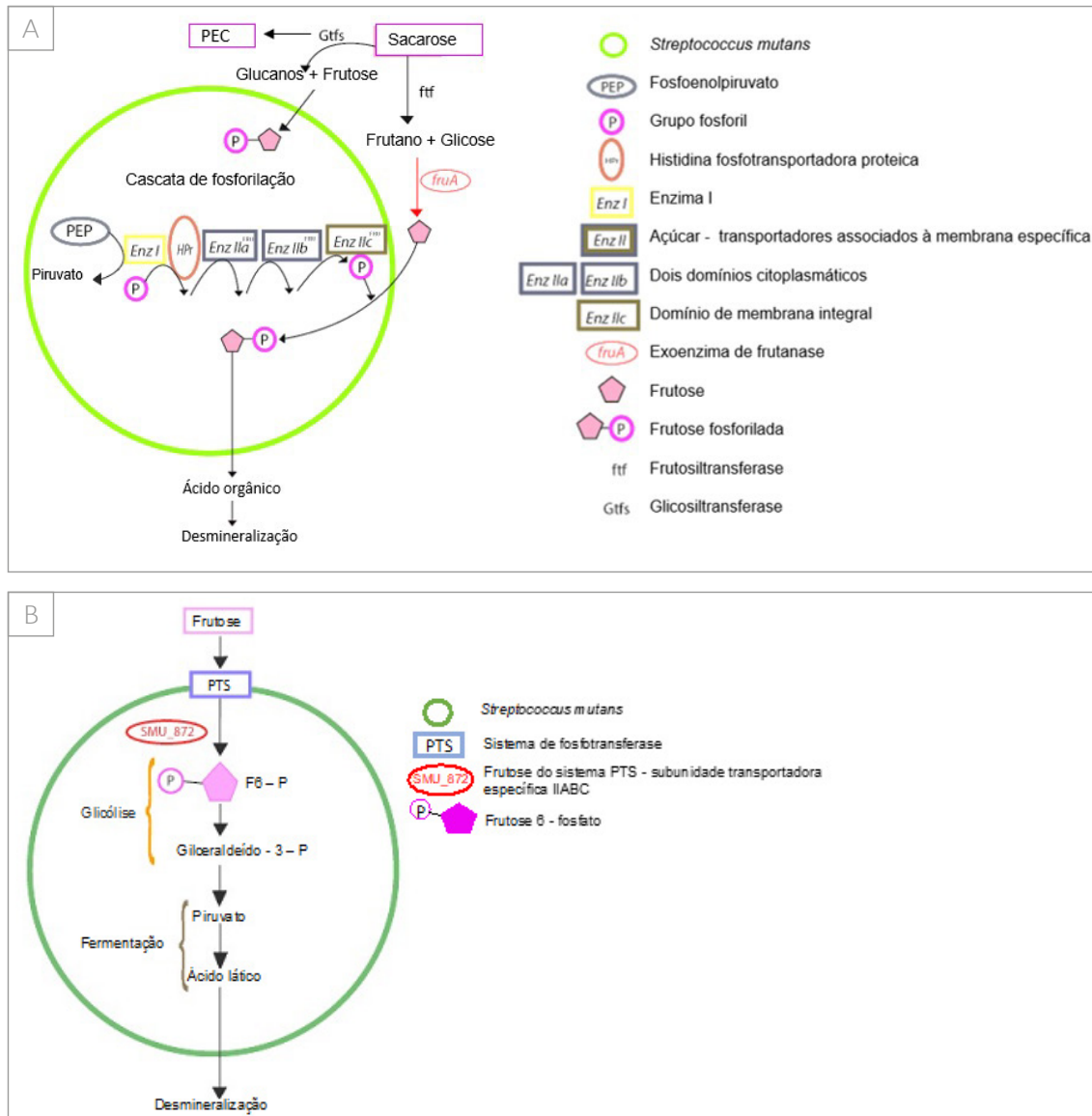
Uma via glicolítica completa foi demonstrada na cepa *S. mutans* UA159, levando à produção de piruvato, que é então reduzido, quando em excesso, a vários produtos de fermentação, sendo eles ácido láctico, formato, acetato e etanol¹³. Em condições de excesso de carboidratos, o ácido láctico é o produto final glicolítico predominante. Formato, acetato e etanol são produzidos principalmente sob condições de limitação de carboidratos³⁹. Devido ao seu baixo valor de pKa (constante de dissociação ácida), o ácido láctico é capaz de desmineralizar a es-

estrutura dentária de forma mais eficaz quando comparado a outros subprodutos glicolíticos⁴⁰. As enzimas responsáveis pelo metabolismo do piruvato incluem piruvato desidrogenase, piruvato formato-liase, fosfotransacetilase, acetato quinase, lactato desidrogenase, álcool desidrogenase e acetoína desidrogenase¹³.

Devido às drásticas variações nas concentrações de nutrientes disponíveis a partir da dieta do hospedeiro, as bactérias dos biofilmes dentais precisam se adaptar para enfrentarem esta condição de estresse. O genoma de *S. mutans* contém diversos maquinários enzimáticos para metabolismo de glicose, frutose, sacarose, lactose, galactose, manose, celobiose, β -glucosídeos, trealose, maltose/maltodextrose, rafinose, ribulose, melibiose, isomaltossacarídeos, amido e, possivelmente, sorbose. Como exemplo, dentre os agrupamentos de genes identificados para tal, o gene estrutural da pululanase, *pulA* (SMU.1535-1541) é o responsável pela síntese e degradação do amido. O *S. mutans* também é capaz de converter vários açúcares álcoois em intermediários glicolíticos, e genes para o metabolismo do sorbitol e manitol também estão presentes. Uma recente análise de bibliotecas metatranscriptômicas demonstrou o potencial uso de sorbitol por *S. mutans* como uma fonte adicional de carbono em doença cárie⁴¹.

Pelo menos 14 sistemas de transporte fosfotransferases (PTS, de *phosphotransferase system*) específicos para diferentes açúcares foram detectados (Figura 1). Os sistemas PTS consistem de duas proteínas inespecíficas (IIa e IIb) de transferência de energia, uma enzima I (SMU.675), uma proteína estável ao calor (HPr, de *heat-stable protein*; SMU.674) e uma enzima II, permease específica, para o açúcar a ser transportado (IIc). Essa cepa também possui proteínas putativas de efluxo de carboidratos para o transporte ativo de intermediários de açúcar que precisam ser excretados. Apesar da maioria dos açúcares ser transportada pelos sistemas PTS, *S. mutans* apresenta cinco sistemas de transporte do tipo ABC (*ATP-binding cassette*)¹³, incluindo-se o sistema de metabolismo de múltiplos açúcares (MSM, de *multiple sugar metabolism*)⁴². Os mecanismos de transporte de tais compostos dependem do tamanho das cadeias orgânicas de polissacarídeos, dos tipos de unidades que as compõem e do tipo de ligações entre elas⁴². Durante o sistema de transporte do tipo ABC, o substrato é transportado para o citoplasma através do canal da proteína transportadora, sendo necessária a energia gerada pela hidrólise de adenosina trifosfato (ATP)¹³.

Figura 1: Ilustração do sistema de transporte de frutose PTS em *Streptococcus mutans* e sua relação com adesão e produção de ácido²⁶. A) Célula utiliza o frutano por meio da ação da exoenzima frutanase e pelo sistema de transporte fosfoenolpiruvato-açúcar fosfotransferase (PEP:PTS), onde ocorre a fosforilação e a absorção do frutano. O PTS é composto por dois sistemas de acoplamento de energia, designados Enzima I (Enz I) e proteína de HPr, e por um específico para açúcar ligado à membrana, denominado Enzima II (Enz II). O próprio Enz II consiste em três subunidades: Enz IIa e Enz IIb estão localizados no citoplasma, enquanto Enz IIc está localizado na membrana. O PTS usa fosfoenolpiruvato como doador de fosfato para fosforilar o carboidrato frutano envolvendo Enz I, HPr e Enz II. O frutano então ativa um PTS específico de frutose (Enz II Fru), que internaliza esse carboidrato, resultando na produção de ácido orgânico a partir de vias glicolíticas; B) Representação simplificada da internalização da frutose, mediada por um sistema fosfoenolpiruvato-frutose fosfotransferase. A proteína permease de frutose induzível, SMU_872, promove a catálise do transporte de frutose dependente de fosfoenolpiruvato, que é controlado pelo transporte conduzido por transferência de fosforil através da membrana plasmática. Após a internalização da frutose, a transformação desse carboidrato em ácidos orgânicos poderá contribuir para o desenvolvimento da cárie.



O *S. mutans* é capaz de sintetizar polissacarídeos intracelulares (PIC) a partir do excesso de açúcar disponível. Os PIC são polímeros do tipo glicogênio-amilopectina com dois tipos de ligações de glicose, α (1-4) e α (1-6), os quais funcionam como uma reserva de carboidratos e diminuem o estresse osmótico. Isso o torna ainda mais acidogênico, pois assim é capaz de produzir ácidos até em períodos em que não há disponibilidade de substrato pela dieta do hospedeiro. A síntese das reservas intracelulares de armazenamento de glicogênio envolve pelo menos três enzimas: glicogênio sintase, glicose-1-fosfato pirofosforilase e enzima ramificada. Os genes que as codificam são comumente encontrados no operon *glg*⁴³.

Aciduricidade

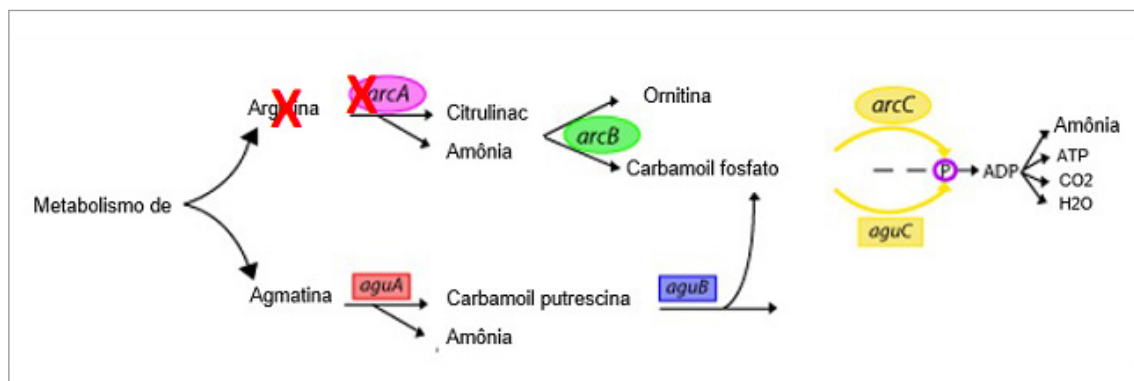
A acidificação do biofilme pelos produtos finais do metabolismo inibe o crescimento de muitas espécies bacterianas concorrentes, favorecendo o crescimento de *S. mutans* devido à sua aciduricidade⁴⁴. O *S. mutans* emprega vários mecanismos para lidar com condições de baixo pH. Enquanto alguns desses mecanismos são constitutivos, outros são induzíveis em resposta a um pH subletal de aproximadamente 5,5, que prepara a célula para sobrevivência a pH mais baixo, até mesmo de 3,0⁴⁰.





Uma das principais defesas do *S. mutans* contra o ácido é a sua própria membrana plasmática, pois pela ativação do gene *fabM*, seu perfil de ácidos graxos altera-se para incorporar mais ácidos graxos monoinsaturados, resultando em menor permeabilidade da membrana a prótons⁴⁵. Quando o ambiente se torna ácido, essa barreira permite que os organismos mantenham um citoplasma mais neutro em relação ao espaço extracelular. Embora os estreptococos não mantenham um pH intracelular fixo, o *S. mutans* procura manter um pH intracelular aproximadamente uma unidade de pH mais alta que a do ambiente extracelular, para evitar danos ao seu DNA e às enzimas sensíveis ao ácido.

A função de tolerância ácida de *S. mutans* é também baseada na importante presença de uma bomba translocadora de prótons H⁺, denominada F₀F₁ ATPase, estável em baixo pH e ligada à membrana celular. Tal via funciona para manter o pH intracelular por volta de 7,5⁴⁶. Todos os genes que codificam os componentes dessa F₀F₁ ATPase estão presentes em seu genoma¹³. Além desse mecanismo, a alcalinização do citoplasma ocorre através da geração de moléculas básicas para neutralizar prótons²².

Alguns estreptococos orais usam a via da arginina deiminase para sobreviver a uma diminuição do pH ambiental. Porém, embora a enzima arginina deiminase não tenha sido encontrada no genoma do *S. mutans*, foram identificadas outras enzimas dessa via, incluindo a ornitina carbamoiltransferase e a carbamato quinase (Figura 2), indicando que o *S. mutans* pode utilizar aminoácido, possivelmente a agmatina, para a conversão de prótons H⁺ em aminas¹³. O sistema agmatina deiminase (AgDS) converte agmatina em amônia, dióxido de carbono (CO₂), putrescina e ATP. Embora o AgDS (Figura 2) não pareça ter um impacto considerável sobre a alcalinização ambiental, a amônia gerada internamente parece contribuir para neutralização do pH citoplasmático, enquanto o ATP gerado pode ser usado para alimentar a bomba translocadora de prótons H⁺⁴⁷. A fermentação malolática (MLF) converte o L-malato em L-lactato e em CO₂. O produto de CO₂ pode então ser usado para a neutralização citoplasmática por conversão em bicarbonato, via anidrase carbônica. Em *S. mutans*, a transcrição dos genes *mle*, que codificam a enzima malolática, são induzíveis por ácido, e a atividade MLF foi considerada ideal a um pH extracelular de 4,0⁴⁸. Além disso, o malato mostrou poder contribuir para a aciduricidade de *S. mutans*, pois também foi associado à regeneração de ATP⁴⁹.

Figura 2: Ilustração do sistema agmatina deiminase (AgDS), relacionado ao processo metabólico de agmatina, descrito para *Streptococcus mutans*. Ausência do gene *arcA* sugere que o *S. mutans* não utiliza arginina. Porém, a agmatina é metabolizada pela via AgDI, que começa quando a agmatina entra na célula. Em seguida, a agmatina intracelular é convertida em carbamoil-putrescina e amônia. A próxima etapa é sua fosforólise, produzindo carbamoil fosfato e putrescina. Finalmente, a enzima carbamato quinase ArcC catalisa a transferência de fosfato para ADP, produzindo amônia, ATP, CO₂ e H₂O. A via AgDI aumenta a tolerância ao ácido, neutralizando o citoplasma, e o ATP gerado pode ser usado para crescimento e manutenção celular.



	Arginina desiminase
	Ornitina carbamoil transferase
	Carbamato quinase
	Agmatina desiminase
	Carbamoil transferase putrescina
	Carbamato quinase

O *S. mutans* também codifica um maquinário induzível por ácido para reparar o DNA e as proteínas degradadas danificadas por condições ácidas⁵⁰. As ligações glicosídicas de desoxirribonucleotídeos são instáveis sob condições ácidas, portanto o acúmulo de ácido dentro da célula pode causar perda de purinas e pirimidinas do DNA, o que resulta na formação de um sítio apurínico ou apirimidínico. Este evento ocorre devido à protonação da base nitrogenada e subsequente clivagem da ligação glicosil⁵¹. Os sítios apurínicos ou apirimidínicos serão reconhecidos e reparados por enzimas denominadas AP endonucleases⁵².

Chaperonas moleculares também são aumentadas em resposta a condições ácidas para evitar o acúmulo e a agregação de proteínas com configurações inapropriadas ao desempenho de suas tarefas, que podem resultar em toxicidade. Em *S. mutans*, em resposta a condições ácidas, são produzidas proteínas de choque térmico – HSP (do inglês *Heat Shock Proteins*). Essas proteínas pertencem a uma classe de chaperonas moleculares, as quais são proteínas responsáveis pelo correto dobramento de outras proteínas sintetizadas e pela prevenção da agregação proteica. São altamente conservadas, sugerindo uma grande importância evolutiva. Entre elas estão os sistemas DnaK e GroEL⁵³.

Todos os processos de tolerância a ácidos acima mencionados trabalham juntos para preservar a integridade da célula de *S. mutans*. Além do ácido, outras mudanças ambientais podem desencadear uma variedade de respostas adaptativas nesse organismo e a expressão de vários genes é afetada após a exposição ao estresse oxidativo, osmótico, térmico ou de inanição¹³.

Proteases

As proteases de *S. mutans* podem contribuir para a virulência e o que se sabe é que estão envolvidas na quebra das proteínas do hospedeiro para nutrição bacteriana e na degradação direta das proteínas estruturais do hospedeiro. Em geral, a cepa UA159 possui inúmeras proteases, incluindo as proteases Clp e FtsH dependentes de ATP, e possui pelo menos 15 peptidases, indicando que é capaz de usar os peptídeos gerados por essas proteases, bem como os de outras bactérias no biofilme¹³. Através da análise de sequência do genoma de *S. mutans*, várias proteases potencialmente envolvidas no processamento da superfície também foram identificadas. Dentre elas, encontra-se a serina HtrA, a qual ajuda os organismos a sobreviverem a estresses ambientais, como temperatura elevada, estresse oxidativo e osmótico, através da degradação de proteínas que perderam parcial ou totalmente sua funcionalidade na célula, garantindo assim a homeostase celular⁵⁴. Também foi identificada uma protease homóloga à HtpX de *Streptococcus gordonii*⁵⁵.

Além disso, foram identificadas três proteases dependentes de Zn (SMU.160, SMU.1438 e SMU.1784), duas proteases relacionadas à colagenase (SMU.759 e SMU.761), uma protease serina RgpF e uma protease de membrana (SMU.235) (13). Em *S. mutans*, acredita-se que as proteases desempenham um importante papel no desenvolvimento da cárie dentinária ou radicular.

Produção de Mutacinas

Devido ao grande número de espécies microbianas diferentes na cavidade oral⁵⁶, o *S. mutans* sofre uma grande concorrência para uma colonização bem sucedida e formação de biofilme na

superfície dentária. Esse processo é auxiliado pelos pequenos peptídeos catiônicos sintetizados no ribossomo da célula do *S. mutans*, chamados mutacinas⁵⁷. Foram identificados cinco tipos principais de mutacinas, as quais são codificadas pelos genes estruturais *mutAI*⁵⁸, *mutAII*⁵⁹, *mutAIII*⁶⁰, *mutAIV*^{61,62}, *smbA* e *smbB*⁶² e são geralmente divididas em duas categorias principais, lantibióticos e não-lantibióticos. Ambas categorias foram identificadas em *S. mutans*⁶³. As mutacinas tipo I, II, III e Smb, representantes da classe dos lantibióticos, apresentam potencial para serem utilizados em terapias antibióticas devido ao seu amplo espectro de ação contra patógenos Gram-positivos⁶⁴. A representante da classe dos não-lantibióticos é a mutacina tipo IV, a qual atua inibindo o crescimento dos colonizadores primários da superfície dentária favorecendo, desta forma, a instalação de *S. mutans*⁶¹.

A cepa *S. mutans* UA159 codifica pelo menos seis outros pequenos peptídeos com um alto grau de similaridade com mutacinas, e esses genes também mostraram ser regulados por CSP⁶³. As mutacinas, também chamadas de bacteriocinas, são capazes de inibir o crescimento de diversos microrganismos comensais competidores como *S. sanguinis*, *S. mitis*, *S. gordonii*, *S. oralis*, *S. sobrinus* e até mesmo outras cepas da espécie *S. mutans*. Apresentam importante vantagem ecológica no processo de colonização por *S. mutans*, mantendo-se estáveis na microbiota bucal do hospedeiro e favorecendo a transmissão intrafamiliar. Estudos sobre a transmissão de cepas de *S. mutans* das mães para os filhos sugerem que as cepas de *S. mutans* das mães com maior número de mutacinas produzidas são as mais frequentemente transmitidas para os filhos, quando comparadas a outras cepas da cavidade oral das mães com menor produção e diversidade de mutacinas⁶⁵.

Sistema de Transdução de Sinal de Dois Componentes

O sistema de transdução de sinal de dois componentes (SDC) desempenha um importante papel na adaptação de transcriptomas bacterianos em resposta aos estímulos do ambiente⁶⁶. A composição de um típico sistema de dois componentes inclui um receptor de membrana, normalmente uma histidina-quinase, e uma proteína reguladora intracelular denominada regulador de resposta. O genoma da cepa de *S. mutans* UA159 contém pelo menos 14 SDC completos e um regulador de resposta órfão, CovR, cujo receptor de membrana cognato (CovS) não foi identificado em nenhuma cepa desta espécie⁶⁷. Nessa bactéria, a maioria dos sinais detectados pelos receptores de membrana HKs dos 14 SDC permanece praticamente indefinida. Portanto, são necessários estudos adicionais sobre esses sistemas para aumentar nossa compreensão de como o *S. mutans* detecta e responde às mudanças ambientais. Provavelmente, o SDC melhor caracterizado seja o sistema de indução da competência, *quorum sensing*, presente em muitas espécies de estreptococos e que foi sugerido estar associado ao controle do desenvolvimento da competência genética em *S. mutans*.

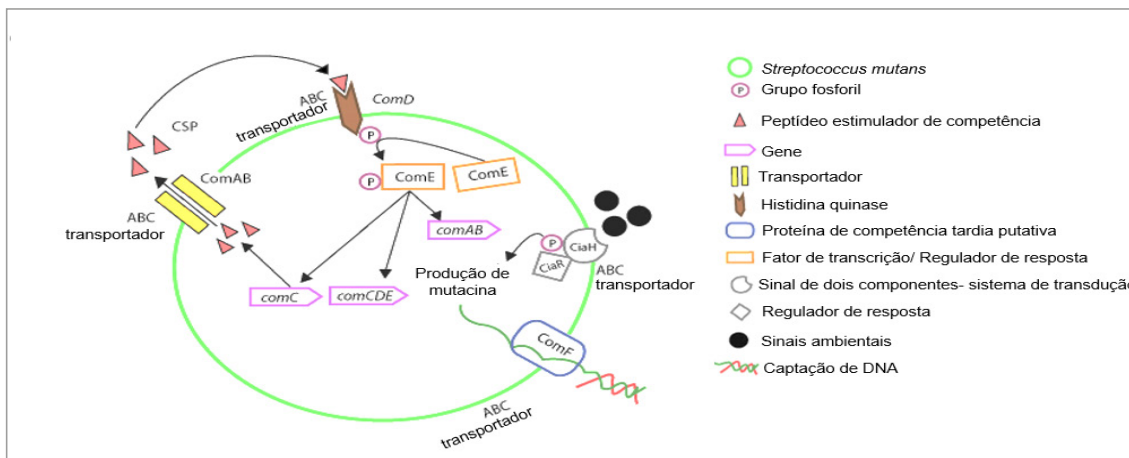
Quorum Sensing

Sabe-se que muitas bactérias regulam suas atividades cooperativas e processos fisiológicos através de um mecanismo chamado *quorum sensing* (Figura 3), no qual as células bacterianas comunicam-se liberando, detectando e respondendo a pequenas moléculas de sinais difusíveis. O *S. mutans* também utiliza este mecanismo, sendo capaz de avaliar as condições do ambiente e adaptar tanto sua fisiologia quanto seu comportamento. Em função dessa mudança, esse mecanismo de adaptabilidade é essencial na sobrevivência e persistência desse organismo⁶⁸.

Os genes que constituem este sistema de comunicação intercelular envolvem a produção e a translocação de pequenos peptídeos que, ao atingir concentrações ótimas no meio extracelular, ativam o receptor de membrana histidina-quinase, transmitindo um sinal intracelular que ativa a expressão de diversos genes envolvidos na captação de DNA extracelular, e também aqueles envolvidos na capacidade de responderem aos estímulos de pressão osmótica, diminuição de pH e outras condições de estresse⁶⁹. Em células de *S. mutans* esse sistema é controlado

por dois genes, *comCDE* e *comAB*. Os genes *comC*, *comD* e *comE* codificam o peptídeo indutor de competência CSP que se liga à membrana histidina-quinase ComD e resulta na autofosforilação e na ativação do regulador de resposta cognato ComE, que modifica e ativa o *sigX*, induzindo sua transcrição de modo a ativar a expressão de um conjunto específico de genes envolvidos na resposta adaptativa necessária, como para regular a produção de bacteriocina, a genética competência, a tolerância ao ácido e a formação de biofilme⁷⁰. Já a densidade celular, a disponibilidade de nutrientes e outras condições ambientais induzem a expressão do gene *comC* que irá codificar o precursor do peptídeo estimulador de competência (CSP). Assim, após a clivagem do pró-peptídeo CSP no interior da célula, o transportador ABC específico pelo qual o pró-peptídeo CSP será transportado para o meio extracelular será codificado pelos genes *comA* e *comB*. Ao atingir um certo limite, o CSP maduro será reconhecido pelo sistema *comDE* de dois componentes, acionando a cascata de fosforilação¹⁴.

Figura 3: Caracterização da via metabólica do sistema de comunicação intercelular relacionados com a regulação do *quorum sensing* no *Streptococcus mutans*. Os genes do operon *comAB* codificam um transportador de cassete de ligação de ATP (ComA) e uma proteína ComB acessória, envolvidos no processamento e excreção do peptídeo estimulador de competência (CSP), representado em triângulos alaranjados. O loci *comC*, por sua vez, codifica respectivamente o precursor do CSP, uma histidina quinase ComD (representada em marrom) que atua como um receptor CSP e um regulador de resposta - ComE. CSP interage com a proteína receptora ComD das células vizinhas e ativa seu regulador de resposta cognato, ComE, desencadeando a cascata de sinalização para a produção de bacteriocina e outras atividades dependentes da densidade celular. CiaH (sensor de histidina quinase) e CiaR (regulador de resposta) compreendem um sistema de transdução de sinal de dois componentes.



A cepa de *S. mutans* UA159 possui pelo menos mais dois SDCs de *quorum sensing*. O primeiro caracterizado por LuxS, envolve o autoindutor Al-2, uma molécula envolvida na sinalização célula-célula e apontada por ser responsável pela comunicação entre espécies¹³. O segundo, CiaHR, caracterizado por poder contribuir para a formação de biofilme, tolerância a ácidos e entrada em competência, possivelmente interagindo com o CSP⁷¹. Dessa forma, a análise da frequência de genes envolvidos no sistema *quorum sensing*, que regulam a competência natural em *S. mutans*, e de genes responsáveis pela transformação em resposta aos estímulos ambientais, é importante para o entendimento da biologia e a evolução das populações desta espécie.

DISCUSSÃO

Entender como o microbioma humano atua em situações de saúde e doença é fundamental para que o conhecimento ultrapasse os estudos científicos e possa ser implementado no ambiente clínico para desenvolvimento de tratamentos mais efetivos. O primeiro passo para o desenvolvimento de novas estratégias de tratamento é o entendimento da etiopatogenia da doença alvo. Apesar dos inúmeros fatores de virulência aqui discutidos, o *S. mutans* representa baixa proporção na comunidade bacteriana. Avanços em métodos moleculares, como técnicas Ômicas que estudam moléculas informativas de DNA, RNA, proteínas e metabólitos⁷², têm permitido uma caracterização mais completa dessa microbiota tão diversificada. Identificou-se que para cada pessoa, o microbioma é específico, podendo variar com a alteração dos fatores que o determinam⁷³. Assim, torna-se difícil estabelecer uma relação de microrganismos específicos com saúde ou doença⁷⁴. Em um estudo de metagenômica (uma das técnicas Ômicas que consiste na análise de comunidades microbianas através de seu conteúdo total de DNA), foi sugerido que amostras de indivíduos com cárie não são dominadas por *S. mutans*, mas são uma comunidade complexa formada por dezenas de espécies bacterianas⁷⁵. Também foi proposto que o uso de cepas bacterianas comensais pode atuar como probióticos na prevenção de lesões de cárie^{75,76}.

Estudos anteriores mostraram que perfis metagenômicos e metatranscriptômicos (técnica Ômica que consiste na análise de comunidades microbianas através de seu conteúdo total de RNA) de uma mesma amostra diferem em sua composição filogenética⁷⁷. Como consequência, os membros da comunidade que estão presentes no metagenoma em baixos números podem ser críticos para a continuação das atividades metabólicas essenciais para a sobrevivência da comunidade microbiana⁷⁸. Um estudo metatranscriptômico, que estudou comunidades bacterianas ativas de lesões de cárie, revelou que lesões não cavitadas em esmalte, lesões cavitadas com dentina exposta e lesões ocultas em dentina, apresentavam diferentes comunidades ativas. Entre os achados significativos deste trabalho, com relação a proporção de diferentes espécies estreptocócicas ativas, *S. sanguinis* demonstrou atividade nos três tipos de lesões, enquanto *S. mutans* apresentou-se ativo em lesões não cavitadas em esmalte e em lesões cavitadas⁷⁹. A proporção de *S. mutans* encontrada em todas amostras foi dramaticamente baixa, variando de 0,73% em lesões de esmalte a 0,48% em lesões cavitadas e 0,02% em lesões ocultas, dados esses que confirmaram que essa espécie é minoria, questionando sua importância como principal agente etiológico da doença cárie.

Essa dualidade, existente mesmo após anos de pesquisa acerca do *S. mutans* aponta para a necessidade de continuarmos estudando a bactéria em estudos *in vitro* e *in vivo*, para entender sua relação com a transição da homeostase para disbiose. É preciso desvendar seu possível papel como um microrganismo-chave (*keystone*) nesse cenário⁸⁰. Embora diversos microrganismos façam parte do biofilme cariogênico, o *S. mutans* continua sendo seu microrganismo modelo⁸¹.

Hoje, portanto, acredita-se que terapias antimicrobianas, mais especificamente anti-*S. mutans*, voltadas para a eliminação do microrganismo, podem não ser a chave do controle da doença cárie e a modulação do microbioma poderá se tornar o futuro das clínicas odontológicas. Estratégias focadas na modificação do ambiente com o objetivo de restaurar o equilíbrio ecológico da comunidade microbiana vêm sendo desenvolvidas. Novos estreptococos orais, alguns não cultiváveis, foram identificados e sua caracterização fenotípica revelou possíveis candidatos à terapia probiótica^{76,82}. Embora tenham sido bastante informativos, os dados atuais ainda precisam ser cuidadosamente testados pela construção de modelos de estudo novos e bem projetados, de modo que essa nova tecnologia possa incentivar a descoberta de novos biomarcadores de cárie e o desenvolvimento de diagnósticos e terapias da próxima geração para o controle de cárie⁸³.

CONCLUSÃO

Biofilmes associados a doença cárie compreendem um ecossistema diverso, sugerindo uma etiologia ecológica polimicrobiana, porém, estudos futuros que visem à prospecção, ao desenvolvimento e à inter-relação do *S. mutans* com outros microrganismos e com o hospedeiro humano ainda são justificados a fim de desvendar a transição ‘homeostase-disbiose’.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Os autores também agradecem ao programa de pós-graduação em Odontologia da UnB pelo apoio a esta pesquisa. ND-T agradece ao UK Academy of Medical Sciences Newton International Fellowship.

CONFLITO DE INTERESSES

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

REFERÊNCIAS

- 1 Vance RE, Isberg RR, Portnoy DA. Patterns of pathogenesis: discrimination of pathogenic and nonpathogenic microbes by the innate immune system. *Cell Host Microbe*. 2009;6(1):10-21.
- 2 Shanmugam Kt, Masthan Kmk, Balachander N, Sudha J, Sarangarajan R. Dental caries vaccine: a possible option? *J Clin Diagn Res*. 2013;7(6):1250-3.
- 3 Zhang S. Dental caries and vaccination strategy against the major cariogenic pathogen, *Streptococcus mutans*. *Curr Pharm Biotechnol*. 2013;14(11):960-6.
- 4 Gross EL, Beall CJ, Kutsch SR, Firestone ND, Leys EJ, Griffen AL. Beyond *Streptococcus mutans*: dental caries onset linked to multiple species by 16S rRNA Community Analysis. *PLoS One*. 2012;7(10):e47722.
- 5 Thenisch NL, Bachmann LM, Imfeld T, Leisebach Minder T, Steuer J. Are *mutans streptococci* detected in preschool children a reliable predictive factor for dental caries risk? A systematic review. *Caries Res*. 2006;40(5):366-74.
- 6 Marsh PD. Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. *Adv Dent Res*. 1994;8(2):263-71.
- 7 Eberl G. A new vision of immunity: homeostasis of the superorganism. *Mucosal Immunol*. 2010;3(5):450-60.
- 8 Clarke JK. On the bacterial factor in the aetiology of dental caries. *Br J Exp Pathol*. 1924;5(3):141-7.
- 9 Lemos JA, Quivey RG, Koo H, Abranches J. *Streptococcus mutans*: a new Gram-positive paradigm? *Microbiology (Reading)*. 2013;159(Pt 3):436-45.
- 10 Hamada S, Slade HD. Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiol Rev*. 1980;44(2):331-84.
- 11 Sztajer H, Szafranski SP, Tomasch J, Reck M, Nimtz M, Rohde M, *et al*. Cross-feeding and interkingdom communication in dual-species biofilms of *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*. *ISME j*. 2014;8(11):2256-71.
- 12 Nakano K, Ooshima T. Serotype classification of *Streptococcus mutans* and its detection outside the oral cavity. *Future Microbiol*. 2009;4(7):891-902.
- 13 Ajdic D, McShan WM, McLaughlin RE, Savic G, Chang J, Carson MB, *et al*. Genome sequence of *Streptococcus mutans* UA159, a cariogenic dental pathogen. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(22):14434-9.
- 14 Lemos JA, Palmer SR, Zeng L, Wen ZT, Kajfasz JK, Freires IA, *et al*. The biology of *Streptococcus mutans*. *Microbiol Spectr*. 2019;7(1).
- 15 Argimón S, Konganti K, Chen H, Alekseyenko AV, Brown S, Caufield PW. Comparative genomics of oral isolates of *Streptococcus mutans* by in silico genome subtraction does not reveal accessory DNA associated with severe early childhood caries. *Infect Genet Evol*. 2014;21:269-78.

- 16 Liu L, Hao T, Xie Z, Horsman GP, Chen Y. Genome mining unveils widespread natural product biosynthetic capacity in human oral microbe *Streptococcus mutans*. *Sci Rep*. 2016;6:37479.
- 17 Maruyama F, Kobata M, Kurokawa K, Nishida K, Sakurai A, Nakano K, *et al*. Comparative genomic analyses of *Streptococcus mutans* provide insights into chromosomal shuffling and species-specific content. *BMC Genomics*. 2009;10:358.
- 18 Meng P, Lu C, Zhang Q, Lin J, Chen F. Exploring the genomic diversity and cariogenic differences of *Streptococcus mutans* strains through pan-genome and comparative genome analysis. *Curr Microbiol*. 2017;74(10):1200-9.
- 19 Cornejo OE, Lefébure T, Bitar PD, Lang P, Richards VP, Eilertson K, *et al*. Evolutionary and population genomics of the cavity causing bacteria *Streptococcus mutans*. *Mol Biol Evol*. 2013;30(4):881-93.
- 20 Palmer SR, Miller JH, Abranches J, Zeng L, Lefebure T, Richards VP, *et al*. Phenotypic heterogeneity of genomically-diverse isolates of *Streptococcus mutans*. *PLoS One*. 2013;8(4):e61358.
- 21 Phattarataratip E, Olson B, Broffitt B, Qian F, Brogden KA, Drake DR, *et al*. *Streptococcus mutans* strains recovered from caries-active or caries-free individuals differ in sensitivity to host antimicrobial peptides. *Mol Oral Microbiol*. 2011;26(3):187-99.
- 22 Lemos JA, Burne RA. A model of efficiency: stress tolerance by *Streptococcus mutans*. *Microbiology (Reading)*. 2008;154(Pt 11):3247-55.
- 23 Do T, Damé-Teixeira N, Naginyte M, Marsh PD. Root surface biofilms and caries. *Monogr Oral Sci*. 2017;26:26-34.
- 24 Petersen FC, Assev S, van der Mei HC, Busscher HJ, Scheie AA. Functional variation of the antigen I/II surface protein in *Streptococcus mutans* and *Streptococcus intermedius*. *Infect Immun*. 2002;70(1):249-56.
- 25 Banas JA. Virulence properties of *Streptococcus mutans*. *Front Biosci*. 2004;9:1267-77.
- 26 Bowen WH, Koo H. Biology of *Streptococcus mutans*-derived glucosyltransferases: role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms. *Caries Res*. 2011;45(1):69-86.
- 27 Guo L, Hu W, He X, Lux R, McLean J, Shi W. Investigating acid production by *Streptococcus mutans* with a surface-displayed pH-sensitive green fluorescent protein. *PLoS One*. 2013;8(2):e57182.
- 28 Ren Z, Cui T, Zeng J, Chen L, Zhang W, Xu X, *et al*. Molecule targeting glucosyltransferase inhibits *Streptococcus mutans* biofilm formation and virulence. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016;60(1):126-35.
- 29 Klahan P, Okuyama M, Jinnai K, Ma M, Kikuchi A, Kumagai Y, *et al*. Engineered dextranase from *Streptococcus mutans* enhances the production of longer isomaltooligosaccharides. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2018;82(9):1480
- 30 Nagasawa R, Sato T, Senpuku H. Raffinose induces biofilm formation by *Streptococcus mutans* in low concentrations of sucrose by increasing production of extracellular DNA and fructan. *Appl Environ Microbiol*. 2017;83(15):e00869-17.
- 31 Rozen R, Steinberg D, Bachrach G. *Streptococcus mutans* fructosyltransferase interactions with glucans. *FEMS Microbiol Lett*. 2004;232(1):39-43.
- 32 Wexler DL, Penders JE, Bowen WH, Burne RA. Characteristics and cariogenicity of a fructanase-defective *Streptococcus mutans* strain. *Infect Immun*. 1992;60(9):3673-81.
- 33 Banas JA, Vickerman MM. Glucan-binding proteins of the oral streptococci. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2003;14(2):89-99.
- 34 Nogueira RD, Alves AC, Napimoga MH, Smith DJ, Mattos-Graner RO. Characterization of salivary immunoglobulin A responses in children heavily exposed to the oral bacterium *Streptococcus mutans*: influence of specific antigen recognition in infection. *Infect Immun*. 2005;73(9):5675-84.
- 35 Perry JA, Cvitkovitch DG, Lévesque CM. Cell death in *Streptococcus mutans* biofilms: a link between CSP and extracellular DNA. *FEMS Microbiol Lett*. 2009;299(2):261-6.
- 36 Wu J, Xi C. Evaluation of different methods for extracting extracellular DNA from the biofilm matrix. *Appl Environ Microbiol*. 2009;75(16):5390-5.
- 37 de Soet JJ, Nyvad B, Kilian M. Strain-related acid production by oral streptococci. *Caries Res*. 2000;34(6):486-90.
- 38 Loesche WJ. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol Rev*. 1986;50(4):353-80.
- 39 Carlsson J, Griffith CJ. Fermentation products and bacterial yields in glucose-limited and nitrogen-limited cultures of streptococci. *Arch Oral Biol*. 1974;19(12):1105-9.
- 40 Matsui R, Cvitkovitch D. Acid tolerance mechanisms utilized by *Streptococcus mutans*. *Future Microbiol*. 2010;5(3):403-17.
- 41 May A, Brandt BW, El-Kebir M, Klau GW, Zaura E, Crielaard W, *et al*. metaModules identifies key functional subnetworks in microbiome-related disease. *Bioinformatics*. 2016;32(11):1678-85.
- 42 Russell RR, Aduse-Opoku J, Sutcliffe IC, Tao L, Ferretti JJ. A binding protein-dependent transport system in *Streptococcus mutans* responsible for multiple sugar metabolism. *J Biol Chem*. 1992;267(7):4631-7.
- 43 Busuioc M, Mackiewicz K, Buttaro BA, Piggot PJ. Role of intracellular polysaccharide in persistence of *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol*. 2009;191(23):7315-22.
- 44 Burne RA. Oral streptococci... products of their environment. *J Dent Res*. 1998;77(3):445-52.

- 45 Fozo EM, Quivey RG, Jr. Shifts in the membrane fatty acid profile of *Streptococcus mutans* enhance survival in acidic environments. *Appl Environ Microbiol.* 2004;70(2):929-36.
- 46 Bender GR, Sutton SV, Marquis RE. Acid tolerance, proton permeabilities, and membrane ATPases of oral streptococci. *Infect Immun.* 1986;53(2):331-8.
- 47 Liu Y, Burne RA. Multiple two-component systems of *Streptococcus mutans* regulate agmatine deiminase gene expression and stress tolerance. *J Bacteriol.* 2009;191(23):7363-6.
- 48 Lemme A, Sztajer H, Wagner-Döbler I. Characterization of mIeR, a positive regulator of malolactic fermentation and part of the acid tolerance response in *Streptococcus mutans*. *BMC Microbiol.* 2010;10:58.
- 49 Sheng J, Marquis RE. Malolactic fermentation by *Streptococcus mutans*. *FEMS Microbiol Lett.* 2007;272(2):196-201.
- 50 Baker JL, Faustoferrri RC, Quivey RG, Jr. Acid-adaptive mechanisms of *Streptococcus mutans*-the more we know, the more we don't. *Mol Oral Microbiol.* 2017;32(2):107-17.
- 51 Lindahl T, Nyberg B. Rate of depurination of native deoxyribonucleic acid. *Biochemistry.* 1972;11(19):3610-8.
- 52 Sancar A. DNA excision repair. *Annu Rev Biochem.* 1996;65:43-81.
- 53 Jayaraman GC, Penders JE, Burne RA. Transcriptional analysis of the *Streptococcus mutans* hrcA, grpE and dnaK genes and regulation of expression in response to heat shock and environmental acidification. *Mol Microbiol.* 1997;25(2):329-41.
- 54 Diaz-Torres ML, Russell RR. HtrA protease and processing of extracellular proteins of *Streptococcus mutans*. *FEMS Microbiol Lett.* 2001;204(1):23-8.
- 55 Vickerman MM, Mather NM, Minick PE, Edwards CA. Initial characterization of the *Streptococcus gordonii* htpX gene. *Oral Microbiol Immunol.* 2002;17(1):22-31.
- 56 Aas JA, Griffen AL, Dardis SR, Lee AM, Olsen I, Dewhirst FE, *et al.* Bacteria of dental caries in primary and permanent teeth in children and young adults. *J Clin Microbiol.* 2008;46(4):1407-17.
- 57 Hamada S, Ooshima T. Production and properties of bacteriocins (mutacins) from *Streptococcus mutans*. *Arch Oral Biol.* 1975;20(10):641-8.
- 58 Qi F, Chen P, Caufield PW. Purification and biochemical characterization of mutacin I from the group I strain of *Streptococcus mutans*, CH43, and genetic analysis of mutacin I biosynthesis genes. *Appl Environ Microbiol.* 2000;66(8):3221-9.
- 59 Novák J, Caufield PW, Miller EJ. Isolation and biochemical characterization of a novel lantibiotic mutacin from *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol.* 1994;176(14):4316-20.
- 60 Qi F, Chen P, Caufield PW. Purification of mutacin III from group III *Streptococcus mutans* UA787 and genetic analyses of mutacin III biosynthesis genes. *Appl Environ Microbiol.* 1999;65(9):3880-7.
- 61 Qi F, Chen P, Caufield PW. The group I strain of *Streptococcus mutans*, UA140, produces both the lantibiotic mutacin I and a nonlantibiotic bacteriocin, mutacin IV. *Appl Environ Microbiol.* 2001;67(1):15-21.
- 62 Yonezawa H, Kuramitsu HK. Genetic analysis of a unique bacteriocin, Smb, produced by *Streptococcus mutans* GS5. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(2):541-8.
- 63 Hossain MS, Biswas I. An extracellular protease, SepM, generates functional competence-stimulating peptide in *Streptococcus mutans* UA159. *J Bacteriol.* 2012;194(21):5886-96.
- 64 Parrot M, Caufield PW, Lavoie MC. Preliminary characterization of four bacteriocins from *Streptococcus mutans*. *Can J Microbiol.* 1990;36(2):123-30.
- 65 Grönroos L, Saarela M, Mättö J, Tanner-Salo U, Vuorela A, Alaluusua S. Mutacin production by *Streptococcus mutans* may promote transmission of bacteria from mother to child. *Infect Immun.* 1998;66(6):2595-600.
- 66 Lamy MC, Zouine M, Fert J, Vergassola M, Couve E, Pellegrini E, *et al.* CovS/CovR of group B streptococcus: a two-component global regulatory system involved in virulence. *Mol Microbiol.* 2004;54(5):1250-68.
- 67 Chong P, Drake L, Biswas I. Modulation of covR expression in *Streptococcus mutans* UA159. *J Bacteriol.* 2008;190(13):4478-88.
- 68 Zhang K, Ou M, Wang W, Ling J. Effects of quorum sensing on cell viability in *Streptococcus mutans* biofilm formation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;379(4):933-8.
- 69 de Kievit TR, Iglewski BH. Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships. *Infect Immun.* 2000;68(9):4839-49.
- 70 Li YH, Tang N, Aspiras MB, Lau PC, Lee JH, Ellen RP, *et al.* A quorum-sensing signaling system essential for genetic competence in *Streptococcus mutans* is involved in biofilm formation. *J Bacteriol.* 2002;184(10):2699-708.
- 71 Ahn SJ, Wen ZT, Burne RA. Multilevel control of competence development and stress tolerance in *Streptococcus mutans* UA159. *Infect Immun.* 2006;74(3):1631-42.
- 72 Belda-Ferre P, Williamson J, Simón-Soro Á, Artacho A, Jensen ON, Mira A. The human oral metaproteome reveals potential biomarkers for caries disease. *Proteomics.* 2015;15(20):3497-507.
- 73 Cho I, Blaser MJ. The human microbiome: at the interface of health and disease. *Nat Rev Genet.* 2012;13(4):260-70.
- 74 Simón-Soro A, Tomás I, Cabrera-Rubio R, Catalan MD, Nyvad B, Mira A. Microbial geography of the oral cavity. *J Dent Res.* 2013;92(7):616-21.

- 75 Belda-Ferre P, Alcaraz LD, Cabrera-Rubio R, Romero H, Simón-Soro A, Pignatelli M, *et al.* The oral metagenome in health and disease. *Isme j.* 2012;6(1):46-56.
- 76 Camelo-Castillo A, Benítez-Páez A, Belda-Ferre P, Cabrera-Rubio R, Mira A. *Streptococcus dentisani* sp. nov., a novel member of the mitis group. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2014;64(Pt 1):60-5.
- 77 Benítez-Páez A, Belda-Ferre P, Simón-Soro A, Mira A. Microbiota diversity and gene expression dynamics in human oral biofilms. *BMC Genomics.* 2014;15:311.
- 78 Solbiati J, Frias-Lopez J. Metatranscriptome of the oral microbiome in health and disease. *J Dent Res.* 2018;97(5):492-500.
- 79 Simón-Soro A, Guillen-Navarro M, Mira A. Metatranscriptomics reveals overall active bacterial composition in caries lesions. *J Oral Microbiol.* 2014;6:25443.
- 80 Hajishengallis G, Darveau RP, Curtis MA. The keystone-pathogen hypothesis. *Nat Rev Microbiol.* 2012;10(10):717-25.
- 81 Wassel MO, Khattab MA. Antibacterial activity against *Streptococcus mutans* and inhibition of bacterial induced enamel demineralization of propolis, miswak, and chitosan nanoparticles based dental varnishes. *J Adv Res.* 2017;8(4):387-92.
- 82 Huang X, Palmer SR, Ahn SJ, Richards VP, Williams ML, Nascimento MM, *et al.* A highly arginolytic *Streptococcus* species that potently antagonizes *Streptococcus mutans*. *Appl Environ Microbiol.* 2016;82(7):2187-201.
- 83 Nascimento MM, Zaura E, Mira A, Takahashi N, Ten Cate JM. Second era of OMICS in caries research: moving past the phase of disillusionment. *J Dent Res.* 2017;96(7):733-40.