



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Faculdade de Odontologia de Araçatuba

JÉSSICA SILVA SANTANA

**Lesão de subsuperfície desenvolvida por biofilmes de
Streptococcus mutans e *Candida albicans***

Araçatuba – SP

2023



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Faculdade de Odontologia de Araçatuba

JÉSSICA SILVA SANTANA

**Lesão de subsuperfície desenvolvida por biofilmes de
Streptococcus mutans e *Candida albicans***

Dissertação de Mestrado apresentado à Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências – área Saúde Bucal da Criança.

Orientadora: Prof^ª. Ass. Dr^ª. Thayse Yumi Hosida

Coorientador: Prof. Assoc. Juliano Pelim Pessan

Coorientador: Prof. Tit. Alberto Carlos Botazzo Delbem

Araçatuba – SP

2023

Catálogo-na-Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

S232L Santana, Jéssica Silva.
Lesão de subsuperfície desenvolvida por biofilmes de
Streptococcus mutans e *Candida albicans* / Jéssica Silva
Santana. – Araçatuba, 2023
44 f. : il. ; tab.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual
Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Orientadora: Profa. Thayse Yumi Hosida
Coorientador: Prof. Juliano Pelim Pessan
Coorientador: Prof. Alberto Carlos Botazzo Delbem

1. Cárie dentária 2. Esmalte dentário 3. Biofilmes
4. Desmineralização I. T.

Black D27
CDD 617.645

Dedicatória

Dedico esta dissertação de mestrado à minha família, que me ampara e apoia dia e noite, permitindo assim que eu possa realizar meus sonhos. Meu alicerce, aqueles que estão por mim nos momentos mais difíceis e nos de maior alegria. Não existem palavras capazes de descrever a gratidão que tenho por todos, minha mãe *Lúcia Helena*, minha avó *Lúcia* e meu avô *Antônio*, meus irmãos *Leonardo* e *Pedro*, minha tia *Andréa*, meu namorado *André* e minha sogra *Edilene*. Sem vocês nada disso seria ao menos sonhado, idealizado e quiçá concluído. Sou muito feliz por tê-los ao meu lado todos os dias.

Agradecimientos

A minha família, em especial à minha mãe, **Lúcia Helena**, agradeço imensamente por ser a maior incentivadora de minha trajetória acadêmica, sempre disposta a me ajudar e estendo um abraço amigo para me amparar nos momentos difíceis. À minha avó, **Lúcia**, agradeço por toda a paciência e compreensão pelos momentos que preciso me ausentar, e também pelas palavras amorosas que me acalentam.

A minha tia **Andrea**, agradeço por estar presente sempre que preciso para auxiliar nos momentos em que eu não pude. Aos meus irmãos, **Leonardo** e **Pedro**, por serem os melhores amigos da minha vida, agradeço pelo suporte, pela compreensão e pelo amor que cultivamos e nos mantém unidos.

Ao meu namorado, **André**, agradeço toda a paciência, principalmente frente as oscilações de humor que sincronizam com os momentos mais fáceis ou difíceis dessa trajetória. Você é uma pessoa essencial para que eu me mantivesse sã até a conclusão dessa etapa, muito obrigada pela parceria. A minha sogra, **Edilene**, por todo o apoio.

Agradeço as minhas amigas **Juliana**, **Lais** e **Janaína**, por serem presentes mesmo na distância e torcerem diariamente pelo meu sucesso. Também agradeço à **Stefany**, **Juliana**, **Mariana** e **Michele**, por sempre estarem dispostas a me ouvir e compartilhar as experiências da nossa trajetória profissional, pelo carinho e cumplicidade.

Agradeço, ainda, a todos os professores que tive a oportunidade de conviver durante este curso de mestrado, em especial à minha orientadora, **Thayse Yumi Hosida**, por toda a paciência, companheirismo e comprometimento para que esse trabalho fosse desenvolvido. Obrigada por me receber na Odontopediatria, mesmo sem que eu tivesse qualquer experiência laboratorial ou clínica na área, me ensinando desde os passos laboratoriais mais básicos e confiando em mim para realizar esta pesquisa. Sua dedicação à pesquisa e a docência me motivam a continuar minha

própria trajetória acadêmica. Saiba ainda que a vejo como uma grande amiga, e espero que possamos contribuir em muitos outros trabalhos.

Aos meus coorientadores, **Juliano Pelim Pessan** e **Alberto Carlos Botazzo Delbem**, agradeço pela grande oportunidade de podermos trabalhar junto, pela orientação e todo o conhecimento compartilhado. Os senhores são grandes professores e pesquisadores nos quais eu sempre me espelharei.

A professora **Cristiane Duque**, agradeço pelo incentivo inicial que motivou o meu ingresso neste curso de pós-graduação, obrigada por isto e por cada palavra de incentivo que me dirigiu, espero que ainda possamos conviver e compartilhar muitas outras experiências. A senhora é uma grande inspiração para mim.

Ao professor **Robson Frederico Cunha**, agradeço pelas excelentes aulas e pelo compartilhamento de sua experiência clínica, o senhor decerto foi muito importante para o meu desenvolvimento profissional nestes últimos dois anos.

Aos meus amigos da pós-graduação, **Viviane, Caio, Leonardo, Geórgia, Luigi e Liliana**, agradeço por toda a ajuda, sem vocês este trabalho não seria possível, cada um contribuiu em fases cruciais para obter este resultado. Agradeço também pelos laços de amizade criados que ultrapassaram o companheirismo e a convivência no laboratório, obrigada por compartilhar conselhos, experiências, angústias e aspirações, fazendo com que a caminhada se tornasse mais leve.

À **Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”**, na pessoa do diretor da **Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Prof. Tit. Glauco Issamu Miyahara** e do vice-diretor **Prof. Tit. Alberto Carlos Botazzo Delbem** por proporcionarem um ensino de qualidade e pela oportunidade de realizar esta pesquisa.

À **Seção de Pós-Graduação** da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP e seus colaboradores, pelo profissionalismo e atenção que dispuseram, auxiliando em cada etapa a ser realizados.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior** – **CAPES**, pela concessão da bolsa de mestrado nestes dois anos.

Epigrafe

“ Ninguém ignora tudo. Ninguém sabe tudo. Todos nós sabemos alguma coisa. Todos nós ignoramos alguma coisa. Por isso aprendemos sempre. ”

Paulo Freire

Santana, JS. **Lesão de subsuperfície desenvolvida por biofilmes de *Streptococcus mutans* e *Candida albicans***. 2023. 44 f. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Ciências, área de Saúde Bucal da Criança) - Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba 2023.

RESUMO

Este estudo teve como objetivo desenvolver um protocolo para a formação de lesão de cárie de subsuperfície em esmalte bovino por biofilmes mistos de *Streptococcus mutans* e *Candida albicans in vitro*, e verificar a influência da presença de flúor (F) e desafios cariogênicos. Os biofilmes foram formados em blocos de esmalte bovino ($8 \times 8 \times 2$ mm), por 7 dias, usando saliva artificial (SA) como meio de crescimento. Após 24 h de formação, os biofilmes foram cultivados em SA, suplementada ou não com 0,005 ppm F ou 0,008 ppm F. A cada 24 h, os biofilmes foram expostos ou não à uma solução de sacarose 20%, por 3 min (simulando um desafio cariogênico). No 7º dia, os biofilmes foram coletados e o conteúdo de polissacarídeos extracelulares (EPS) e concentrações de F, cálcio (Ca) e fósforo (Pi) nos biofilmes foram analisados. Os blocos foram submetidos à análise de microtomografia computadorizada de raios X para determinação da concentração mineral ($g_{HAP} \times cm^{-3} \times \mu m$). Os dados foram submetidos a ANOVA a dois critérios, seguido pelos testes de Fisher LSD ou Student-Newman-Keuls ($p < 0,05$). A exposição ao desafio cariogênico levou a um aumento significativo nas concentrações de EPS do biofilme em comparação aos biofilmes não expostos ao desafio, independentemente da presença de F na SA. Após desafio, os biofilmes formados na presença de 0,008 ppm F apresentaram níveis significativamente menores de F no biofilme, em comparação com aqueles não expostos ao desafio. Os biofilmes expostos a 0,008 ppm F e ao desafio com sacarose apresentaram profundidade de lesão e área integrada da lesão significativamente menor, e maior camada externa, em comparação aos biofilmes cultivados em SA (*i.e.*, não contendo F), expostos ao desafio cariogênico. Pode-se concluir que biofilme de duas espécies de *S. mutans* e *C. albicans* foram capazes de produzir lesão de cárie de subsuperfície *in vitro*, tendo sido influenciada pela presença de F no meio de cultura e pelo desafio cariogênico.

Palavras-chaves: Cárie dentária, Esmalte dentário, Biofilmes, Desmineralização.

Santana, JS. **Subsurface lesion developed by *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* biofilms**. 2023. 44 p. Masters dissertation (Master's degree in Science, field Child Dental Health) - Faculty of Dentistry of Araçatuba, São Paulo State University, Araçatuba 2023.

ABSTRACT

This study aimed to develop a protocol for the formation of enamel subsurface lesion on bovine enamel by dual-species biofilms of *Streptococcus mutans* and *Candida albicans in vitro*, and to verify the influence of the presence of fluoride (F) and cariogenic challenges. The biofilms were formed on bovine enamel blocks ($8 \times 8 \times 2$ mm) for 7 days, using artificial saliva (AS) as the growth medium. After 24 h of formation, the biofilms were grown in AS, supplemented or not with 0.005 ppm F or 0.008 ppm F. Every 24 h, the biofilms were exposed or not to a 20% sucrose solution, for 3 min (simulating a cariogenic challenge). On the 7th day, the biofilms were collected and the extracellular polysaccharides (EPS) content and the F, calcium (Ca), and phosphorus (Pi) concentrations in the biofilms were analyzed. The blocks were submitted to X-ray computed microtomography analysis to determine the mineral concentration ($g_{HAP} \times cm^{-3} \times \mu m$). Data were submitted to 2-way ANOVA, followed by Fisher's LSD or Student-Newman-Keuls' tests ($p < 0.05$). The exposure to the cariogenic challenge led to a significant increase in the biofilm carbohydrate concentrations in comparison to biofilms not exposed to the challenge, regardless of the presence of F in the AS. After the challenge, the biofilms grown in the presence of 0.008 ppm F presented significantly lower biofilm F levels in comparison to those not exposed to the challenge. The biofilms exposed to 0.008 ppm F and the sucrose challenge presented significantly lower depth of lesion and integrated area, and higher outer layer in comparison to biofilms grown on AS, exposed to the cariogenic challenge. It is concluded that dual-species biofilms of *S. mutans* and *C. albicans* were capable to develop enamel subsurface lesion *in vitro*, influenced by the presence of F and exposure to a cariogenic challenge.

Keywords: Dental caries, Dental enamel, Biofilms, Demineralization.

Sumário

Introdução	15
Materiais e Métodos	16
<i>Preparo dos espécimes de esmalte bovino</i>	16
<i>Desenvolvimento de biofilme e desafios cariogênicos</i>	16
<i>Preparo da saliva artificial</i>	16
<i>Cepas de microrganismos e condições de crescimento</i>	16
<i>Formação de biofilme e desafio cariogênico</i>	17
<i>Análise da composição do biofilme dental</i>	17
<i>Análise de microtomografia computadorizada do esmalte</i>	18
<i>Análise estatística</i>	18
Resultados	19
<i>Concentrações de EPS e de componentes inorgânicos no biofilme</i>	19
<i>Análise da concentração mineral dentinária e profundidade de lesão</i>	19
Discussão	20
Conclusão	22
Bibliografia	23
Anexos	30

**Lesão de subsuperfície desenvolvida por biofilmes de *Streptococcus mutans* e
*Candida albicans***

Jesica Silva Santana¹, Alberto Carlos Botazzo Delbem¹, Juliano Pelim
Pessan¹, Caio Sampaio¹, Leonardo Antonio de Morais¹, Douglas Roberto Monteiro^{1,2},
Thayse Yumi Hosida^{1*}.

¹ Department of Preventive and Restorative Dentistry, São Paulo State University
(UNESP), School of Dentistry, Araçatuba, São Paulo, Brazil.

² Postgraduate Program in Health Sciences, University of Western São Paulo
(UNOESTE), Presidente Prudente, São Paulo, Brazil.

****Corresponding author:***

Thayse Yumi Hosida

E-mail address: thayse.hosida@unesp.br

Full postal address: São Paulo State University (UNESP), School of Dentistry, Araçatuba.

Department of Preventive and Restorative Dentistry.

Rua José Bonifácio, 1193. 16015-050, Araçatuba-SP, Brazil.

Phone: +55 18 3636 3317.

Lesão de subsuperfície desenvolvida por biofilmes de *Streptococcus mutans* e *Candida albicans*

Abstract

Objetivos: Desenvolver um protocolo para a formação de lesão de cárie de subsuperfície em esmalte bovino por biofilmes de dupla espécie de *Streptococcus mutans* e *Candida albicans in vitro*.

Materiais e métodos: Os biofilmes foram cultivados em blocos de esmalte bovino por 7 dias em saliva artificial (SA). Após 24 h de formação, a SA foi suplementada ou não com 0,005 ou 0,008 ppm F, e os biofilmes foram expostos ou não à uma solução de sacarose a 20% (simulando um desafio cariogênico). No 7º dia, os biofilmes foram coletados e tiveram seus polissacarídeos extracelulares (EPS) e componentes inorgânicos analisados. Além disso, os blocos foram submetidos à análise de microtomografia computadorizada de raios-X para determinar a concentração mineral ($g_{HAP} \times cm^{-3} \times \mu m$). Os dados foram submetidos a 2-way ANOVA, seguido pelos testes de Fisher LSD ou Student-Newman-Keuls ($p < 0,05$).

Resultados: A exposição ao desafio cariogênico levou a um aumento significativo nas concentrações de EPS do que aqueles não expostos ao desafio, independentemente da presença de F no SA. Após o desafio, para os biofilmes crescidos na presença de 0,008 ppm F, observou-se teores de F significativamente menores em comparação aos não expostos ao desafio. Os biofilmes expostos a 0,008 ppm F e ao desafio com sacarose apresentaram significativamente menor profundidade de lesão e área integrada, e maior camada externa em comparação aos biofilmes cultivados em SA, expostos ao desafio.

Conclusões: Os biofilmes analisados foram capazes de desenvolver lesão de cárie de subsuperfície do esmalte, influenciadas pela presença de F e exposição a um desafio cariogênico.

Significado clínico: O desenvolvimento de um modelo *in vitro* simplificado para a formação de lesão de cárie de subsuperfície apresentado neste estudo pode ser útil para a investigação de propriedades de produtos potencialmente anticáries.

Palavras-chaves: Cárie dentária, Esmalte dentário, Biofilmes, Desmineralização.

Introdução

A cárie dentária é uma das doenças bucais mais prevalentes no mundo, sendo definida como uma doença dinâmica, mediada por biofilme, modulada pela dieta, multifatorial e não transmissível, resultando em perda de minerais dos tecidos duros dentários [1, 2, 3]. A lesão de cárie inicial ou lesão de subsuperfície (“*caries-like*”) são termos frequentemente utilizados para a denominação de lesão de cárie não cavitada, comumente conhecida como “lesão de mancha branca” (LMB) [3]. As lesões de manchas branca são definidas como áreas clinicamente opacas e esbranquiçadas, resultantes de perda de minerais, induzidas por biofilme cariogênico, abaixo da camada mais exterior de esmalte intacta [3]. Essas lesões ocorrem através de um processo dinâmico de alternância entre desmineralização (DES) e remineralização (RE), no qual bactérias presentes no biofilme produzem ácidos por meio da metabolização de carboidratos fermentáveis, os quais promovem a diminuição do pH do fluido do biofilme dental. Esses ácidos penetram na estrutura dentária, removendo o cálcio (Ca) e o fósforo (Pi) presentes na subsuperfície dentária, o que acarreta em um aumento da porosidade da subsuperfície do esmalte [4, 5].

Com o objetivo de responder a questões específicas relacionadas à dinâmica de DES-RE do esmalte dental e ao biofilme cariogênico, o desenvolvimento de modelos laboratoriais simplificados é interessante para o avanço de pesquisas pré-clínicas, especialmente para a triagem inicial (“*screening*”) de concentrações e proporções molares, com um elevado número de grupos de estudo. Tais modelos devem ser capazes de mimetizar as oscilações de pH observadas no biofilme *in vivo*, comparando-se condições de baixa disponibilidade de carboidratos fermentáveis (aumento de pH) e alta disponibilidade destes (redução de pH). Dessa forma, a determinação do padrão de oscilações de pH torna o modelo mais representativo do biofilme dental *in vivo* frente a desafios cariogênicos, uma vez que reproduz os fenômenos de DES e RE e pode ser mais adequado para produzir lesão artificial de subsuperfície semelhantes à cárie. Neste sentido, ressalta-se que um dos maiores desafios na formação de lesões de subsuperfície mediadas por biofilmes *in vitro* é, justamente, a ausência de oscilações de pH (*i.e.*, ciclos alternados de DES e RE), o que frequentemente leva à formação de lesões “erosivas” [6].

As propriedades dos biofilmes mistos de *S. mutans* e *C. albicans* são essenciais para viabilizar o estudo detalhado de biofilmes cariogênicos por meio de diversos métodos analíticos quanti- e qualitativos. A curva de Stephan, por exemplo, foi reproduzida *in vitro* usando um modelo de biofilme misto envolvendo as duas espécies (*S. mutans* e *C. albicans*), no qual o biofilme foi exposto a uma solução de sacarose a 20%, levando a alterações de pH semelhantes às observadas no biofilme dental *in vivo* [7]. A utilização desse modelo também possibilitou, posteriormente, a análise de trocas iônicas entre o fluido do biofilme e sua fase sólida (biomassa) frente a um desafio cariogênico (exposição à sacarose) [8,9,10]. Assim, a validação do modelo de biofilme cariogênico supracitado possibilita a investigação do mecanismo de ação de diferentes tratamentos, visto que, após um desafio cariogênico, íons retidos na biomassa (*e.g.*, superfície microbiana e matriz extracelular) são liberados para o fluido do biofilme, o que pode influenciar diretamente a complexa dinâmica de DES e RE [8,9,10].

Em acréscimo, os estudos realizados até o momento utilizando o modelo de biofilme misto supracitado não determinaram o padrão de perda mineral do substrato dental frente a desafios cariogênicos. Assim, é teoricamente possível que as oscilações de pH no fluido do biofilme (decorrentes de exposições do biofilme à sacarose) levem à formação de lesões de subsuperfície de profundidades variáveis, ou até

mesmo que os desafios sejam demasiadamente intensos e levem à perda da camada superficial das lesões. Até o momento, estes parâmetros não foram determinados. Diante do exposto, é interessante avaliar o modelo de biofilme misto supracitado (*i.e.*, *S. mutans* e *C. albicans*) sobre um substrato dentário exposto a desafios cariogênicos e determinar os parâmetros ideais para a formação de lesões de subsuperfície padronizáveis.

Assim, este estudo teve como objetivo desenvolver um protocolo de formação de lesão de cárie de subsuperfície em esmalte dental bovino, utilizando biofilmes mistos de *S. mutans* e *C. albicans* *in vitro*, verificando a influência da presença de F e de desafios cariogênicos.

Materiais e Métodos

Preparo dos espécimes de esmalte bovino

Sessenta blocos de esmalte (8 × 8 × 2 mm) foram obtidos de dentes incisivos bovinos e mantidos em solução de formol (2%), durante 30 dias antes de qualquer procedimento experimental [11]. Esses blocos tiveram a superfície de dentina polida e na sequência, todas as suas superfícies, exceto a do esmalte, foram protegidas com verniz cosmético (Risqué® Savoy Indústria de Cosméticos S.A., São Paulo, Brasil).

Os espécimes foram adicionados a tubos Falcon® estéreis (três blocos/tubo) contendo 3 mL de água deionizada estéril. Na sequência, os tubos foram levados ao micro-ondas (Eletrolux® MT30S), à potência de 10, durante 3 minutos, para que fossem esterelizados [12].

Desenvolvimento de biofilme e desafios cariogênicos

Preparo da saliva artificial

Saliva artificial foi preparada de acordo com Lamfon et al. [13], modificado por Cavazana et al. [7], com a seguinte composição: Para 400 mL de água deionizada: 1,6 g de sacarose (Sigma-Aldrich, St Louis, US), 0,8 g de extrato de levedura (Sigma-Aldrich), 2 g de peptona (Sigma-Aldrich), 0,4g de mucina tipo III (Sigma-Aldrich), 0,14 g de NaCl (Sigma-Aldrich), 0,08 g de CaCl₂ (Sigma-Aldrich) e 0,08 g de KCl (Sigma-Aldrich). O pH das soluções foram ajustados com NaOH para 6.8.

Cepas de microrganismos e condições de crescimento

Foram utilizadas cepas de referência da American Type Culture Collection (ATCC): *S. mutans* ATCC 25175 e *C. albicans* ATCC 10231. Culturas dos microrganismos mantidas a -70 °C em glicerol foram semeadas em Agar Sabouraud Dextrose (ASD; Difco, Le Pont de Claix, França), para *C. albicans*, e cultivadas por 24 h a 37 °C. Culturas de *S. mutans* foram semeadas em Agar Infusão de Cérebro e Coração (BHI Agar; Difco) e incubadas em 5% de CO₂ a 37 °C por 24 h. Para *C. albicans*, uma alçada obtida das placas de ASD foi suspensa em 10 mL de caldo Sabouraud Dextrose (Difco) e incubada a 37 °C durante a noite, sob agitação de 120 rpm. Colônias de *S. mutans* foram suspensas em 10 mL de BHI caldo (Difco) e incubadas estaticamente durante a noite em 5% de CO₂ a 37 °C. Após o período de incubação, as células

fúngicas e bacterianas foram recuperadas por centrifugação a 8000 rpm, por 5 min, a 15 °C, e os *pellets* de células foram lavados duas vezes com 10 mL de solução salina (0,85% NaCl). A quantidade de células fúngicas foi ajustada para uma concentração de 10^7 células/mL em saliva artificial com auxílio de uma Câmara de Neubauer e um microscópio óptico, enquanto a quantidade de células bacterianas foi ajustada espectrofotometricamente para uma concentração de 10^8 células/mL em saliva artificial [7].

Formação de biofilme e desafio cariogênico

Os biofilmes foram formados em blocos de esmalte bovino estéreis posicionados no fundo dos poços de placas de microtitulação de 24 poços. Para isso, 2 mL de suspensão (1×10^7 células/mL *C. albicans* + 1×10^8 células/mL *S. mutans*) foram adicionados aos poços sobre os blocos e incubadas a 5% CO₂ a 37 °C por 24 h. O meio foi renovado a cada 24 h, pela aspiração de 2 mL e adição de volume equivalente de cada saliva artificial, acrescido ou não 20 ou 30 µL de uma solução padrão de 100 ppm F (NaF; Dinâmica, SP, Brasil), equivalente a 0,005 ppm F e a 0,008 ppm F. Sendo assim, o meio era renovado de acordo com os seguintes grupos ($n=10$): Saliva artificial (SA); saliva artificial com 0,005 ppm F (0,005F); saliva artificial com 0,008 ppm F (0,008F).

Em outro conjunto de experimentos, os desafios cariogênicos foram realizados uma vez por dia, às 10:00, para os grupos ($n=10$): saliva artificial exposto à sacarose (SA/SAC); saliva artificial com 0,005 ppm F exposto à sacarose (0,005F/SAC); saliva artificial com 0,008 ppm F exposto à sacarose (0,008F/SAC). O desafio cariogênico foi realizado desde o 1º dia (24 h) até o 6º dia (144 h) de formação do biofilme, sendo que para este, a suspensão foi completamente aspirada e foi pipetada 1 mL de solução de sacarose a 20%, por um período de 3 min [7], na sequência a solução foi removida e a saliva artificial novamente adicionada aos poços de acordo com a distribuição dos grupos. No 7º dia, o biofilme formado sobre o esmalte foi coletado através de raspagem da superfície e o mesmo, armazenado em tubos de microcentrífuga para posterior análise. O experimento foi realizado em dois momentos independentes.

Análise da composição do biofilme dental

As amostras de biofilmes foram secas a vácuo com pentóxido de P, por 12 h, em temperatura ambiente. Para a análise de F, Ca e P do biofilme total, foi adicionado 0,5 mol/L de HCl aos microtubos contendo os biofilmes na proporção de 0,5 mL/10,0 mg de peso úmido da placa [14] e homogeneizados. A mistura resultante foi mantida por 3 horas à temperatura ambiente e sob agitação constante (120 rpm) e, em seguida, centrifugada ($11000 \times g$), por 1 minuto [15]. Uma quantidade conhecida do líquido foi removida e o mesmo volume de NaOH a 0,5 mol/L foi adicionado.

A análise do íon F foi feita através de eletrodo específico (Orion 9409 BN) e eletrodo de referência (Orion 900100), ambos acoplados a um potenciômetro (Orion; Thermo Scientific). O conteúdo de F da biomassa foi analisado conforme descrito anteriormente, utilizando padrões contendo 0,09, 0,18, 0,36, 0,72 e 1,44 µg F/mL (para biofilmes livres de F) e 0,8, 1,6, 3,2, 6,4 e 12,8 µg F/mL (para biofilmes expostos à saliva contendo F). Para os biofilmes expostos à sacarose, a curva de calibração foi realizada utilizando padrões de 0,2, 0,4, 0,8, 1,6 e 3,2 µg F/mL. Foi adicionado o tampão ajustador de força iônica total (TISAB II) que foi administrado nas mesmas condições das amostras, na proporção de 1:1.

O íon Ca foi mensurado por espectrofotometria em leitor de placas (EONC Spectrophotometer; EONC, Biotek, Winooski, VT, USA) no comprimento de onda de 650 nm, adaptando o método descrito por Vogel et al. [16]. O reagente Arsenazo III foi usado com um método colorimétrico. Uma alíquota de 5 µL em duplicata para ambos os padrões e amostras foi adicionada com 50 µL de Arsenazo III e 50 µL de água deionizada. Posteriormente, foram agitados por 60 s no leitor de microplacas, promovendo a reação entre a amostra e o Arsenazo III antes da obtenção da absorbância resultante. As concentrações de P total foram determinadas de acordo com o método proposto por Fiske e Subbarow [17].

O EPS foi extraído pela adição de 1,0 mol L de NaOH (10 µL/mg de peso seco) ao biofilme [15,18]. A quantidade de EPS foi determinada pelo método fenol-sulfúrico [19]. Os resultados foram expressos em mols por quilograma (F, Ca e Pi) e miligramas por grama (EPS) de peso seco.

Análise de microtomografia computadorizada do esmalte

Os blocos de esmalte obtidos após o experimento foram seccionados nas dimensões de $2 \times 8 \times 1$ mm e submetidos à análise microtomográfica. O conteúdo mineral do esmalte foi analisado em microtomógrafo de alta resolução (SkyScan1272 high-resolution MicroCT, Bruker-MicroCT, Kontich, Belgium) para a determinação do conteúdo mineral do esmalte ($g_{HAP} \times cm^{-3}$) em 3D. A MicroCT foi operada a 70 kV, 142 mA, filtro de alumínio de 0,5 mm, resolução espacial de 1,5 µm, passo de rotação a $0,600^\circ$ e movimento aleatório a 15. As projeções das imagens foram reconstruídas utilizando o software NRecon (version 1.6.10.2, Skyscan1272, Bruker MicroCT, Kontich, Bélgica), com suavização a 5, correção de artefato de anel a 7, e correção do endurecimento a 52%. Após a reconstrução, as fatias virtuais bidimensionais (2D) no plano sagital e coronal foram adquiridas usando o software Data Viewer (Skyscan1272). O agrupamento em 2D das fatias foi importado para o software ImageJ para produzir um perfil geral de concentração mineral ($g_{HAP} \times cm^{-3}$) em função da profundidade (µm). As concentrações minerais foram calculadas a partir do coeficiente de atenuação linear (LAC) e expressas como a massa de hidroxiapatita pura ($\Delta = 3,15 g \times cm^{-3}$) por unidade de volume de tecido ($g_{HAP} \times cm^{-3}$) [20-22].

A área integrada abaixo da curva do perfil mineral ($g_{HAP} \times cm^{-3}$) em secção longitudinal no esmalte foi calculada pela regra trapezoidal (GraphPad Prism, version 3.02, CA, EUA) em cada profundidade (µm), da região de lesão em direção ao esmalte hígido. Estes valores foram subtraídos da área integrada do esmalte hígido obtendo a área integrada da região de subsuperfície no esmalte, a qual foi nomeada como perda mineral integrada (IML) [22].

Análise estatística

Os dados referentes às concentrações de EPS, F, Ca e Pi no biofilme foram submetidos à ANOVA a 2 critérios, seguido pelo teste de Fisher LSD para comparações individuais. Os dados referentes à concentração mineral dentinária e profundidade de lesão foram submetidos à ANOVA a 2 critérios, seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls para comparações individuais. As análises estatísticas foram conduzidas utilizando o Software SigmaPlot 12.0 (Systat Software Inc., San Jose, CA, EUA), adotando um nível de significância de 5%.

Resultados

Concentrações de EPS e de componentes inorgânicos no biofilme

Com relação às concentrações de EPS no biofilme, os grupos SA/SAC, 0,005F/SAC e 0,008F/SAC apresentaram valores significativamente maiores quando comparados aos grupos sem exposição à sacarose (Figura 1A). Além disso, o grupo 0,005F não diferiu significativamente do grupo SA, independentemente da exposição ao desafio cariogênico. Observou-se, também, que o grupo 0,008F/SAC apresentou concentrações de EPS significativamente menores que os grupos SA/SAC e 0,005F/SAC.

Quanto a composição inorgânica dos biofilmes, os grupos SA/SAC, 0,005F/SAC e 0,008F/SAC apresentaram concentrações significativamente menores de Ca quando comparados a suas contrapartes sem exposição ao desafio cariogênico (Figura 1B). Notou-se, também, que o grupo 0,008F apresentou concentrações significativamente maiores de Ca se comparado ao SA, entretanto, sem diferença estatística do grupo 0,005F (Figuras 1B)

Com relação às concentrações de Pi, somente o grupo SA levou à uma redução significativa, para os biofilmes expostos ao desafio cariogênico (Figura 1C). Observou-se que os grupos contendo F apresentaram valores de F significativamente maiores que o SA e SA/SAC, sem diferença, entretanto, entre si (Figura 1D).

Análise da concentração mineral dentinária e profundidade de lesão

Observou-se que somente o grupo contendo 0,008F não apresentou um aumento significativo nos valores de área integrada (AI), para os biofilmes expostos ao desafio cariogênico. Sem a exposição ao desafio cariogênico, nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos. Para os grupos expostos ao desafio, o grupo SA apresentou maiores valores de AI que os grupos contendo F, os quais não diferiram significativamente entre si (Tabela 1).

Somente para o grupo contendo 0,008F, a exposição ao desafio cariogênico levou a valores significativamente menores de espessura da camada superficial se comparado aos espécimes não submetidos ao desafio. Além disso, tanto com quanto sem exposição ao desafio, o grupo 0,008F apresentou valores significativamente maiores de espessura da camada superficial se comparado aos grupos SA, SA/SAC, 0,005F e 0,005F (Tabela 1).

Na Figura 2, pode-se observar que todos os grupos apresentaram perda mineral maiores que dos blocos hígidos. Com relação à profundidade da lesão, notou-se que, para todos os grupos, a exposição ao desafio cariogênico levou à lesões significativamente mais profundas, se comparadas aos grupos não expostos. Os grupos contendo F, independentemente da concentração, apresentaram valores significativamente menores de profundidade de lesão, em comparação ao grupo SA, para os grupos expostos ao desafio cariogênico, sem diferença significativa entre si (Tabela 2).

O grupo SA/SAC apresentou maior perda mineral quando comparado ao SA (Figura 2A). O grupo 0,008F apresentou a uma menor perda mineral quando comparado ao grupo SA e ao grupo 0,005F (Figura 2B). Com exposição ao desafio cariogênico, os grupos contendo F levaram a menor perda mineral quando

comparado ao SA (Figura 2C). A figura 3 mostra as fotomicrografias do microCT representativas das lesões formadas.

Discussão

O desenvolvimento de lesões de cárie de subsuperfície por meio de um protocolo *in vitro*, associando à presença de biofilme se mostra como uma ferramenta essencial para o estudo de terapias anticárie. Alguns modelos de biofilme foram desenvolvidos para avaliar o efeito de produtos voltados para saúde bucal e compostos com efeito antimicrobiano [7- 9, 23-25,]. Entretanto, esses sistemas normalmente não combinam abordagens para avaliar a formação de lesões de cárie de subsuperfície, trocas iônicas, oscilação de pH, composição da matriz extracelular e interações entre o biofilme e substrato. No presente estudo, um modelo de biofilme de duas espécies de *S. mutans* e *C. albicans* permitiu verificar a formação de lesão de cárie de subsuperfície em dentes bovinos, sob desafio cariogênico, independentemente da suplementação do meio de cultura com F, bem como sua concentração.

O meio usado para o crescimento do biofilme, a saliva artificial, apresentava 0,4% de sacarose na composição. A adição de sacarose no meio de cultura foi baseado em estudo anteriores, para melhor adesão, crescimento e formação do biofilme de *S. mutans* e *C. albicans* [7,8]. Segundo van de Sande et al. [26], um modelo de biofilme cariogênico exposto a sacarose 0,5% de modo constante, resultou em erosão na superfície do esmalte, ou seja, perda da camada superficial. É importante ressaltar, que para o biofilme de *S. mutans* e *C. albicans* a concentração de 0,4% de sacarose no meio de cultura de forma contínua, foi capaz de formar lesão de cárie de subsuperfície com uma camada exterior de esmalte intacta, conforme mostrado na imagem de microCT.

Além disso, o biofilme exposto uma vez ao dia à solução de sacarose a 20%, levou a uma maior profundidade da lesão quando comparado aos grupos não expostos. Diante dos resultados obtidos no presente estudo, o modelo proposto por Cavazana et al., [7], o qual simula a curva de Stephan [27] após desafio cariogênico, levando a alterações de pH semelhantes às observadas no biofilme dental *in vivo*, pôde ser validado [7]. Esse modelo é capaz de mimetizar a curva natural de pH observadas clinicamente após a exposição a sacarose, com uma baixa disponibilidade de açúcar e outra com alta disponibilidade de açúcar. Assim, a validação do modelo de biofilme cariogênico possibilita a investigação do mecanismo de ação de diferentes tratamentos, visto que, após um desafio cariogênico, íons retidos na biomassa (*i.e.*, superfície microbiana e matriz extracelular) são liberados para o fluido do biofilme, o que pode influenciar diretamente a complexa dinâmica de DES e RE [8-10].

Estudos anteriores têm avaliado modelos de biofilme *in vitro*, verificando a alteração do conteúdo mineral [28-32]. Nestes estudos, a microdureza de superfície foi escolhida como método analítico para verificar a alteração no conteúdo mineral. A microdureza de superfície é uma medida da integridade estrutural de quase toda a lesão, ou seja, é uma medida que verifica a porcentagem de perda mineral (*i.e.*, desmineralização) [28-32], o que dificulta a avaliação da zona superficial e a zona do corpo da lesão. O método analítico utilizado neste estudo foi microCT, o que permitiu avaliar a área integrada, profundidade, camada externa e concentração mineral das lesões de cárie de subsuperfície formado pelo modelo de biofilme de *S. mutans* e *C. albicans*.

A microCT fornece imagens tridimensionais (3D) e perfis de densidade mineral de uma amostra. O

método tem sido utilizado para análise da desmineralização do esmalte [33-41] e principalmente para a avaliação de lesão de cárie de subsuperfície, visto que é possível quantificar a perda mineral e profundidade da lesão, bem como a espessura e o grau de mineralização da camada superficial [21, 41-44]. A análise das imagens do microCT dos blocos de esmalte após 7 dias de formação de biofilme e desafio cariogênico (*i.e.*, 1 x ao dia), mostrou um corpo de lesão desmineralizado e uma zona de superfície altamente mineralizada consistentes com a lesão de cárie de subsuperfície formadas *in vivo*. Como esperado, a exposição contínua aos níveis de F testados durante a formação do biofilme mostraram uma relação dose-resposta contra a desmineralização em termos de profundidade da lesão, espessura da camada externa e área integrada da lesões de cárie de subsuperfície. As baixas concentrações de flúor usadas de modo constante na saliva artificial, permitiu a preservação da superfície do esmalte, como observado nas lesões formadas após a ciclagem de pH *in vitro*, na qual o flúor em baixas concentrações nas soluções DES e RE resulta na formação de lesão de cárie de superfície [45].

Além disso, essas concentrações poderiam simular o F encontrado na saliva devido à ingestão regular de água fluoretada [46]. Vale salientar que o pH da saliva, bem como a concentração de F podem influenciar a dinâmica do modelo e impedir a verificação de uma relação dose-resposta dos tratamentos. Na presença do F, a fluorhidroapatita é precipitada na superfície do esmalte e diminui a perda mineral. Maiores concentrações de F estão associadas a uma maior saturação em relação à fluorapatita e mais minerais precipitam na superfície do esmalte, reduzindo a desmineralização [47]. Essa propriedade pode explicar menor profundidade da lesão nos grupos contendo 0,005 e 0,008 ppm F, após a exposição sacarose, e maior espessura na camada externa da lesões de cárie de subsuperfície. No biofilme, os grupos contendo F expostos uma vez ao dia a desafios cariogênicos apresentaram menores concentrações de F quando comparado aos grupos não expostos, corroborando resultados anteriores com o mesmo modelo de biofilme [7,8].

Com relação a EPS, a presença do F, independentemente da concentração, reduziu as concentrações de EPS antes da exposição à sacarose. Os grupos expostos ao desafio cariogênico apresentaram maiores valores de EPS, quando comparado aos grupos não expostos. Uma explicação para esse aumento de EPS nos grupos expostos ao desafio cariogênico é que a sacarose serve como substrato para a síntese de EPS. Essa estrutura consiste em um importante fator de virulência, pois provem a aderência do biofilme à superfície do dente, contribuem para a integridade estrutural dos biofilmes, alteram a porosidade e consequentemente, aumentam a desmineralização do esmalte [48]. Logo, a exposição a sacarose leva à diminuição do pH, favorecendo o crescimento e desenvolvimento do biofilme cariogênico e, consequentemente, potencializando a desmineralização.

Estudos anteriores mostraram que os biofilmes formados sob exposição frequente à sacarose apresentam concentrações diminuídas de Ca total da placa, Pi e F [49-52], que foram diretamente relacionados ao aumento da concentração de polissacarídeos extracelulares insolúveis, produzidos a partir da sacarose na matriz do biofilme. O Ca é um indicador químico da desmineralização do esmalte, e sua concentração no meio foi menor nos grupos expostos ao desafio cariogênico, corroborando resultados dos referidos estudos; o mesmo padrão pode ser observado para o grupo contendo 0,008 ppm F. A diminuição da concentração de Pi no fluido após o desafio com açúcar foi observada em outra ocasião [53] e pode ser devido à absorção de Pi por bactérias fermentadoras. De fato, para o grupo controle foi observado uma

redução na concentração de Pi para os grupos expostos ao desafio cariogênico; no entanto, nos grupos contendo F não houve diferença significativa entre os biofilmes expostos ou não à sacarose.

Apesar do presente estudo ter demonstrado ser efetivo no desenvolvimento de lesão de cárie de subsuperfície em espécimes de dentes bovinos, simulando condições observadas *in vivo*, algumas limitações metodológicas devem ser mencionadas. Primeiramente, embora dentes bovinos apresentem características minerais semelhantes aos de dentes humanos e venham sendo utilizadas como uma alternativa interessante para o desenvolvimento de protocolos para estudos de variáveis relacionadas à dinâmica DES-RE [54-56], faz-se importante mencionar que é possível que os resultados encontrados no presente estudo não sejam completamente extrapoláveis para dentes humanos. Um outro ponto que merece comentário é a presença constante de sacarose no meio de cultura, o que levou a formação de lesão de cárie de subsuperfície mesmo sem a exposição ao desafio cariogênico. Apesar desta condição não ser totalmente condizente com situações *in vivo* reais, visto que, clinicamente, não existe a presença constante do açúcar no meio bucal, a sacarose foi mantida no meio de cultura com o intuito de reproduzir identicamente o protocolo proposto por Cavazana et al., [7]. É razoável enfatizar, portanto, a necessidade de avaliações futuras incluindo tais variáveis (*i.e.*, substrato de dente humano e ausência de exposição constante à sacarose), a fim de se obter dados cada vez mais próximos de situações *in vivo*.

Conclusão

Em conclusão, os resultados apresentados sugerem que este modelo biofilme misto de *S. mutans* e *C. albicans* pode ser usado para desenvolvimento de lesão de cárie de subsuperfície, e a presença contínua de F no meio de cultura interfere nos parâmetros orgânicos e inorgânicos do biofilme, bem como na formação da lesão de cárie.

Bibliografia

1. Selwitz RH, Ismail AI, Pitts NB. Dental caries. *Lancet*. 2007 Jan 6;369(9555):51-9. doi: 10.1016/S0140-6736(07)60031-2.
2. Kassebaum NJ, Bernabé E, Dahiya M, Bhandari B, Murray CJ, Marcenes W. Global burden of untreated caries: a systematic review and metaregression. *J Dent Res*. 2015 May;94(5):650-8. doi: 10.1177/0022034515573272.
3. Machiulskiene et al. Terminology of Dental Caries and Dental Caries Management: Consensus Report of a Workshop Organized by ORCA and Cariology Research Group of IADR. *Caries Res*. 2020;54(1):7-14. doi: 10.1159/000503309.
4. Featherstone JD. Prevention and reversal of dental caries: role of low level fluoride. *Community Dent Oral Epidemiol*. 1999 Feb;27(1):31-40. doi: 10.1111/j.1600-0528.1999.tb01989.x.
5. Steinberg S. Adding caries diagnosis to caries risk assessment: the next step in caries management by risk assessment (CAMBRA). *Compend Contin Educ Dent*. 2009 Oct;30(8):522, 524-6, 528 passim.
6. 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 Sep;33(8):661-675. doi: 10.1080/08927014.2017.1354248.
7. Cavazana TP, Pessan JP, Hosida TY, Monteiro DR, Botazzo Delbem AC. pH changes of mixed biofilms of *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* after exposure to sucrose solutions *in vitro*. *Arch Oral Biol*. 2018 Jun;90:9-12. doi: 10.1016/j.archoralbio.2018.02.019.
8. Hosida TY, Pessan JP, Cavazana TP, Sampaio C, de Moraes LA, Monteiro DR, Delbem ACB. Effects of Sodium Hexametaphosphate and Fluoride on the pH and Inorganic Components of *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* Biofilm after Sucrose Exposure. *Antibiotics (Basel)*. 2022 Aug 3;11(8):1044. doi: 10.3390/antibiotics11081044.
9. Cavazana TP, Pessan JP, Hosida TY, Sampaio C, Amarante VOZ, Monteiro DR, Delbem ACB. Effects of Sodium Trimetaphosphate, Associated or Not with Fluoride, on the Composition and pH of Mixed Biofilms, before and after Exposure to Sucrose. *Caries Res*. 2020;54(4):358-368. doi: 10.1159/000501262.
10. Cavazana TP, Hosida TY, Sampaio C, de Moraes LA, Monteiro DR, Pessan JP, Delbem ACB. Calcium glycerophosphate and fluoride affect the pH and inorganic composition of dual-species biofilms of *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*. *J Dent*. 2021 Dec;115:103844. doi: 10.1016/j.jdent.2021.103844.
11. Delbem AC, Cury JA. Effect of application time of APF and NaF gels on microhardness and fluoride uptake of in vitro enamel caries. *Am J Dent*. 2002 Jun;15(3):169-72.
12. Viana PS, Machado AL, Giampaolo ET, Pavarina AC, Vergani CE. Disinfection of bovine enamel by microwave irradiation: effect on the surface microhardness and demineralization/remineralization processes. *Caries Res*. 2010;44(4):349-57. doi: 10.1159/000318528. Epub 2010 Jul 10.
13. Lamfon H, Porter SR, McCullough M, Pratten J. Formation of *Candida albicans* biofilms on non-shedding oral surfaces. *Eur J Oral Sci*. 2003 Dec;111(6):465-71. doi: 10.1111/j.0909-8836.2003.00084.x.
14. Cury JA, Rebelo MA, Del Bel Cury AA, Derbyshire MT, Tabchoury CP. Biochemical composition and cariogenicity of dental plaque formed in the presence of sucrose or glucose and fructose. *Caries Res*. 2000 Nov-Dec;34(6):491-7. doi: 10.1159/000016629.
15. 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 Sep-Oct;36(5):347-52. doi: 10.1159/000065959.
16. Vogel GL, Chow LC, Brown WE. A microanalytical procedure for the determination of calcium, phosphate and fluoride in enamel biopsy samples. *Caries Res*. 1983;17(1):23-31. doi: 10.1159/000260645.
17. King EJ. The colorimetric determination of phosphorus. *Biochem J*. 1932;26(2):292-7. doi: 10.1042/bj0260292. PMID: 16744823;
18. Ccahuana-Vásquez 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):9-15. doi: 10.1159/000096100.
19. DUBOIS, M. et al. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Anal. Chem*, v. 28, n. 3, p. 350–356, mar. 1956. doi: 10.1021/ac60111a017

20. Dowker SE, Elliott JC, Davis GR, Wassif HS. Longitudinal study of the three-dimensional development of subsurface enamel lesions during *in vitro* demineralisation. *Caries Res.* 2003 Jul-Aug;37(4):237-45. doi: 10.1159/000070865.
21. Dowker SE, Elliott JC, Davis GR, Wilson RM, Cloetens P. Synchrotron x-ray microtomographic investigation of mineral concentrations at micrometre scale in sound and carious enamel. *Caries Res.* 2004 Nov-Dec;38(6):514-22. doi: 10.1159/000080580.
22. Dalpasquale G, Delbem ACB, Pessan JP, Nunes GP, Gorup LF, Neto FNS, de Camargo ER, Danelon M. Effect of the addition of nano-sized sodium hexametaphosphate to fluoride toothpastes on tooth demineralization: an *in vitro* study. *Clin Oral Investig.* 2017 Jun;21(5):1821-1827. doi: 10.1007/s00784-017-2093-3.
23. Zhang K, Wang S, Zhou X, Xu HH, Weir MD, Ge Y, Li M, Wang S, Li Y, Xu X, Zheng L, Cheng L. Effect of antibacterial dental adhesive on multispecies biofilms formation. *J Dent Res.* 2015 Apr;94(4):622-9. doi: 10.1177/0022034515571416.
24. Nance WC, Dowd SE, Samaritan D, Chludzinski J, Delli J, Battista J, Rickard AH. A high-throughput microfluidic dental plaque biofilm system to visualize and quantify the effect of antimicrobials. *J Antimicrob Chemother.* 2013 Nov;68(11):2550-60. doi: 10.1093/jac/dkt211.
25. Cavazana TP, Hosida TY, Pessan JP, Sampaio C, Monteiro DR, Delbem ACB. Activity of sodium trimetaphosphate, associated or not with fluoride, on dual-species biofilms. *Biofouling.* 2019 Jul;35(6):710-718. doi: 10.1080/08927014.2019.1653455.
26. van de Sande FH, Azevedo MS, Lund RG, Huysmans MC, Cenci MS. An *in vitro* biofilm model for enamel demineralization and antimicrobial dose-response studies. *Biofouling.* 2011 Oct;27(9):1057-63. doi: 10.1080/08927014.2011.625473.
27. Stephan RM. Intra-Oral Hydrogen-Ion Concentrations Associated With Dental Caries Activity. *Journal of Dental Research.* 1944;23(4):257-266. doi:10.1177/00220345440230040401
28. Florez Salamanca EJ, Dantas RM, Rodriguez MJ, Klein MI. Establishment of microcosm biofilm models that reproduce a cariogenic diet intake. *Biofouling.* 2020 Nov;36(10):1196-1209. doi: 10.1080/08927014.2020.1862093.
29. Ccahuana-Vásquez RA, Cury JA. *S. mutans* biofilm model to evaluate antimicrobial substances and enamel demineralization. *Braz Oral Res.* 2010 Apr-Jun;24(2):135-41. doi: 10.1590/s1806-83242010000200002.
30. Muñoz-Sandoval C, Muñoz-Cifuentes MJ, Giacaman RA, Ccahuana-Vasquez RA, Cury JA. Effect of bovine milk on *Streptococcus mutans* biofilm cariogenic properties and enamel and dentin demineralization. *Pediatr Dent.* 2012 Nov-Dec;34(7):e197-201.
31. Ribeiro CCC, Ccahuana-Vásquez RA, Carmo CDS, et al (2012) The effect of iron on *Streptococcus mutans* biofilm and on enamel demineralization. *Braz. Oral Res.* 26:300–305. doi: 10.1590/s1806-83242012000400003
32. Cavalcanti YW, 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. doi: 10.1080/08927014.2014.905547.
33. Hamba H, Nikaido T, Sadr A, Nakashima S, Tagami J. Enamel lesion parameter correlations between polychromatic micro-CT and TMR. *J Dent Res.* 2012 Jun;91(6):586-91. doi: 10.1177/0022034512444127.
34. Davis GR, Evershed AN, Mills D. Quantitative high contrast X-ray microtomography for dental research. *J Dent.* 2013 May;41(5):475-82. doi: 10.1016/j.jdent.2013.01.010.
35. Zhi QH, Lo EC, Kwok AC. An *in vitro* study of silver and fluoride ions on remineralization of demineralized enamel and dentine. *Aust Dent J.* 2013 Mar;58(1):50-6. doi: 10.1111/adj.12033.
36. Kucuk EB, Malkoc S, Demir A. Microcomputed tomography evaluation of white spot lesion remineralization with various procedures. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2016 Sep;150(3):483-90. doi: 10.1016/j.ajodo.2016.02.026.
37. Shahmoradi M, Lashgari M, Rabbani H, Qin J, Swain M. A comparative study of new and current methods for dental micro-CT image denoising. *Dentomaxillofac Radiol.* 2016;45(3):20150302. doi: 10.1259/dmfr.20150302.
38. Shahmoradi M, Swain MV. Micro-CT analysis of naturally arrested brown spot enamel lesions. *J Dent.* 2017 Jan;56:105-111. doi: 10.1016/j.jdent.2016.11.007.
39. Davis GR, Mills D, Anderson P. Real-time observations of tooth demineralization in 3 dimensions using X-ray microtomography. *J Dent.* 2018 Feb;69:88-92. doi: 10.1016/j.jdent.2017.11.010.
40. Punyanirun K, Yospi boonwong T, Kunapinun T, Thanyasrisung P, Trairatvorakul C. Silver diamine fluoride remineralized artificial incipient caries in permanent teeth after bacterial pH-

- cycling in-vitro. *J Dent.* 2018 Feb;69:55-59. doi: 10.1016/j.jdent.2017.09.005.
41. Rovaris K, Ferreira LM, Sousa TO, Peroni LV, Freitas DQ, Wenzel A, Haiter-Neto F. Feasibility of micro-computed tomography to detect and classify proximal caries lesions *in vitro*. *Dent Res J (Isfahan)*. 2018 Mar-Apr;15(2):123-129.
 42. Delbem AC, Sasaki KT, Vieira AE, Rodrigues E, Bergamaschi M, Stock SR, Cannon ML, Xiao X, De Carlo F, Delbem AC. Comparison of methods for evaluating mineral loss: hardness versus synchrotron microcomputed tomography. *Caries Res.* 2009;43(5):359-65. doi: 10.1159/000231573.
 43. Dowker SE, Elliott JC, Davis GR, Wilson RM, Cloetens P. Three-dimensional study of human dental fissure enamel by synchrotron X-ray microtomography. *Eur J Oral Sci.* 2006 May;114 Suppl 1:353-9; discussion 375-6, 382-3. doi: 10.1111/j.1600-0722.2006.00315.x.
 44. Buzalaf MA, Hannas AR, Magalhães AC, Rios D, Honório HM, Delbem AC. pH-cycling models for *in vitro* evaluation of the efficacy of fluoridated dentifrices for caries control: strengths and limitations. *J Appl Oral Sci.* 2010 Jul-Aug;18(4):316-34. doi: 10.1590/s1678-77572010000400002.
 45. 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 Nov-Dec;39(6):514-20. doi: 10.1159/000088189.
 46. Oliveby A, Twetman S, Ekstrand J. Diurnal fluoride concentration in whole saliva in children living in a high- and a low-fluoride area. *Caries Res.* 1990;24(1):44-7. doi: 10.1159/000261237.
 47. Buzalaf MAR, Pessan JP, Honório HM, Ten Cate JM. Mechanisms of action of fluoride for caries control. *Monogr Oral Sci.* 2011;22:97-114. doi: 10.1159/000325151.
 48. Flemming HC, van Hullebusch ED, Neu TR, Nielsen PH, Seviour T, Stoodley P, Wingender J, Wuertz S. The biofilm matrix: multitasking in a shared space. *Nat Rev Microbiol.* 2023 Feb;21(2):70-86. doi: 10.1038/s41579-022-00791-0.
 49. Cury JA, Rebello MA, Del Bel Cury AA. *In situ* relationship between sucrose exposure and the composition of dental plaque. *Caries Res.* 1997;31(5):356-60. doi: 10.1159/000262418.
 50. Pearce EI, Sissons CH, Coleman M, Wang X, Anderson SA, Wong L. The effect of sucrose application frequency and basal nutrient conditions on the calcium and phosphate content of experimental dental plaque. *Caries Res.* 2002 Mar-Apr;36(2):87-92. doi: 10.1159/000057865.
 51. Paes Leme AF, Dalcico R, Tabchoury CP, Del Bel Cury AA, Rosalen PL, Cury JA. *In situ* effect of frequent sucrose exposure on enamel demineralization and on plaque composition after APF application and F dentifrice use. *J Dent Res.* 2004 Jan;83(1):71-5. doi: 10.1177/154405910408300114.
 52. Pechariki GD, Cury JA, Paes Leme AF, Tabchoury CP, Del Bel Cury AA, Rosalen PL, Bowen WH. Effect of sucrose containing iron (II) on dental biofilm and enamel demineralization *in situ*. *Caries Res.* 2005 Mar-Apr;39(2):123-9. doi: 10.1159/000083157.
 53. Margolis HC, Moreno EC. Kinetics of hydroxyapatite dissolution in acetic, lactic, and phosphoric acid solutions. *Calcif Tissue Int.* 1992 Feb;50(2):137-43. doi: 10.1007/BF00298791.
 54. Moecke SE, Silva AGCS, Andrade ACM, Borges AB, Torres CRG. Efficacy of S-PRG filler varnishes on enamel caries remineralization. *J Dent.* 2022 Apr;119:104074. doi: 10.1016/j.jdent.2022.104074.
 55. Wang Y, Zeng Y, Feng Z, Li Z, Jiang X, Han S, Washio J, Takahashi N, Zhang L. Combined Treatment with Fluoride and Antimicrobial Peptide GH12 Efficiently Controls Caries *in vitro* and *in vivo*. *Caries Res.* 2022;56(5-6):524-534. doi: 10.1159/000528057.
 56. Conti GB, de Lima Oliveira RF, Amorim AA, de Oliveira HF, Pires-de-Souza FCP, de Queiroz AM. Color stability and microhardness alteration of irradiated dental enamel treated with a high fluoride concentration toothpaste. *Clin Oral Investig.* 2022 Sep;26(9):5885-5892. doi: 10.1007/s00784-022-04546-2.

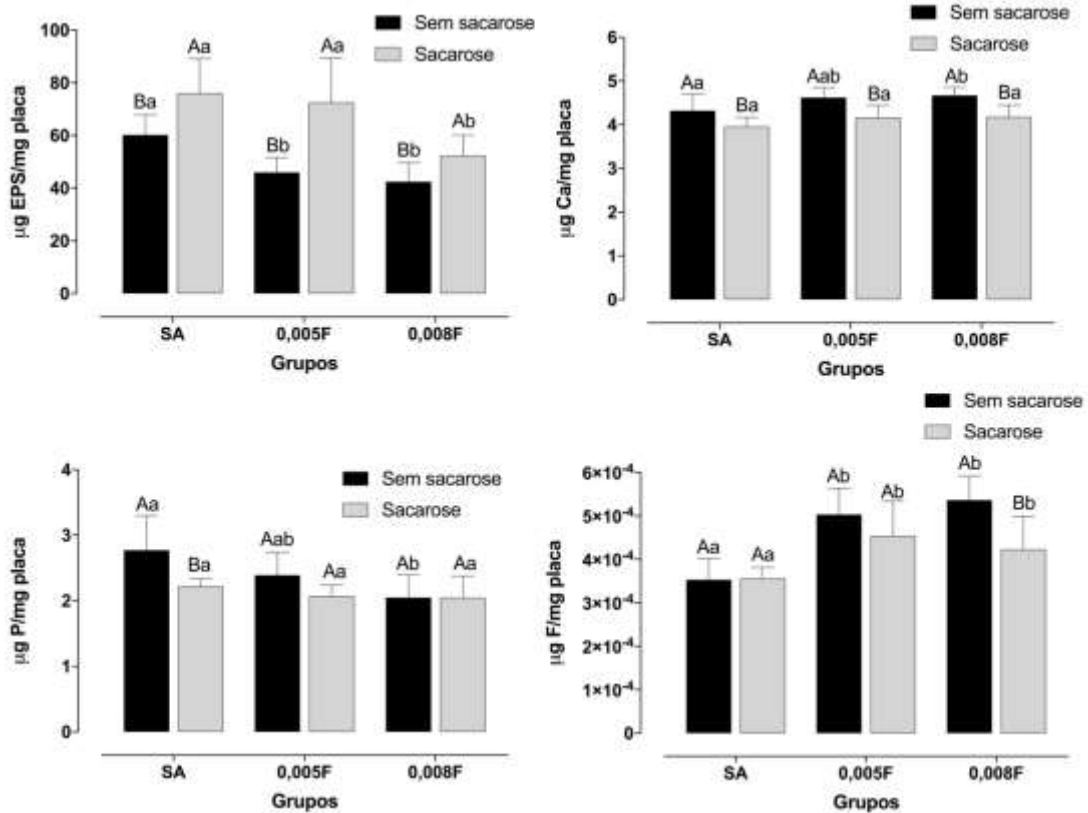


Figura 1. Valores médios de EPS (A), Ca (B), Pi (C) e F (D) do biofilme com ou sem exposição desafio cariogênico. Barras denotam desvios-padrões das médias. Letras maiúsculas distintas indicam diferença estatística entre as condições experimentais (sem sacarose e sacarose). Letras minúsculas distintas indicam diferença estatística entre os grupos (ANOVA a 2 critérios, teste de Fisher LSD, $p < 0,05$; $n = 10$). SA: saliva artificial; 0,005F: 0,005 ppm F; 0,008F: 0,008 ppm F.

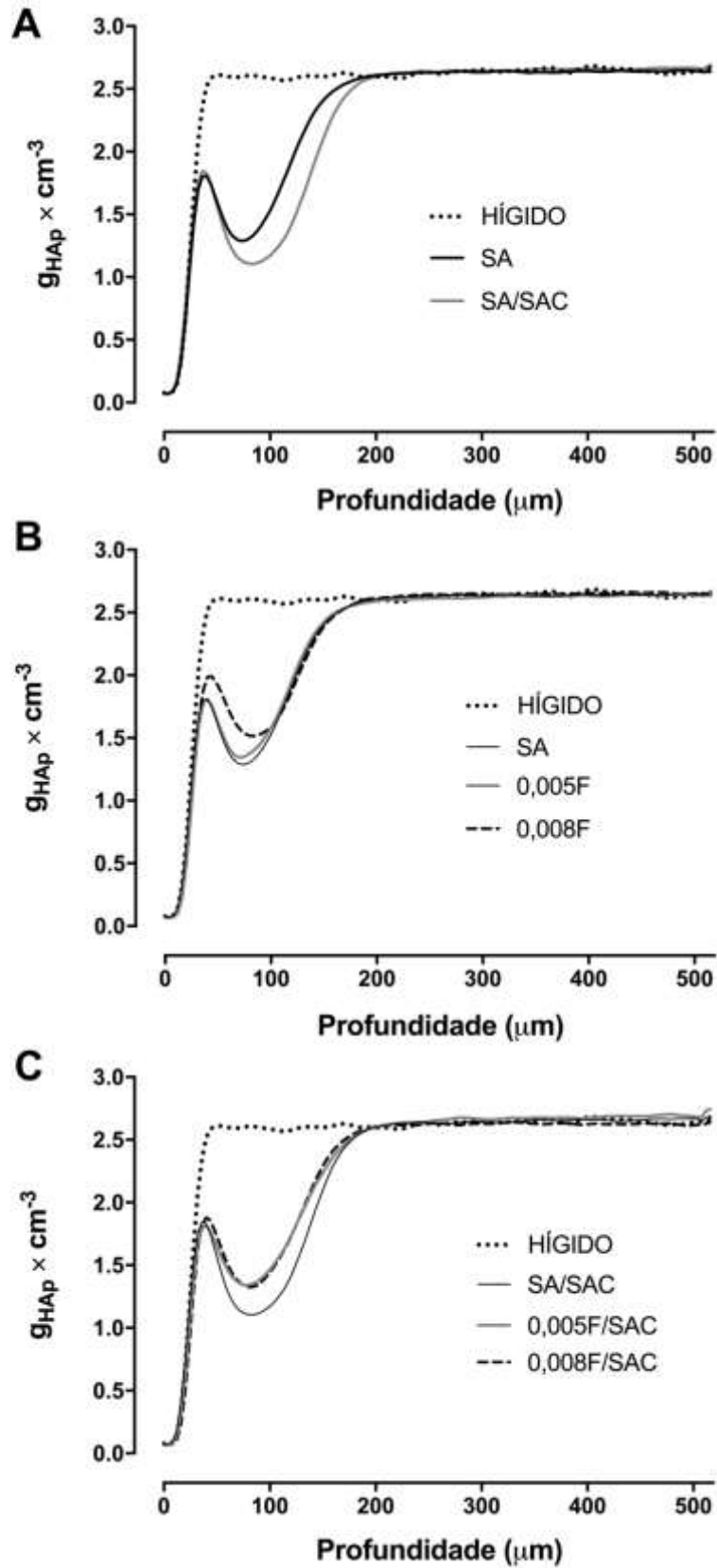


Figura 2. Perfil de concentração mineral (A, B e C) em função da profundidade (μm) de acordo com aos grupos experimentais. SA: saliva artificial; SA/SAC: saliva artificial exposta ao desafio cariogênico; 0,005F: 0,005 ppm F; 0,008F: 0,008 ppm F.

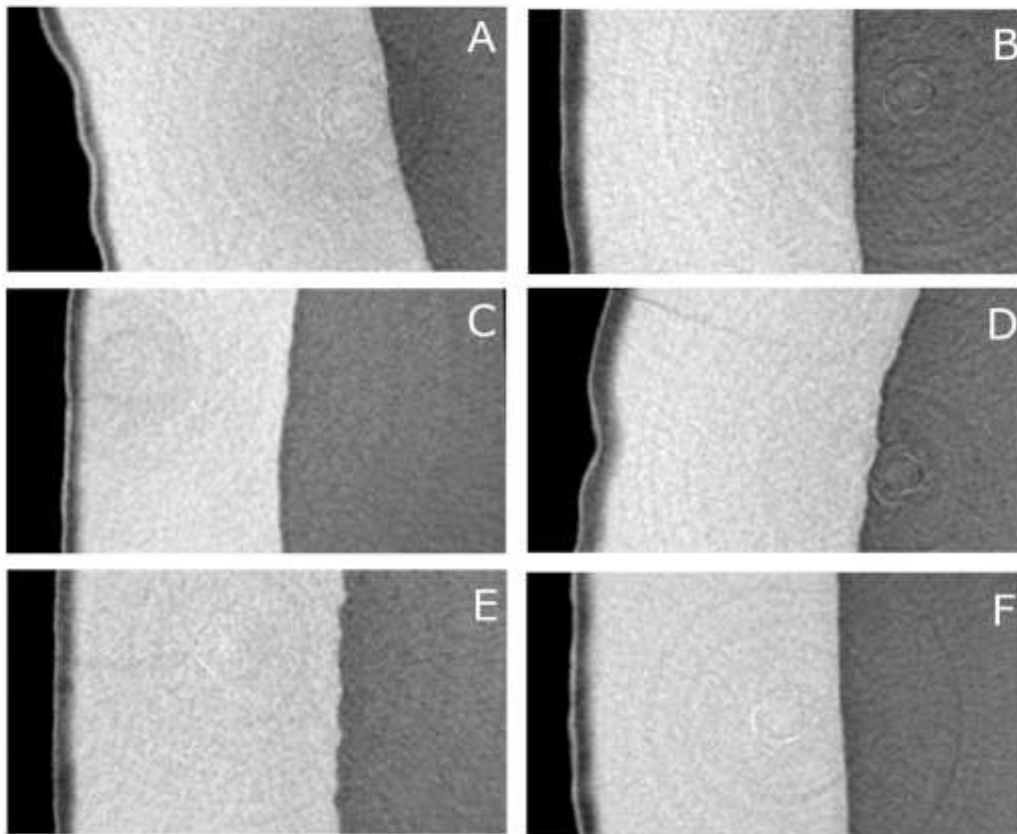


Figura 3. Fotomicrografia do MicroCT representativo das lesões de mancha branca produzidas em esmalte em biofilmes formados com saliva artificial (A), saliva artificial exposta ao desafio cariogênico (B), saliva artificial + 0,005 ppm F (C), saliva artificial + 0,005 ppm F exposta ao desafio cariogênico (D), saliva artificial + 0,008 ppm F (E) e saliva artificial + 0,008 ppm F exposta ao desafio cariogênico.

Tabela 1 . Valores médios (DP) área integrada da lesão, espessura da camada externa e profundidade da lesão na cárie artificial

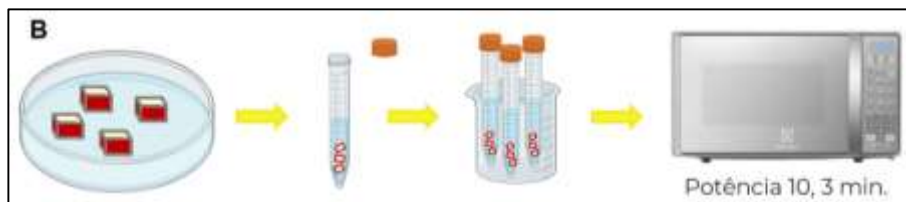
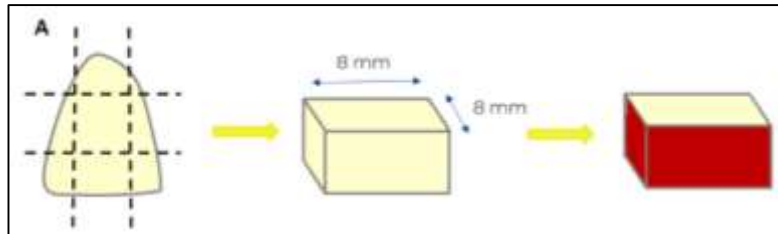
Grupos		Análises		
		Área integrada (g HAp x cm ⁻³ x μm)	Espessura da camada superficial (μm)	Profundidade da lesão (μm)
SALIVA	Sem	-112.9 ^{Aa}	26.4 ^{Aa}	127.6 ^{Aa}
	sacarose	(19.5)	(6.4)	(9.0)
	Sacarose	-153.6 ^{Ba}	22.7 ^{Aa}	155.2 ^{Ba}
		(12.1)	(4.6)	(10.0)
SALIVA 0,005F	Sem	-102.8 ^{Aa}	22.8 ^{Aa}	121.9 ^{Aa}
	sacarose	(16.6)	(4.0)	(5.3)
	Sacarose	-128.5 ^{Bb}	25.1 ^{Aa}	143.5 ^{Bb}
		(22.3)	(4.6)	(13.2)
SALIVA 0,008F	Sem	-99.5 ^{Aa}	37.2 ^{Ab}	126.8 ^{Aa}
	sacarose	(12.7)	(8.4)	(6.8)
	Sacarose	-115.8 ^{Ab}	30.9 ^{Bb}	138.9 ^{Bb}
		(12.5)	(5.2)	(6.9)

Letras maiúsculas distintas indicam diferença estatística entre as condições experimentais (sem sacarose e sacarose). Letras minúsculas distintas indicam diferença estatística entre os grupos (ANOVA a 2 critérios, teste de Student-Newman-Keuls; $p < 0,05$; $n = 10$). Valores entre parênteses representam desvios-padrões das médias.

Anexos

ANEXO A

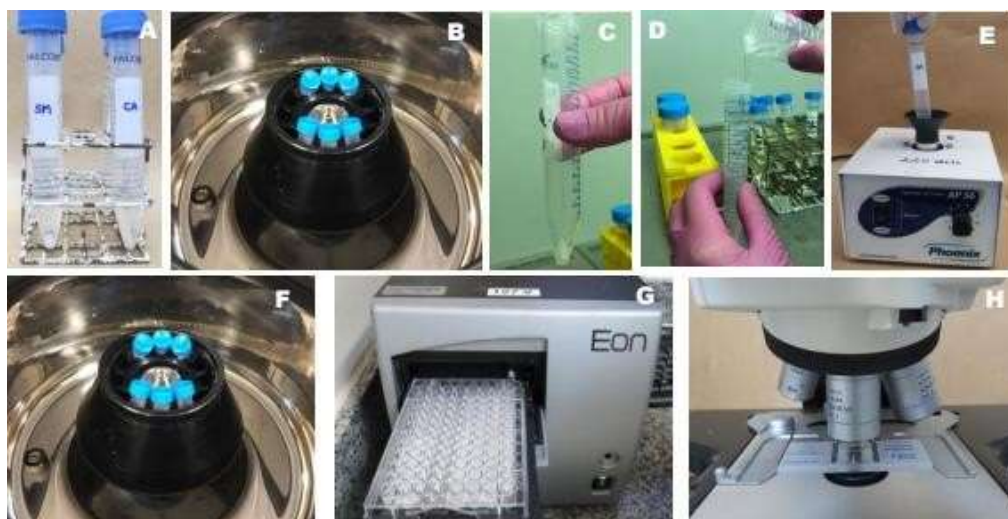
PREPARO DOS ESPÉCIMES DE ESMALTE BOVINO



(A) Ilustração do bloco de esmalte bovino medindo $8 \times 8 \times 2$ mm, obtido após secção longitudinal em cortadeira. Superfícies protegidas com verniz cosmético (Risque® Savoy Indústria de Cosméticos S.A., São Paulo, Brasil). (B) Ilustração esquematizando espécimes acondicionados em tubos Falcon® estéreis (três blocos/tubo) contendo 3 ml de água deionizada estéril; os quais foram levados ao micro-ondas (Eletrolux® MT30S) à potência 10, durante 3 minutos, para que fossem esterelizados.

ANEXO B

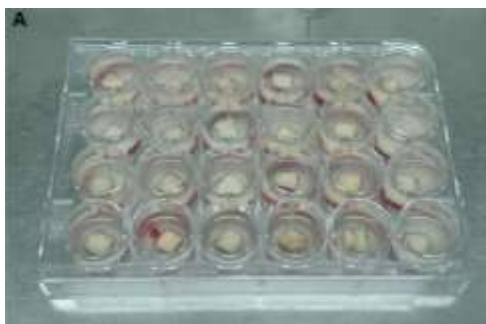
ILUSTRAÇÃO ESQUEMÁTICA DA PREPARAÇÃO DO INÓCULO DA CEPA DE *S. mutans* E *C. albicans*



(A) Preparação do pré-inóculo de *S. mutans* ATCC 25175 e *C. albicans* ATCC 10231; (B) Centrifugação do inóculo a 8000 rpm durante 5 min; (C) Obtenção do pellet de células e descarte do sobrenadante; (D) Lavagem das células de *S. mutans* e *C. albicans* NaCl (0,85%), (E) Homogeneização em vórtex e (F) Centrifugadas novamente (foram realizadas duas lavagens com NaCl); (G) Aliquotas de 200 μ l adicionadas aos poços de placas de 96 poços e levadas para leitura em espectrofotômetro a 640 nm afim de ajustar o número de células de *S. mutans* para 10^8 células/mL em saliva artificial (SA); (H) O número de células de *C. albicans* ajustado para 10^7 células/mL em SA usando uma câmara de Neubauer.

ANEXO C

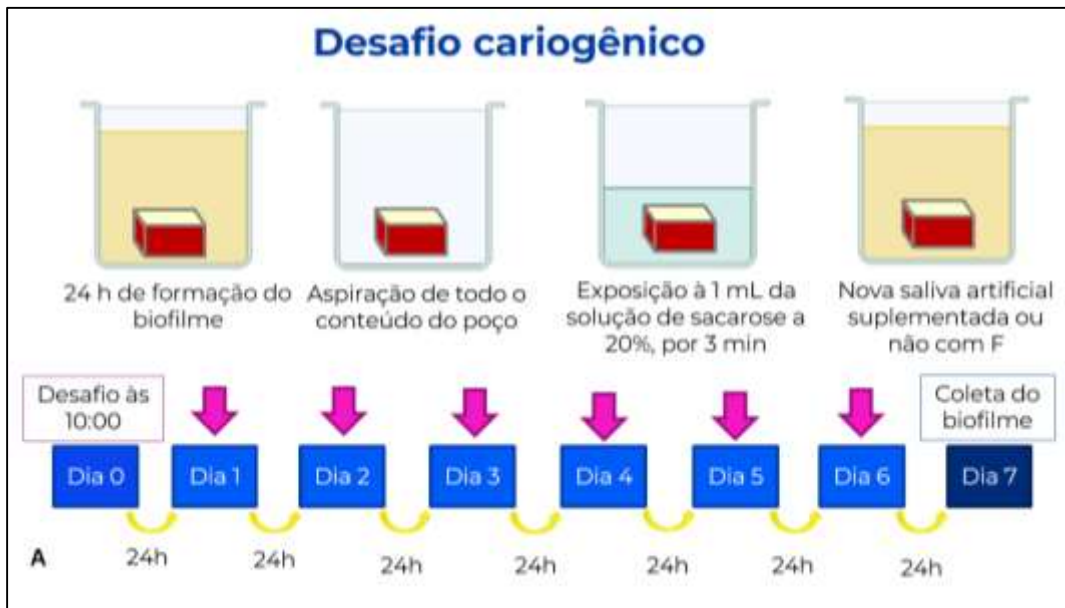
FORMAÇÃO DO BIOFILME



(A) Os biofilmes foram formados em blocos de esmalte bovino estéreis posicionados no fundo dos poços de placas de microtitulação de 24 poços. Para isso, 2 mL de suspensão (1×10^7 células/mL *C. albicans* + 1×10^8 células/mL *S. mutans*) foram adicionados aos poços sobre os blocos e incubadas a 5% CO₂ a 37°C por 24 h.

ANEXO D

PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE DESAFIO CARIOGÊNICO



(A) Fluxograma demonstrando como foram realizados os desafios cariogênicos.



(B) Fluxograma demonstrando como foram realizados os desafios cariogênicos.

ANEXO E

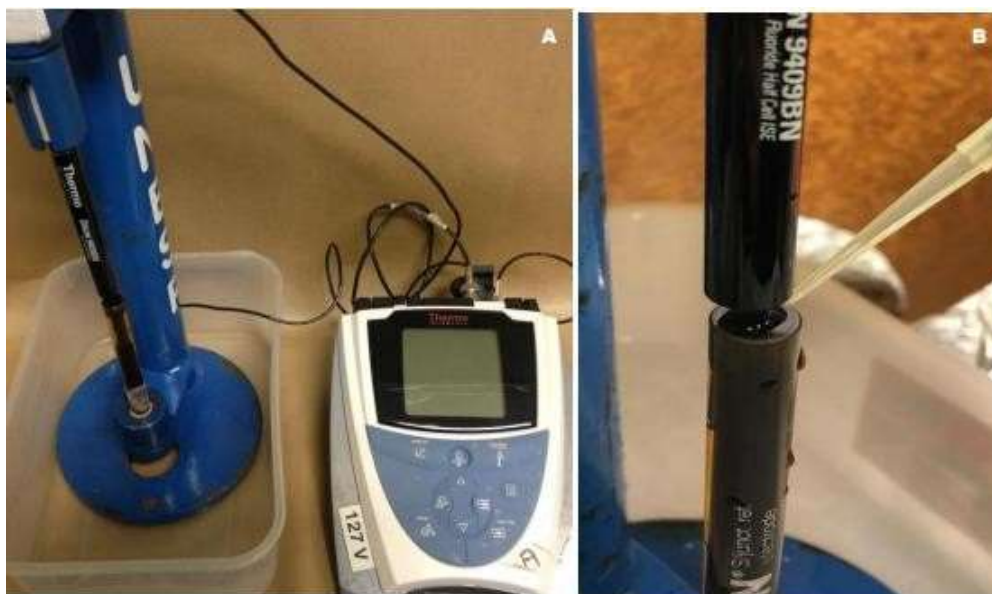
QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNA E CARBOIDRATODA MATRIZ EXTRACELULAR DOS BIOFILMES



(A) Secagem das amostras de biofilmes após tratamento com TMP e/ou F em membrana de acetato de celulose (previamente pesada), para determinação do peso seco dos biofilmes; Amostra sonicada a 30 w por 30 s e (C) homogeneizada em vórtex; (D) centrifugação das amostras durante 10 min a 3000 g; (E) filtração do sobrenadante obtido anteriormente; Kit BCA utilizado para quantificação do conteúdo proteico da matriz extracelular; (G) Pipetagem de 200 μ l da mistura dos reagentes do kit em poços de placa de 96 poços; (H) Pipetagem de 25 μ l do sobrenadante da amostra de biofilme para quantificação de proteínas; Para determinação do conteúdo de carboidrato da matriz extracelular, 500 μ l do sobrenadante das amostras foram adicionados à mistura de 500 μ l de fenol a 9% e 2,5 mL de ácido sulfúrico em tubos de ensaio de vidro; (J) Diferentes tonalidades de cores nos tubos demonstrando diferentes teores de carboidrato; (K) As quantidades de proteína e carboidrato da matriz dos biofilmes foram determinadas colorimetricamente por leitura em espectrofotômetro a 562 e 490 nm, respectivamente.

ANEXO F

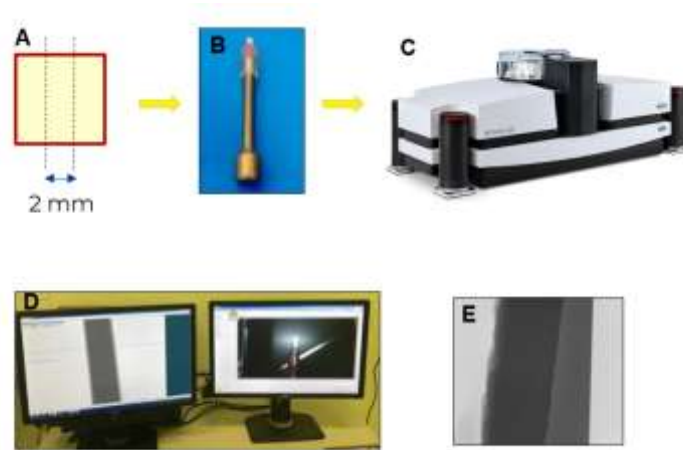
DOSAGEM DE F NO FLUIDO E NO BIOFILME



(A) Eletrodo específico (Orion 9409 BN) e eletrodo de referência (Orion 900100), ambos acoplados a um potenciômetro (Orion - Thermo Scientific); (B) Proporção tampão (TISAB II) e amostra de 1:1 (40 μ L de TISABII + 40 μ L de AMOSTRA).

ANEXO G

ANÁLISE DE MICROTOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA DO ESMALTE



(A) Seccionamento dos blocos de esmalte em espécimes de $2 \times 8 \times 1$ mm para análise em micro CT. (B) Fixação do espécime com cera para inserção na máquina. (C) SkyScan1272 high-resolution MicroCT, Bruker-MicroCT, Kontich, Belgium. (D) Software de scaneamento. (E) Projeção gerada da amostra.

ANEXO H

Clinical Oral Investigations

- Submission guidelines
- Instructions for Authors
- Types of papers
- Papers may be submitted for the following sections:
- Research Article
- Reviews
- Brief Report – with up to 2000 words and up to two figures and/or tables
- Correspondence (Discussion paper)
- Debate (Letter to the Editor)
- Perspective (by Editor invitation only)

Perspective articles are focused articles on topics of interest to a broad audience, but are written from a personal viewpoint. They are intended to provide a forum to be more speculative than Reviews, but should remain balanced and are intended to cover timely and relevant topics. These articles are peer reviewed.

Limited to 1,500-3,000 words (excluding abstract, references and figure legends); Unstructured abstract 200 words; 4 tables/figures; 60 references

It is the general policy of this journal not to accept case reports and pilot studies.

Manuscript Submission

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

Online Submission

Please follow the hyperlink “Submit manuscript” and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

Source Files

Please ensure you provide all relevant editable source files at every submission and revision. Failing to submit a complete set of editable source files will result in your article not being considered for review. For your manuscript text please always submit in common word processing formats such as .docx or LaTeX.

The Springer Author Academy is a set of comprehensive online training pages mainly geared towards first-time authors. At this point, more than 50 pages offer advice to authors on how to write and publish a journal article.

Title Page

The title page should include:

The name(s) of the author(s)

A concise and informative title

The affiliation(s) and address(es) of the author(s)

The e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author

Abstract

Please provide a structured abstract of 150 to 250 words which should be divided into the following sections:

Objectives (stating the main purposes and research question)

Materials and Methods

Results

Conclusions

Clinical Relevance

These headings must appear in the abstract.

Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

Text

Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.

Use italics for emphasis.

Use the automatic page numbering function to number the pages.

Do not use field functions.

Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.

Use the table function, not spreadsheets, to make tables.

Use the equation editor or MathType for equations.

Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX. We recommend using [Springer Nature's LaTeX template](#).

Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section on the title page. The names of funding organizations should be written in full.

References

Citation

Reference citations in the text should be identified by numbers in square brackets. Some examples:

1. Negotiation research spans many disciplines [3].
2. This result was later contradicted by Becker and Seligman [5].
3. This effect has been widely studied [1-3, 7].

Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text.

The entries in the list should be numbered consecutively.

If available, please always include DOIs as full DOI links in your reference list (e.g. "https://doi.org/abc").

Journal article

Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. <https://doi.org/10.1007/s00421-008-0955-8>

Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of "et al" in long author lists will also be accepted:

Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 329:325–329

Article by DOI

Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med*. <https://doi.org/10.1007/s001090000086>

Book

South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics*. Blackwell, London

Book chapter

Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) The rise of modern genomics, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257

Online document

Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007

Dissertation

Trent JW (1975) Experimental acute renal failure. Dissertation, University of California

Always use the standard abbreviation of a journal's name according to the ISSN List of Title Word

Abbreviations, see

[ISSN.org LTWA](http://ISSN.org/LTWA)

If you are unsure, please use the full journal title.

Authors preparing their manuscript in LaTeX can use the bibliography style file sn-basic.bst which is included in the [Springer Nature Article Template](#).

Tables

All tables are to be numbered using Arabic numerals.

Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.

For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.

Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.

Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

Artwork and Illustrations Guidelines

Electronic Figure Submission

Supply all figures electronically.

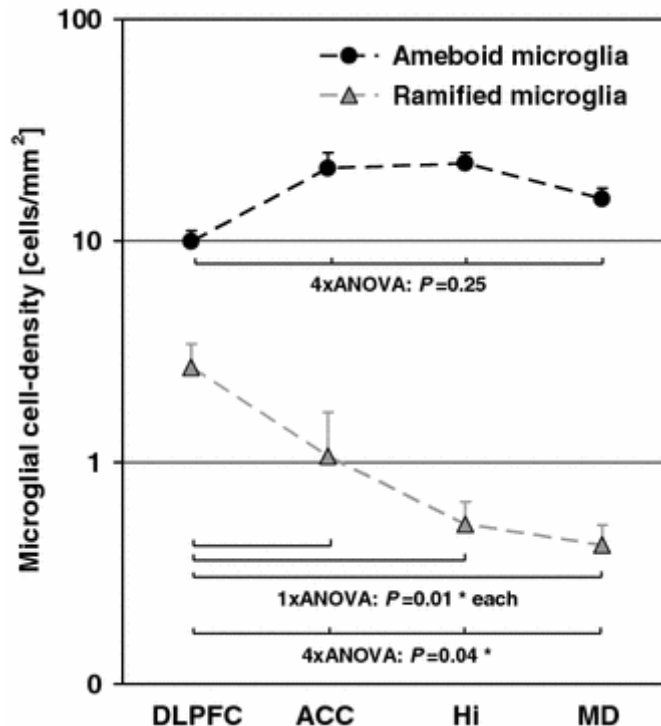
Indicate what graphics program was used to create the artwork.

For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MSOffice files are also acceptable.

Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

Line Art



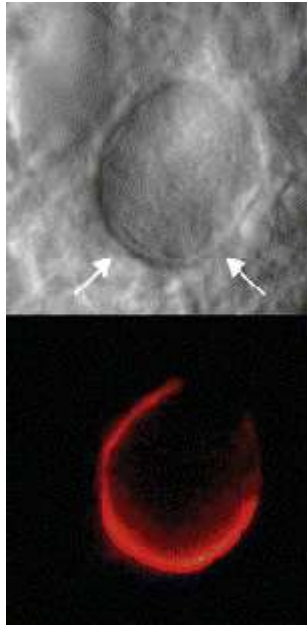
Definition: Black and white graphic with no shading.

Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.

All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.

Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.

Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.
Halftone Art

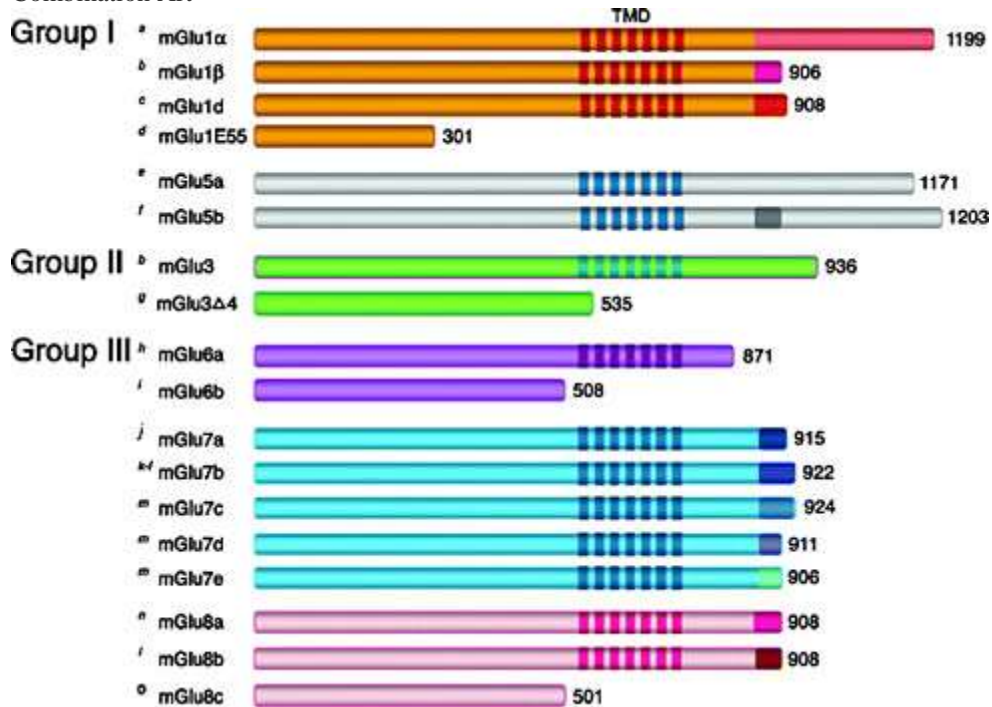


Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc.

If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves.

Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.

Combination Art



Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing line drawing, extensive lettering, color diagrams, etc.

Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.

Color Art

Color art is free of charge for online publication.

If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another when converted to black and white. A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors are still apparent.

If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions.

Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

Figure Lettering

To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).

Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).

Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.

Avoid effects such as shading, outline letters, etc.

Do not include titles or captions within your illustrations.

Figure Numbering

All figures are to be numbered using Arabic numerals.

Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.

Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).

If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures, "A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices [Supplementary Information (SI)] should, however, be numbered separately.

Figure Captions

Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.

Figure captions begin with the term Fig. in bold type, followed by the figure number, also in bold type.

No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.

Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.

Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

Figure Placement and Size

Figures should be submitted within the body of the text. Only if the file size of the manuscript causes problems in uploading it, the large figures should be submitted separately from the text.

When preparing your figures, size figures to fit in the column width.

For large-sized journals the figures should be 84 mm (for double-column text areas), or 174 mm (for single-column text areas) wide and not higher than 234 mm.

For small-sized journals, the figures should be 119 mm wide and not higher than 195 mm.

Permissions

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that

All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech software or a text-to-Braille hardware)

Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information (colorblind users would then be able to distinguish the visual elements)

Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1

Supplementary Information (SI)

Springer accepts electronic multimedia files (animations, movies, audio, etc.) and other supplementary files to be published online along with an article or a book chapter. This feature can add dimension to the author's article, as certain information cannot be printed or is more convenient in electronic form.

Before submitting research datasets as Supplementary Information, authors should read the journal's Research data policy. We encourage research data to be archived in data repositories wherever possible.

Submission

Supply all supplementary material in standard file formats.

Please include in each file the following information: article title, journal name, author names; affiliation and e-mail address of the corresponding author.

To accommodate user downloads, please keep in mind that larger-sized files may require very long

download times and that some users may experience other problems during downloading.

High resolution (streamable quality) videos can be submitted up to a maximum of 25GB; low resolution videos should not be larger than 5GB.

Audio, Video, and Animations

Aspect ratio: 16:9 or 4:3

Maximum file size: 25 GB for high resolution files; 5 GB for low resolution files

Minimum video duration: 1 sec

Supported file formats: avi, wmv, mp4, mov, m2p, mp2, mpg, mpeg, flv, mxf, mts, m4v, 3gp

Text and Presentations

Submit your material in PDF format; .doc or .ppt files are not suitable for long-term viability.

A collection of figures may also be combined in a PDF file.

Spreadsheets

Spreadsheets should be submitted as .csv or .xlsx files (MS Excel).

Specialized Formats

Specialized format such as .pdb (chemical), .wrl (VRML), .nb (Mathematica notebook), and .tex can also be supplied.

Collecting Multiple Files

It is possible to collect multiple files in a .zip or .gz file.

Numbering

If supplying any supplementary material, the text must make specific mention of the material as a citation, similar to that of figures and tables.

Refer to the supplementary files as “Online Resource”, e.g., “... as shown in the animation (Online Resource 3)”, “... additional data are given in Online Resource 4”.

Name the files consecutively, e.g. “ESM_3.mpg”, “ESM_4.pdf”.

Captions

For each supplementary material, please supply a concise caption describing the content of the file.

Processing of supplementary files

Supplementary Information (SI) will be published as received from the author without any conversion, editing, or reformatting.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your supplementary files, please make sure that

The manuscript contains a descriptive caption for each supplementary material

Video files do not contain anything that flashes more than three times per second (so that users prone to seizures caused by such effects are not put at risk)

Authorship principles

These guidelines describe authorship principles and good authorship practices to which prospective authors should adhere to.

Authorship clarified

The Journal and Publisher assume all authors agreed with the content and that all gave explicit consent to submit and that they obtained consent from the responsible authorities at the institute/organization where the work has been carried out, **before** the work is submitted.

The Publisher does not prescribe the kinds of contributions that warrant authorship. It is recommended that authors adhere to the guidelines for authorship that are applicable in their specific research field. In absence of specific guidelines it is recommended to adhere to the following guidelines*:

All authors whose names appear on the submission

1) made substantial contributions to the conception or design of the work; or the acquisition, analysis, or interpretation of data; or the creation of new software used in the work;

2) drafted the work or revised it critically for important intellectual content;

3) approved the version to be published; and

4) agree to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

* Based on/adapted from:

[ICMJE, Defining the Role of Authors and Contributors.](#)

[Transparency in authors' contributions and responsibilities to promote integrity in scientific publication, McNutt at all, PNAS February 27, 2018](#)

Disclosures and declarations

All authors are requested to include information regarding sources of funding, financial or non-financial interests, study-specific approval by the appropriate ethics committee for research involving

humans and/or animals, informed consent if the research involved human participants, and a statement on welfare of animals if the research involved animals (as appropriate).

The decision whether such information should be included is not only dependent on the scope of the journal, but also the scope of the article. Work submitted for publication may have implications for public health or general welfare and in those cases it is the responsibility of all authors to include the appropriate disclosures and declarations.

Data transparency

All authors are requested to make sure that all data and materials as well as software application or custom code support their published claims and comply with field standards. Please note that journals may have individual policies on (sharing) research data in concordance with disciplinary norms and expectations.

Role of the Corresponding Author

One author is assigned as Corresponding Author and acts on behalf of all co-authors and ensures that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately addressed.

The Corresponding Author is responsible for the following requirements:

ensuring that all listed authors have approved the manuscript before submission, including the names and order of authors;

managing all communication between the Journal and all co-authors, before and after publication;*

providing transparency on re-use of material and mention any unpublished material (for example manuscripts in press) included in the manuscript in a cover letter to the Editor;

making sure disclosures, declarations and transparency on data statements from all authors are included in the manuscript as appropriate (see above).

* The requirement of managing all communication between the journal and all co-authors during submission and proofing may be delegated to a Contact or Submitting Author. In this case please make sure the Corresponding Author is clearly indicated in the manuscript.

Author contributions

In absence of specific instructions and in research fields where it is possible to describe discrete efforts, the Publisher recommends authors to include contribution statements in the work that specifies the contribution of every author in order to promote transparency. These contributions should be listed at the separate title page.

Affiliation

The primary affiliation for each author should be the institution where the majority of their work was done. If an author has subsequently moved, the current address may additionally be stated. Addresses will not be updated or changed after publication of the article.

Author identification

Authors are recommended to use their [ORCID](#) ID when submitting an article for consideration or acquire an [ORCID](#) ID via the submission process.

Deceased or incapacitated authors

For cases in which a co-author dies or is incapacitated during the writing, submission, or peer-review process, and the co-authors feel it is appropriate to include the author, co-authors should obtain approval from a (legal) representative which could be a direct relative.

Authorship issues or disputes

In the case of an authorship dispute during peer review or after acceptance and publication, the Journal will not be in a position to investigate or adjudicate. Authors will be asked to resolve the dispute themselves. If they are unable the Journal reserves the right to withdraw a manuscript from the editorial process or in case of a published paper raise the issue with the authors' institution(s) and abide by its guidelines.

Confidentiality

Authors should treat all communication with the Journal as confidential which includes correspondence with direct representatives from the Journal such as Editors-in-Chief and/or Handling Editors and reviewers' reports unless explicit consent has been received to share information.

Compliance with Ethical Standards

To ensure objectivity and transparency in research and to ensure that accepted principles of ethical and professional conduct have been followed, authors should include information regarding sources of funding, potential conflicts of interest (financial or non-financial), informed consent if the research involved human participants, and a statement on welfare of animals if the research involved animals.

Authors should include the following statements (if applicable) in a separate section entitled "Compliance with Ethical Standards" when submitting a paper:

Disclosure of potential conflicts of interest

Research involving Human Participants and/or Animals

Informed consent

Please note that standards could vary slightly per journal dependent on their peer review policies (i.e. single or double blind peer review) as well as per journal subject discipline. Before submitting your article check the instructions following this section carefully.

The corresponding author should be prepared to collect documentation of compliance with ethical standards and send if requested during peer review or after publication.

The Editors reserve the right to reject manuscripts that do not comply with the above-mentioned guidelines. The author will be held responsible for false statements or failure to fulfill the above-mentioned guidelines.

Disclosure of potential conflicts of interest

Authors must disclose all relationships or interests that could have direct or potential influence or impart bias on the work. Although an author may not feel there is any conflict, disclosure of relationships and interests provides a more complete and transparent process, leading to an accurate and objective assessment of the work. Awareness of a real or perceived conflicts of interest is a perspective to which the readers are entitled. This is not meant to imply that a financial relationship with an organization that sponsored the research or compensation received for consultancy work is inappropriate. Examples of potential conflicts of interests **that are directly or indirectly related to the research** may include but are not limited to the following:

- Research grants from funding agencies (please give the research funder and the grant number)

- Honoraria for speaking at symposia

- Financial support for attending symposia

- Financial support for educational programs

- Employment or consultation

- Support from a project sponsor

- Position on advisory board or board of directors or other type of management relationships

- Multiple affiliations

- Financial relationships, for example equity ownership or investment interest

- Intellectual property rights (e.g. patents, copyrights and royalties from such rights)

- Holdings of spouse and/or children that may have financial interest in the work

In addition, interests that go beyond financial interests and compensation (non-financial interests) that may be important to readers should be disclosed. These may include but are not limited to personal relationships or competing interests directly or indirectly tied to this research, or professional interests or personal beliefs that may influence your research.

The corresponding author collects the conflict of interest disclosure forms from all authors. In author collaborations where formal agreements for representation allow it, it is sufficient for the corresponding author to sign the disclosure form on behalf of all authors. Examples of forms can be found [here](#):

The corresponding author will include a summary statement in the text of the manuscript in a separate section before the reference list, that reflects what is recorded in the potential conflict of interest disclosure form(s).

Please make sure to submit all Conflict of Interest disclosure forms together with the manuscript. in this section.

Research Data Policy

This journal operates a [type 1 research data policy](#). The journal encourages authors, where possible and applicable, to deposit data that support the findings of their research in a public repository. Authors and editors who do not have a preferred repository should consult Springer Nature's list of repositories and research data policy.

[List of Repositories](#)

[Research Data Policy](#)

General repositories - for all types of research data - such as figshare and Dryad may also be used.

Datasets that are assigned digital object identifiers (DOIs) by a data repository may be cited in the reference list. Data citations should include the minimum information recommended by DataCite: authors, title, publisher (repository name), identifier.

[DataCite](#)

If the journal that you're submitting to uses double-blind peer review and you are providing reviewers with access to your data (for example via a repository link, supplementary information or data on request), it is strongly suggested that the authorship in the data is also blinded. There are [data repositories that can assist with this](#) and/or will create a link to mask the authorship of your data.

Authors who need help understanding our data sharing policies, help finding a suitable data

repository, or help organising and sharing research data can access our [Author Support portal](#) for additional guidance.

After Acceptance

Upon acceptance, your article will be exported to Production to undergo typesetting. Once typesetting is complete, you will receive a link asking you to confirm your affiliation, choose the publishing model for your article as well as arrange rights and payment of any associated publication cost.

Once you have completed this, your article will be processed and you will receive the proofs.

Article publishing agreement

Depending on the ownership of the journal and its policies, you will either grant the Publisher an exclusive licence to publish the article or will be asked to transfer copyright of the article to the Publisher.

Offprints

Offprints can be ordered by the corresponding author.

Color illustrations

Publication of color illustrations is free of charge.

Proof reading

The purpose of the proof is to check for typesetting or conversion errors and the completeness and accuracy of the text, tables and figures. Substantial changes in content, e.g., new results, corrected values, title and authorship, are not allowed without the approval of the Editor.

After online publication, further changes can only be made in the form of an Erratum, which will be hyperlinked to the article.

Online First

The article will be published online after receipt of the corrected proofs. This is the official first publication citable with the DOI. After release of the printed version, the paper can also be cited by issue and page numbers.

Open Choice

Open Choice allows you to publish open access in more than 1850 Springer Nature journals, making your research more visible and accessible immediately on publication.

Article processing charges (APCs) vary by journal – [view the full list](#)

Benefits:

Increased researcher engagement: Open Choice enables access by anyone with an internet connection, immediately on publication.

Higher visibility and impact: In Springer hybrid journals, OA articles are accessed 4 times more often on average, and cited 1.7 more times on average*.

Easy compliance with funder and institutional mandates: Many funders require open access publishing, and some take compliance into account when assessing future grant applications.

It is easy to find funding to support open access – please see our funding and support pages for more information.

*) Within the first three years of publication. Springer Nature hybrid journal OA impact analysis, 2018.

Copyright and license term – CC BY

Open Choice articles do not require transfer of copyright as the copyright remains with the author. In opting for open access, the author(s) agree to publish the article under the Creative Commons Attribution License.

Open access publishing

To find out more about publishing your work Open Access in *Clinical Oral Investigations*, including information on fees, funding and licenses, visit our [Open access publishing page](#).