



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**

VANESSA RODRIGUES DOS SANTOS

**Estudo do potencial cariogênico *in vitro* de espécies de
bifidobactérias e lactobacilos**

Araçatuba- SP

2016

VANESSA RODRIGUES DOS SANTOS

**Estudo do potencial cariogênico *in vitro* de espécies de
bifidobactérias e lactobacilos**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Faculdade de
Odontologia de Araçatuba, Universidade
Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita
Filho'-UNESP, como parte dos requisitos
para obtenção do título de Bacharel em
Odontologia.

Orientadora: Profa Dra. Cristiane Duque

Araçatuba-SP

2016

Dedico este trabalho aos meus pais, Antonio Roberto e Euciene, e aos meus irmãos Renata e Victor. Por todos os momentos que estiveram ao meu lado, por não medirem esforços para que eu chegasse a esta etapa de minha vida. O apoio e a confiança que sempre depositaram em mim foram fundamentais nesta conquista.

Amo muito vocês!

AGRADECIMENTOS

À Deus, que me abençoou durante toda essa caminhada estando ao meu lado, me guardando, fortalecendo e ajudando em todos os momentos. Vejo Sua mão em cada detalhe dessa conquista! Obrigada Senhor pela força nos momentos de desânimo, pela coragem nas horas de medo e indecisão, pela inteligência e sabedoria, pelas oportunidades que surgiram e por cada pessoa que colocou no meu caminho. Rendo Graças a Ti por essa grande vitória na minha vida!

Aos meus pais, Antonio Roberto e Euciene, que não mediram esforços para que esse dia chegasse. Agradeço por sonharem comigo, mesmo diante de dificuldades e empecilhos nunca disseram que não íamos conseguir, muito pelo contrario me apoiaram em cada decisão que tomei. Obrigada pela confiança que depositaram em mim. Obrigada pelos valores e princípios a mim ensinados, pois foram muito importantes nessa caminhada. Amo vocês!

Aos meus irmãos, Renata e Victor, pelo apoio e carinho. Tê-los ao meu lado durante esse trajeto foi muito importante. Obrigada por me incentivarem e acreditarem em mim. Amo vocês!

Tio Waldir e tia Mercilene, por todo apoio e incentivo.

À minha Avó Divina, tios, tias e primos, pelo apoio e ajuda. Obrigada por sempre torcerem por mim e por acreditar no meu sonho.

À minha Avó Felis (in memoriam), pela ajuda e carinho.

Ao Michael, por sua amizade, cumplicidade e dedicação. Obrigada por compartilhar sua vida comigo e por me deixar fazer o mesmo.

À Dra. Silvânia e Dra Elaine, minhas ex-patroas, que me apoiaram e incentivaram a buscar por esse sonho, sempre me ajudando da maneira que podiam.

Às minhas companheiras de Apê e Amigas Laís e Morganna, obrigada pela amizade e companheirismo de vocês! Tê-las comigo nessa caminhada foi de grande importância. Vocês são presentes de Deus na minha vida e espero que nossa amizade vá além da Odontologia. Amo vocês!

Aos amigos e irmãos da igreja, obrigada por ser a família que Deus me deu nessa cidade. Vocês foram aqueles que fizeram a saudade de casa se tornar um pouco menor. Obrigada pelos conselhos, carinho e por me acolher na vida de vocês. Obrigada por me ajudarem a crescer. Sempre os terei em meu coração. Amo cada um de vocês!

À minha amiga da graduação Carol, pela amizade e cumplicidade durante esses anos. Obrigada por toda ajuda, por dividir comigo momentos bons e ruins nessa trajetória. Amo você!

À Cecília, que foi aquela que me levou até a minha orientadora Cristiane Duque, me incentivando a ingressar na Iniciação Científica.

À minha orientadora Cristiane Duque, pela orientadora, professora e pessoa maravilhosa que é. Obrigada por todo carinho e dedicação durante esses quase cinco anos de convivência. Sempre prestativa e atenciosa demonstrando amor pelo que faz. Obrigada por todo conhecimento ensinado a mim, por toda paciência nas minhas dificuldades. Compreensiva com meu limitado tempo de dedicação ao estágio devido às demais atividades da graduação, assim como as minhas viagens para rever a família. Obrigada por me ajudar a conhecer um pouco do ramo da pesquisa e por me orientar com excelência.

Ao Remberto, pela parceria nas pesquisas. Obrigada pela fundamental contribuição para a realização do projeto. Obrigada pela amizade e ótima convivência.

À Karina, José Antonio e Marcelle, pela colaboração no projeto. Obrigada pela paciência, ajuda e por toda prestatividade.

À Natália Helena Colombo, pela paciência e atenção em me ensinar o funcionamento do laboratório.

Aos colegas de laboratório, pela excelente convivência.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, na pessoa do diretor da Faculdade de Odontologia de Araçatuba Prof. Wilson Roberto Poi e do vice-diretor Prof. João Eduardo Gomes Filho.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo- FAPESP, pela concessão da bolsa de estudos (Processo 2014/02072-1) e pelo apoio financeiro para o desenvolvimento do projeto.

“Suba o primeiro degrau com fé. Não é necessário que você veja toda escada.

Apenas dê o primeiro passo”

Martin Luther King Jr.

Santos, V.R. **Estudo do potencial cariogênico *in vitro* de espécies de bifidobactérias e lactobacilos**. 2016 49 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2016.

RESUMO

As bactérias consideradas mais cariogênicas são os estreptococos do grupo mutans, principalmente *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus*. Entretanto, outras espécies bacterianas, tais como *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* também são detectadas em lesões de cárie dentária. Assim, o objetivo deste estudo foi verificar a capacidade de espécies de *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* associadas com estreptococos em produzir polissacarídeos extracelulares insolúveis (PECI) e desmineralizar o esmalte dentário. As espécies bacterianas utilizadas foram: *Bifidobacterium animalis* (ACTIVIA®), *B. longum* (ATCC 15707), *B. lactis* (LMG 18905), *B. dentium* (ATCC 27678), *Lactobacillus acidophilus* (ATCC 4356), *L. casei* (ATCC 393), *L. casei shirota* (Yakult®), *Streptococcus mutans* (3VF2), *S. sobrinus* (ATCC 27607). Após a preparação e seleção dos blocos de esmalte bovino (n=180) através da dureza de superfície, os blocos foram divididos em 2 grupos: G1: todas as espécies bacterianas combinadas com *S. mutans* (3FV2) e G2: estas espécies combinadas com *S. mutans*+ *S. sobrinus*. Para cada combinação, 10 blocos foram expostos às combinações de espécies bacterianas por 7 dias. Após esse período, a dureza em secção longitudinal ou de subsuperfície (Δ KHN) e a quantidade de PECIs foram determinados. Os dados foram submetidos à análise de variância (1-critério) seguida pelo teste de Bonferroni ($p < 0,05$). Os resultados mostraram que no G1, as combinações de *S. mutans* com *B. animalis*, ou *B. dentium* ou *L. acidophilus* produziram as maiores quantidades de PECIs ($p < 0,05$) e a combinação de *S. mutans*+ *B. animalis* levou à maior perda de dureza de subsuperfície ($p < 0,05$). No G2, a combinação de *S. mutans* + *S. sobrinus* + *B. longum* produziu a maior quantidade de PECIs e causou a maior desmineralização de subsuperfície de esmalte ($p < 0,05$). Conclui-se que *B. animalis* e *B. longum*, quando associados com *S. mutans* e *S. mutans*/*S. sobrinus* respectivamente contribuem para a produção de PECIs e induzem maior desmineralização de subsuperfície do esmalte.

Palavras-chaves: Bifidobactérias. Lactobacilos. Cárie dentária. Desmineralização dentária. Polissacarídeos extracelulares.

Santos, V.R. *In vitro* cariogenic potential study of species of bifidobacteria and lactobacilli. 2016 49 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2016.

ABSTRACT

The bacteria considered more cariogenic are mutans streptococci, specially *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*. However, other bacterial species, such as *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* have been also detected in dental caries lesions. Thus, the aim of this study was to verify the ability of species of *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* associated with mutans streptococci in producing insoluble extracellular polysaccharides (iEPS) and demineralizing dental enamel. Bacterial species used were: *Bifidobacterium animalis* (ACTIVIA®), *B. longum* (ATCC 15707), *B. lactis* (LMG 18905), *B. dentium* (ATCC 27678), *Lactobacillus acidophilus* (ATCC 4356), *L. casei* (ATCC 393), *L. casei shirota* (Yakult®) *Streptococcus mutans* (3VF2) and *S. sobrinus* (ATCC 27607). Bovine enamel blocks (N=180) were used. After the preparation and selection of bovine enamel blocks (n=180) by means the surface hardness, the blocks were divided in 2 groups: G1: bacterial species combined with *S. mutans*(3FV2) and G2: these species with *S. mutans* + *S. sobrinus*. For each combination, 10 blocks were exposed to the bacterial associations for 7 days. Afterwards, the quantity of iEPS and the cross-sectional hardness or subsurface hardness (Δ KHN) values were determined. Data were submitted to variance analysis (one-way) followed by the Bonferroni's test ($p < 0.05$). The results showed that the combinations of *S. mutans*+ *B. animalis* or *L. acidophilus* or *B. dentium* produced higher quantify of iEPS ($p < 0.05$) and the combination of *S. mutans*+ *B. animalis* led to the highest loss of subsurface hardness ($p < 0.05$). In G2, *S. mutans* + *S. sobrinus*+ *B. longum* produced the highest quantity of iEPS and led to the highest enamel demineralization ($p < 0.05$). It was concluded that *B. animalis* e *B. longum* when associated with *S. mutans* and/or *S. mutans*/*S. sobrinus* contributes to iEPS and induced higher enamel demineralization.

Keywords: Bifidobacteria. Lactobacilli. Dental caries. Dental demineralization. Extracellular polyssacharides.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Valores das médias (desvio padrão) referentes às perdas de dureza integrada de subsuperfície (Δ KHN) e dosagem de polissacarídeos extracelulares insolúveis (PEIs) das combinações duplas.

Tabela 2 – Valores das médias (desvio padrão) referentes às perdas de dureza integrada de subsuperfície (Δ KHN) e dosagem de polissacarídeos extracelulares insolúveis (PEIs) das combinações triplas.

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de variância
BHI	Brain Heart Infusion
CPI	Cárie precoce da infância
DS	Dureza superficial
KHN	Dureza de subsuperfície
et al.	E colaboradores
°C	Grau Celsius
g	Gramas
h	Hora
TOS	Meio de cultura para bifidobactérias
µm	Micrometro
mL	Mililitro
mm	Milímetro
min	Minutos
n	Número de amostras
ΔKHN	Perda integrada de dureza de subsuperfície
%	Porcentagem
PEIs	Polissacarídeos extracelulares insolúveis
PCR	Reação em cadeia da polimerase
s	Segundos

SUMÁRIO

1	Introdução	13
2	Objetivos	16
3	Material e Métodos	17
4	Resultados	21
5	Discussão	23
6	Conclusão	27
	Referências	28
	Anexos	34
	Apêndice	35

1 INTRODUÇÃO

A cárie é uma doença infecciosa, caracterizada pela desmineralização dos tecidos duros do dente pela ação de ácidos provenientes da fermentação microbiana dos carboidratos da dieta (FERJERSKOV e KIDD, 2005). Quando atinge crianças muito jovens, na fase da dentição decídua é denominada de cárie precoce da infância (CPI)(DRURY et al., 1990). Devido a progressão rápida da doença, a etiologia proposta para a CPI envolve a associação entre três fatores principais: ingestão frequente de dieta rica em carboidratos fermentáveis como a sacarose, alta contagem de bactérias cariogênicas e maior vulnerabilidade imunológica da criança (MATTOS-GRANER et al., 1998; MATTOS-GRANER et al., 2001; RAMOS-GOMEZ et al., 2002; COLOMBO et al., 2016)

O grupo bacteriano considerado mais cariogênico é o dos estreptococos mutans, especialmente *Streptococcus mutans* (VAN HOUTE et al., 1991; MATTOS-GRANER et al., 2001). Entretanto, outras espécies igualmente acidogênicas e acidúricas podem estar envolvidas com o início das lesões de cárie (SANSONE et al., 1993; VAN HOUTE et al., 1996). *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* têm sido encontradas nos biofilmes de lesões de mancha branca (VAN RUYVEN et al., 2000). Estudo mostrou alta prevalência de bactérias da família *Bifidobacteriaceae* ou ainda grande associação entre *Streptococcus mutans* e bifidobactérias em amostras de saliva de crianças com CPI (TANNER et al., 2011)

A família *Bifidobacteriaceae* é composta por microrganismos anaeróbios gram-positivos, não filamentosos, em forma de bastonete, que habitam o trato gastrointestinal. É dividida em sete gêneros: *Bifidobacterium*, *Aeriscardovia*, *Falcivibrio*, *Gardnerella*, *Parascardovia*, *Scardovia* e *Alloscardovia*(SAXELIN et al., 2005). Espécies do gênero *Bifidobacterium* ou bifidobactérias tem recebido muita atenção por seu papel benéfico para a saúde humana, incluindo o aumento da resposta imune adaptativa, tratamento ou prevenção de infecções do trato respiratório e urogenital, além da prevenção de alergias e doenças atópicas na infância e por isso vêm sendo incluídos em produtos alimentícios (SAXELIN et al., 2005). Estudos tem sugerido que o consumo de produtos contendo probióticos, ou seja, microrganismos vivos, entre os quais, as bifidobactérias e os lactobacilos, poderiam atuarna redução de *S. mutans* na saliva (CAGLAR et al., 2005, CAGLAR et al., 2008; CILDIR et al., 2009). Entretanto, outros estudos têm apontado para o

potencial cariogênico de alguns desses probióticos (NAKAJO et al., 2010; VALDEZ et al., 2016).

Algumas espécies de bifidobactérias, como *B. dentium*, *B. longum*, *B. breve*, *B. subtile*, *B. adolescentis* e *B. urinalis*, têm sido isoladas do biofilme dental, saliva e lesões de cárie (MODESTO et al., 2006, BEIGHTON et al., 2008, MANTZOURANI et al., 2009). Estudo verificou alta frequência de *B. dentium*, *B. longum* e *B. breve* em lesões de cárie oclusal ausentes dessas espécies em superfícies livres de cárie, sustentando a hipótese de que essas bactérias apresentam um papel na progressão das lesões de cárie oclusal (MANTZOURANI et al., 2009). Esses achados podem ser explicados pela habilidade acidogênica (produção de ácidos através da fermentação de carboidratos) e acidúrica (tolerância a um pH baixo) das bifidobactérias em sobreviver e proliferar em ambientes ácidos de lesões de cárie, similar ao que ocorre no trato gastrointestinal (VAN HOUTE et al., 1996; NAKAJO et al., 2010, VALDEZ et al., 2016). As quedas de pH causadas por 14 probióticos, entre eles as bifidobactérias *B. longum* e *B. lactis* e os lactobacilos *L. casei*, *L. casei shirota* e *L. acidophilus*, a partir da degradação de sacarose e outros açúcares foram avaliadas por Haukioja et al. (2008). Os autores verificaram que todas as cepas produziram ácidos eficientemente a partir de glicose e reduziram o pH comparável à *S. mutans*. Todos os lactobacilos testados, exceto *L. rhamnosus* (GG), e somente uma das bifidobactérias, *B. lactis* (Bb12) causaram redução significativa no pH na presença de lactose.

S. mutans são capazes de produzir enzimas denominadas glucosiltransferases que hidrolisam a sacarose da dieta em glicose e frutose. Os resíduos de glicose ligam-se entre si para formar os polissacarídeos extracelulares (PEC) ou glucanos insolúveis que são responsáveis pela adesão dos microrganismos às superfícies dentárias e formação da matriz extracelular que estrutura o biofilme dental (BURNE, 1998). A maioria das espécies de lactobacilos e bifidobactérias consegue degradar diversos tipos de carboidratos, dentre eles, glicose, frutose, manose, n-acetilglicosamina, sorbitol, entre outros. Muitas delas apresentam glicosidases, transportadores e enzimas metabólicas para fermentar até açúcares que não são absorvidos por humanos ou animais (FUSHINOBU, 2010), o que favorece sua sobrevivência e proliferação em ambientes hostis. Além da degradação de açúcar, para a formação de biofilme é necessário que haja a denominada coagregação microbiana, que consiste no reconhecimento específico e

adesão de microrganismos distintos geneticamente que promoverá a organização e as interações célula-célula que aumentarão a resistência das espécies individualmente ou do biofilme como um todo (KOLENBRANDER et al., 2010). Ainda existem poucos estudos avaliando coagregação de *S. mutans* e espécies de bifidobactérias. O primeiro estudo que avaliou a interação entre espécies da microbiota oral e intestinal foi realizado por Ledder et al. (2008). Os autores verificaram forte coagregação entre *Fusobacterium nucleatum* e seis das nove espécies orais avaliadas, mas somente com uma bactéria intestinal, *B. adolescentis*. Neste estudo, *S. mutans* teve melhor interação com *L. rhamnosus* e mínima coagregação com bactérias intestinais. Haukioja et al. (2006) avaliaram a capacidade de adesão a discos de hidroxiapatita cobertos com saliva ou não de espécies de bifidobactérias e lactobacilos e verificaram que eles apresentam baixa capacidade de adesão com ou sem a presença de saliva, sendo que essa capacidade é melhorada quando essas espécies são coagregadas com *F. nucleatum*. Mais estudos são necessários a fim de se conhecer o papel de bifidobactérias e lactobacilos na progressão da cárie dentária, quando em associação com estreptococos orais.

2 OBJETIVOS

Avaliar a capacidade de espécies de bifidobactérias (*Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium animalis* e *Bifidobacterium dentium*) e de lactobacilos (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus casei shirota*) associadas com estreptococos (*Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus*) em induzir lesão de cárie dentária inicial e produzir polissacarídeos extracelulares insolúveis (PECIs).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Cepas bacterianas e condições de crescimento

Os ensaios foram realizados utilizando as seguintes espécies de *Bifidobacterium*: *B. animalis* (ACTIVIA®), *B. longum* (ATCC 15707), *B. lactis* (LMG 18905) e *B. dentium* (ATCC 27678); espécies de *Lactobacillus*: *L. acidophilus* (ATCC 4356), *L. casei* (ATCC 393) e *L. casei shirota*(Yakult®) e espécies de *Streptococcus*: *S. mutans* (3VF2) e *S. sobrinus* (ATCC 27607). Todas as cepas ATCC foram obtidas da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) ou Fundação André Tosello (Campinas, SP, Brasil). *B. animalis* foi isolada do iogurte ACTIVIA® e *L. casei* do leite fermentado Yakult®. *S. mutans* 3VF2 é uma cepa clínica gentilmente cedida pela Profa. Dra. Renata de Oliveira Mattos-Graner da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP-UNICAMP), que se mostrou cariogênica em estudo realizado pela pesquisadora (Mattos-Graneret al., 2004). As espécies foram reativadas em placas contendo meios de cultura específicos (Mitis Agar Salivarius (Difco Lab.) com bacitracina para *S. mutans* e *S. sobrinus*; RogosaAfar (Difco Lab.) para *L. casei* e *L. acidophilus*; TOS-muporicina (Merck) para as bifidobactérias, em anaerobiose com sistema Anaerocult (Merck). Em seguida, 5 colônias de cada espécie foram inseridas em caldo BHI – Brain Heart Infusion (Difco Lab.) – individualmente e incubadas a 37 °C por 24 h. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

3.2. Indução de lesão de cárie inicial *in vitro* (APÊNDICE1)

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP (protocolo 197/2013, ANEXO 1). Dentes incisivos centrais bovinos foram utilizados. Estes dentes foram mantidos em solução de formol a 2%, em pH 7,0, durante 1 mês para desinfecção. Blocos de esmalte bovino (4×4 mm) foram obtidos a partir da porção mais plana da superfície vestibular das coroas utilizando uma cortadeira de bancada (IsoMet 1000, Buehler, Lake Bluff, IL, EUA) com dois discos diamantados (series 15HC 11 – 4243 Diamond, Buehler) separados por um disco espaçador (espessura: 4 mm) sob refrigeração com água destilada. A dentina foi ajustada para obter superfícies paralelas entre esmalte e dentina (espessura ± 2 mm), utilizando lixas de granulação (CARBIMET, Buehler), sob baixa velocidade e refrigeração. Em seguida, os blocos foram sequencialmente

polidos utilizando lixas de granulação (600, 800 e 1200 – Buehler); um polimento final foi realizado utilizando um disco feltro (BuehlerPolishingCloth 40-7618) umedecido com uma solução diamantada de 1 µm (ExtecCorp., Enfield, CT, EUA) (VIEIRA et al., 2005). Blocos com uma dureza superficial (DS) entre 320 e 380 KHN foram selecionados e randomizados utilizando o programa Excel (Microsoft Inc.). 180 blocos de esmalte foram utilizados. Grupo 1 (n=90): espécies bacterianas combinadas com *Streptococcus mutans* (3FV2) totalizando 9 combinações (10 blocos para cada combinação); Grupo 2: (n=80): espécies bacterianas combinadas com *S. mutans* + *S. sobrinus* totalizando 8 combinações (10 blocos para cada combinação). Em cada grupo, controles de *S. mutans* (n=10) e *S. mutans* + *S. sobrinus* também foram analisados.

Grupo 1	Grupo 2
<i>S. mutans</i> + <i>S. sobrinus</i>	<i>S. mutans</i> + <i>S. sobrinus</i> + <i>L. casei</i>
<i>S. mutans</i> + <i>L. casei</i>	<i>S. mutans</i> + <i>S. sobrinus</i> + <i>L. casei shirota</i>
<i>S. mutans</i> + <i>L. casei shirota</i>	<i>S. mutans</i> + <i>S. sobrinus</i> + <i>L. acidophilus</i>
<i>S. mutans</i> + <i>L. acidophilus</i>	<i>S. mutans</i> + <i>S. sobrinus</i> + <i>B. dentium</i>
<i>S. mutans</i> + <i>B. dentium</i>	<i>S. mutans</i> + <i>S. sobrinus</i> + <i>B. longum</i>
<i>S. mutans</i> + <i>B. longum</i>	<i>S. mutans</i> + <i>S. sobrinus</i> + <i>B. animalis</i>
<i>S. mutans</i> + <i>B. animalis</i>	<i>S. mutans</i> + <i>S. sobrinus</i> + <i>B. lactis</i>
<i>S. mutans</i> + <i>B. lactis</i>	

Um protocolo modificado de um estudo prévio (LIMA et al., 2005) foi utilizado para induzir lesões de cárie artificial. Os blocos de esmalte bovino foram completamente isolados com uma fina camada de esmalte de unha cosmético, exceto a superfície externa (área = 16 cm²) e individualmente colados em poços de placa de microtitulação utilizando fita dupla face. Em cada poço foi adicionado solução de cárie artificial modificada (BHI suplementado com 1% extrato de levedura, 0,5% de glicose, 1% de sacarose e 2% das respectivas combinações bacterianas (10⁸ células/mL)) por 7 dias, a 37°C, trocando-se o meio de cultura a cada 48 h.

3.3. Análise da dureza em secção longitudinal (APÊNDICE1)

Após o período de 7 dias, os blocos foram removidos dos poços da placa de microtitulação e devidamente armazenados em microtubos. 6 blocos de cada combinação foi fixado em placas de vidro e seccionados ao meio. Uma das metades de cada bloco foi incluída em resina acrílica utilizando uma embutidora metalográfica (AROTEC PRE 30S) e, na sequência, os blocos foram gradualmente polidos. Uma sequência de 14 endentações em diferentes distâncias (5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 70, 90, 110, 130, 220 e 330 μm) foi realizada na superfície do esmalte na região central com o auxílio de um microdurômetro (Micrometer 5114, Buehler, Lake Bluff, EUA) operando com uma carga de 5 g por 10 s (DELBEM et al., 2010).

3.4. Análise do biofilme dental (APÊNDICE 2)

Após 7 dias, antes da análise da dureza, o biofilme formado sobre os blocos de esmalte foi coletado e pesado em eppendorfs pré-pesados. Os tubos foram congelados para análise posterior. Depois disso, as amostras de biofilme foram secas em vácuo com pentóxido de fósforo (Vetec Química Fina Ltda., Duque de Caxias, RJ, Brasil) por 12 h em temperatura ambiente. Ácido clorídrico (0,5 mol/L) foi adicionado aos tubos na proporção de 250 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de placa seca. Depois da extração por 3 h em temperatura ambiente sob agitação constante, o mesmo volume de NaOH 0,5 mol/L foi adicionado. As amostras foram então centrifugadas (11000 x g) por 1 minuto (NOBRE DOS SANTOS et al., 2002) e o sobrenadante foi guardado. Polissacarídeos extracelulares insolúveis (PECs) foram extraídos pela adição de NaOH 1,0 mol/L (500 $\mu\text{L}/\text{mg}$ de placa seca) ao biofilme. As amostras foram vortexadas por 1 min e depois de 3 h sob agitação constante em temperatura ambiente, os tubos foram centrifugados (1 min, 11000 x g em temperatura ambiente) (Nobre dos Santos et al., 2002). Os sobrenadantes foram precipitados com etanol a 75% durante a noite, centrifugados e ressuspensos em NaOH 1,0 mol/L (CCAHUANA-VASQUEZ et al., 2007). A análise de carboidratos foi realizada pelo método fenol-sulfúrico (DUBOIS, 1956). Os resultados foram expressos como mg/mg de biofilme seco.

3.5. Análise Estatística

Para a análise estática, o programa SPSS (versão 17.1) foi utilizado, com nível de significância de 5%. Os dados de Δ KHN e PEIs foram submetidos à análise de variância (1-critério) seguido pelo teste de Bonferroni.

4 Resultados

A Tabela 1 mostra os resultados da perda de dureza integrada de subsuperfície (Δ KHN) dos blocos de esmalte e da quantidade de polissacarídeos extracelulares insolúveis (PECIs) no biofilme para as combinações (duplas) e grupo controle (*S. mutans*). Quando o *S. mutans* foi inoculado com *L. casei shirota* e *B. longum*, a perda de dureza de subsuperfície foi similar a do *S. mutans* inoculado isoladamente. Nos demais grupos, houve uma maior perda de dureza quando comparado ao grupo controle ($p < 0,05$). A combinação dupla que induziu a maior perda de dureza de subsuperfície foi *S. mutans*+ *B. animalis*.

Quando o *S. mutans* foi inoculado com *L. acidophilus*, *B. dentium* e *B. animalis*, houve um aumento na quantidade de PECIs em comparação com *S. mutans* inoculado isoladamente ($p < 0,05$). As demais combinações não diferiram estatisticamente do grupo *S. mutans*.

Tabela 1. Valores das médias (desvio padrão) referentes às perdas de dureza integrada de subsuperfície (Δ KHN) e dosagem de polissacarídeos extracelulares insolúveis (PECIs) das combinações duplas

Grupos	Δ KHN	PECIs (mg/mg de biofilme)
<i>S. mutans</i>	5025,5 (2401,09) ^A	2,6 (0,9) ^a
<i>S. mutans</i> + <i>S. sobrinus</i>	7794,6 (1202,79) ^B	3,1 (1,1) ^a
<i>S. mutans</i> + <i>L. casei</i>	6690,4 (1953,00) ^B	2,8 (0,9) ^a
<i>S. mutans</i> + <i>L. casei shirota</i>	4984,0 (1508,53) ^A	2,3 (0,7) ^a
<i>S. mutans</i> + <i>L. acidophilus</i>	7079,6 (3321,11) ^B	5,5 (2,3) ^b
<i>S. mutans</i> + <i>B. dentium</i>	7281,7 (1637,37) ^B	4,5 (1,6) ^{b,c}
<i>S. mutans</i> + <i>B. longum</i>	4140,3 (1613,33) ^A	2,1 (0,6) ^a
<i>S. mutans</i> + <i>B. animalis</i>	9186,9 (1859,67) ^C	3,9 (1,6) ^c
<i>S. mutans</i> + <i>B. lactis</i>	7096,9 (2970,05) ^B	2,7 (0,7) ^a

^ALetras maiúsculas diferentes mostram diferença estatística entre os grupos de bactérias para as análises de Δ KHN, de acordo com os testes de ANOVA e Bonferroni.

^aLetras minúsculas diferentes mostram diferença estatística entre os grupos de bactérias para a dosagem de PEIs, de acordo com os testes de ANOVA e Bonferroni.

A tabela 2 mostra os resultados da perda de dureza em secção longitudinal ou de subsuperfície do esmalte (Δ KHN) e da quantidade de PECIs no biofilme dental. O grupo *S. mutans* + *S.sobrinus* + *B. longum* induziu a uma maior perda de dureza de subsuperfície (Δ KHN) comparada com o grupo *S. mutans* + *S. sobrinus* e maior quantidade de PECIs quando comparado aos demais grupos ($p < 0,05$). Apenas a associação *S. mutans* + *S.sobrinus* + *B. lactis* não diferiu estatisticamente do grupo, em relação às dosagens de PECIs.

Tabela 2. Valores das médias (desvio padrão) referentes às perdas de dureza integrada de subsuperfície (Δ KHN) e dosagem de polissacarídeos extracelulares insolúveis (PECIs) das combinações triplas.

Grupos	Δ KHN	PECIs (mg/mg de biofilme)
<i>S. m</i> + <i>S. sobrinus</i>	7794,6 (1202,79) ^A	3,1 (1,1) ^a
<i>S. m</i> + <i>S. s</i> + <i>L. casei</i>	5862,8(3850,33) ^B	4,7 (1,2) ^b
<i>S. m</i> + <i>S. s</i> + <i>L. casei shirota</i>	6373,1(2511,2) ^B	5,1(2,2) ^b
<i>S. m</i> + <i>S. s</i> + <i>L. acidophilus</i>	8689,6 (1504,71) ^A	4,4(1,4) ^b
<i>S. m</i> + <i>S. s</i> + <i>B. dentium</i>	6958,2 (1819,39) ^A	5,3 (3,3) ^b
<i>S. m</i> + <i>S. s</i> + <i>B. longum</i>	10022,3 (2487,94) ^C	6,1(2,3) ^c
<i>S. m</i> + <i>S. s</i> + <i>B. animalis</i>	8040,5(3516,35) ^A	5,2(0,8) ^b
<i>S. m</i> + <i>S. s</i> + <i>B. lactis</i>	5563,9(3011,20) ^B	3,2 (1,7) ^a

^ALetras maiúsculas diferentes mostram diferença estatística entre os grupos de bactérias para as análises de Δ KHN, de acordo com os testes de ANOVA e Bonferroni.

^aLetras minúsculas diferentes mostram diferença estatística entre os grupos de bactérias para a dosagem de PEIs, de acordo com os testes de ANOVA e Bonferroni.

S. m – *Streptococcusmutans*; *S. s* – *Streptococcussobrinus*

5 Discussão

Ainda existe divergência entre os estudos quanto ao efeito positivo do uso de probióticos sobre o controle de bactérias cariogênicas. Alguns estudos mostram redução na contagem de estreptococos grupo mutans (CAGLAR et al., 2005; 2008, Cildir et al., 2009), entretanto, outros apontam não haver diferença na contagem de estreptococos (AHOLA et al., 2002; MONTALTO et al., 2004, GIZANI et al., 2015) e aumento de lactobacilos (MONTALTO et al., 2004, CAGLAR et al., 2007). Além disso, não é possível concluir que a redução salivar de bactérias potencialmente relacionadas com a cárie dentária por um curto ou longo prazo levaria a uma melhora na saúde bucal e na redução da incidência de novas lesões de cárie.

Recentemente, nosso grupo de estudo avaliou o potencial cariogênico de algumas espécies de bifidobactérias, *B. lactis*, *B. longum*, *B. animalis*, *B. dentium*, em comparação com bactérias associadas a cárie dentária (*S. mutans*, *S. sobrinus*, *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei* e *Actinomyces israelii*). Dentre as bifidobactérias, *B. animalis* e *B. longum* induziram a maior perda superficial de esmalte quando inoculadas com *S. mutans* ou *S. mutans/S. sobrinus*, comparáveis às bactérias cariogênicas. No presente estudo, as mesmas espécies de bifidobactérias, *B. animalis* e *B. longum*, quando associadas com *S. mutans* ou *S. mutans/S. sobrinus*, respectivamente, induziram as maiores perdas de dureza de subsuperfície. Na sequência, *B. dentium* e *L. acidophilus* também tiveram efeito marcante na perda de dureza de subsuperfície, quando combinado com as bactérias cariogênicas. Baseado no fato de que as bifidobactérias e lactobacilos apresentam baixa capacidade de se aderirem à estrutura dentária por si mesmos (HAUKIOJA et al., 2006) somente se mediados por outras bactérias orais (HAUKIOJA et al., 2006; NAGAOKA et al., 2008) e conseqüentemente não apresentarem habilidade de formar biofilme como as bactérias cariogênicas (FERNÁNDEZ et al., 2015; VALDEZ et al., 2016), que neste presente estudo foram realizados os ensaios de desmineralização de esmalte dentário com as espécies de bifidobactérias e lactobacilos combinadas com *S. mutans* ou *S. sobrinus*. Além disso, estudo mostrou que quando lactobacilos crescem em biofilme isoladamente (monoespécie), nenhuma desmineralização do esmalte é observada (FERNÁNDEZ et al., 2015).

Estudo comparando diferentes combinações de *S. mutans* com *L. casei* e *L. acidophilus* e o impacto sobre a indução de lesões de esmalte não cavidadas foi

desenvolvido recentemente por DE CAMPOS et al. (2015). Os resultados mostraram que as combinações: dupla de *S. mutans* com *L. casei* ou tripla de *S. mutans*, *L. acidophilus* e *L. casei* levaram às maiores perdas de dureza superficial do esmalte e maiores valores de profundidade de lesão cariiosa observado nos primeiros quatro dias de indução. A profundidade da lesão foi analisada por microscopia de luz polarizada e foi verificado que esses grupos causaram lesões semelhantes à erosão, após 20 dias de desafio cariogênico. Esses resultados estão em concordância com os obtidos no presente estudo que mostraram que a combinação de *S. mutans* com outras espécies também acidogênicas e acidúricas, como *B. longum* e *B. animalis* (VALDEZ et al., 2016) causou maior perda desmineralização do esmalte comparada às outras bactérias avaliadas. Outro estudo também verificou que quando *L. rhamnosus* foi associado com *S. mutans*, ocorreu maior perda mineral em esmalte quando comparado ao biofilme de *S. mutans* ou *L. rhamnosus* isoladamente, após 10 dias de indução especialmente em cavidades de dentina e sob condições cariogênicas (SCHWENDICKE et al., 2014).

Das espécies de bifidobactérias avaliadas, *B. dentium* é a única que foi isolada da cavidade bucal. Neste estudo, *B. dentium* contribuiu para a perda da dureza de subsuperfície do esmalte, quando associado com *S. mutans* e com *S. mutans* e *S. sobrinus*. No estudo anterior desenvolvido por este grupo de pesquisa, a associação de *B. dentium* com as espécies de estreptococos produziu similar

perda de dureza superficial que quando os estreptococos foram avaliados isoladamente (VALDEZ et al., 2016). Também foi observado que *B. dentium* não apresentou destaque como cepa produtora de ácido e ácido-resistente quando comparada com *S. mutans* e outras espécies cariogênicas (NAKAJO et al., 2010; VALDEZ et al., 2016). Contrariamente, estudo de Andriantsoanirina et al. (2015) observaram que, quando comparada à outras espécies de bifidobactérias, *B. dentium* apresentou moderada tolerância ao baixo pH, com 40% das células viáveis após 60 minutos de exposição ácida. Assim, mais estudos são necessários para confirmar a capacidade acidúrica de *B. dentium*.

Os biofilmes são comunidades microbianas que se desenvolvem em uma matriz composta principalmente por polissacarídeos extracelulares ou exopolissacarídeos (PEC) que facilitam a difusão de substâncias para dentro ou fora do biofilme e auxiliam na formação de diversos microambientes dentro do biofilme. Além disso, são reconhecidos como fatores de virulência envolvidos na patogênese da cárie dentária (KOO et al., 2012). Isso ocorre porque os polímeros que se formam na superfície do dente fornecem sítios para adesão bacteriana para subsequente colonização e acúmulo de *S. mutans* e outros microrganismos (HAMADA et al., 1978). No presente estudo, as dosagens de PECs foram realizadas a partir dos biofilmes desenvolvidos na superfície do esmalte bovino, por isso, as combinações de espécies bacterianas seguiram o mesmo padrão que o realizado na análise de dureza de subsuperfície. Sendo assim, as espécies de bifidobactérias foram avaliadas somente em combinação com *S. mutans* e *S. mutans/S. sobrinus*. É conhecido que a maioria das bactérias ácido lácticas e bifidobactérias são capazes de produzir PEC. Embora não apresentem habilidade de aderir no esmalte, as bifidobactérias poderiam contribuir para o aumento da produção de PEC e estes poderiam ser substrato para as bactérias cariogênicas associadas. Salazar et al. (2009) avaliaram o crescimento de espécies bacterianas na presença de PEC isolados de *B. longum*, *B. animalis* e observaram que estes estimularam o crescimento de *Lactobacillus/Enterococcus*, *Bifidobacterium*, e *Bacteroides/Prevotella*. No presente estudo, justamente as espécies de bifidobactérias, *B. animalis* e *B. longum*, que associadas respectivamente com *S. mutans* ou *S. mutans/S. sobrinus* produziram maior perda de dureza de subsuperfície, também apresentaram a maior dosagem de PEC, sugerindo que essas espécies poderiam fornecer mais substrato para as bactérias cariogênicas,

aumentando conseqüentemente a biomassa do biofilme, como verificado em estudo anterior (VALDEZ et al., 2016) e a desmineralização do esmalte tanto em superfície (VALDEZ et al., 2016) quanto em subsuperfície (dados deste estudo).

A indução de lesão de cárie artificial *in vitro* tem sido amplamente usada como modelo para estudar o desenvolvimento da cárie dentária (CAVALCANTI et al., 2014). Alguns modelos químicos tem sido muito utilizados, tais como: ciclagem de pH e imersão em soluções desmineralizantes (GOMEZ et al., 2014; DANELON et al., 2013). Entretanto, estes modelos não simulam o processo de desmineralização que acontece na cavidade oral, devido à ausência de microrganismos e, portanto eles refletem apenas os aspectos físico-químicos da dissolução do esmalte (SEEMANN et al., 2005). Outros meios de induzir lesões de cárie artificial envolvem o uso de modelos experimentais com biofilme em que as bactérias estão seletivamente ligadas (ARTHUR et al., 2013; CAVALCANTI et al., 2014). No presente estudo, este modelo foi aplicado. Assim, este modelo *in vitro*, que usa biofilme bacteriano, seria mais representativo do que modelos experimentais químicos, visto que para o desenvolvimento da cárie dentária são necessárias interações entre superfície dentária e microbiota.

6 CONCLUSÃO

Conclui-se que, dentre as espécies avaliadas, *B. animalis* e *B. longum* quando associados com *S. mutans* ou *S. mutans/S. sobrinus* contribuíram para a maior desmineralização de subsuperfície do esmalte e para a produção de polissacarídeos extracelulares insolúveis no biofilme.

REFERÊNCIAS

Ahola AJ, Yli-Knuuttila H, Suomalainen T, Poussa T, Ahlström A, Meurman JH, Korpela R: Short-term consumption of probiotic-containing cheese and its effect on dental caries risk factors. *Arch Oral Biol* 2002; 47:799–804.

Andriantsoanirina V, Allano S, Butel MJ, Aires J. Tolerance of *Bifidobacterium* human isolates to bile, acid and oxygen. *Anaerobe*. 2013 Jun;21:39-42.

Arthur RA, Waeiss RA, Hara AT, Lippert F, Eckert GJ, Zero DT. A defined-multispecies microbial model for studying enamel caries development. *Caries Res*. 2013;47(4):318-24.

Beighton D, Gilbert SC, Clark D, Mantzourani M, Al-Haboubi M, Ali F, Ransome E, Hodson N, Fenlon M, Zoitopoulos L, Gallagher J: Isolation and identification of *Bifidobacteriaceae* from human saliva. *Appl Environ Microbiol* 2008; 74: 6457–6460.

Burne RA. Oral streptococci... products of their environment. *J Dent Res*. 1998 Mar;77(3):445-52

Caglar E, Kavaloglu SC, Kuscu OO, Sandalli N, Holgerson PL, Twetman S. Effect of chewing gums containing xylitol or probiotic bacteria on salivary mutans streptococci and lactobacilli. *Clin Oral Investig*. 2007 Dec;11(4):425-9.

Caglar E, Kuscu OO, SelviKuvvetli S, KavalogluCildir S, Sandalli N, Twetman S. Short-term effect of ice-cream containing *Bifidobacterium lactis* Bb-12 on the number of salivary mutans streptococci and lactobacilli. *Acta Odontol Scand* 2008;66:154-158.

Caglar E, Sandalli N, Twetman S, Kavaloglu S, Ergeneli S, Selvi S. Effect of yoghurt with *Bifidobacterium* DN-173 010 on salivary mutans streptococci and lactobacilli in young adults. *Acta Odont Scand* 2005;63:317-320.

Cavalcanti YW¹, Bertolini MM, da Silva WJ, Del-Bel-Cury AA, Tenuta LM, Cury JA. A three-species biofilm model for the evaluation of enamel and dentin demineralization. *Biofouling*. 2014;30(5):579-88.

Ccahuana-Vasquez RA, Tabchoury CP, Tenuta LM, Del Bel Cury AA, Vale GC, Cury JA. Effect of frequency of sucrose exposure on dental biofilm composition and enamel demineralization in the presence of fluoride. *Caries Res*. 2007;41(1): 9-45.

Ccahuana-Vásquez RA, Tacchoury COM, Tenuta LMA, Del Bel Cury AA, Vale GC. Effect of frequency of sucrose exposure on dental biofilm composition and enamel demineralization in the presence of fluoride. *Caries Res* 2007; 41:9-15.

Cildir SK, Germec D, Sandalli N, Ozdemir FI, Arun T, Twetman S, et al. Reduction of salivary mutans streptococci in orthodontic patients during daily consumption of yoghurt containing probiotic bacteria. *Eur J Orthod* 2009;31:407- 4011.

Danelon M, Takeshita EM, Sasaki KT, Delbem AC. In situ evaluation of a low fluoride concentration gel with sodium trimetaphosphate in enamel remineralization. *Am J Dent*. 2013 Feb;26(1):15-20.

De Campos PH, Sanabe ME, Rodrigues JA, Duarte DA, Santos MT, Guaré RO, Duque C, Lussi A, Diniz MB. Different bacterial models for in vitro induction of non-cavitated enamel caries-like lesions: Microhardness and polarized light microscopy analyses. *Microsc Res Tech*. 2015 Jun;78(6):444-51.

Delbem AC, Danelon M, Sasaki KT, Vieira AE, Takeshita EM, Brighenti FL et al. Effect of rinsing with water immediately after neutral gel and foam fluoride topical application on enamel remineralization: an in situ study. *Arch Oral Biol* 2010;55:913-918.

Drury TF, Horowitz AM, Ismail IA, Maertens MP, Rozier GR, Selwitz RH. Diagnosing and reporting early childhood caries for research purposes. *J Public Health Dent* 1999;59:192-197.

Dubois M. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem* 1956;28:350-356.

Fejerskov O, Kidd E. Cárie Dentária. A doença e seu tratamento clínico. Editora Santos, 2005.

Fernández CE, Giacaman RA, Tenuta LM, Cury JA. Effect of the Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* LB21 on the Cariogenicity of *Streptococcus mutans* UA159 in a Dual-Species Biofilm Model. *Caries Res.* 2015;49(6):583-90.

Fushinobu S. Unique sugar metabolic pathways of bifidobacteria. *S Biosci Biotechnol Biochem.* 2010;74(12):2374-84.

Gizani S, Petsi G, Twetman S, Caroni C, Makou M, Papagianoulis L. Effect of the probiotic bacterium *Lactobacillus reuteri* on white spot lesion development in orthodontic patients. *Eur J Orthod.* 2015 Apr 3. pii: cjv015. [

Gomez J, Pretty IA, Santarpia RP 3rd, Cantore B, Rege A, Petrou I, Ellwood RP. Quantitative light-induced fluorescence to measure enamel remineralization in vitro. *Caries Res.* 2014;48(3):223-7.

Hamada S, Tai S, Slade HD. Binding of glucosyltransferase and glucan synthesis by *Streptococcus mutans* and other bacteria. *Infect Immun* 1978;21:213–220.

Haukioja A, Loimaranta V, Tenovuo J. Probiotic bacteria affect the composition of salivary pellicle and streptococcal adhesion in vitro. *Oral Microbiol Immunol.* 2008 Aug;23(4):336-43.

Haukioja A, Yli-Knuutila H, Loimaranta V, Kari K, Ouwehand AC, Meurman JH, Tenovuo J: Oral adhesion and survival of probiotic and other lactobacilli and bifidobacteria in vitro. *Oral Microbiol Immunol* 2006; 21:326–332

Klein MI, Xiao J, Lu B, Delahunty CM, Yates JR 3rd, Koo H. *Streptococcus mutans* protein synthesis during mixed-species biofilm development by high-throughput quantitative proteomics. *PLoS One.* 2012;7(9):e45795.

Kolenbrander PE, Palmer RJ Jr, Periasamy S, Jakubovics NS. Oral multispecies biofilm development and the key role of cell-cell distance. *Nat Rev Microbiol*. 2010 Jul;8(7):471-80.

Ledder RG, Timperley AS, Friswell MK, Macfarlane S, McBain AJ. Coaggregation between and among human intestinal and oral bacteria. *FEMS Microbiol Ecol*. 2008 Dec;66(3):630-6.

Lima LM, Motisuki C, Spolidorio DM, Santos-Pinto L. In vitro evaluation of probiotics microorganisms adhesion to an artificial caries model. *Eur J Clin Nutr*. 2005 Jul;59(7):884-6.

Mantzourani M, Gilbert SC, Sulong HN, Sheehy EC, Tank S, Fenlon M, Beighton D: The isolation of bifidobacteria from occlusal carious lesions in children and adults. *Caries Res* 2009b;43: 308–313.

Mattos-Graner RO, Correa MSNP, Latorre MRO, Peres RCR, Mayer MPA. Mutans streptococci oral colonization in 12-30-month-old Brazilian children over a one year follow-up period. *J Public Health Dent* 2001;61(3):161-67.

Mattos-Graner RO, Napimoga MH, Fukushima K, Duncan MJ, Smith DJ. Comparative analysis of Gtf isozyme production and diversity in isolates of *Streptococcus mutans* with different biofilm growth phenotypes. *J Clin Microbiol*. 2004 Oct;42(10):4586-92.

Mattos-Graner RO, Zelante F, Line RC, Mayer MP. Association between caries prevalence and clinical, microbiological and dietary variables in 1.0 to 2.5-year-old Brazilian children. *Caries Res*. 1998;32:319-23.

Modesto M, Biavati B, Mattarelli P: Occurrence of the family *Bifidobacteriaceae* in human dental caries and plaque. *Caries Res* 2006; 40: 271–276.

Montalto M, Vastola M, Marigo L, Covino M, Graziosetto R, Curigliano V, Santoro L, Cuoco L, Manna R, Gasbarrini G: Probiotic treatment increases salivary counts of lactobacilli: a double-blind, randomized, controlled study. *Digestion* 2004; 69: 53–56.

Nagaoka S, Hojo K, Murata S, Mori T, Ohshima T, Maeda N. Interactions between salivary *Bifidobacterium adolescentis* and other oral bacteria: in vitro coaggregation and coadhesion assays. *FEMS Microbiol Lett.* 2008 Apr;281(2):183-9.

Nakajo K, Takahashi N, Beighton D. Resistance to acidic environments of caries-associated bacteria: *Bifidobacterium dentium* and *Bifidobacterium longum*. *Caries Res.* 2010;44(5):431-7.

Nobre dos Santos M, Melo dos Santos L, Francisco SB, Cury JA. Relationship among dental plaque composition, daily sugar exposure and caries in the primary dentition. *Caries Res* 2002; 36:347-352.

Ramos-Gomez FJ, Weintraub JA, Gansky SA, Hoover CI, Featherstone JD. Bacterial, behavioral and environmental factors associated with early childhood caries. *J Clin Pediatr Dent* 2002;26(2):165-73.

Salazar N, Ruas-Madiedo P, Kolida S, Collins M, Rastall R, Gibson G, de Los Reyes-Gavilán CG. Exopolysaccharides produced by *Bifidobacterium longum* IPLA E44 and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* IPLA R1 modify the composition and metabolic activity of human faecal microbiota in pH-controlled batch cultures. *Int J Food Microbiol.* 2009 Nov 15;135(3):260-7. d

Sansone C, van Houte J, Joshipura K, Kent R, Margolis HC. The association of mutans streptococci and non-mutans streptococci capable of acidogenesis at a low pH with dental caries on enamel and root surfaces. *J Dent Res* 1993;72:508-516.

Saxelin M, Tynkkynen S, Mattila-Sandholm T, deVos WM. Probiotic and other functional microbes: from markets to mechanisms. *Curr Opin Biotechnol* 2005;16:204-211.

Schwendicke F, Dorfer C, Kneist S, Meyer-Lueckel H, Paris S: Cariogenic effects of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG in a dental biofilm model. *Caries Res* 2014; 48: 186–192.

Schwendicke F, Dörfer C, Kneist S, Meyer-Lueckel H, Paris S. Cariogenic effects of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG in a dental biofilm model. *Caries Res.* 2014;48(3):186-92. doi: 10.1159/000355907. Epub 2014 Jan 29.

Seemann R, Bizhang M, Kluck I, Loth J, Roulet JF. A novel in vitro microbial-based model for studying caries formation--development and initial testing. *Caries Res.* 2005 May-Jun;39(3):185-90.

Tanner AC, Kent RL Jr, Holgerson PL, Hughes CV, Loo CY, Kanasi E, Chalmers NI, Johansson I. Microbiota of severe early childhood caries before and after therapy. *J Dent Res.* 2011 Nov;90(11):1298-305.

Torlakovic L, Klepac-Ceraj V, Ogaard B, Cotton SL, Paster BJ, Olsen I. Microbial community succession on developing lesions on human enamel. *J Oral Microbiol.* 2012;4. doi: 10.3402/jom.v4i0.16125. Epub 2012 Mar 14.

Valdez RM, Dos Santos VR, Caiaffa KS, Danelon M, Arthur RA, Negrini TC, Delbem AC, Duque C. Comparative in vitro investigation of the cariogenic potential of bifidobacteria. *Arch Oral Biol.* 2016 Jul;71:97-103.

vanHoute J, Lopman J, Kent R. The final pH of bacteria comprising the predominant flora on sound and carious human root and enamel surfaces. *J Dent Res* 1996;75:1008-1014.

vanHoute J, Sansone C, Joshipura K, Kent R. *In vitro* acidogenic potential and mutans streptococci of human smooth-surface plaque associated with initial caries lesions and sound enamel. *J Dent Res* 1991;7:1497-1502.

vanRuyven FO, Lingstrom P, van Houte J, Kent R. Relationship among mutans streptococci, "low-pH" bacteria, and iodophilic polysaccharide-producing bacteria in dental plaque and early enamel caries in humans. *J Dent Res* 2000;79:778-784.

Vieira AEM, Delbem ACB, Sasaki KT, Rodrigues E, Cury JA, Cunha RF. Fluoride dose response in Ph-Cycling models using bovine enamel. *Caries Res* 2005;39:514-520.

ANEXO

APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM ANIMAIS (CEUA)



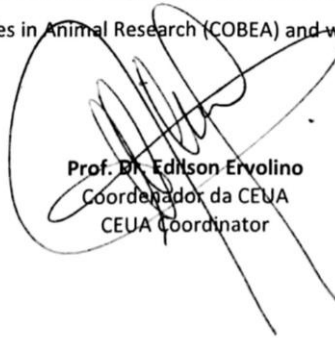
Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)
Committee for Ethical Use of Animals (CEUA)

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto “Detecção molecular e avaliação do potencial cariogênico *in vitro* de bifidobactérias isoladas de crianças com cárie da primeira infância” sob responsabilidade da Pesquisadora **CRISTIANE DUQUE** e colaboração de Remberto Marcelo Argandoña Valdez e Vanessa Rodrigues dos Santos está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo CEUA, de acordo com o processo **00197-2013**.

CERTIFICATE

We certify that the research “Molecular detection and evaluation of *in vitro* cariogenic potential of bifidobacteria isolated from children with early childhood caries”, process number **00197-2013**, under responsibility of **CRISTIANE DUQUE** and with collaboration of Remberto Marcelo Argandoña Valdez and Vanessa Rodrigues dos Santos agree with Ethical Principles in Animal Research (COBEA) and was approved by CEUA.



Prof. Dr. Edilson Ervolino
Coordenador da CEUA
CEUA Coordinator

APÊNDICE 1

Análise da dureza em secção longitudinal



Figura 1. Corte dos dentes bovinos e obtenção dos blocos.

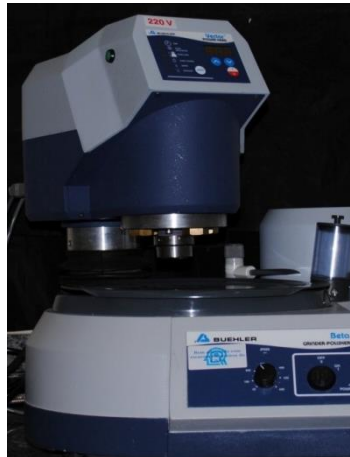


Figura 2. Polimento dos blocos de esmalte.



Figura 3. Colagem dos blocos de esmalte e distribuição de 2 ml das culturas bacterianas nas placas de microtitulação (24 poços).

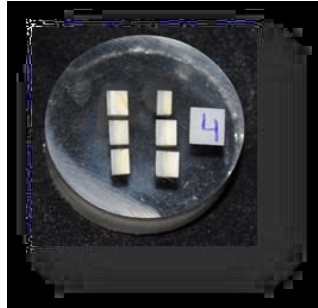


Figura 3. Corpo de prova – plano longitudinal voltado para a superfície da resina acrílica.



Figura 4. Microdurômetro Micromet 5114 Hardness Tester (Buehler, Lake Bluff, USA e Mitutoyo Corporation, Kanagawa, Japan), com penetrador (Knoop) acoplado ao Software para análise de imagem Buehler OminMet (Buehler, Lake Bluff, USA).

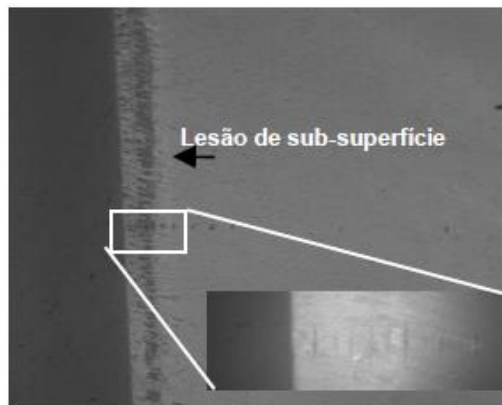
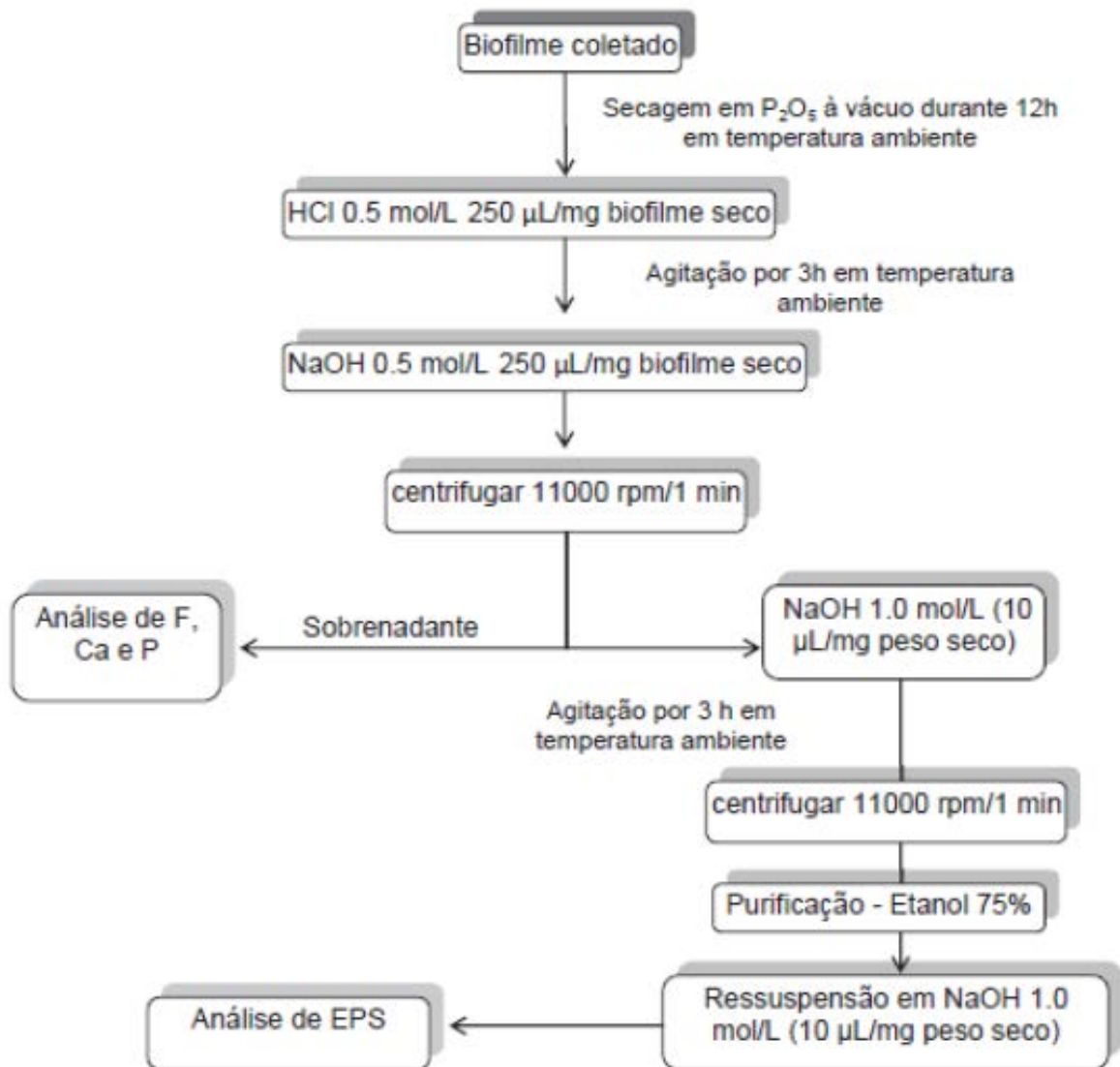


Figura 5. Fotomicrografia das impressões. (Aumento: 1000x).

APÊNDICE 2

Protocolo para análise bioquímica do biofilme dentário seco



DOSAGEM DE POLISSACARÍDEOS EXTRACELULARES INSOLÚVEIS

1. Secagem do biofilme dentário e procedimentos para posterior análise

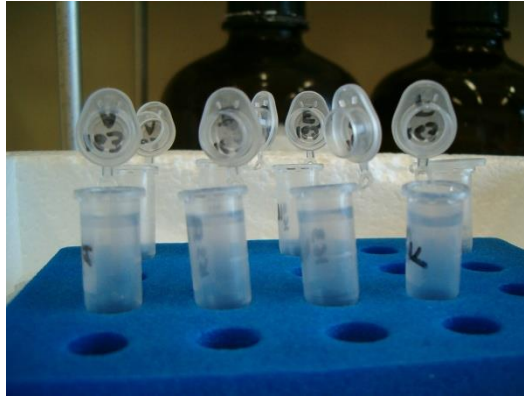


Figura 1. Transferência do biofilme para eppendorfs contendo PBS e armazenamento a -70°C .



Figura 2. Pentóxido de fósforo em placa de petri no fundo da jarra.



Figura 3. Amostras de biofilme acondicionadas em microtubos abertos, colocados sobre uma base acima da placa de petri contendo pentóxido de fósforo. Secagem do biofilme em jarra de anaerobiose (sob vácuo), por 12 horas.



Figura 4. Pesagem do biofilme seco.

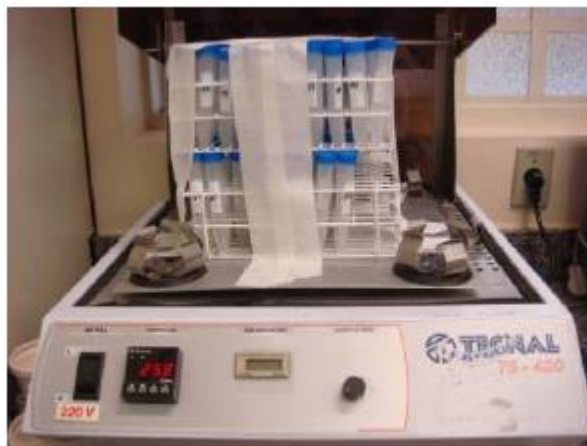


Figura 5. Agitação em incubadora TE-420 (Tecnal, Piracicaba-SP) por 3 horas a temperatura ambiente, após adição de HCl 0,5 mol/L ao biofilme seco.

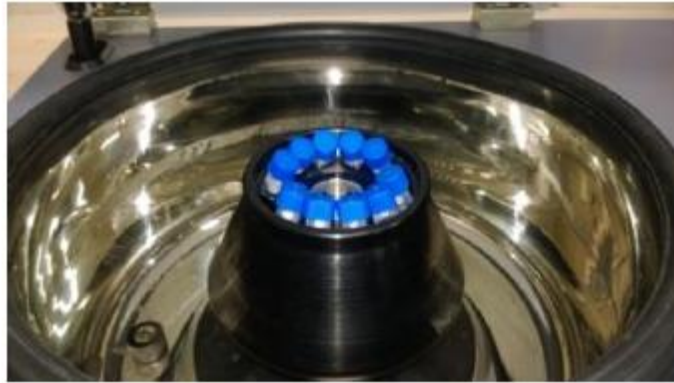


Figura 6. Centrifugação das amostras em centrífuga de bancada Combi 514R (HanilBiomed Inc., Korea) por 3 horas. Tubos posicionados.

2. Dosagem de carboidrato álcali-solúvel

A dosagem dos carboidratos álcali-solúveis foi realizada pelo método fenol-sulfúrico conforme descrito por Dubois et al. (1956), empregando os seguintes reagentes:

1 – Fenol 5%:

2 – Ácido Sulfúrico concentrado

A reação foi feita de acordo com a tabela abaixo:

	Blank	Padrão	Padrão	Padrão	Padrão	Padrão	Amostra
Água deionizada	0.5 mL	0.4 mL	0.3 mL	0.2 mL	0.1 mL	-	0.3 mL
Solução padrão (Glicose)	-	0.1 mL	0.2 mL	0.3 mL	0.4 mL	0.5 mL	-
Amostra	-	-	-	-	-	-	0.2 mL
Fenol 5%	0.5 mL em todos						
Ac. Sulfúrico	2.5 mL em todos, agitar imediatamente, esperar 20 minutos e ler a 490 nm						

Inicialmente foi colocada água deionizada nos tubos de ensaio de acordo com os volumes descritos na tabela acima. A seguir foram colocados os padrões de glicose ou as amostras, em duplicata. Então, foram adicionados 0.5 mL de fenol 5% em todos os tubos e em seguida colocou-se 2.5 mL de ácido sulfúrico e agitou-se imediatamente. A coloração da reação foi desenvolvida pela adição do ácido sulfúrico concentrado. Após 20 min da colocação do ácido sulfúrico realizou-se a leitura em espectrofotômetro (Espectrophotometer UV-1800 Shimadzu) a 490 nm de absorvância. Esses valores foram transferidos para uma planilha (programa Excel-Microsoft) e convertidos para μg de glicose.