

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 21/03/2020.



**UNESP - Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Odontologia de Araraquara**



ROSA VIRGINIA DUTRA DE OLIVEIRA

INTERAÇÃO ENTRE BACTÉRIAS CARIOGÊNICAS

Araraquara

2016



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



ROSA VIRGINIA DUTRA DE OLIVEIRA

INTERAÇÃO ENTRE BACTÉRIAS CARIOGÊNICAS

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas, Área de Odontopediatria, da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista para título de Doutor em Ciências Odontológicas, Área de Concentração Odontopediatria.

Orientador: Fernanda Lourenção Brighenti
Co-orientadora: Denise Madalena Palomari Spolidorio

Araraquara

2016

Oliveira, Rosa Virginia Dutra de

Interação entre bactérias cariogênicas / Rosa Virgínia Dutra de
Oliveira .-- Araraquara: [s.n.], 2016.
55 f. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Odontologia

Orientadora: Profa. Dra Fernanda Lourenção Brighenti

Co-orientadora: Profa. Dra. Denise Madalena Palomari Spolidório

1. Streptococcus mutans 2. Lactobacillus acidophilus
3. Actinomyces 4. Clorexidina 5. Cárie dentária 6. Biofilmes
I. Título

ROSA VIRGINIA DUTRA DE OLIVEIRA

INTERAÇÃO ENTRE BACTÉRIAS CARIOGÊNICAS

Tese para obtenção do grau de Doutor

Comissão julgadora

Presidente e Orientadora: Prof^a. Dr^a. Fernanda Lourenção Brighenti

2º Examinador: Prof^a. Dr^a. Aline Voltan

3º Examinador: Prof^a. Dr^a. Fabíola Galbiati

4º Examinador: Prof^a. Dr^a. Elisa Maria Aparecida Giro

5º Examinador: Prof^a. Dr^a. Marlise Inêz Klein Furlan

Araraquara, 21 de março de 2016

DADOS CURRICULARES

ROSA VIRGINIA DUTRA DE OLIVEIRA

NASCIMENTO	29 de setembro de 1981 – João Pessoa/PB
FILIAÇÃO	Jair Santiago de Oliveira Alzir Rosa Dutra de Oliveira
2000 - 2004	Graduação em Odontologia Universidade Federal da Paraíba – UFPB
2004 - 2005	Aperfeiçoamento em Endodontia Núcleo de Estudos e Aperfeiçoamento Odontológicos - NEAO
2005 - 2006	Aperfeiçoamento em Periodontia Núcleo de Estudos e Aperfeiçoamentos Odontológicos- NEAO
2005 - 2007	Especialização em Endodontia Clínica Integrada de Odontologia – CIODONTO
2007 - 2008	Especialização em Programa de Saúde da Família Faculdade de Ciências Médicas – FCM

2008 - 2009	Especialização em Saúde Pública Faculdade de Ciências Médicas – FCM
2010 - 2011	Mestrado em Odontologia Preventiva Infantil Universidade Federal da Paraíba – UFPB
2012 - 2016	Doutorado em Odontopediatria Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP
2014 - 2015	Estágio Sanduíche Center for Biofilm Engineering – Montana State University

Dedico este trabalho,

*Aos meus pais Jair e Alzir Rosa,
que merecem reconhecimento especial em gratidão
pelo apoio e encorajamento caloroso e inabalável.*

*Por todos os esforços que dispensaram em prol da minha educação.
Agradeço às oportunidades dadas para que eu pudesse percorrer este
longo caminho, abrindo mão de seus sonhos para realizarem os meus.
Por isso, sonhei com esse momento e hoje vocês compartilham isso comigo,
não como mero espectadores, mas também como “doutores” que são!*

*À minha irmã, Dayse,
pelo incentivo incondicional e por
estar presente mesmo distante.*

*Vocês são inspirações para
tudo que há de nobre em
minha vida. Amo vocês!*

À Deus

Obrigada Senhor por ter me iluminado e mostrado que esse era o caminho e por ter colocado nele pessoas tão queridas e situações tão engrandecedoras.

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Fernanda Lourenção Brighenti,

Obrigada por ter apostado em mim e acreditado no meu potencial desde o princípio. Você me incentivou de maneira tal que me fez alçar voos maiores do que eu jamais imaginei. Com você aprendi não só microbiologia e odontopediatria, mas também como ser pesquisadora e um ser humano melhor. Você, para mim, é exemplo de profissionalismo e fonte de inspiração. Obrigada por sua amizade, dedicação e incentivo.

Ao Prof. Dr. James Garth,

Obrigada pela disponibilidade e oportunidade de trabalhar sob sua supervisão durante meu estágio no Center for Biofilm Engineering. Seus apontamentos contribuíram para ampliar meu conhecimento e me permitiram enxergar a microbiologia sob outra perspectiva.

À Prof^a. Dr^a. Cristiane Yumi Koga-Ito

Sua colaboração foi imprescindível para o desenvolvimento deste e de outros trabalhos. Obrigada por partilhar seu conhecimento comigo!

À **Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho**, em nome do magnífico Reitor Prof. Dr. Júlio Cezar Durigan e Vice- Reitora Prof^a. Dr^a. Marilza Vieira Cunha Rudge.

À **Faculdade de Odontologia de Araraquara**, representada pela digníssima Diretora Prof^a. Dr^a. Andréia Affonso Barretto Montandon e pela Vice- Diretora Prof^a. Dr^a. Elaine Maria Sgaviolli Massucato.

À **Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas** da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, representada pela Prof. Dr. Osmir Batista de Oliveira Júnior e Prof^a. Dr^a. Lídia Parsekian Martins

À Prof^a. Dr^a. **Denise Madalena Palomari Spolidorio**, pela co-orientação deste trabalho.

Às professoras da banca examinadora

Prof^a. Dr^a. Fabíola Galbiatti Carvalho, Prof^a. Dr^a. Aline Voltan, Prof^a. Dr^a. Elisa Maria Aparecida Giro e Prof^a. Dr^a. Marlise Inêz Klein Furlan por terem prontamente aceitado participar da banca de defesa desta tese.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP** pela concessão das bolsas de estudos no Brasil (Processo 2012/17236-4) e no exterior (Processo 2014/02397-8), bem como do auxílio regular (Processo 2013/12326-8) para o desenvolvimento desta pesquisa.

À Prof^a. Dr^a. **Elinor Pulcini** (Medical Biofilm Lab, Center for Biofilm Engineering, Montana State University), pela recepção calorosa, por colaborar na revisão de artigos e toda ajuda prestada durante minha estada no CBE.

À Prof^a. Dr^a. **Kelly Kirker** (Medical Biofilm Lab, Center for Biofilm Engineering, Montana State University), pelo seu cuidadoso trabalho na captura de imagens no microscópio confocal.

À **Laura Boegli** (Medical Biofilm Lab, Center for Biofilm Engineering, Montana State University), pelo acolhimento, treinamento e colaboração com a realização desta pesquisa.

À **Fernanda Salloume Sampaio Bonafé**, por toda a ajuda dispensada na análise estatística.

Aos professores da Disciplina de Odontopediatria

Ângela Cristina Cilense Zuanon, Cyneu Aguiar Pansani, Elisa Maria Aparecida Giro, Fábio César Braga de Abreu e Lima, Fabiano Jeremias, Josimeri Hebling, Lourdes Aparecida Martins dos Santos-Pinto, Rita de Cássia Loiola Cordeiro, pela convivência diária e por contribuírem para o meu crescimento profissional.

A todos os funcionários e colegas do Departamento de Clínica Infantil, pela convivência, disponibilidade e ajuda recebida.

As bolsistas de treinamento técnico, Gabrielle Fioranelli e Gabriela Pereira, por todo apoio no laboratório.

Aos professores e funcionários da Faculdade de Odontologia de Araraquara, pelo acolhimento e convivência.

A todos os professores e funcionários do Center for Biofilm Engineering, por toda a ajuda recebida e pelo convívio diário.

A Leopoldina e Yuri, por me “trazerem à Araraquara”, pela convivência agradável, pelo companheirismo, pelas discussões científicas e inúmeros momentos de diversão.

À Aline Leite de Farias, pela oportunidade de ensinar um pouquinho e aprender tanto. Agradeço sua paciência, amizade e companheirismo. Você é uma dessas pessoas que eu vou levar no meu coração onde quer que eu esteja.

As “Freudinhas”

Ionária, Fernanda, Tatiana, Viviany, Suellen, amigas que me acompanham desde a graduação e mesmo espalhadas pelo Brasil, não deixam de apoiar e torcer umas pelas outras.

A minha família em Bozeman

Luisa, Muneeb, Anali, Fede, Dayane, Collin, Erika, Chiachi, Deicy, Dan, Andrea, João, Abbey, Rachel, Shinya, Crispy, Leo, Brenda, Marcelle, Brenda, Vanessa, Caio, Karol, Luan, Raully, Luisa Braga, Mariah, Jana... *Thanks for support me! You guys were my family in Bozeman and provided unforgettable moments.*

Aos colegas da pós-graduação, pela troca de experiências, pelos momentos de leveza e diversão, pelos papos-cabeça e por compartilharem as angústias diante das dificuldades.

A minha família e amigos, por me dirigirem sempre palavras de conforto e otimismo.

Oliveira RVD. Interação microbiana entre bactérias cariogênicas [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2016.

RESUMO

A proximidade entre micro-organismos presentes no biofilme dentário determina a existência de interações entre eles, que podem beneficiar ou antagonizar as espécies envolvidas. Os objetivos deste estudo foram: 1) apresentar uma revisão de literatura sobre interações entre espécies bacterianas cariogênicas no biofilme oral; 2) validar o uso do reator “drip-flow” (DFR) para desenvolver biofilmes dentários e testar agentes antimicrobianos; 3) avaliar o crescimento e a suscetibilidade à clorexidina de biofilmes compostos por *Streptococcus mutans* ATCC 25175 e *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, usando o DFR; 4) avaliar o crescimento e a suscetibilidade à clorexidina de biofilmes compostos por *Streptococcus mutans* e *Actinomyces naeslundii* ATCC 12104, usando o DFR. Biofilmes cresceram sobre lâminas de vidro cobertas com hidróxiapatita e caldo BHI suplementado com sacarose 0.2% ou 0.5%, dependendo das espécies e um fluxo de 10 mL/h foi usado. O DFR foi incubado por 24 h a 37 °C / 5% CO₂. Biofilmes foram tratados com clorexidina 0.2% (CHX) ou NaCl 0.9% por 2 min. Crescimento e efeito dos tratamentos foram determinados por contagem de unidades formadoras de colônias (UFC). Biofilmes foram marcados com o kit de Viabilidade *Live/Dead* e analisados por microscopia confocal de varredura a laser para diferenciar células com membranas íntegras das lesadas pela ação da CHX. A validação do DFR foi analisada por teste t ($\alpha=0.05$). Avaliação da interação foi analisada por ANOVA dois fatores e teste de Tukey ($\alpha=0.05$). A revisão de literatura mostrou o papel das interações microbianas no balanço competição/ coexistência. Na validação do DFR, resultados mostraram que, apesar da diferença inicial das concentrações de mono-culturas de *S. mutans*, o tratamento com clorexidina afetou ambos os biofilmes na mesma proporção. Não foi observada interação entre solução de tratamento e condição de cultura em biofilmes de *S. mutans* e *L. acidophilus*. Entretanto, a viabilidade foi significativamente reduzida após o tratamento com CHX. Mono-culturas de *L. acidophilus* cresceram significativamente menos que ambas mono- culturas e culturas mistas de *S. mutans*. *S. mutans* e *A. naeslundii* cresceram similarmente em ambas condições de cultura, dentro do grupo NaCl 0.9%. A viabilidade bacteriana foi significativamente reduzida em todos os grupos tratados com clorexidina, exceto para culturas mistas de *S. mutans*. Mono-culturas de *A. naeslundii* foram as mais suscetíveis, enquanto culturas mistas de *S. mutans* forma as menos suscetíveis à CHX. Em conclusão, relações entre os micro-organismos podem influenciar a ocorrência de cárie dentária. O presente estudo mostrou a aplicabilidade do DFR para crescer biofilmes orais e testar o uso de agentes antimicrobianos. Foram encontradas interações significantes entre *S. mutans* e *A. naeslundii*, mas não entre *S. mutans* e *L. acidophilus*.

Palavras-chave: *Streptococcus mutans*. *Lactobacillus acidophilus*. *Actinomyces*. Clorexidina. Cárie dentária. Biofilmes.

Oliveira RVD. Interactions among cariogenic bacteria [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2016.

ABSTRACT

The proximity between microorganisms present in dental biofilm determines the existence of interaction between them, which can benefit or antagonize the involved species. The aims of this study were: 1) to present a review about interactions among cariogenic bacterial species within oral biofilm; 2) to show the applicability of the drip flow reactor (DFR) for developing oral biofilms and testing antimicrobial agents; 3) to evaluate the growth and chlorhexidine susceptibility of biofilms comprised by *Streptococcus mutans* ATCC 25175 and *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, using DFR; 3) to assess the growth and chlorhexidine susceptibility of biofilms comprised by *Streptococcus mutans* ATCC 25175 and *Actinomyces naeslundii* ATCC 12104, using DFR. Biofilms grew on hydroxyapatite coated glass slides, with BHI broth at 10 mL/h flow rate supplemented with 0.2 or 0.5% sucrose depending on the species used. DFR was incubated for 24 h at 37 °C / 5% CO₂. Biofilms were treated with 0.2% chlorhexidine (CHX) or 0.9% NaCl for 2 min. Growth and effect of treatments were determined by colony forming units (CFU) counts. Biofilms were stained using the Live/Dead Viability kit and analyzed by confocal laser scanning microscopy (CLSM) to differentiate bacterial cells without damage and damaged by the action of CHX. DFR validation was analyzed by unpaired t test ($\alpha=0.05$). Interaction evaluation was analyzed by two-way ANOVA and Tukey test ($\alpha=0.05$). Literature review showed the role of microbial interactions in balancing competition/coexistence. For DFR validation, results showed that despite distinct initial concentrations of *S. mutans* mono-cultures, chlorhexidine treatment affected both biofilms at the same proportion. No interaction between treatment solution and culture condition was found in *S. mutans* and *L. acidophilus* biofilms. However, viability was significantly reduced by CHX treatment. *L. acidophilus* in mono-culture grew significantly less than *S. mutans* in either mono or mixed-culture. *S. mutans* and *A. naeslundii* grew similarly in both culture conditions within NaCl group. Bacterial viability was significantly reduced in all groups treated with chlorhexidine, except for *S. mutans* in mixed-cultures. *A. naeslundii* in mono-culture was the most susceptible group, whereas *S. mutans* in mixed-cultures was the least susceptible. In conclusion, relationships among microorganisms may influence the occurrence of dental caries. The present study showed the applicability of the DFR for growing oral biofilms and testing antimicrobial agents. Significant interactions were found between *S. mutans* and *A. naeslundii* but not between *S. mutans* and *L. acidophilus*.

Keywords: *Streptococcus mutans*. *Lactobacillus acidophilus*. Actinomyces. Chlorhexidine. Dental caries. Biofilms.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 PUBLICAÇÃO 1	15
3 PUBLICAÇÃO 2	26
4 PUBLICAÇÃO 3	40
5 CONCLUSÃO	51
REFERÊNCIAS	52
ANEXO	55

1 INTRODUÇÃO

Biofilmes são definidos como uma comunidade de micro-organismos metabolicamente integrada, espacialmente organizada, delimitada por uma matriz extracelular produzida pelos próprios co-habitantes (Davey⁸, 2000). O processo de formação do biofilme dentário inicia-se com os colonizadores primários aderindo a película adquirida (Kolenbrander e London.¹⁵, 1993). Eles agem como uma superfície de reconhecimento para adesão dos colonizadores secundários (Nobbs et al.²⁵, 2011). Diante de condições favoráveis, esses micro-organismos começam a se multiplicar, desenvolvendo uma comunidade composta por múltiplas espécies (Rickard et al.³⁰, 2003). A proximidade entre eles facilita a ocorrência de interações que podem tanto beneficiar quanto antagonizar os envolvidos (Marsh, Devine²¹, 2011), assim como influenciar na composição da comunidade (Kolenbrander et al.¹⁶, 2006).

Actinomyces naeslundii é um colonizador primário do biofilme que coadere/coagrega com outras espécies, especialmente estreptococos do grupo mutans (Al-Ahmad et al.³, 2007; Kneist et al.¹⁴, 2012). Foi sugerido que este micro-organismo estaria associado com a baixa prevalência de cárie (Stenudd et al.³², 2001; Levine et al.¹⁸, 2005), devido à sua capacidade de reduzir o potencial acidogênico do biofilme através da degradação do lactato produzido por outros micro-organismos a ácidos fracos (Takahashi, Nyvad²⁸, 2008; Takahashi, Yamada²⁶, 1999). Entretanto, à medida que o biofilme se torna maduro e o meio, anaeróbio, *A. naeslundii* passa a metabolizar exclusivamente carboidratos em ácidos, cujo acúmulo ocasiona redução no pH do ambiente (Takahashi, Yamada²⁷, 1999). Essa queda no pH do biofilme poderia promover a proliferação de bactérias acidogênicas e ácido-tolerantes, como *Streptococcus mutans* (Takahashi, Nyvad²⁹, 2011). Isso explicaria a associação de espécies do gênero *Actinomyces* com o desenvolvimento de manchas brancas (Aas et al.¹, 2008) e cáries radiculares (Brailsford et al.⁶, 2001).

O papel de *Streptococcus mutans* no desenvolvimento de cárie dentária, por sua vez, já está bem estabelecido (Loesche¹⁹, 1986). *S. mutans* é capaz de metabolizar diferentes tipos de carboidratos em ácidos, desmineralizando o esmalte dentário (Moye et al.²⁴, 2014). Ele também produz três diferentes glicosiltransferases (Bowen, Koo⁵, 2011; Koo et al.¹⁷, 2013), relacionadas com a síntese de polissacarídeos extracelulares (Forssten et al.⁹, 2010).

Lactobacillus spp. são espécies fortemente acidogênicas e capazes de sobreviver e proliferar em pH baixo (Badet et al.⁴, 2008; Takahashi, Nyvad²⁹, 2011). Espécies desse gênero estão associadas com a progressão de lesões cariosas (Simark-Mattsson et al.³³, 2007). *L. acidophilus* pode ser encontrado tanto em cáries superficiais quanto profundas (Mei et al.²³, 2015), porém necessita de nichos retentivos para colonizar a superfície dentária (Badet et al.⁴, 2008). Polissacarídeos extracelulares produzidos por outros micro-organismos, tais como *S. mutans* poderiam também melhorar a adesão de lactobacilli ao biofilme (Badet et al.⁴, 2008; Wen et al.³⁴, 2010).

Relações de colaboração e oposição entre espécies podem influenciar a virulência e cariogenicidade do biofilme dentário (Kara et al.¹², 2006; Luppens et al.²⁰, 2008). Entretanto, poucos estudos foram realizados para verificar como essas interações interferem na resistência a antimicrobianos. Grande parte dos estudos *in vitro* disponíveis fizeram uso de sistemas estáticos para formar e tratar os biofilmes (Kara et al.¹³, 2007; Guggenheim, Meier¹¹, 2011; Ruiz-Linares et al.³¹, 2014). Entretanto, a metodologia ideal para testar a tolerância a antimicrobianos seria usar um modelo capaz de simular o ambiente no qual biofilmes são formados *in vivo*. Assim, uma abordagem eficiente seria a utilização de reatores de fluxo, nos quais biofilmes crescem sob a influência de um fluxo constante de meio de cultura (Goeres et al.¹⁰, 2009).

Em 2002, um estudo sugeriu que o reator “drip flow” seria capaz de mimetizar o ambiente da cavidade bucal (Adams et al.², 2002), provavelmente devido à possibilidade de

gerar um fluxo lento e contínuo de meio de cultura, semelhante ao fluxo salivar na cavidade bucal. Seu uso já foi validado para o desenvolvimento de biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa* (Method E2647-13 Standard test method²²) e mais recentemente, o reator “drip flow” foi empregado para formar biofilmes de *S. mutans* e testar o potencial antimicrobiano de dentifrícios (Brambilla et al.⁷, 2014). Entretanto esse modelo ainda não foi efetivamente validado para o desenvolvimento de biofilmes envolvendo micro-organismos orais utilizando um agente antimicrobiano padrão-ouro como a clorexidina.

Desse modo, os objetivos desse estudo foram: 1) apresentar uma revisão de literatura sobre interações entre bactérias cariogênicas no biofilme dentário; 2) discutir a aplicabilidade do reator “drip-flow” (DFR) para a formação de biofilmes dentário e teste de agentes antimicrobianos; 3) avaliar o crescimento e a suscetibilidade à clorexidina de biofilmes compostos por *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus acidophilus*, usando DFR; 3) avaliar o crescimento e a suscetibilidade à clorexidina de biofilmes compostos por *Streptococcus mutans* e *Actinomyces naeslundii*, usando DFR.

5 CONCLUSÃO

Diante dos estudos aqui apresentados, concluímos que:

- Interações entre micro-organismos podem influenciar a composição, virulência e cariogenicidade do biofilme oral, bem como a ocorrência de cárie dentária;
- O reator “drip-flow” demonstrou ser uma ferramenta adequada para desenvolver biofilmes orais e testar a eficácia de agentes antimicrobianos;
- Não foi observada interação significativa entre *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus acidophilus*
- A presença de *Actinomyces naeslundii* afetou a resistência de *Streptococcus mutans* à clorexidina.

REFERÊNCIAS*

1. Aas JA, Griffen AL, Dardis SR, Lee AM, Olsen I, Dewhirst FE, et al. Bacteria of dental caries in primary and permanent teeth in children and young adults. *J Clin Microbiol.* 2008; 46(4): 1407-17.
2. Adams H, Winston MT, Heersink J, Buckingham-Meyer KA, Costerton JW, Stoodley P. Development of a laboratory model to assess the removal of biofilm from interproximal spaces by powered tooth brushing. *Am J Dent.* 2002;15 Spec No:12B-17B.
3. Al-Ahmad A, Wunder A, Ausschill TM, Follo M, Braun G, Hellwig E, et al. The in vivo dynamics of *Streptococcus spp.*, *Actinomyces naeslundii*, *Fusobacterium nucleatum* and *Veillonella spp.* in dental plaque biofilm as analysed by five-colour multiplex fluorescence in situ hybridization. *J Med Microbiol.* 2007; 56(Pt 5): 681-7.
4. Badet C, Thebaud NB. Ecology of lactobacilli in the oral cavity: a review of literature. *Open Microbiol J.* 2008; 2: 38-48.
5. 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.
6. Brailsford SR, Shah B, Simons D, Gilbert S, Clark D, Ines I, et al. The predominant aciduric microflora of root-caries lesions. *J Dent Res.* 2001;80(9):1828-33.
7. Brambilla E, Ionescu A, Cazzaniga G, Edefonti V, Gagliani M. The influence of antibacterial toothpastes on in vitro *Streptococcus mutans* biofilm formation: a continuous culture study. *Am J Dent.* 2014; 27(3): 160-6.
8. Davey ME, O'toole GA. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2000; 64(4): 847-67.
9. Forssten SD1, Björklund M, Ouwehand AC. *Streptococcus mutans*, caries and simulation models. *Nutrients.* 2010; 2(3): 290-8.
10. 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.
11. Guggenheim B, Meier A. In vitro effect of chlorhexidine mouth rinses on polyspecies biofilms. *Schweiz Monatsschr Zahnmed.* 2011; 121(5): 432-41.

* De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/#biblioteca/manual>.

12. Kara D, Luppens SBI, ten Cate JM. Differences between single- and dual-species biofilms of *Streptococcus mutans* and *Veillonella parvula* in growth, acidogenicity and susceptibility to chlorhexidine. *Eur J Oral Sci* 2006; 114 (1): 58–63.
13. Kara D, Luppens SB, van Marle J, Ozok R, ten Cate JM. Microstructural differences between single-species and dual-species biofilms of *Streptococcus mutans* and *Veillonella parvula*, before and after exposure to chlorhexidine. *FEMS Microbiol Lett.* 2007; 271(1): 90-7.
14. Kneist S, Kubieziel H, Willershausen B, Küpper H, Callaway A. Modeling of *S. mutans* and *A. naeslundii* acid production in vitro with caries incidence of low- and high-risk children. *Quintessence Int.* 2012; 43(5): 413-20.
15. Kolenbrander PE, London J. Adhere today, here tomorrow: oral bacterial adherence. *J Bacteriol.* 1993;175(11):3247-52.
16. Kolenbrander PE, Palmer RJ Jr, Rickard AH, Jakubovics NS, Chalmers NI, Diaz PI. Bacterial interactions and successions during plaque development. *Periodontol* 2000. 2006; 42: 47-79.
17. Koo H, Falsetta ML, Klein MI. The exopolysaccharide matrix: a virulence determinant of cariogenic biofilm. *J Dent Res.* 2013; 92(12): 1065-73.
18. Levine M, Owen WL, Avery KT. Antibody response to actinomyces antigen and dental caries experience: implications for caries susceptibility. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2005; 12(6): 764-9.
19. Loesche WJ. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol Rev.* 1986; 50(4): 353-80.
20. Luppens SB, Kara D, Bandounas L, Jonker MJ, Wittink FR, Bruning O, et al. Effect of *Veillonella parvula* on the antimicrobial resistance and gene expression of *Streptococcus mutans* grown in a dual-species biofilm. *Oral Microbiol Immunol.* 2008; 23(3): 183-9.
21. Marsh PD, Devine DA. How is the development of dental biofilms influenced by the host? *J Clin Periodontol* 2011; 38(11): 28–5.
22. Method E2647-13 Standard test method for quantification of a *Pseudomonas aeruginosa* biofilm grown using a drip flow biofilm reactor with low shear and continuous flow. West Conshohocken, PA: ASTM; 2013.
23. Mei ML, Zhao IS, Ito L, Lo EC, Chu CH. Prevention of secondary caries by silver diamine fluoride. *Int Dent J.* 2015 Dec 22. [Epub ahead of print]
24. Moye ZD, Zeng L, Burne RA. Fueling the caries process: carbohydrate metabolism and gene regulation by *Streptococcus mutans*. *J Oral Microbiol.* 2014; 6: 24878.
25. Nobbs AH, Jenkinson HF, Jakubovics NS. Stick to your gums: mechanisms of oral microbial adherence. *J Dent Res.* 2011; 90(11):1271-8.

26. Takahashi N, Yamada T. Effects of pH on the glucose and lactate metabolisms by the washed cells of *Actinomyces naeslundii* under anaerobic and aerobic conditions. *Oral Microbiol Immunol*. 1999; 14(1): 60-5.
27. Takahashi N, Yamada T. Glucose and lactate metabolism by *Actinomyces naeslundii*. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1999; 10(4): 487-503.
28. Takahashi N, Nyvad B. Caries ecology revisited: microbial dynamics and the caries process. *Caries Res*. 2008; 42(6): 409-18.
29. Takahashi N, Nyvad B. The role of bacteria in the caries process: ecological perspectives. *J Dent Res*. 2011; 90(3): 294-303.
30. 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.
31. Ruiz-Linares M, Ferrer-Luque CM, Arias-Moliz T, de Castro P, Aguado B, Baca P. Antimicrobial activity of alexidine, chlorhexidine and cetrимide against *Streptococcus mutans* biofilm. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2014; 13: 41.
32. Stenudd C, Nordlund A, Ryberg M, Johansson I, Källestål C, Strömberg N. The association of bacterial adhesion with dental caries. *J Dent Res*. 2001; 80(11): 2005-10.
33. Simark-Mattsson C, Emilson C-G, Grahn Hakansson E, Jacobsson C, Roos K, Holm S. Lactobacillus-mediated interference of mutans streptococci in caries-free vs. caries-active subjects. *Eur J Oral Sci* 2007; 115(4): 308–14.
34. Wen ZT, Yates D, Ahn SJ, Burne RA. Biofilm formation and virulence expression by *Streptococcus mutans* are altered when grown in dual-species model. *BMC Microbiol*. 2010; 10: 111.
35. 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.