

# RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)  
autor(a), o texto completo desta tese  
será disponibilizado somente a partir  
de 30/03/2023.



**UNESP - Universidade Estadual Paulista**  
**“Júlio de Mesquita Filho”**  
**Faculdade de Odontologia de Araraquara**



**Elkin Jahir Florez Salamanca**

**Influência de *Streptococcus mutans* na construção da matriz durante o desenvolvimento de biofilmes microcosmos expostos a desafio nutricional**

**Araraquara**

**2021**



**UNESP - Universidade Estadual Paulista**  
**“Júlio de Mesquita Filho”**  
**Faculdade de Odontologia de Araraquara**



**Elkin Jahir Florez Salamanca**

**Influência de *Streptococcus mutans* na construção da matriz durante o desenvolvimento de biofilmes microcosmos expostos a desafio nutricional**

Tese apresentada à Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara para obtenção do título de Doutor em Reabilitação Oral, na Área de Materiais Dentários e Prótese

**Orientador: Dra. Marlise Inêz Klein Furlan**

**Araraquara**

**2021**

F634i Florez-Salamanca, Elkin Jahir  
Influência de Streptococcus mutans na construção da matriz durante o desenvolvimento de biofilmes microcosmos expostos a desafio nutricional / Elkin Jahir Florez-Salamanca. -- Araraquara, 2021  
156 p. : il., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara  
Orientadora: Marlise Inêz Klein Furlan

1. Cárie dental. 2. Biofilme. 3. Microbiota. 4. Desmineralização. 5. Carboidratos na dieta. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp.  
Biblioteca da Faculdade de Odontologia, Araraquara. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

**Elkin Jahir Florez Salamanca**

**Influência de *Streptococcus mutans* na construção da matriz durante o desenvolvimento de biofilmes microcosmos expostos a desafio nutricional.**

**Comissão julgadora**

**Tese para obtenção do grau de Doutor em Reabilitação Oral**

Presidente e orientador: Dra. Marlise Inêz Klein Furlan

2º Examinador: Profa. Dra. Tamires Timm Maske

3º Examinador: Profa. Dra. Fernanda Lourenção Brighenti

4º Examinador: Profa. Dra. Daniela Rios Honório

5º Examinador: Profa. Dra. Josimeri Hebling Costa

Araraquara, 30 de março de 2021.

## **DADOS CURRICULARES**

### **Elkin Jahir Florez Salamanca**

**NASCIMENTO:** 28/03/1988 – Bucaramanga, Santander - Colômbia

**FILIAÇÃO:** Ana Ines Salamanca Maluendas (Mãe)  
Domingo Florez Jaimes (Pai)

**2017/Atual** Curso de Pós-Graduação em Reabilitação Oral, nível Doutorado  
Universidade Estadual Paulista UNESP, Araraquara – Brasil

**2018/2019** Extensão universitária em Prótese fixa: Estética com ênfase em  
restaurações adesivas indiretas  
Associação Paulista de Cirurgiões Dentistas, Araraquara – Brasil.

**2015/2017** Curso de Pós-Graduação em Reabilitação Oral, nível Mestrado  
Universidade Estadual Paulista UNESP, Araraquara - Brasil

**2015/2016** Extensão universitária em Dentística estética integrada.  
Fundação Araraquarense de Ensino e Pesquisa em Odontologia, FAEPO,  
Araraquara - Brasil

**2005/2011** Curso de Graduação em Odontologia  
Universidad Santo Tomas de Aquino Bucaramanga, Santander - Colômbia

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais Ana Ines Salamanca e Domingo Florez, que sempre me motivaram a ser curioso e continuar aprendendo, obrigado por serem o exemplo de pessoas esforçadas e pelo suporte nos momentos mais complicados.

Ao meu filho Daniel Santiago Florez por ter sido a minha fonte de motivação quando o cansaço, a solidão e os problemas pareciam nunca terminar, obrigado filho por ter sido tão maduro e valente ao aceitar o sacrifício de estarmos longe, graças a ti consegui realizar o meu sonho de realizar os meus estudos.

Ao meu irmão Ludwing Florez por ser um excelente ponto de referência e exemplo, obrigado por ser uma bússola que norteia o meu caminho, mesmo a milhares de quilômetros de distância.

A Ana Carolina minha linda, brilhante e amorosa esposa. Obrigado por ter acreditado em mim, por ter me ajudado na organização das minhas ideias, por ter me e me confortado inúmeras vezes, por ter sido fonte de motivação e suporte, espero conseguir retribuir toda a paciência e amor que tem comigo.

A cada uma das pessoas amáveis que convivi e compartilhei, vocês foram fundamentais durante estes quase 6 anos de aprendizagens, pois me ajudaram a crescer. Obrigado pelos momentos felizes partilhados, pelas conversas e conselhos, pelos gestos de carinho e pela solidariedade quando mais precisei, de forma geral vocês se tornaram a minha família no Brasil.

A minha orientadora Marlise Inêz Klein, pelos ensinamentos, retroalimentações e críticas construtivas, as quais me ajudaram a atingir os meus objetivos acadêmicos. Teus ensinamentos foram fundamentais para me tornar uma pessoa mais crítica, motivada pelo conhecimento e de forma geral um profissional mais preparado.

Ao programa de Pós-Graduação em Reabilitação Oral, FOAr-UNESP, em especial à Profa. Dra. Ana Claudia Pavarina.

Ao Laboratório de Caracterização Estrutural (LCE / DEMa / UFSCar), Laboratório de Patologia Experimental e Biomateriais (LPEB/ FOAr/ Unesp), Laboratório de Microbiologia Aplicada (FOAr/ Unesp), Laboratório de Biologia Molecular

(FOAr/ Unesp), Laboratório de Materiais Dentários (FOAr/ Unesp), Laboratório de Ensaio Mecânicos (FOAr, Unesp) e ao Centro de Tecnologia de Radiação-CTR (IPEN / CNEN-SP).

À FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processo nº 2017/26623-5) pelo apoio financeiro, essencial para a realização dessa pesquisa.

À CAPES: O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001.

Ao ICETEX – Instituto Colombiano de Crédito Educacional e Estudos Técnicos no Exterior pelo financiamento para passagens e apoio de instalação (ICETEX, crédito ID 3594721).



Se não podermos pensar por nós mesmos, se formos incapazes de questionar a autoridade, somos pura massa em mãos dos que exercem o poder. Mas se os cidadãos recebem uma educação e formam suas próprias opiniões, os que estão no poder trabalham para nós. “

Carl Sagan\*

---

\*Sagan Carl. O mundo assombrado pelos demônios: a ciência vista como uma vela no escuro. São Paulo, Brasil: Companhia das Letras; 2006.

Florez Salamanca EJ. Influência de *Streptococcus mutans* na construção da matriz durante o desenvolvimento de biofilmes microcosmos expostos a desafio nutricional. [tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2021.

## RESUMO

A cárie é a doença crônica mais prevalente no mundo. Sua fisiopatologia está associada a fatores como: biofilmes (microrganismos e matriz extracelular); dieta rica em carboidratos; tecidos dentários e tempo de interação. Embora muitos modelos laboratoriais tenham simplificado o estudo da cárie focando apenas no entendimento em microrganismos específicos, mimetizar a cavidade bucal para o controle das variáveis que influenciam a cárie ainda é um dos maiores desafios. O objetivo do estudo foi avaliar de forma longitudinal a importância de *Streptococcus mutans* na construção da matriz extracelular e na estruturação de biofilmes polimicrobianos associados a cárie. Foram desenvolvidos biofilmes microcosmos para avaliar o desenvolvimento destas comunidades. Para isso a microbiota salivar humana foi inoculada sobre discos de esmalte bovino em quatro desafios nutricionais ou modelos de biofilme *in vitro*. Foram avaliados: pH dos meios de cultura; microdureza e rugosidade dos discos de esmalte; biomassa total e dinâmica populacional (via UFC. mL<sup>-1</sup>) dos biofilmes. Entre os modelos estudados o modelo 3 (M3) – ‘Três refeições diárias’ apresentou características mais próximas da cavidade bucal, uma vez que os valores de pH permaneceram próximos do neutro, apresentaram desmineralização sutil e progressiva do esmalte, não favoreceram grupos microbianos específicos e permitiram o acúmulo do biofilme, o que foi evidenciado pelo aumento da biomassa e da microbiota total. M3 foi utilizado para testar duas estratégias de inoculação única (UNI) e múltipla (MULTI), a segunda visando simular a colonização secundária dos microrganismos. Foram avaliados: pH dos meios de cultura; os biofilmes (arquitetura; dinâmica populacional microbiana via UFC. mL<sup>-1</sup>, sequenciamento de DNA e qPCR; biomassa insolúvel e componentes da matriz extracelular); e desmineralização do esmalte (via microdureza). As flutuações observadas no pH foram semelhantes as relatadas na cavidade bucal, observando-se uma acidificação após ingestão de carboidratos e a ação tamponante da saliva, simulada com o retorno do caldo de cultura de saliva com um pH neutro. A configuração espacial foi semelhante a encontrada em biofilmes orais associados com cárie, representada por arquiteturas do tipo ouriços (*hedgehog*) e espigas de milho (*corncob*). A representatividade dos estreptococos do grupo mutans foi  $\leq 2$  % da microbiota total cultivável. O gênero *Streptococcus* foi o mais abundante, porém, *S. mutans* não foi detectado em nenhuma amostra via sequenciamento. Na estratégia MULTI foi detectada uma maior diversidade microbiana. Ao quantificar o número de células bacterianas via qPCR observou-se que *S. mutans* representa  $< 0,01$  % da saliva e  $< 0,005$  % nos biofilmes. Conforme o envelhecimento do biofilme, houve um aumento da biomassa, dos exopolissacarídeos e do DNA extracelular na matriz nas duas estratégias. O acúmulo destes componentes está associado a uma estrutura coesa que pode favorecer a formação de nichos ácidos. O amadurecimento do biofilme e a desmineralização do esmalte aconteceu de forma independente à baixa proporção de *S. mutans* e da estratégia de inoculação,

diminuindo o protagonismo de certas espécies em uma doença que possui caráter multifatorial.

**Palavras – chave:** Cárie dental. Biofilme. Microbiota. Desmineralização. Carboidratos na dieta.

Florez Salamanca EJ. Influence of *Streptococcus mutans* on matrix construction during the development of microcosm biofilms exposed to nutritional challenge. [tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2021.

## ABSTRACT

Dental caries is the most prevalent chronic disease in the world. Its pathophysiology is associated with factors such as biofilms (microorganisms and extracellular matrix), carbohydrate-rich diet, dental tissues, and interaction time. Although many laboratory models have simplified the study of caries by focusing only on understanding specific microorganisms, mimicking the oral cavity to control the variables that influence caries is still one of the greatest challenges. The study aimed to evaluate longitudinally the importance of *Streptococcus mutans* constructing the extracellular matrix and structuring polymicrobial biofilms associated with dental caries. Microcosm biofilms were developed to assess the dynamics of these communities. For this purpose, the human salivary microbiota was inoculated on bovine enamel discs in four biofilm models *in vitro*. The following were assessed: pH culture media; microhardness and roughness of enamel discs; total biomass and population dynamics (via CFU mL<sup>-1</sup>) of biofilms. Among the models studied, model 3 (M3) - 'Three meals a day' presented characteristics closest to the oral cavity since the pH values remained close to neutral, subtle and progressive enamel demineralization, did not favor specific microbial groups, and allowed the accumulation of biofilm, which was evidenced by the increase in biomass and total microbiota. M3 was used to test two single (UNI) and multiple (MULTI) inoculation strategies, the second simulating the secondary colonization of microorganisms. The following were assessed: pH of the culture media; biofilms (architecture; microbial population dynamics via CFU mL<sup>-1</sup>, DNA and qPCR sequencing; insoluble biomass and matrix components); and enamel demineralization (via microhardness). The fluctuations observed in the pH were similar to those reported in the oral cavity; there was acidification after exposure to carbohydrates, and the buffering action of the saliva was simulated by returning biofilms to a saliva culture broth with a neutral pH. The spatial configuration was similar to that found in oral biofilms associated with caries, represented by hedgehogs and corn cobs architectures. The representativeness of streptococci from the mutans group was  $\leq 2\%$  of the total cultivable microbiota. The genus *Streptococcus* was the most abundant; however, *S. mutans* was not detected in any sample via sequencing. In the MULTI strategy, a greater microbial diversity was detected. When quantifying the number of bacterial cells via qPCR, it was observed that *S. mutans* represents  $<0.01\%$  of saliva and  $<0.005\%$  in biofilms. As the biofilm aged, there was an increase in biomass, exopolysaccharides, and extracellular DNA in the extracellular matrix in both inoculation strategies. The accumulation of these components is associated with a cohesive structure that can favor the formation of acidic niches. The maturation of the biofilm and enamel demineralization occurred independently of the low proportion of *S. mutans* and the inoculation strategy, reducing the role of specific species in the multifactorial disease.

**Keywords:** Dental caries. Biofilm. Microbiota. Demineralization. Dietary carbohydrates.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
<b>2 PROPOSIÇÃO</b> .....	<b>20</b>
<b>3 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>21</b>
<b>3.1 Cárie Dental</b> .....	<b>21</b>
<b>3.2 Biofilme Dental</b> .....	<b>24</b>
<b>3.3 Matriz Extracelular de Biofilme</b> .....	<b>26</b>
<b>3.4 Modelos de Cárie <i>in vitro</i></b> .....	<b>30</b>
<b>3.5 Dieta</b> .....	<b>32</b>
<b>3.6 Saliva</b> .....	<b>34</b>
<b>3.7 Microrganismos</b> .....	<b>35</b>
<b>3.8 Substrato (Esmalte Dentário)</b> .....	<b>38</b>
<b>3.9 Perspectivas Futuras no Estudo da Cárie</b> .....	<b>39</b>
<b>4 MATERIAL E MÉTODO</b> .....	<b>41</b>
<b>4.1 Corpos de Prova de Esmalte para Teste Microbiológicos</b> .....	<b>41</b>
<b>4.1.1 Seleção de coroas de dentes bovinos</b> .....	<b>41</b>
<b>4.1.2 Corte dos dentes e preparo dos discos</b> .....	<b>41</b>
<b>4.1.3 Caracterização morfológica e mecânica dos discos</b> .....	<b>42</b>
<b>4.1.4 Limpeza dos discos e posicionamento em dispositivos</b> .....	<b>45</b>
<b>4.1.5 Esterilização dos discos acoplados nos dispositivos</b> .....	<b>45</b>
<b>4.2 Inóculo da Microbiota Salivar Humana</b> .....	<b>46</b>
<b>4.2.1 Critérios para a seleção de voluntários e coleta da saliva</b> .....	<b>46</b>
<b>4.2.2 Processamento da saliva</b> .....	<b>47</b>
<b>4.2.3 Avaliação da microbiota dos precipitados da saliva</b> .....	<b>48</b>
<b>4.3 Ensaio para Simular Dietas Cariogênicas</b> .....	<b>51</b>
<b>4.3.1 Modelos de biofilme utilizados para os desafios nutricionais</b> .....	<b>51</b>
<b>4.3.2 Formação dos biofilmes</b> .....	<b>54</b>
<b>4.3.3 Avaliação da mudança de pH do meio de cultura</b> .....	<b>54</b>
<b>4.3.4 Processamento do biofilme</b> .....	<b>55</b>

4.3.5 Avaliação da dinâmica da população microbiana .....	55
4.3.6 Avaliação da biomassa total .....	55
4.3.7 Avaliação da dureza e rugosidade superficial do esmalte .....	56
4.4 Ensaio para Simular a Colonização Secundária e Tardia durante a Formação dos Biofilmes .....	57
4.4.1 Formação dos biofilmes .....	58
4.4.2 Avaliação da mudança de pH do meio de cultura .....	59
4.4.3 Avaliação da arquitetura de biofilmes por MEV.....	59
4.4.4 Processamento dos biofilmes .....	61
4.4.5 Avaliação da dinâmica da população microbiana .....	63
4.4.6 Avaliação da matriz extracelular do biofilme e da biomassa da porção insolúvel do biofilme .....	69
4.4.7 Avaliação superficial do disco de esmalte .....	72
4.5 Análise Estatística .....	72
5 RESULTADOS .....	75
5.1 Caracterização de Corpos de Prova de Esmalte Bovino para Testes Microbiológicos .....	75
5.2 Microbiota Salivar dos Voluntários .....	77
5.3 Estabelecimento de Modelos de Biofilme de Microcosmo que Reproduzem a Ingestão de uma Dieta Cariogênica <sup>125</sup> .....	79
5.3.1 Perfil do valor de pH frente diferentes dietas cariogênicas.....	79
5.3.2 Dinâmica populacional microbiana dos modelos de biofilme cariogênicos	82
5.3.3 Biomassa total dos modelos de biofilme cariogênicos .....	84
5.3.4 Microdureza e rugosidade da superfície do disco de esmalte onde se formaram os biofilmes cariogênicos .....	86
5.4 Ensaio para Simular a Colonização Secundária e Tardia Durante a Formação dos Biofilmes .....	89
5.4.1 Perfil de pH do meio de cultura segundo a estratégia de inoculação .....	89
5.4.2 Arquitetura do biofilme segundo a estratégia de inoculação .....	91
5.4.3 Dinâmica populacional microbiana .....	94

<b>5.4.4 Matriz extracelular e biomassa dos biofilmes cariogênicos segundo a estratégia de inoculação .....</b>	<b>106</b>
<b>5.4.5 Microdureza e rugosidade da superfície do disco de esmalte após crescimento dos biofilmes cariogênicos segundo a estratégia de inoculação ..</b>	<b>109</b>
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>112</b>
<b>7 CONCLUSÃO .....</b>	<b>129</b>
<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>131</b>
<b>APENDICE A .....</b>	<b>144</b>
<b>ANEXO A .....</b>	<b>152</b>
<b>ANEXO B.....</b>	<b>153</b>



## 1 INTRODUÇÃO

A cárie é uma doença que gera dor, sofrimento, diminuição em várias funções da cavidade bucal, além do alto custo envolvido no tratamento. É uma das doenças mais prevalentes no mundo, tornando-se um problema de saúde pública (Petersen <sup>1</sup>, 2008; Kassebaum et al. <sup>2</sup>, 2015). Esta doença é um processo biológico dinâmico que está fortemente relacionado com carboidratos presentes na dieta do hospedeiro e estruturação de comunidades polimicrobianas (biofilmes), resultando na produção de ácidos por estes microrganismos. Estes ácidos interagem com as superfícies dos tecidos dentais, levando a perda de minerais nos tecidos e, conseqüentemente nas lesões de cárie (Selwitz et al. <sup>3</sup>, 2007).

A cavidade bucal fornece condições ideais para os microrganismos, configurando um dos locais com maior densidade e diversidade do corpo humano (The Human Microbiome Project consortium <sup>4</sup>, 2012). A saliva é um fluido biológico da cavidade bucal rico em água, eletrólitos (sódio, cálcio, potássio, magnésio, bicarbonato e fosfato), restos de células epiteliais, imunoglobulinas, enzimas, proteínas, polissacarídeos, amônia e ureia. Todos estes compostos fornecem nutrientes suficiente para a sobrevivência de uma diversidade de microrganismos. Estes microrganismos são provenientes de diferentes nichos e estão suspensos na saliva (forma planctônica), conseguindo assim se dispersarem por toda a cavidade bucal (Humphrey e Williamson <sup>5</sup>, 2001). Alguns destes microrganismos chamados de colonizadores iniciais apresentam ferramentas biológicas para aderirem as superfícies, tais como mucosas e tecidos dentários. Uma vez aderidos, o processo de colonização das superfícies e formação de microcolônias é iniciado. Outros grupos microbianos têm como papel a colonização secundária e tardia, uma vez que possuem afinidade com alguns elementos das superfícies dos colonizadores iniciais e/ou com as substâncias por eles secretadas. Todo este processo resulta na construção de complexas comunidades conhecidas como biofilmes (Rickard et al. <sup>6</sup>, 2003).

As propriedades e as atividades metabólicas e fisiológicas que os microrganismos apresentam na forma planctônica diferem de quando estão na forma de biofilme (Flemming et al. <sup>7</sup>, 2016). Nos biofilmes as células microbianas estão imersas em substâncias poliméricas extracelulares hidratadas, tais como: exopolissacarídeos, proteínas e ácidos nucleicos, entre outras. Estas substâncias constroem uma estrutura tridimensional (3D) conhecida como matriz extracelular (Flemming e Wingender <sup>8</sup>, 2010).

Os microrganismos que constituem o biofilme estão constantemente interagindo entre si, seja se comunicando, competindo e/ou em forma de mutualismo, garantindo assim a auto sobrevivência (Hooshangi e Bentley <sup>9</sup>, 2008). Como consequência destas interações, ocorre algumas alterações no ecossistema oral, favorecendo grupos microbianos específicos, e conseqüentemente um desbalanço entre os microrganismos protetores e agressores. Este processo é denominado disbiose (Samaranayake e Matsaruba <sup>10</sup>, 2017). A proliferação de algumas espécies de microrganismos pode interferir na capacidade de reparo do hospedeiro, resultando em doenças (Rosier et al. <sup>11</sup>, 2018).

Nos biofilmes maduros associados às lesões de cáries ativas, observa-se uma matriz extracelular coesa que favorece a acumulação de produtos metabólicos como ácidos orgânicos, conseqüentemente favorecendo a queda de pH. Isso ocorre pois os microrganismos em geral são versáteis e conseguem utilizar uma ampla gama de carboidratos provenientes da dieta do hospedeiro para a obtenção de energia. Como consequência, há a produção de resíduos metabólicos, como alguns ácidos orgânicos. Estes microrganismos são denominados microrganismos acidogênicos (Loesche <sup>12</sup>, 1988). O entorno ácido dentro do biofilme é hostil para alguns microrganismos, reduzindo assim a diversidade microbiana. No entanto favorece a sobrevivência de microrganismos que possuem a capacidade de prosperar em pH baixo, denominados microrganismos acidúricos (Marsh <sup>13</sup>, 2003; Takahashi e Nyvad <sup>14</sup>, 2011). Além da capacidade de sobreviverem no entorno ácido, estes microrganismos também possuem alguns sistemas que auxiliam na prevenção do acúmulo de níveis tóxicos de

espécies reativas de oxigênio, garantindo sua sobrevivência quando submetido ao estresse oxidativo (Lemos et al. <sup>15</sup>, 2019).

A estrutura coesa do biofilme dificulta a difusão de ácidos para fora do biofilme, e conseqüentemente, a difusão da saliva para o interior dele, diminuindo assim a capacidade tamponante da saliva, e dificultando o processo de remineralização, uma vez que os íons cálcio, fosfato e flúor presentes na saliva não conseguem interagir com os tecidos dentários (Hicks et al. <sup>16</sup>, 2004). Desta forma os microrganismos produtores de acidogênicos e acidúricos têm sido considerados por anos como agentes etiológicos da cárie. Por outro lado, é válido ressaltar que outros fatores contribuem para a virulência, tais como a capacidade dos microrganismos de adesão, de formação do biofilme, de serem tolerância a meios ácidos e de produção de bacteriocinas (Takahashi <sup>17</sup>, 2015).

Uma vez que as lesões cariosas estão associadas com a desmineralização, diferentes estratégias têm sido utilizadas para representar e simular este processo. Como por exemplo, o crescimento de microrganismos sobre tecidos dentários, com exposição intermitente a diferentes tipos de carboidratos, gerando flutuações de pH (Maske et al. <sup>18</sup>, 2017). De forma geral, independentemente dos modelos de biofilmes utilizados, há uma extrema dificuldade na reprodução *in vitro* do ambiente natural encontrado *in vivo*, tendo como principal barreira o controle dos múltiplos fatores que influenciam o crescimento microbiano. Entre os muitos modelos propostos, há um modelo que se pode considerar que melhor mimetiza o biofilme dental, tendo como vantagem a utilização de um inóculo de microbiota humana normal (saliva ou biofilme dental de voluntários); este modelo é conhecido como biofilme microcosmo (Wimpenny <sup>19</sup>, 1981).

A maioria dos trabalhos têm focado o estudo na enumeração de patógenos e/ou identificação de novos microrganismos acidogênicos e acidúricos, na compreensão destes e no desenvolvimento de estratégias específicas de biofilmes dentários. Como resultado, temos um grande acervo na literatura para melhor entendimento da complexidade do processo carioso.

Dentre vários microrganismos estudados, destaca-se a espécie *Streptococcus mutans*. Este microrganismo apresenta algumas características que podem influenciar no estabelecimento da cárie, como a capacidade de sintetizar exopolissacarídeos (Bowen e Koo <sup>20</sup>, 2011). A presença de glucanos e frutanos, influenciam na colonização de superfícies duras, na construção da matriz extracelular do biofilme e na adesão de novas bactérias, modulando desta forma o desenvolvimento do biofilme cariogênico (Bowen e Koo <sup>20</sup>, 2011, Klein et al. <sup>21</sup>, 2009). Adicionalmente, esses microrganismos possuem mecanismos para liberar DNA extracelular e ácidos lipoteicóicos, os quais interagem com os exopolissacarídeos. Esta interação torna mais estável e coesa a matriz conforme o biofilme envelhece, e conseqüentemente, dificulta a ação tamponante da saliva (Koo, et al. <sup>22</sup>, 2013; Liao et al. <sup>23</sup>, 2014; Castillo Pedraza et al. <sup>24</sup>, 2017).

Entende-se que para o estudo desta doença, que está fortemente relacionada com os biofilmes, é fundamental compreender como a matriz extracelular dos biofilmes pode influenciar no acúmulo das células microbianas, e que sua composição pode ser modificada pelos microrganismos que utilizam diferentes rotas metabólicas (Xiao, et al. <sup>25</sup>, 2012; Koo et al. <sup>22</sup>, 2013).

Para ter um melhor entendimento da cárie e para o delineamento dos experimentos é fundamental compreender que: 1) Os biofilmes são agentes etiológicos da cárie, tanto a sua composição química (matriz extracelular) como a sua composição microbiana; 2) As relações que existem entre diferentes grupos microbianos poderiam ser melhor esclarecidas se os inóculos fossem provenientes de amostras clínicas que representem a cavidade bucal; 3) A exposição a alimentos considerados cariogênicos (carboidratos como sacarose e amido) deve ser intermitente e de curta duração; 4) Os microrganismos orais estão imersos em saliva e assim evoluíram na presença dela, tornando fundamental incluí-la como meio de cultura *in vitro*; 5) A desmineralização dos tecidos dentários não pode ser simulada sobre superfícies artificiais; 6) O ecossistema oral é construído por interações muito complexas entre saliva, microrganismos, esmalte-dentina e dieta; a omissão de um destes fatores pode levar a desfechos que

se afastam do que realmente constituem a fisiopatologia da cárie; 7) A cooperação entre as mais diversas áreas do conhecimento é fundamental para interpretar os resultados e construir um conceito desde uma perspectiva holística.

Como mencionado, na literatura científica são utilizadas diversas metodologias para o estudo da cárie, e dificilmente se encontra um sistema que seja abrangente e mimetize de forma realista o entorno bucal onde a cárie se desenvolve. Devido às limitações já mencionadas sobre os modelos *in vitro*, primeiramente se torna necessário encarar o desafio de estabelecer um modelo de biofilme que consiga incluir de forma mais realista os fatores que mais influenciam o estabelecimento da doença (Azeredo et al. <sup>26</sup>, 2017). Sumarizando os estudos, percebe-se que a cárie é um processo em que a composição microbiana da cavidade bucal vai apresentando uma transição progressiva (não drástica) de microbiota comensal até patogênica, um processo no qual o desequilíbrio de qualquer fator pode potencializar a mudança do ecossistema bucal (Marsh <sup>27</sup>, 2018). Assim, este trabalho almejou a avaliação longitudinal da presença de *S. mutans* e sua possível influência na construção e amadurecimento de biofilmes cariogênicos em modelos de biofilmes polimicrobianos que mimetizem melhor a cavidade bucal.

## 7 CONCLUSÃO

Foram desenvolvidos modelos de biofilme *in vitro* que se aproximam um pouco mais a realidade encontrada na clínica, sendo um deles com melhores características (M3 - 'Três refeições diárias'). Este modelo foi testado com duas estratégias de inoculação. O uso de múltiplas inoculações durante o desenvolvimento dos biofilmes parece mimetizar melhor o que ocorre na cavidade bucal. Ao avaliar a influência de *S. mutans* na construção do biofilme, esta espécie parece não ser o protagonista em comunidades polimicrobianas nas estratégias de inoculação desenvolvidas. Assim, outras espécies ou o conjunto de espécies podem ser mais influentes do que uma única espécie. Especificamente:

- A utilização de saliva humana e dos discos de esmalte bovino aumentaram as semelhanças do sistema *in vitro* com o que acontece na cavidade bucal, permitindo um ambiente neutro que ajuda na manutenção da integridade do dente.
- A utilização de inóculo de microbiota humana proveniente da saliva permitiu uma maior aproximação ao que acontece na cavidade bucal e foi demonstrado que o microrganismo *S. mutans* representa menos do 0,01% da microbiota salivar.
- A exposição intermitente da combinação de carboidratos e retorno a meio de cultura com saliva, conseguiu recriar flutuações de pH sem gerar um ambiente hostil (i.e., drasticamente ácido, o qual favoreceria alguma espécie específica). Ao mesmo tempo foi possível recriar a diminuição progressiva e sutil da microdureza, algo mais próximo ao que acontece na cavidade bucal.
- As duas estratégias de inoculação apresentaram características semelhante aos achados reportados em amostras clínicas de biofilme. Houve uma predominância do gênero *Streptococcus* e espécies anaeróbias como *Prevotella* e *Veillonella* apresentaram abundância relativa de entre 5 e 10%, mesmo sendo cultivado em ambientes de microaerofilia. No entanto a estratégia de múltiplas inoculações permitiu um ambiente competitivo entre os microrganismos, e algumas espécies minoritárias conseguiram garantir um espaço no biofilme em diferentes idades, apresentando assim uma maior diversidade.

- O biofilme foi aumentando sua biomassa insolúvel conforme envelheceu e foi configurando uma estrutura mais coesa pois os componentes da matriz extracelular (exopolissacarídeos e eDNA) foram aumentando com o tempo. Embora que o principal contribuinte para a biomassa seja desconhecido, acreditamos que podem ser as células microbianas, pois a proporção de exopolissacarídeos insolúveis representou entorno de 1 a 2 % da biomassa.
- O amadurecimento do biofilme foi independente das baixas proporções de *S. mutans* nos biofilmes oriundos das duas estratégias. Assim, a utilização de metodologias adicionais como a análise de transcriptoma (proteoma, metaboloma) poderia esclarecer quais espécies contribuem na construção do biofilme.

**REFERENCIAS\***

1. Petersen PE. World Health Organization global policy for improvement of oral health – World Health Assembly 2007. *Int Dent J.* 2008; 58 (3): 15–121.
2. Kassebaum NJ, Bernabé E, Dahiya M, Bhandari B, Murray CJL, Marcenes W. Global burden of untreated caries: a systematic review and metaregression. *J Dent Res.* 2015; 94 (5): 650–8.
3. Selwitz RH, Ismail AI, Pitts NB. Dental caries. *Lancet.* 2007; 369 (9555): 51–9.
4. The Human Microbiome Project Consortium. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature.* 2012; 486 (7402): 207–14.
5. Humphrey SP, Williamson RT. A review of saliva normal composition, flow, and function. *J Prosthet Dent.* 2001; 85: 162–9.
6. Rickard AH, Gilbert P, High NJ, Kolenbrander PE, Handley PS. Bacterial coaggregation: an integral process in the development of multi-species biofilms. *Trends Microbiol.* 2003; 11 (2): 94–100.
7. Flemming HC, Wingender J, Szewzyk U, Steinberg P, Rice SA, Kjelleberg S. Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nat Rev Microbiol.* 2016; 14 (9): 563–75.
8. Flemming HC, Wingender J. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol.* 2010; 8 (9): 623–33.
9. Hooshangi S, Bentley WE. From unicellular properties to multicellular behavior: bacteria quorum sensing circuitry and applications. *Curr Opin Biotechnol.* 2008;19 (6): 550–5.
10. Samaranayake L, Matsubara VH. Normal oral flora and the oral ecosystem. *Dent Clin North Am.* 2017; 61 (2): 199–215.
11. Rosier BT, Marsh PD, Mira A. Resilience of the oral microbiota in health: mechanisms that prevent dysbiosis. *J Dent Res.* 2018; 97 (4): 371–80.
12. Loesche WJ. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol Rev.* 1986; 50 (4): 353–80.
13. Marsh PD. Are dental diseases examples of ecological catastrophes? *Microbiology.* 2003;149 (2): 279–94.
14. Takahashi N, Nyvad B. The role of bacteria in the caries process: ecological perspectives. *J Dent Res.* 2011; 90 (3): 294–303.
15. Lemos JA, Palmer SR, Zeng L, Wen ZT, Kajfasz JK, Freires IA, et al. The biology of *Streptococcus mutans*. *Gram-Positive Pathog.* 2019; 7 (1): 435–48.
16. Hicks J, Garcia-Godoy F, Flaitz C. Biological factors in dental caries enamel structure and the caries process in the dynamic process of demineralization and remineralization (part 2). *J Clin Pediatr Dent.* 2004; 28 (2): 119–24.

---

\* De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver.

Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/Home/Biblioteca/guia-de-normalizacao-marco-2015.pdf>.



17. Takahashi N. Oral microbiome metabolism: From “who are they?” to “what are they doing?” *J Dent Res.* 2015; 94 (12): 1628–37.
18. Maske TT, van de Sande FH, Arthur RA, Huysmans MCDNJM, Cenci MS. In vitro biofilm models to study dental caries: a systematic review. *Biofouling.* 2017; 33 (8): 661–75.
19. Wimpenny JWT. Spatial order in microbial ecosystems. *Biol Rev Camb Philos Soc.* 1981; 56: 295-342.
20. 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.
21. Klein MI, Duarte S, Xiao J, Mitra S, Foster TH, Koo H. Structural and molecular basis of the role of starch and sucrose in streptococcus mutans biofilm development. *Appl Environ Microbiol.* 2009; 75 (3): 837–41.
22. Koo H, Falsetta ML, Klein MI. The xopolysaccharide Matrix: a virulence determinant of cariogenic biofilm. *J Dent Res.* 2013; 92 (12): 1065–73.
23. Liao S, Klein MI, Heim KP, Fan Y, Bitoun JP, Ahn SJ, et al. Streptococcus mutans extracellular DNA is upregulated during growth in biofilms, actively released via membrane vesicles, and influenced by components of the protein secretion machinery. *J Bacteriol.* 2014; 196 (13): 2355–66.
24. Castillo Pedraza MC, Novais TF, Faustoferri RC, Quivey RG, Terekhov A, Hamaker BR, et al. Extracellular DNA and lipoteichoic acids interact with exopolysaccharides in the extracellular matrix of Streptococcus mutans biofilms. *Biofouling.* 2017; 33 (9): 722–40.
25. Xiao J, Klein MI, Falsetta ML, Lu B, Delahunty CM, Yates JR, et al. The exopolysaccharide matrix modulates the interaction between 3D architecture and virulence of a mixed-species oral biofilm. *PLoS Pathogens.* 2012; 8 (4): e1002623.
26. Azeredo J, Azevedo NF, Briandet R, Cerca N, Coenye T, Costa AR, et al. Critical review on biofilm methods. *Crit Rev Microbiol.* 2017; 43 (3): 313–51.
27. Marsh PD. In sickness and in health- what does the oral microbiome mean to us? An Ecological Perspective. *Adv Dent Res.* 2018; 29 (1): 60–5.
28. Featherstone JD., ten Cate JM, Shariati M, Arends J. Comparison of artificial caries-like lesions by quantitative microradiography and microhardness profiles. *Caries Res.* 1983; 17: 385–91.
29. Firestone A, Schmid R, Muhlemann R. Effects of cooked wheat frequency-controlled. *Arch Oral Biol.* 1982; 27: 759–63.
30. Jenkins DJA, Wolever T, Vuksan V, Brighenti F, Cunnane SC, Rao V, et al. Nibbling versus Gorging: Metabolic advantages of increased meal frequency. *N Engl J Med.* 1989; 321: 929–34.
31. Franko DL, Striegel-Moore RH, Thompson D, Affenito SG, Schreiber GB, Daniels SR, et al. The relationship between meal frequency and body mass index in black and white adolescent girls: more is less. *Int J Obes.* 2008; 32 (1): 23–9.

32. Rogers JD, Palmer J, Kolenbrander PE, Scannapieco FA. Role of *Streptococcus gordonii* amylase-binding protein A in adhesion to hydroxyapatite, starch metabolism, and biofilm formation. *Infect Immun*. 2001; 69 (11): 7046–56.
33. Thylstrup A, Bruun C, Holmen L. In vivo caries models - mechanisms for caries initiation and arrestment. *Adv Dent Res*. 1994; 8: 144–57.
34. Bagramian RA, Garcia-Godoy F, Volpe AR. The global increase in dental caries. A pending public health crisis. *Am J Dent*. 2009; 22 (1): 3–8.
35. Dye BA, Thornton-Evans G. Trends in oral health by poverty status as measured by Healthy People 2010 objectives. *Public Health Rep*. 2010; 125 (6): 817–30.
36. Marsh PD. Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. *Adv Dent Res*. 1994; 8 (2): 263–71.
37. Sissons CH. Artificial dental plaque biofilm model systems. *Adv Dent Res*. 1997; 11 (1): 110–26.
38. Jakubovics NS, Kolenbrander PE. The road to ruin: The formation of disease-associated oral biofilms. *Oral Dis*. 2010;16 (8): 729–39.
39. Bowen WH. Dental caries – not just holes in teeth! A perspective. *Mol Oral Microbiol*. 2016; 31 (3): 228–33.
40. Kidd EAM, Fejerskov O. What constitutes dental caries? Histopathology of carious enamel and dentin related to the action of cariogenic biofilms. *J Dent Res*. 2004; 83 (Suppl 1): C35 - 8.
41. Kleter GA. Discoloration of dental carious lesions ( a review ). *Arch Oral Biol*. 1998; 43: 629–32.
42. Hannig M, Joiner A. The structure, function and properties of the acquired pellicle. *Monogr Oral Sci*. 2006; 19: 29–64.
43. Hicks J, Garcia-godoy F, Catherine FG. Plaque in the dynamic process of demineralization and remineralization (part 1). *J Clin Pediatr Dent*. 2003; 28 (1): 47–52.
44. Simón-Soro Á, 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.
45. Xu X, He J, Xue J, Wang Y, Li K, Zhang K, et al. Oral cavity contains distinct niches with dynamic microbial communities. *Environ Microbiol*. 2014; 17 (3): 699–710.
46. Kilian M, Chapple ILC, Hannig M, Marsh PD, Meuric V, Pedersen AML, et al. The oral microbiome - an update for oral healthcare professionals. *Br Dent J*. 2016; 221 (10): 657–66.
47. Falsetta ML, Klein MI, Colonne PM, Scott-Anne K, Gregoire S, Pai CH, et al. Symbiotic relationship between *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* synergizes virulence of plaque biofilms in vivo. *Infect Immun*. 2014; 82 (5): 1968–81.
48. Valm AM, Mark Welch JL, Rieken CW, Hasegawa Y, Sogin ML, Oldenbourg R, et al. Systems-level analysis of microbial community organization through combinatorial labeling and spectral imaging. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011; 108 (10): 4152–7.

49. Mark Welch JL, Rossetti BJ, Rieken CW, Dewhirst FE, Borisy GG. Biogeography of a human oral microbiome at the micron scale. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016; 113 (6): E791–800.
50. Kim D, Barraza JP, Arthur RA, Hara A, Lewis K, Liu Y. Spatial mapping of polymicrobial communities reveals a precise biogeography associated with human dental caries. *PNAS*. 2020; 117 (22): 12375–12386.
51. Flemming H, Neu TR, Wozniak DJ, Carolina N, Decho A, Kreft J, et al. The EPS matrix : the “ House of Biofilm Cells .” *J Bacteriol*. 2007; 189 (22): 7945–7.
52. Wimpenny J. Microbial metropolis. *Adv Microb Physiol*. 2009; 56: 29–84
53. Matsumoto-Nakano M. Role of *Streptococcus mutans* surface proteins for biofilm formation. *Jpn Dent Sci Rev*. 2018; 54 (1): 22–9.
54. Klein MI, Xiao J, Lu B, Delahunty CM, Yates JR, Koo H. *Streptococcus mutans* protein synthesis during mixed-species biofilm development by high-throughput Quantitative Proteomics. *PLoS One*. 2012; 7 (9).
55. Whitchurch CB, Tolker-Nielsen T, Ragas PC, Mattick JS. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science*. 2002; 295 (5559): 1487.
56. Petersen FC, Tao L, Scheie AA. DNA binding-uptake system: A link between cell-to-cell communication and biofilm formation. *J Bacteriol*. 2005; 187 (13): 4392–400.
57. Das T, Sharma PK, Busscher HJ, Van Der Mei HC, Krom BP. Role of extracellular DNA in initial bacterial adhesion and surface aggregation. *Appl Environ Microbiol*. 2010; 76 (10): 3405–8.
58. Wilking JN, Zaburdaev V, De Volder M, Losick R, Brenner MP, Weitz DA. Liquid transport facilitated by channels in *Bacillus subtilis* biofilms. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013; 110 (3): 848-52.
59. Costerton JW, Lewandowski Z, Debeer D, Caldwell D, Korber D. MINIREVIEW Biofilms, the Customized Microniche. *J Bacteriol*. 1994; 176 (8): 2137–42.
60. Neuhaus FC, Baddiley J. A continuum of anionic charge: structures and functions of D-alanyl-teichoic acids in gram-positive bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2003; 67 (4): 686–723.
61. Ciardi JE, Rølla G, Bowen WH, Reilly JA. Adsorption of *Streptococcus mutans* lipoteichoic acid to hydroxyapatite. *Eur J Oral Sci*. 1977; 85 (6): 387–91.
62. Hogg SD, Whiley RA, De Soet JJ. Occurrence of lipoteichoic acid in oral streptococci. *Int J Syst Bacteriol*. 1997; 47 (1): 62–6.
63. Costerton JW, Irvin RT. The bacterial glycocalyx in nature and disease. *Annu Rev Microbiol*. 1981; 35: 299–324.
64. Rølla G, Oppermann R V., Bowen WH, Ciardi JE, Knox KW. High amounts of lipoteichoic acid in sucrose-induced plaque in vivo. *Caries Res*. 1980; 14 (4): 235–8.
65. Rocha GR, Florez Salamanca EJ, de Barros AL, Lobo CIV, Klein MI. Effect of tt-farnesol and myricetin on in vitro biofilm formed by *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*. *BMC Complement Altern Med*. 2018; 18 (1): 1–9.

66. Pedraza MCC, Dante E, Fratucelli DO, Ribeiro SM, Jahir E, Florez Salamanca, et al. Modulation of lipoteichoic acids and exopolysaccharides prevents *Streptococcus mutans* biofilm accumulation. *Molecules*. 2020; 25 (9): 2232.
67. Fejerskov O, Nyvad B, Larsen J, M. Human experimental caries models: intra-oral environmental variability. *Adv Dent Res*. 1994; 8 (2): 134–43.
68. Spiguel MH, Tovo MF, Kramer PF, Franco KS, Alves K, Delbem A. Evaluation of laser fluorescence in the monitoring of the initial stage of the de- / remineralization process : an in vitro and in situ study. *Caries Res*. 2009; 43: 302–7.
69. Al-ahmad A, Roth D, Wolkewitz M, Wiedmann-al-ahmad M, Follo M, Ratka-krüger P, et al. Change in diet and oral hygiene over an 8-week period : effects on oral health and oral biofilm. *Clin Oral Investig*. 2010; 391–6.
70. Marsh PD. The role of microbiology in models of dental caries. *Adv Dent Res* 9(3)244-54.
71. Bowen WH. Rodent model in caries research. *Odontology*. 2013; 101: 9–14.
72. Bowen WH. Ethical use of animals. *J Dent Res*. 1994; 73 (11): 1773–7.
73. Kuchma SL, O'Toole G. Surface-induced and biofilm-induced changes in gene expression. *Curr Opin Biotechnol*. 2000; 11: 429–33.
74. Lemos JA, Abranches J, Koo H, Marquis RE, Burne RA. Protocols to study the physiology of oral biofilms. *Methods Mol Biol*. 2010; 666: 87–102.
75. Sim CPC, Dashper SG, Reynolds EC. Oral microbial biofilm models and their application to the testing of anticariogenic agents. *J Dent*. 2016; 50:1–11.
76. Wimpenny JW. The validity of models. *Adv Dent Res*. 1997; 11 (1): 150–9.
77. Wimpenny JWT. Spatial order in microbial ecosystems. *Biol Rev Camb Philos. Soc*. 1981; 56: 295-342.
78. McBain AJ. Chapter 4: In vitro biofilm models: an overview. *Adv Appl Microbiol*. 2009; 69: 99–132.
79. Signori C, Van De Sande FH, Maske TT, De Oliveira EF, Cenci MS. Influence of the inoculum source on the cariogenicity of in vitro microcosm biofilms. *Caries Res*. 2016; 50 (2): 97–103.
80. Krasse B. The Vipeholm dental caries study: Recollections and reflections 50 years later. *J Dent Res*. 2001; 80 (9): 1785–8.
81. Sheiham A. Dietary effects on dental diseases. *Public Health Nutr*. 2001;4 (2B): 569–91.
82. Bowen WH, Amsbaugh SM, Monell-Torrens S, Brunelle J, Kuzmiak-Jones H, Cole MF. A method to assess cariogenic potential of foodstuffs. *J Am Dent Assoc*. 1980; 100 (5): 677–81.
83. Ribeiro CCC, Tabchoury CPM, Del Bel Cury AA, Tenuta LMA, Rosalen PL, Cury JA. Effect of starch on the cariogenic potential of sucrose. *Br J Nutr*. 2005; 94 (1): 44–50.
84. Yamashita Y, Bowen WH, Burne RA, Kuramitsu HK. Role of the *Streptococcus mutans* *gtf* genes in caries induction in the specific-pathogen-free rat model. *Infect Immun*. 1993; 61 (9): 3811–7.

85. Vacca Smith AM, Scott-Anne KM, Whelehan MT, Berkowitz RJ, Feng C, Bowen WH. Salivary glucosyltransferase B as a possible marker for caries activity. *Caries Res.* 2007; 41 (6): 445–50.
86. Bowen WH. The Stephan curve revisited. *Odontology.* 2013; 101 (1): 2–8.
87. Nyström T. Global systems approach to the physiology of the starved cell. In: Kjelleberg S, editor. *Starvation in bacteria.* New York: Springer; 1993. p. 129–50.
88. Carlsson J. Regulation of sugar metabolism in relation to the feast-and-famine existence of plaque. *Cariol Today.* 1984; 211: 205–11.
89. McBain AJ, Bartolo RG, Catrenich CE, Charbonneau D, Ledder RG, Gilbert P. Growth and molecular characterization of dental plaque microcosms. *J Appl Microbiol.* 2003; 94 (4): 655–64.
90. Lemos JA, Burne RA. A model of efficiency: Stress tolerance by *Streptococcus mutans*. *Microbiology.* 2008; 154 (11): 3247–55.
91. de Oliveira Duque CC, Soares DG, Basso FG, Hebling J, de Souza Costa CA. Influence of enamel/dentin thickness on the toxic and esthetic effects of experimental in-office bleaching protocols. *Clin Oral Investig.* 2017; 21 (8): 2509–20.
92. Bowden GH. Nutritional influences on biofilm development. *Adv Dent Res.* 1997; 11 (1): 81–99.
93. Inui T, Walker LC, Dodds MWJ, Bryan A. Extracellular glycoside hydrolase activities in the human oral cavity. *Appl Environ Microbiol.* 2015; 81 (16): 5471–6.
94. Miller DP, Fitzsimonds ZR, Lamont RJ. Metabolic signaling and spatial interactions in the oral polymicrobial community. *J Dent Res.* 2019; 98 (12): 1308 - 14.
95. Lynge Pedersen AM, Belstrøm D. The role of natural salivary defences in maintaining a healthy oral microbiota. *J Dent.* 2019; 80: S3–12.
96. Marsh PD, Do T, Beighton D, Devine D. Influence of saliva on the oral microbiota. *Periodontol 2000.* 2015; 70: 80–92.
97. Siqueira WL, Helmerhorst EJ, Zhang W, Salih E, Oppenheim FG. Acquired enamel pellicle and its potential role in oral diagnostics. *Ann N Y Acad Sci.* 2007; 1098: 504–9.
98. Hannig C, Hannig M. The oral cavity - a key system to understand substratum-dependent bioadhesion on solid surfaces in man. *Clin Oral Investig.* 2009; 13 (2): 123–39.
99. Kolenbrander PE, Andersen RN, Blehert DS, Egland PG, Foster JS, Palmer RJ. Communication among oral bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2002; 66 (3): 486–505.
100. Hamada S, Slade HD. Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiol Rev.* 1980; 44 (2): 331–84.
101. 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.
102. Banas JA. Virulence properties of *streptococcus mutans*. *Front Biosci.* 2004; 9: 1267–77.

103. Paes Leme AF, Koo H, Bellato CM, Bedi G, Cury JA. The role of sucrose in cariogenic dental biofilm formation - new insight. *J Dent Res.* 2006; 85 (10): 878–87.
104. Duarte S, Klein MI, Aires CP, Cury JA, Bowen WH, Koo H. Influences of starch and sucrose on *Streptococcus mutans* biofilms. *Oral Microbiol Immunol.* 2008; 23 (3): 206–12.
105. Xiao J, Koo H. Structural organization and dynamics of exopolysaccharide matrix and microcolonies formation by *Streptococcus mutans* in biofilms. *J Appl Microbiol.* 2010; 108 (6): 2103–13.
106. Florez Salamanca EJ, Klein MI. Extracellular matrix influence in *Streptococcus mutans* gene expression in a cariogenic biofilm. *Mol Oral Microbiol.* 2018; 33 (2): 181–93.
107. Klein MI, Hwang G, Santos PHS, Campanella OH, Koo H. *Streptococcus mutans*-derived extracellular matrix in cariogenic oral biofilms. *Front Cell Infect Microbiol.* 2015; 5: 1–8.
108. Badet C, Thebaud NB. Ecology of lactobacilli in the oral cavity: a review of literature. *Open Microbiol J.* 2008; 2: 38–48.
109. Tanner ACR, Mathney MJ, Kent RL, Chalmers NI, Hughes CV, Loo CY, et al. Cultivable anaerobic microbiota of severe early childhood caries. *J Clin Microbiol.* 2011; 49 (4): 1464–74.
110. Caufield PW, Schön CN, Saraithong P, Li Y, Argimón S. Oral Lactobacilli and dental caries: a model for niche adaptation in humans. *J Dent Res.* 2015; 94 (9, Suppl 2): 110–8.
111. Kralj S, Dondorff MMG, Kirsanovs S, Maarel MJEC Van Der, Dijkhuizen L. Glucan synthesis in the genus *Lactobacillus*: isolation and characterization of glucansucrase genes, enzymes and glucan products from six different strains. *Microbiology.* 2004; 150: 3681–90.
112. McGrady JA, Butcher WG, Beighton D, Switalskil LM. Specific and charge interactions mediate collagen recognition by oral Lactobacilli. *J Dent Res.* 1995; 74 (2): 649–57.
113. de Carvalho FG, Silva DS, Hebling J, Spolidorio LC, Spolidorio DMP. Presence of mutans streptococci and *Candida* spp. in dental plaque/dentine of carious teeth and early childhood caries. *Arch Oral Biol.* 2006; 51 (11): 1024–8.
114. Shirtliff ME, Peters BM, Jabra-rizk MA. Cross-kingdom interactions: *Candida albicans* and bacteria. *FEMS Microbiol Lett.* 2009; 299 (1): 1–8.
115. Klinke T, Kneist S, De Soet JJ, Kuhlisch E, Mauersberger S, Förster A, et al. Acid production by oral strains of *Candida albicans* and lactobacilli. *Caries Res.* 2009; 43 (2): 83–91.
116. Goeres DM, Hamilton MA, Beck NA, Buckingham-Meyer K, Hilyard JD, Loetterle LR, et al. A method for growing a biofilm under low shear at the air-liquid interface using the drip flow biofilm reactor. *Nat Protoc.* 2009; 4 (5): 783–8.
117. Simón-Soro A, Mira A. Solving the etiology of dental caries. *Trends Microbiol.* 2015;23 (2): 76–82.

118. Tanner ACR, Kressirer CA, Rothmiller S, Johansson I, Chalmers NI. The caries microbiome: implications for reversing dysbiosis. *Adv Dent Res*. 2018; 29 (1):78–85.
119. Simmer JP, Papagerakis P, Smith CE, Fisher DC, Rountrey AN, Zheng L, et al. Regulation of dental enamel shape and hardness. *J Dent Res*. 2010; 89 (10): 1024–38.
120. Teruel JDD, Alcolea A, Hernández A, Ruiz AJO. Comparison of chemical composition of enamel and dentine in human, bovine, porcine and ovine teeth. *Arch Oral Biol*. 2015; 60 (5): 768–75.
121. Richardson CF, Johnsson M, Raj PA, Levine MJ, Nancollas GH. The influence of histatin-5 fragments on the mineralization of hydroxyapatite. *Arch Oral Biol*. 1993; 38 (11): 997–1002.
122. Dowd FJ. Saliva and dental caries. *Dent Clin North Am*. 1999; 43 (4): 579–97.
123. Buzalaf MAR, Hannas AR, Kato MT. Saliva and dental erosion. *J Appl Oral Sci*. 2012; 20 (5): 493–502.
124. Jordão MC, Ionta FQ, Bergantin BTP, Oliveira GC, Moretto MJ, Honório HM, et al. The effect of mucin in artificial saliva on erosive rehardening and demineralization. *Caries Res*. 2017; 51 (2): 136–40.
125. Florez Salamanca EJ, Dantas RM, Rodriguez MJ, Klein MI. Establishment of microcosm biofilm models that reproduce a cariogenic diet intake. *Biofouling*. 2020; 36 (10): 1196-209.
126. Dawes C. What is the critical pH and why does a tooth dissolve in acid? *J Can Dent Assoc*. 2003; 69 (11): 722–4.
127. Grippo JO, Simring M, Coleman TA. Abfraction, abrasion, biocorrosion, and the enigma of noncarious cervical lesions: a 20-year perspective. *J Esthet Restor Dent*. 2012; 24 (1): 10–23.
128. Lappin-scott H, Burton S, Stoodley P. Revealing a world of biofilms — the pioneering research of Bill Costerton. *Nat Ver Microbiol*. 2014; 12: 781-7.
129. Metzker ML. Sequencing technologies — the next generation. *Nat Rev Genet*. 2009; 11 (1): 31–46.
130. Choi SC. On the study of microbial transcriptomes using second- and third-generation sequencing technologies. *J Microbiol*. 2016; 54 (8): 527–36.
131. Caselli E, Fabbri C, D'Accolti M, Soffritti I, Bassi C, Mazzacane S, et al. Defining the oral microbiome by whole-genome sequencing and resistome analysis: the complexity of the healthy picture. *BMC Microbiol*. 2020; 20 (120): 1–19.
132. Chuenarrom C, Benjakul P, Daosodsai P. Effect of indentation load and time on knoop and vickers microhardness tests for enamel and dentin. *Mater Res*. 2009; 12 (4): 473–6.
133. Viana PS, Orlandi MO, Pavarina AC, Machado AL, Vergani CE. Chemical composition and morphology study of bovine enamel submitted to different sterilization methods. *Clin Oral Investig*. 2018; 22 (2): 733–44.
134. Exterkate RAM, Crielaard W, Ten Cate JM. Different response to amine fluoride by streptococcus mutans and polymicrobial biofilms in a novel high-throughput active

- attachment model. *Caries Res.* 2010; 44 (4): 372–9.
135. McBain AJ, Sissons C, Ledger RG, Sreenivasan PK, De Vizio W, Gilbert P. Development and characterization of a simple perfused oral microcosm. *J Appl Microbiol.* 2005; 98 (3): 624–34.
  136. Albuquerque YE, Danelon M, Salvador MJ, Koga-Ito CY, Botazzo Delbem AC, Ramirez-Rueda RY, et al. Essential oil : in vitro study using a validated model of caries induction. *Future Microbiol.* 2018; 13: 631–43.
  137. Brex M, Theilade J, Attström R. Influence of optimal and excluded oral hygiene on early formation of dental plaque on plastic films: a quantitative and descriptive light and electron microscopic study. *J Clin Periodontol.* 1980; 7: 361–73.
  138. Brex M, Ronstrom A, Theilade J, Attstrom R. Early formation of dental plaque on plastic films. *J Periodontal Res.* 1981; 16: 213–27.
  139. Tavares LJ, Klein MI, Panariello BHD, de Avila ED, Pavarina AC. An in vitro model of *Fusobacterium nucleatum* and *Porphyromonas gingivalis* in single-and dual-species biofilms. *J Periodontal Implant Sci.* 2018; 48 (1): 12–21.
  140. Nocker A, Sossa-Fernandez P, Burr MD, Camper AK. Use of propidium monoazide for live/dead distinction in microbial ecology. *Appl Environ Microbiol.* 2007; 73 (16): 5111–7.
  141. Fadrosch DW, Ma B, Gajer P, Sengamalay N, Ott S, Brotman RM, et al. An improved dual-indexing approach for multiplexed 16S rRNA gene sequencing on the Illumina MiSeq platform. *Microbiome.* 2014; 2 (6): 1–7.
  142. Magoč T, Salzberg SL. FLASH : fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies Tanja Mago c. *Bioinformatics.* 2011; 27 (21): 2957–63.
  143. Desantis TZ, Hugenholtz P, Larsen N, Rojas M, Brodie EL, Keller K, et al. Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Appl Env Microbiol.* 2006; 72 (7): 5069–72.
  144. Cole JR, Wang Q, Fish JA, Chai B, Mcgarrell DM, Sun Y, et al. Ribosomal database project : data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Res.* 2014; 42 (Database issue): 633–42.
  145. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem.* 2009; 55 (4): 611–22.
  146. Fierer N, Jackson JA, Vilgalys R, Jackson RB. Assessment of soil microbial community structure by use of taxon-specific quantitative PCR assays. *Appl Env Microbiol.* 2005; 71 (7): 4117–20.
  147. Chen Z, Saxena D, Caufield PW, Ge Y, Wang M, Li Y. Development of species-specific primers for detection of *Streptococcus mutans* in mixed bacterial samples. *FEMS Microbiol Lett.* 2007; 272 (2): 154–62.
  148. Klein MI, Scott-Anne KM, Gregoire S, Rosalen PL, Koo H. Molecular approaches for viable bacterial population and transcriptional analyses in a rodent model of dental caries. *Mol Oral Microbiol.* 2012; 27 (5): 350–61.



149. Sutcliffe IC, Hogg SD. Extraction of lipoteichoic acid from *Streptococcus* mutants with the non-ionic detergent Triton X-114. *J Microbiol Methods*. 1993; 17 (3): 215–25.
150. Dubois M, Gilles K, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. A colorimetric method for the determination of sugars. *Nature*. 1951; 168 (4265): 167.
151. Vieira AE, Delbem AC, Sasaki KT, Rodrigues E, Cury JA, Cunha RF. Fluoride dose response in pH-cycling models using bovine enamel. *Caries Res*. 2005; 39 (6): 514–20.
152. Bang DY, Lee IK, Lee BM. Toxicological characterization of phthalic acid. *Toxicol Res*. 2011; 27 (4): 191–203.
153. Kistler JO, Pesaro M, Wade WG. Development and pyrosequencing analysis of an in-vitro oral biofilm model. *BMC Microbiol*. 2015; 15:24.
154. Carlsson J. Bacterial metabolism in dental biofilms. *Adv Dent Res*. 1997; 11 (1): 75–80.
155. Rudney JD. Saliva and dental plaque. *Adv Dent Res*. 2000; 14: 29–39.
156. Gao XJ, Fan Y, Kent RL, Van Houte J, Margolis HC. Association of caries activity with the composition of dental plaque fluid. *J Dent Res*. 2001; 80 (9): 1834–9.
157. Bollen CML, Lambrecht P, Quirynen M. Comparison of surface roughness of oral hard materials to the threshold surface roughness for bacterial plaque retention : a review of the literature. *Dent Mater*. 1997; 13: 258–69.
158. Janiszewska-olszowska J, Drozdziak A, Tandecka K, Grocholewicz K. Effect of air-polishing on surface roughness of composite dental restorative material – comparison of three different air-polishing powders. *BMC Oral Health*. 2020; 20 (1): 30.
159. Incesu E, Yanikoglu N. Evaluation of the effect of different polishing systems on the surface roughness of dental ceramics. *J Prosthet Dent*. 2020;124 (1):100–9.
160. Anderson P, Hector MP, Rampersad MA. Critical pH in resting and stimulated whole saliva in groups of children and adults. *Int J Paediatr Dent*. 2001; 11 (4): 266–73.
161. Ortiz S, Herrman E, Lyashenko C, Purcell A, Raslan K, Khor B. Sex-specific differences in the salivary microbiome of caries-active children. *J Oral Microbiol*. 2019; 11 (1): 1653124.
162. Hurley E, Barrett MPJ, Kinirons M, Whelton H, Ryan CA, Stanton C, et al. Comparison of the salivary and dentinal microbiome of children with severe-early childhood caries to the salivary microbiome of caries-free children. *BMC Oral Health*. 2019; 19 (1): 13.
163. Bowen WH, Burne RA, Wu H, Koo H. Oral biofilms: pathogens, matrix, and polymicrobial interactions in microenvironments. *Trends Microbiol*. 2018; 26 (3): 229–42.
164. Bayles KW. The biological role of death and lysis in biofilm development. *Nat Rev Microbiol*. 2007; 5 (9): 721–6.
165. Qudeimat MA, Alyahya A, Karched M, Behbehani J, Salako NO. Dental plaque microbiota profiles of children with caries-free and caries-active dentition. *J Dent*. 2021; 104 (103539).

166. Keller MK, Kressirer CA. Oral microbial profiles of individuals with different levels of sugar intake. *J Oral Microbiol.* 2017; 9 (1): 1355207..
167. Agnello M, Marques J, Cen L, Mittermuller B, Huang A, Tran NC, et al. Microbiome associated with severe caries in canadian first nations children. *J Dent Res.* 2017; 96 (12): 1378-85.
168. Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol.* 2005; 43 (11): 5721–32.
169. Stephen KCNG, Hamilton IR. Lactate metabolism by *Veillonella parvula*. *J Bacteriol.* 1971; 105 (3): 999–1005.
170. Wicaksono DP, Washio J, Abiko Y, Domon H, Takahashi N. Nitrite production from nitrate and its link with lactate metabolism in oral *Veillonella* spp. *Appl Environ Microbiol.* 2020; 86 (20): e01255-20.
171. Noorda W, Purdell-Lewis D, van Montfort A, Weerkamp A. Monobacterial and mixed bacterial plaques of *Streptococcus mutans* and *Veillonella alcalescens* in an artificial Mouth : Development , Metabolism , and Effect on Human Dental Enamel. *Caries Res.* 1988; 22: 342–7.
172. Jiang S, Gao X, Jin L, Lo ECM. Salivary Microbiome Diversity in Caries-Free and Caries-Affected Children. *Int J Mol Sci.* 2016; 17 (12): 1978.
173. Wu C, Johnson JL, Moore WEC, Moore LVH. Emended descriptions of *Prevotella denticola*, *Prevotella loesceii*, *Prevotella veroralis* , and *Prevotella melaninogenica*. *Int J Syst Bacteriol.* 1992; 42 (4): 536–41.
174. Tanner ACR, Kent RL, Lif Holgerson P, Hughes C V, Loo CY, Kanasi E, et al. Microbiota of severe early childhood caries before and after therapy. *J Dent Res.* 2011; 90 (11): 1298–305.
175. Kimmel L, Tinanoff N. A modified mitissalivarius medium for a caries diagnostic test. *Oral Microbiol Immunol.* 1991; 6 (5):275–9.
176. Kianoush N, Adler CJ, Nguyen KT, Browne G V, Simonian M, Hunter N. Bacterial profile of dentine caries and the impact of pH on bacterial population diversity. *PLoS One.* 2014; 9 (3): e92940.
177. Chen X, Daliri EB, Chelliah R, Oh D. Isolation and identification of potentially pathogenic microorganisms associated with dental caries in human teeth biofilms. *Microorganisms.* 2020; 8 (10): 1596.
178. Kressirer CA, Chen T, Lake Harriman K, Frias-lopez J, Dewhirst FE, Tavares MA, et al. Functional profiles of coronal and dentin caries in children. *J Oral Microbiol.* 2018;10 (1): 1495976.
179. Kim UJ, Won EJ, Kim JE, Jang MO, Kang SJ, Jang HC, et al. *Rothia aeria* infective endocarditis: A first case in korea and literature review. *Ann Lab Med.* 2014; 34 (4): 317–20.
180. Maraki S, Papadakis IS. *Rothia mucilaginosa* pneumonia: a literature review. *Infect Dis .* 2015; 47 (3): 125–9.
181. Musher DM. *Haemophilus* species. In: Baron S, editor. *Medical microbiology.* chapter 30. Galveston: University of Texas Medical Branch; 1996..
182. Liu G, Tang CM, Exley RM. Non-pathogenic neisseria: members of an abundant,

- multi-habitat, diverse genus. *Microbiol.* 2015; 161 (7): 1297–312.
183. ElSalhy M, Söderling E, Honkala E, Fontana M, Flannagan S, Kokaras A, et al. Salivary microbiota and caries occurrence in Mutans Streptococci- positive school children. *Eur J Paediatr Dent.* 2016; 17 (3): 188–92.
  184. Wang Y, Wang S, Wu C, Chen X, Duan Z, Xu Q, et al. Oral microbiome alterations associated with early childhood caries highlight the importance of carbohydrate metabolic. *mSystems.* 2019;4 (6): e00450.
  185. Downes J, Munson MA, Radford DR, Spratt DA, Wade WG. Isolated from the human oral cavity. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2002; 52 (5): 1469–75.
  186. Lemos JAC, Abranches J, Burne RA. Responses of cariogenic streptococci to environmental stresses. *Curr Issues Mol Biol.* 2005; 7 (1): 95–108.
  187. Tenuta LMA, Ricomini Filho AP, Del Bel Cury AA, Cury JA. Effect of sucrose on the selection of mutans streptococci and lactobacilli in dental biofilm formed in situ. *Caries Res.* 2006; 40 (6): 546–9.
  188. Schlafer S, Meyer RL, Dige I, Regina VR. Extracellular DNA contributes to dental biofilm stability. *Caries Res.* 2017; 51 (4): 436–42.
  189. Rostami N, Shields RC, Yassin SA, Hawkins AR, Bowen L, Luo TL, et al. A Critical role for extracellular DNA in dental plaque formation. *J Dent Res.* 2016; 96 (2): 208–16.
  190. Allesen-Holm M, Barken KB, Yang L, Klausen M, Webb JS, Kjelleberg S, et al. A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms. *Mol Microbiol.* 2006; 59 (4): 1114–28.
  191. 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.
  192. Turnbull L, Toyofuku M, Hynen AL, Kurosawa M, Pessi G, Gloag ES, et al. Explosive cell lysis as a mechanism for the biogenesis of bacterial membrane vesicles and biofilms. *Nat Commun.* 2016; 7: 11220.
  193. Juhas M, Van Der Meer JR, Gaillard M, Harding RM, Hood DW, Crook DW. Genomic islands: tools of bacterial horizontal gene transfer and evolution. *FEMS Microbiol Rev.* 2009; 33 (2): 376–93.
  194. Bedoya-Correa CM, Rincón Rodríguez RJ, Parada-Sanchez MT. Genomic and phenotypic diversity of *Streptococcus mutans*. *J Oral Biosci.* 2019; 61 (1): 22–31.
  195. Ahn SJ, Rice KC, Oleas J, Bayles KW, Burne RA. The *Streptococcus mutans* Cid and Lrg systems modulate virulence traits in response to multiple environmental signals. *Microbiology.* 2010; 156 (10): 3136–47.
  196. Ahn SJ, Rice KC. Understanding the *Streptococcus mutans* Cid/Lrg system through CidB function. *Appl Environ Microbiol.* 2016; 82 (20): 6189–203.
  197. Tang G, Yip HK, Cutress TW, Samaranayake LP. Artificial mouth model systems and their contribution to caries research: a review. *J Dent.* 2003; 31 (3): 161–71.
  198. Rickard AH, McBain AJ, Stead AT, Gilbert P. Shear rate moderates community diversity in freshwater biofilms. *Appl Environ Microbiol.* 2004; 70 (12): 7426–35.

199. Basso FG, Hebling J, Marcelo CL, Costa CADS, Feinberg SE. Development of an oral mucosa equivalent using a porcine dermal matrix. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2017; 55 (3): 308–11.
200. BGI Co., Ltd. Amplicon project report - Agreement No. F19FTSUSAT1735. Shenzhen 2020. [acesso em 2020 julho 15] Disponível em: <http://cdts-wh.bgi.com/customerSupport/login.xhtml>