



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



Elkin Jahir Florez Salamanca

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

Araraquara

2021



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



Elkin Jahir Florez Salamanca

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

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

Orientador: Dra. Marlise Inêz Klein Furlan

Araraquara

2021

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

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

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

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

Essa ficha não pode ser modificada.

Elkin Jahir Florez Salamanca

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

Comissão julgadora

Tese para obtenção do grau de Doutor em Reabilitação Oral

Presidente e orientador: Dra. Marlise Inêz Klein Furlan

2º Examinador: Profa. Dra. Tamires Timm Maske

3º Examinador: Profa. Dra. Fernanda Lourenção Brighenti

4º Examinador: Profa. Dra. Daniela Rios Honório

5º Examinador: Profa. Dra. Josimeri Hebling Costa

Araraquara, 30 de março de 2021.

DADOS CURRICULARES

Elkin Jahir Florez Salamanca

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

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

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

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

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

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

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

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Carl Sagan*

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

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

RESUMO

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

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

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

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

ABSTRACT

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

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

SUMÁRIO

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

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

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

1 INTRODUÇÃO

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2 PROPOSIÇÃO

O objetivo geral do projeto foi avaliar de forma longitudinal a importância do microrganismo *S. mutans* na construção da matriz extracelular e na estruturação do biofilme até tornar-se cariogênico.

Objetivo 1. Desenvolver e avaliar diferentes desafios nutricionais (modelos de biofilme) que reproduzissem uma dieta cariogênica, utilizando a metodologia microcosmo. As análises para atingir este objetivo foram:

1. Avaliação de mudanças de pH dos meios de cultura
2. Avaliação da dinâmica populacional microbiana
3. Avaliação da biomassa total dos biofilmes
4. Avaliação superficial dos discos de esmalte (microdureza e rugosidade)

Objetivo 2. Desenvolver e avaliar as estratégias de inoculação única e múltiplas em modelo de biofilmes microcosmos, utilizando o melhor desafio nutricional desenvolvido no objetivo 1, com as seguintes análises:

1. Avaliação de mudanças de pH dos meios de cultura
2. Avaliação da arquitetura dos biofilmes
3. Avaliação da dinâmica populacional microbiana
4. Avaliação da matriz extracelular e biomassa insolúvel
5. Avaliação superficial dos discos de esmalte (microdureza e rugosidade)

3 REVISÃO DA LITERATURA

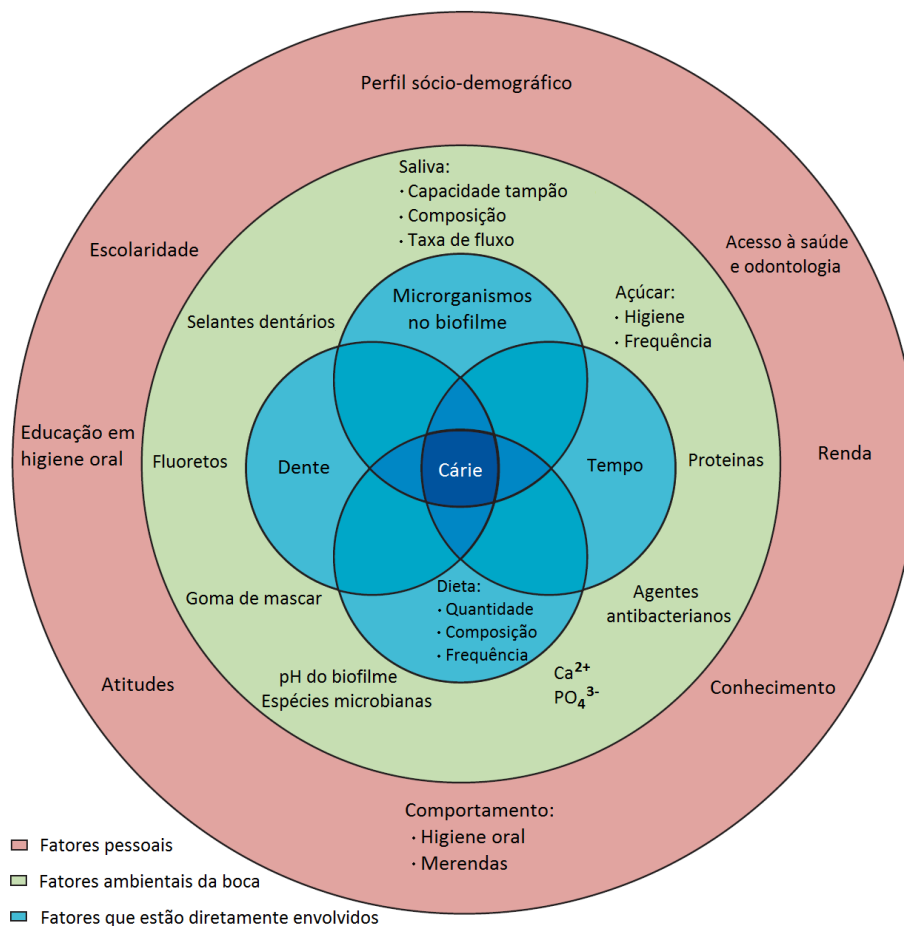
3.1 Cárie Dental

A cárie dental representa uma das doenças humanas mais prevalentes no mundo inteiro. Em 2010 se estimou que aproximadamente 35% (2,4 bilhões de pessoas) da população mundial apresentava lesões de cárie não tratadas nos dentes permanentes (Kassebaum et al. ², 2015). Atualmente é uma das principais causas de visitas à centros de emergência (dor de dente, abscesso dentário etc.), tornando-se um problema preocupante de saúde pública, além de gerar um aumento no custo dos serviços odontológicos (Bagramian et al. ³⁴, 2009). Os tratamentos das sequelas ocasionadas pelas doenças orais, vão desde tratamentos restauradores a nível local (obturações, tratamento de canal, próteses etc.) até alterações sistêmicas (desnutrição, malformações e disseminação de infecção através da corrente sanguínea), configurando um gasto dispendioso para o paciente. Os sistemas de saúde pública algumas vezes são os encarregados de financiar tanto os programas preventivos, quanto os tratamentos, porém em regiões de baixa renda, principalmente em países em desenvolvimento, estes serviços não estão disponíveis para a população em geral (Petersen ¹, 2008), prejudicando ainda mais a qualidade de vida, com o sofrimento em decorrência da dor e perda ou alteração de funções como deglutição e fonação (Dye et al. ³⁵, 2010)

A doença cárie tem uma etiologia multifatorial (Figura 1), que dificulta a compreensão uma vez que envolve fatores pessoais, ambientais e locais. Estes fatores interferem diretamente nas condições que favorecem a mudança da composição da microbiota oral dos humanos e, conseqüentemente, na perda da homeostase (Selwitz et al. ³, 2007). É de conhecimento geral que grandes mudanças nos ecossistemas naturais perturbam as comunidades residentes e geram conseqüências irreversíveis, tais como extinções e destruição de biomas. No contexto oral acontece algo semelhante, considerando uma escala microscópica (Marsh ^{36, 13}, 1994, 2003; Rosier et al. ¹¹, 2018). Por exemplo, as bactérias produzem diferentes ácidos como produto de

fermentação. Esses ácidos podem se dissociar em íons de hidrogênio, ocasionando uma redução do pH no interior da estrutura do biofilme maduro. Estas mudanças levam a pressões seletivas, favorecendo microrganismos acidúricos. Assim, estes locais expostos a estas alterações estão mais vulneráveis a instalação da doença cárie (Marsh ^{36, 13}, 1994, 2003).

Figura 1- Fatores envolvidos no desenvolvimento da cárie.



Esquema demonstra a complexa trama de fatores de risco que estão relacionados no desenvolvimento da cárie dental. A cárie tem fatores que estão diretamente envolvidos (azul), como os microrganismos, tempo, dieta e tecido dentário. Estes fatores estão conectados e são dependentes entre si. Adicionalmente estes sofrem interferência dos fatores ambientais da cavidade bucal (verde). Estes por sua vez são dependentes de fatores pessoais (rosa). No geral a instalação e desenvolvimento da doença cárie tem uma alta complexidade, pois existem interações e influências de inúmeras variáveis, o que também dificultam a prevenção e tratamento.

Fonte: Traduzido de Selwitz et al. ³, 2007.

Apesar da palavra “cárie” ser amplamente utilizada, o significado dela pode gerar divergências. As cavidades que se formam nos dentes correspondem a forma mais coloquial que este termo é utilizado, no entanto atualmente vem se utilizando o termo “lesões de cárie”. As cavidades são manifestações clínicas tardias de um processo patológico complexo, porém desconhecer todos os estágios que são necessários para chegar nessa condição é de grande equívoco (Jakubovics e Kolenbrander ³⁸, 2010; Bowen ³⁹, 2016). Atualmente, o profissional da odontologia tem a extrema necessidade em distinguir o processo carioso da cavidade resultante. O acúmulo de biofilme nos dentes pode ser o primeiro indício ou sinal clínico do que poderia ser o início da doença (Bowen ³⁹, 2016).

A cárie dental é o processo pelo qual os produtos metabólicos (como os ácidos orgânicos) provenientes dos biofilmes dentais resultam na perda de minerais (desmineralização) das estruturas dentárias. A cárie dental é considerada natural e sempre está presente em níveis microscópicos (Kidd e Fejerskov ⁴⁰, 2004). Existe uma troca de íons entre biofilme e substrato levando à dissolução inicial do esmalte, esta desmineralização ocorre geralmente na subsuperfície e não gera alterações na integridade dos dentes. Uma das primeiras e principais alterações que se observa visualmente é a modificação da cor do dente, denominada como lesões manchas brancas (Kleter ⁴¹, 1998).

A saliva tem um papel compensatório nesta região com perda de minerais. Isso porque forma uma película salivar que, além de atuar como um tampão, modula a movimentação de soluto para dentro e para fora desta região. O soluto é constituído por íons cálcio, fosfato e flúor, contribuindo assim no processo de remineralização das estruturas dentais (Hannig e Joiner ⁴², 2006; Hicks et al. ¹⁶, 2004). Os processos de desmineralização e remineralização se mantem um equilíbrio de uma forma dinâmica (Hicks et al. ⁴³, ¹⁶, 2003, 2004). Uma vez que ocorra o desequilíbrio entre os microrganismos que constituem o ecossistema oral (Samaranayake e Matsaruba ¹⁰, 2017), um processo de disbiose se inicia, e assim a microbiota e o hospedeiro não conseguem restabelecer os parâmetros de equilíbrio compatíveis com o considerado saudável (Rosier et al. ¹¹, 2018).

Quando um biofilme maduro está estabelecido na superfície do dente, a dinâmica dos movimentos de solutos é prejudicada pela estrutura do biofilme. Como consequência, os ácidos orgânicos provenientes da “placa dental” (produtos metabólicos dos biofilmes dentais) induzem a perda de minerais (desmineralização) das estruturas dentárias, ocasionando a cárie dental (Kidd e Fejerskov 2004 ⁴⁰).

3.2 Biofilme Dental

A cavidade bucal é uma porta de entrada para o corpo humano, tanto na ingestão de alimentos, como na respiração e fonação. Nesta cavidade há diferentes ambientes anatômicos que favorecem o crescimento de múltiplas espécies microbianas, levando ao desenvolvimento de micronichos (The Human Microbiome Project consortium ⁴, 2012). De forma geral, estes micronichos possuem superfícies que favorecem a adesão de microrganismos. Podem estar localizados nos espaços interdentais, nas superfícies lisas dos dentes, nas superfícies oclusais, nas mucosas, nos sulcos gengivais, na língua, entre outros. A cavidade bucal dispõe de oxigênio, nutrientes, temperatura e humidade adequada para o desenvolvimento microbiano. No entanto, dependendo da localização geográfica e das propriedades biológicas e físicas disponíveis, levam a uma influência diferente na composição tanto química como microbiológica dos biofilmes (Simón-Soro et al. ⁴⁴, 2013; Xu et al. ⁴⁵, 2014). Este amplo leque de nichos permite que a cavidade bucal seja um dos locais com maior variedade e densidade microbiana do corpo humano, com mais de 700 espécies de microrganismos vivendo em comunidade (The Human Microbiome Project consortium ⁴, 2012).

As bactérias, arqueias, fungos, micoplasmas, protozoários e possivelmente, vírus que estão tanto de forma comensal como transitória na cavidade bucal, vivem em harmonia (Marsh ²⁷, 2018). Entretanto, sabe-se que não é simples a dinâmica entre os microrganismos unicelulares que coabitam, sendo que se desenvolvem interações inter e intra-espécies e reinos que permitem a formação de comunidades altamente dinâmicas e autorreguladas (Kilian et al. ⁴⁶, 2017). Estas estruturas comunitárias se

encontram aderidas a superfícies, sendo altamente organizadas e funcionais, demonstrando assim que são formas de vida bem-sucedidas. Este estilo de vida microbiano é possível porque existe a estabilidade ecológica, que é o resultado de uma cooperação social onde o mais importante é a construção de um habitat (Flemming et al. ⁷, 2016), estas comunidades são chamadas de biofilmes.

As propriedades e atividades fisiológicas que apresentam os microrganismos quando fazem parte de um biofilme, diferem do seu comportamento quando estão na forma livre (planctônica). Microrganismos unicelulares integrantes de um biofilme utilizam as estratégias que viabilizam a comunicação célula-célula (*quorum sensing*). Esta estratégia revela um comportamento coordenado entre os integrantes da população, atuando como entidades multicelulares e aumentando assim as chances de sobrevivência em ambientes complexos (Hooshangi e Bentley ⁹, 2008). Entre os maiores objetivos deste trabalho colaborativo está a construção de uma estrutura tridimensional (3D), na qual os microrganismos encontram-se imersos e rodeados de substâncias poliméricas extracelulares, conhecida como matriz extracelular (Flemming e Wingender ⁸, 2010).

As substâncias poliméricas extracelulares que constituem a matriz ajudam na conformação de uma complexa arquitetura do biofilme, pois são depositadas lentamente ao redor das células e, adicionalmente, fornecem sítios de união entre os microrganismos, favorecendo relações simbióticas (Bowen e Koo ²⁰, 2011, Falseta et al. ⁴⁷, 2014). As relações entre diversos grupos microbianos configuram estruturas e sequências bem definidas na organização micrométrica. Esta complexa organização ainda não está completamente elucidada, pois existem limitações na marcação dos microrganismos e aquisição de imagens (Valm et al. ⁴⁸, 2010). Mediante a utilização de um consórcio de microrganismos conseguiu-se aproximar, compreender e ilustrar uma parte da complexa organização biogeográfica que apresentam os biofilmes dentários (Mark Welch et al. ⁴⁹, 2016).

Nas amostras clínicas têm sido observado que as células microbianas alongadas de maior comprimento tem uma inserção nas camadas mais profundas do biofilme e suas prolongações se espalham dando aparência de espinhas,

conformando estruturas que se assemelham a um ouriço (*hedgehog*) ou a algas marinhas (*seaweed*) que muitas vezes estão emaranhadas (Mark Welch et al. ⁴⁹, 2016; Kim et al. ⁵⁰, 2020). Também foi frequentemente observado que as células esféricas (cocos) se aderiam e recobriram as células alongadas e filamentosas formando uma estrutura que semelhante com uma espiga de milho, cheia de grãos (*corncob*) (Mark Welch et al. ⁴⁹, 2016; Kim et al. ⁵⁰, 2020).

3.3 Matriz Extracelular de Biofilme

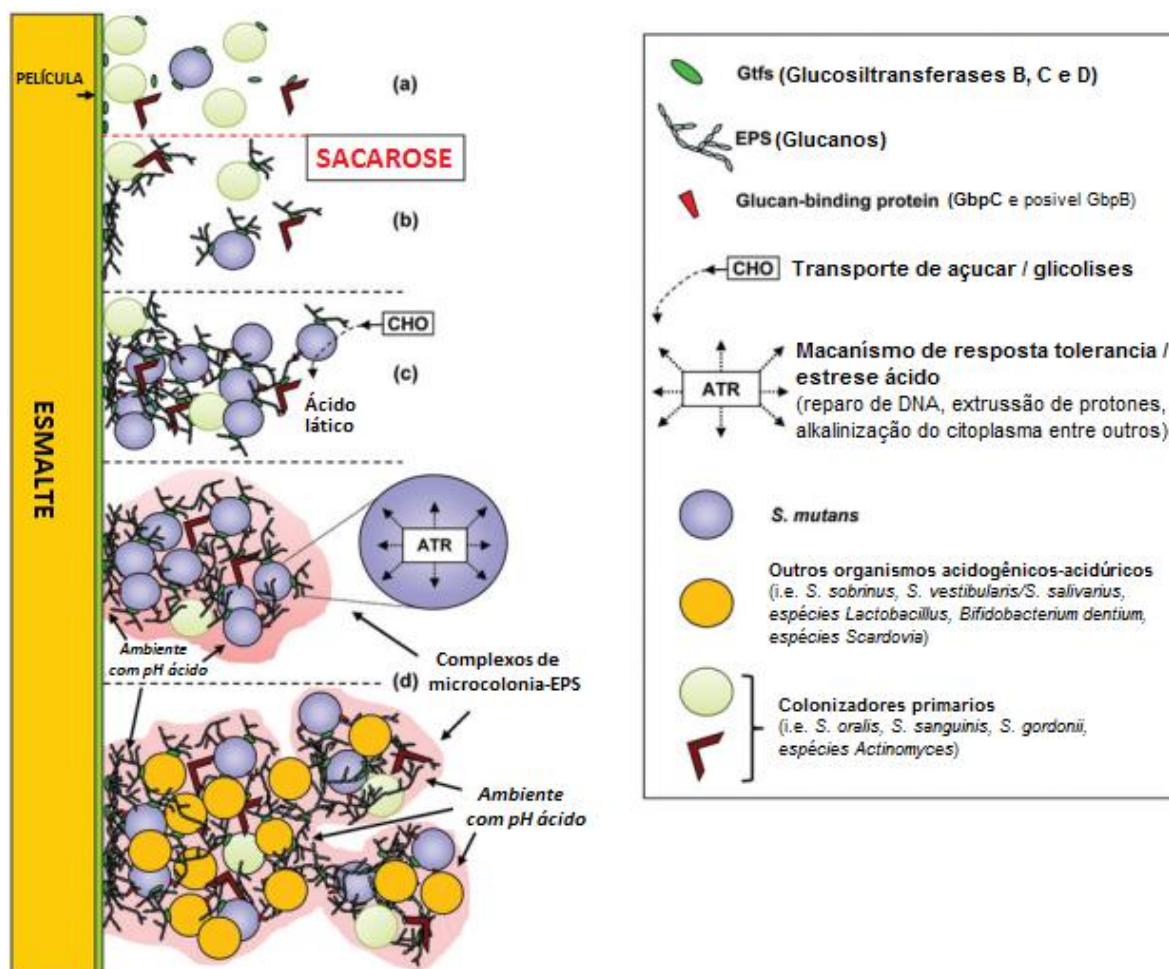
A matriz compõe a maior porção do biofilme (cerca de 90% da massa seca). Esta estrutura é localizada ao ambiente externo dos microrganismos, uma vez que estes produzem estes biopolímeros. Assim, se torna uma estrutura coesa, formando uma base para a construção do biofilme, com o propósito de fornecer adesão, suporte, proteção e estabilidade aos microrganismos que vivem dentro de ambientes considerados desafiadores (expostos a constantes mudanças físicas e químicas) (Flemming, Wingender ⁸, 2010).

Estas estruturas são compostas principalmente por exopolissacarídeos, proteínas, glicoproteínas, glicolípídios e DNA extracelular (eDNA), os quais provêm de várias fontes (Fleming et al. ⁵¹, 2007). Alguns componentes são adquiridos do ambiente externo ao biofilme, outros de microrganismos e células orais lisadas, e outros fazem parte dos produtos metabólicos dos microrganismos que compõem o mesmo biofilme. Os microrganismos contribuem no processo de reutilização (reciclagem) destes recursos e utilizam a matriz com um centro de processamento e armazenamento. Fazendo uma analogia, é como se o biofilme fosse uma grande metrópole autossustentável (Fleming et al. ⁵¹, 2007; Wimppeny ⁵², 2009).

Os microrganismos presentes nos biofilmes orais (principalmente os associados com lesões de cárie) aproveitam a disponibilidade de nutrientes provenientes da dieta humana e conseguem sintetizar glucanos e frutanos. Estes são utilizados como tijolos na construção de substâncias poliméricas mais complexas como os exopolissacarídeos (Bowen e Koo ²⁰, 2011). Alguns microrganismos possuem arsenais de genes que

conferem a habilidade de sintetizar enzimas, tais como as Glucosiltransferases (Gtfs) e Frutossiltransferase (Ftfs), que cumprem a função de síntese e facilitam o desenvolvimento do biofilme (Figura 2).

Figura 2 - A síntese de exopolissacarídeos *in situ* ajuda na estruturação da Matriz Extracelular do biofilme.



Síntese de exopolissacarídeos *in situ* ajuda na estruturação da Matriz Extracelular do biofilme (a) Incorporação de Gtfs na película salivar. (b) Gtfs livres sintetizam glucanos a partir de sacarose e hidrolisados de amido. (c) Os glucanos formados ligam vários microrganismos, principalmente através de interações feitas pelas enzimas Gbps presentes no *S. mutans*. Além disso, as bactérias revestidas por Gtfs tornam-se produtoras de glucanos, levando à produção da matriz que fornece proteção e nichos ácidos. (d) Predominância e sobrevivência de espécies dependendo das condições dos nichos. Na exposição de sacarose se geram ácidos fermentáveis o que favorece a sobrevivência e dominância de organismos altamente tolerantes ao estresse ácido, promovendo a desmineralização do esmalte.

Fonte: Traduzido de Koo et al.²², 2013.

As Gtfs e Ftfs em conjunto com outras proteínas, provenientes dos microrganismos e do hospedeiro, se incorporam em uma fina película presente nas superfícies dos dentes (Hannig e Joiner ⁴², 2006). Esta é denominada película salivar adquirida e auxilia na ligação dos microrganismos, ajudando na colonização inicial das superfícies (Matsumoto-Nakano ⁵³, 2018). Outros grupos de enzimas ajudam na ligação entre os monômeros como os glicanos (as *Glucan Binding Proteins* – Gbps e *Dextran Binding Domain*), resultando em uma maior coesão da estrutura da matriz. No entanto a remodelagem da matriz está diretamente ligada na manutenção do biofilme. O processo de catálise de ligações glicosídicas exercido por algumas enzimas (as frutanasase e dextranasase) ajuda no amadurecimento do biofilme (Matsumoto-Nakano ⁵³, 2018; Klein et al. ⁵⁴, 2012).

O eDNA tem um papel importante na estrutura do biofilme, pois consegue se aderir nas superfícies, estabelecendo ligações entre os microrganismos e interagindo com os exopolissacarídeos, aumentando a adesão. Desta maneira, contribui para a organização espacial, fortalecimento das estruturas do biofilme e aumento da estabilidade mecânica da matriz (Whitchurch et al. ⁵⁵, 2002; Petersen et al. ⁵⁶, 2005; Das et al. ⁵⁷, 2010).

A estrutura da matriz apresenta canais que facilitam o trânsito e o intercâmbio de alguns produtos (Wilking et al. ⁵⁸, 2013). Tanto nutrientes como metabólitos e/ou a água podem permear o biofilme, principalmente por mecanismo de difusão, atingindo diversos locais, tais como a interface do biofilme/dente. No entanto, este transporte é limitado e as vezes barreiras de difusão podem existir. Uma das barreiras mais frequentes está localizada entre a parte interna do biofilme e ambiente externo (Costerton et al. ⁵⁹, 1994). É paradoxo saber que apesar de alguns componentes da matriz serem solúveis em água e/ou estarem sujeitos a ação de hidrolases salivares, a estrutura como um todo se mantém coesa. Isto é devido à somatória de substâncias que estão ligadas entre si, dificultando a dissolução do biofilme (Fleming et al. ⁵¹, 2007).

Processos biológicos como a formação de vesículas de membrana, remodelagem da parede celular e autólise dos microrganismos, disponibilizam ao meio

extracelular algumas substâncias que conformam o biofilme (Liao et al. ²³, 2014; Neuhaus, Baddiley ⁶⁰, 2003). Entre elas encontramos os ácidos lipoteicóicos de bactérias Gram positivas, que são polímeros constituídos de moléculas anfifílicas de poli-ol-fosfatos. Estas estão ancoradas na membrana celular e se estendem para a parede celular do microrganismo por um glicolípido e sua cadeia poli (glicerofosfato) (GRO-P) (Neuhaus, Baddiley ⁶⁰, 2003). Os ácidos lipoteicóicos tem afinidade por superfícies sólidas, além de interagir com os glucanos que revestem a parede de alguns microrganismos, principalmente estreptococos orais (forma um composto de ácidos lipoteicóicos/glucanos), favorecendo assim maior aderência entre os microrganismos (Rolla et al. ⁶¹, 1980; Hogg et al. ⁶², 1997).

Os biofilmes apresentam resistência mecânica, embora não sejam estruturas rígidas. Esta característica pode ser comparada com as encontradas na matriz extracelular dos tecidos conectivos em organismos multicelulares (Costerton e Irving ⁶³, 1981; Flemming et al. ⁵¹, 2007; Flemming e Wingender ⁸, 2010). Os ácidos lipoteicóicos, presente na matriz extracelular dos biofilmes, ajudam na configuração de uma barreira de difusão, com o papel de inibir a difusão dos ácidos para fora do biofilme, entretanto, o fluxo inverso é permitido, assim moléculas da parte externa, principalmente não carregadas, alcançam o interior (Ciardi et al. ⁶¹, 1997; Rolla et al. ⁶⁴, 1980).

De forma geral, estudos tem demonstrado a influência de substâncias poliméricas na arquitetura dos biofilmes. Nestas comunidades de microrganismos há uma forte interação entre exopolissacarídeos, eDNA e ácidos lipoteicóicos, resultando em biofilmes mais coesos (Castillo Pedraza, et al. ²⁴, 2017), o que dificultaria a difusão de dentro e fora do biofilme. Como estratégias para o controle de biofilmes patogênicos, testes *in vitro* utilizaram tratamentos tópicos que diminuíram a formação da matriz extracelular. Moléculas que afetam a síntese de polissacarídeos e que modulam o metabolismo dos ácidos lipoteicóicos estão apresentando resultados interessantes e poderiam ser novas alternativas terapêuticas (Rocha et al. ⁶⁵, 2018; Castillo Pedraza, et al. ⁶⁶, 2020).

3.4 Modelos de Cárie *in vitro*

A multifatorialidade da cárie dificulta o entendimento da doença, e diversas estratégias têm sido utilizadas para o estudo deste complexo processo patológico. Modelos experimentais de desenvolvimento de cárie em humanos oferecem dados dificilmente reproduzíveis, devido a situações ambientais heterogêneas, características individuais da cavidade bucal e das implicações éticas (Fejerskov et al. ⁶⁷, 1994). Estudos *in situ* permitem o crescimento de biofilmes sobre espécimes padronizados enquanto estão dentro de ambientes reais (i.e., cavidade bucal). Porém, a participação de voluntários é baixa devido aos desconfortos gerados pelos aparelhos intraorais. Além disso, a variabilidade dos participantes dificulta a obtenção de dados homogêneos, chegando muitas vezes a resultados variáveis e até contraditórios (Spiguel et al. ⁶⁸, 2008, Al-hamad et al. ⁶⁹, 2010).

Modelos que utilizam animais ajudam a determinar os fatores envolvidos na patogênese da cárie, pois dentro destes sistemas biológicos são geradas lesões de cárie, e não somente os estágios iniciais da desmineralização (Marsh, 1995 ⁷⁰; Bowen ⁷¹, 2013). Entretanto, a utilização de animais para fins de pesquisa é um assunto muito controverso, por questões éticas e pelo viés da relação microbiota-hospedeiro. A microbiota humana difere, em muitos aspectos, da dos roedores e a técnica de realizar a inoculação de uma única espécie bacteriana no animal gera um desbalanço na natureza polimicrobiana da cavidade bucal (Bowen ⁷², 1994; Marsh ⁷⁰, 1995).

Estudos *in vitro* ajudam no entendimento individual de alguns microrganismos, considerados agentes etiológicos. Os cultivos com uma espécie (monoculturas), simplificam os estudos, mas se afastam das condições clínicas reais (Kuchma e O'Toole ⁷³, 2000; Lemos et al. ⁷⁴, 2010). Modelos de biofilmes mistos (usualmente consórcio de alguns poucos microrganismos) facilitam a compreensão do comportamento, das relações interespecíes e das respostas a situações ambientais de alguns microrganismos (Maske et al. ¹⁸, 2017; Sim et al. ⁷⁵, 2016). Com o advento da hipótese da placa ecológica e da sua influência na etiologia da cárie, têm surgido metodologias que procuram replicar *in vitro* a formação de complexas comunidades

microbianas semelhantes aos biofilmes dentários (Wimpenny ⁷⁶, 1997; Sissons ³⁷, 1997). O termo microcosmo, alcunhado por Julian Wimpenny faz referência a utilização de sistemas fechados, nos quais devem ser incluídas e mantidas algumas características dos ecossistemas de onde as espécies microbianas provém. A inclusão deste entorno ecológico permite uma melhor adaptação e posterior sobrevivência de uma maior diversidade de espécies, criando assim um replica em miniatura (Wimpenney ^{19, 77}, 1981, 1988).

A transposição do termo microcosmo para a área de microbiologia oral procura imitar de perto as condições físico-químicas, microbiológicas e nutricionais presentes na cavidade bucal, conseguindo manter a complexidade e biodiversidade do ambiente original (Wimpenny ⁷⁶, 1997; Sissons ³⁷, 1997). Neste modelo é utilizado, como inóculo, a microbiota oral original, uma vez que amostras de saliva ou biofilme dentário de voluntários humanos são coletadas para serem utilizadas. Assim, se pretende simular o microambiente oral dentro das configurações de um ambiente laboratorial controlado, no qual diferentes variáveis de interesse possam ser manejadas para esclarecer os processos biológicos associados com as doenças, neste caso com a cárie (McBain ⁷⁸, 2009; Signori et al. ⁷⁹, 2016; Maske et al. ¹⁸, 2016).

De forma geral, observa-se que no estudo da cárie têm sido utilizadas diversas metodologias (laboratorial – *in vitro*, animal - *in vivo* e modelos humanos - *in situ*), tecnologias e sistemas microbianos. Cada tipo de estudo apresenta algumas fortalezas que são úteis para entender aspecto específico, porém apresentam algum tipo de limitação que levam a extrapolar os resultados. Em síntese podemos afirmar que o modelo não é a doença, pois não consegue desvelar o peso real dos múltiplos fatores envolvidos na doença. No entanto, a utilização de modelos tem permitido grande avanço no desenvolvimento de novos conceitos (Marsh ⁷⁰, 1995; Bowen ⁷¹, 2013). Adicionalmente o avanço na tecnologia tem permitido aumentar o realismo dos modelos *in vitro*, aproximando-se cada vez mais ao ecossistema existente na cavidade bucal e obtendo resultados úteis para realizar inferências sobre a fisiopatologia da doença. Como por exemplo, a influência dos carboidratos e de alguns microrganismos.

Adicionalmente, estes modelos contribuem para a prospecção de estratégias antimicrobianas no controle dos biofilmes (Maske et al.¹⁸, 2017; Sim et al.⁷⁵, 2016).

3.5 Dieta

Há quase um século a dieta é vista como um dos fatores fundamentais para o desenvolvimento da cárie. Existem múltiplos estudos que estabelecem uma relação entre os carboidratos (principalmente açúcares) e a doença. O volume e a frequência exacerbada do consumo de alimentos açucarados, os quais possuem consistência pegajosa, aumenta o tempo de exposição dos microrganismos da cavidade bucal a estas fontes de carboidratos. Consequentemente, ocorre o aumento da atividade microbiana, o que eleva a incidência de cárie (Krasse⁸⁰, 2001; Sheiham⁸¹, 2001). A sacarose e o amido são frequentemente encontrados em muitos alimentos processados, e são os carboidratos predominantes na dieta da sociedade moderna. Esta combinação resulta no aumento da cariogenicidade da sacarose (Bowen et al.⁸², 1980; Firestone et al.²⁹, 1982; Ribeiro et al.⁸³, 2005). Proteínas, como as amilases, que são provenientes do hospedeiro e/ou de microrganismos, ajudam a hidrolisar as moléculas complexas e deixam disponíveis estruturas mais simples, facilmente metabolizáveis pelos microrganismos (Rogers et al.³², 2001).

O crescimento de alguns microrganismos depende da disponibilidade dos monossacarídeos fermentáveis que são fornecidos diretamente ou indiretamente pela dieta do hospedeiro. A alta disponibilidade destes aumenta a síntese de constituintes da matriz extracelular, por microrganismos específicos (Bowen e Koo²⁰, 2011; Klein et al.²¹, 2009). Entre eles microrganismos dos gêneros *Cândida*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Prevotella* e *Peptostreptococcus* têm a facilidade de fermentar carboidratos. Algumas Gtfs auxiliam na estruturação dos exopolissacarídeos insolúveis em água, favorecem a retenção de alguns ácidos e outros produtos metabólicos finais, os quais, como mencionado anteriormente, reduzem o pH do meio de cultivo (Yamashita et al.⁸⁴, 1993; Vacca-Smith et al.⁸⁵, 2007). Estudos descrevem que o pH *in situ* pode alcançar valores menores que 5,5, o que é considerado o valor crítico para desmineralização do esmalte dentário (Bowen⁸⁶, 2013). A acidificação do entorno leva

a uma mudança na microbiota residente, diminuindo a diversidade microbiana e favorecendo espécies que geram ácido a partir dos carboidratos e que sobrevivem em ambiente ácido; isto gera um sistema de retroalimentação positiva entre o entorno ácido e a presença de microrganismos específicos (Marsh ³⁶, 1994)

Os humanos necessitam ingerir alimentos com periodicidade para evitar transtornos nutricionais e metabólicos, sendo recomendado a realizar cinco por dia, de três em três horas (Jenkins et al. ³⁰, 1989; Franko et al. ³¹, 2008). Estes cinco períodos, ricos em recursos nutricionais, são considerados como “fartura” para os microrganismos orais. Entretanto, nos intervalos entre as refeições há a ausência de recursos nutricionais, principalmente no período noturno (repouso prolongado), denominados como períodos de “miséria” (Nyström et al. ⁸⁷, 1993; Carlsson et al. ⁸⁸, 1997, McBain et al. ⁸⁹, 2003). Nesses períodos de “miséria” os microrganismos podem diminuir seu metabolismo e também utilizar a matriz extracelular do biofilme como fonte de nutrientes (Lemos e Burne ⁹⁰, 2008; Costa Oliveira et al. ⁹¹, 2017), ou se beneficiar dos carboidratos provenientes das proteínas do hospedeiro disponibilizados pelas glicosilases de alguns microrganismos orais.

No interior do biofilme a disponibilidade de carboidratos também diminui pela baixa difusão, desta forma alguns microrganismos têm se adaptado a utilizar glicoproteínas salivares endógenos, como a mucina. Esta pode ser a fonte nutricional principal, quando os carboidratos provenientes da dieta estão ausentes. A produção de glicosil hidrolases por parte dos microrganismos presentes nos biofilmes orais permite a utilização de açúcares das glicoproteínas como fonte de energia, isto é mais evidente após períodos “noturnos” (Bowden ⁹², 1997; Inui et al. ⁹³, 2015). Posteriormente, a degradação destas proteínas (proteólise) em peptídeos menores e a fermentação de aminoácidos demonstram que as enzimas ativadas por carboidratos desempenham um papel importante na adaptação do microrganismo e os torna capazes de metabolizar moléculas orgânicas complexas e utilizá-las como nutrientes (Inui et al. ⁹³, 2015).

Adicionalmente, em comunidades polimicrobianas complexas existem interações que beneficiam microrganismos parceiros. A troca de substâncias metabólicas primárias ou secundárias, que são utilizadas como nutrientes, é conhecida como

alimentação cruzada. Algumas vezes os microrganismos secretam em excesso ou vazam acidentalmente um metabólito no ambiente, outras vezes investem recursos para produzir um metabólito que será utilizado por uma espécie parceira. Usualmente isto fornece um benefício para o microrganismo produtor, pois aumenta a sua sobrevivência e compensa o gasto de energia, desta forma observamos como os microrganismos atuam de forma cooperativa (Miller et al. ⁹⁴, 2019). Outra interação metabólica, na qual é evidenciado o cooperativismo dos microrganismos, é quando grandes moléculas são degradadas separadamente por diversos microrganismos (como descrito no caso das glicoproteínas salivares). Um exemplo crítico que reduz a quantidade de ácidos produzidos pela fermentação microbiana é a utilização de lactato por espécies de *Veillonella* (Takahashi ¹⁷, 2015). No entanto isto acontece de forma sequencial, existindo uma coordenação entre as funções especializadas de cada tipo de célula (Inui et al. ⁹³, 2015; Miller et al. ⁹⁴, 2019). Este tipo de relacionamento é chamado de sintrofia, sendo considerado benéfico para os microrganismos envolvidos, uma vez que não há a necessidade de um gasto energético e/ou possuir um arsenal genético que propiciaria a lise completa destas complexas moléculas (Miller et al. ⁹⁴, 2019).

3.6 Saliva

A saliva é uma mistura complexa de fluidos geralmente composta por uma variedade de eletrólitos, microrganismos, restos alimentares, imunoglobulinas, enzimas, mucinas (entre outras proteínas) e produtos nitrogenados (ureia, amônia etc.). A saliva desempenha um papel muito significativo na homeostase oral e na manutenção da simbiose do complexo e diversificado ecossistema microbiano oral. Nesse contexto, dentre as principais funções da saliva, estão: (1) modulação do pH pela capacidade de tamponamento; (2) favorecimento da união e/ou agregação dos microrganismos orais, contribuindo para o metabolismo dos biofilmes; (3) ação anti-solubilizante, regulando o processo de desmineralização; e (4) ação antibacteriana (Humphrey e Williamson ⁵, 2001). Dessa maneira, a saliva auxilia a manutenção do

microbioma e exerce uma ampla variedade de funções que promovem a saúde bucal (Lyng Pedersen e Belstrom ⁹⁵, 2019; Marsh et al. ⁹⁶, 2015)

A interação entre macromoléculas específicas presentes na saliva e a superfícies da hidroxiapatita do esmalte, formam a película adquirida que atua como uma barreira. Além disso, também contribui na formação da película da mucosa que cobre os tecidos orais moles (Hannig e Joiner ⁴², 2006; Siqueira et al. ⁹⁷, 2007). As proteínas salivares também podem favorecer a formação de películas em diferentes tecidos e materiais, no entanto apresentam diferenças consideráveis para colonização microbiana e separação de camadas de biofilme (Hannig e Hannig ⁹⁸, 2009).

A película no esmalte ajuda na adesão inicial e colonização dos microrganismos que estão suspensos na saliva, assim a saliva indiretamente promove a formação do biofilme. De modo geral, os microrganismos progressivamente atingem e aderem as superfícies dentais, e posteriormente forneceram ligações para outros microrganismos, resultando em uma colonização secundário ou tardia (Kolenbrander et al. ⁹⁹, 2002; Rickard et al. ⁶, 2003). Desta forma, a saliva é um dos fatores moduladores da composição da microbiota residente oral, favorece alguns microrganismos comensais e benéficos para que se organizem em biofilmes (Lyng Pedersen e Belstrom ⁹⁵, 2019)

3.7 Microrganismos

Em 1924 Clarke isolou alguns microrganismos das lesões de cárie e as associou com a doença. No entanto a associação de dois fatores não indica necessariamente a sua causalidade (fazendo uma analogia com o ditado popular: quem veio primeiro, o ovo ou a galinha). Com a evolução das pesquisas na área microbiológica, uma das propostas de hipótese apresentadas foi que apenas um pequeno número de microrganismos estava diretamente envolvido na causa da doença cárie, principalmente aqueles acidogênicos e acidúricos (Loesche ¹², 1976). Os microrganismos do gênero *Streptococcus* representam um dos mais abundantes na cavidade bucal, e entre eles a espécie *Streptococcus mutans* foi amplamente descrita como um microrganismo cariogênico (Hamada e Slade ¹⁰⁰, 1980).

Entretanto outras propriedades contribuem para a virulência de microrganismos potencialmente cariogênicos. Entre elas, estão a capacidade de adesão, formação do biofilme, tolerância ao ácido e produção de bacteriocinas (Grönroos et al. ¹⁰¹, 1998; Banas ¹⁰², 2004; Lemos e Burne ⁹⁰, 2008; Takahashi ¹⁷, 2015). *S. mutans*, na presença de sacarose e amido (provenientes da dieta do hospedeiro), tem uma grande capacidade de sintetizar exopolissacarídeos que influenciam na construção da matriz extracelular do biofilme e na adesão de novas bactérias (Bowen e Koo ²⁰, 2011; Paes-Leme et al. ¹⁰³, 2006; Duarte et al. ¹⁰⁴, 2008; Klein et al. ²¹, 2009).

As Gtfs secretadas por *S. mutans* podem ser adsorvidas às superfícies dos dentes tornando-se parte da película salivar, levando a formação de exopolissacarídeos *in situ*, e promovendo a colonização microbiana (Bowen e Koo ²⁰, 2011). Além disso, as Gtfs podem também ser adsorvidas às superfícies de outros microrganismos orais, tornando-os produtores de glucanos (Bowen e Koo ²⁰, 2011). Portanto, a produção de exopolissacarídeos nas diferentes superfícies aumenta o acúmulo e agrupamento local de microrganismos nos dentes (Vacca-Smith et al. ⁸⁵, 2007). Conforme o biofilme se torna mais maduro, os exopolissacarídeos ajudam a construir a matriz extracelular do biofilme, promovendo um ambiente coeso, e por isto se considera que *S. mutans* coordene a construção do biofilme (Xiao, et al. ¹⁰⁵, 2012; Koo, et al. ²², 2013). O gene *gtfB* de *S. mutans* está envolvido na síntese de glicanos insolúveis em água, a sua deleção afeta a expressão de genes associados com eDNA, ácidos lipoteicóicos e exopolissacarídeos, consequente no acúmulo dos principais componentes da matriz extracelular do biofilme (Castillo Pedraza et al. ²⁴, 2017; Florez Salamanca e Klein ¹⁰⁶, 2018). Adicionalmente, *S. mutans* aporta também eDNA e ácidos lipoteicóicos, influenciando o desenvolvimento de uma matriz extracelular que oferece maior estabilidade ao biofilme (Klein et al. ¹⁰⁷, 2015).

Em lesões de cárie mais avançadas que apresentam uma maior extensão e cavidades mais profundas, como é o caso de lesões de cárie na primeira infância, o gênero *Lactobacillus* tem sido amplamente identificado (Badet e Thebaud ¹⁰⁸, 2008; Tanner et al. ¹⁰⁹, 2011a). Este de forma geral tem uma alta capacidade de utilizar diferentes carboidratos como fonte nutricional para fermentação, resultando na

produção de ácidos, as quais possui tolerância (Caufield et al. ¹¹⁰, 2015). Ainda algumas espécies do gênero também produzem Gtfs que são capazes de sintetizar diferentes tipos de glucanos, no entanto estes microrganismos não são colonizadores iniciais (Kralj et al. ¹¹¹, 2004).

Uma vez que o esmalte é desmineralizado pelos ácidos produzidos pelos microrganismos do biofilme, o colágeno da dentina fica exposto e se torna um alvo para as proteínas de ligação ao colágeno gerando assim um tipo de colonização diferente à que acontece no início da formação do biofilme. Várias espécies de *Lactobacillus* apresentam este tipo de proteínas, o que favorece a sua presença nas lesões de cárie profunda (McGrady et al. ¹¹², 1995). Microrganismos como o fungo *Candida albicans* também são acidogênicos e acidúricos. São detectados neste tipo de lesões, pois se co-aderem com espécies de microrganismos comensais e apresentam relações simbióticas com bactérias, garantido sua preservação no ambiente competitivo (de Carvalho et al. ¹¹³, 2006; Shirtliff et al. ¹¹⁴, 2009; Klinker et al. ¹¹⁵, 2009). Tanto as *Candidas* como os *Lactobacillus* têm a capacidade de produzir protease que ajudam a degradar o colágeno e aumentar a destruição dos tecidos dentários. A degradação da dentina também acontece sob condições ácidas (Caufield et al. ¹¹⁰, 2015; Klinker et al. ¹¹⁵, 2007).

De forma geral, para o desenvolvimento da doença, é essencial a interação coordenada de diferentes microrganismos de vários gêneros, entre eles: *Streptococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Actinomyces* spp., *Scardovia* spp., *Veillonella* spp., *Candida* spp. (Takahashi e Nyvad ¹⁴, 2011; Becker et al. ¹¹⁶, 2002), sendo que cada vez mais novos microrganismos são descritos. Embora existam variações metodológicas, a diversidade que se encontra em amostras clínicas de lesões de cárie deixa em evidência que não existe um único padrão de microbiota compatível com a doença e muito menos a ideia de que só alguns microrganismos sejam os agentes causais da doença (Simon-Soro e Mira ¹¹⁷, 2015). A influência ambiental promove algumas interações microbianas levando a pequenas mudanças na microbiota. Estas alterações se iniciam em estados subclínicos, no qual o equilíbrio entre a microbiota e a

capacidade de recuperação do hospedeiro lentamente vai diminuindo ao mesmo tempo que a cárie vai se desenvolvendo (Marsh ²⁷, 2018; Tanner et al. ¹¹⁸, 2018).

3.8 Substrato (Esmalte Dentário)

O esmalte é um tecido que possui particularidades como composição heterogênea, características mecânicas e organização histológica. Tentar representar o processo carioso em superfícies artificiais (i.e., plástico, vidro etc.) pode resultar em uma interpretação equivocada da doença (Simmer et al. ¹¹⁹, 2010; Teruel et al. ¹²⁰, 2015). A interação entre macromoléculas específicas presentes na saliva e na superfície dos tecidos duros (i.e., hidroxiapatita do esmalte) formam a película adquirida que atua como uma barreira (Hanning e Joiner ⁴², 2006; Siqueira et al. ⁹⁷, 2007). No entanto, películas formadas em diferentes materiais têm diferenças consideráveis para colonização microbiana e desprendimento de camadas de biofilme (Hanning e Hanning ⁹⁸, 2009).

Em situações clínicas, os eletrólitos e proteínas (como mucina, histatina, estaterina etc) provenientes da saliva trabalham no processo de remineralização dentária. A presença contínua de saliva evita a perda severa de minerais ao longo do tempo, influenciando positivamente a biomecânica do esmalte (Richardson et al. ¹²¹, 1993; Dowd ¹²², 1999; Buzalaf et al. ¹²³, 2012; Jordão et al. ¹²⁴, 2017). O oposto acontece em modelos *in vitro* baseados em placas de múltiplos poços, nos quais usualmente utilizam-se meios de cultura para inocular uma espécie ou um consórcio de espécies a serem investigados. Os microrganismos são crescidos em diversas condições nutricionais (utilizando saliva humana, substitutos de saliva, com ou sem meio de crescimento suplementar etc.) e os experimentos são conduzidos por diferentes tempos (McBain ⁷⁸, 2009; Maske et al. ¹⁸, 2016).

Estes modelos são chamados de sistemas fechados e se caracterizam porque os microrganismos permanecem períodos prolongado em caldo de cultura (McBain ⁷⁸, 2009; Maske et al. ¹⁸, 2016), resultando em valores baixos de pH, o que configura um entorno ácido, ocasionado pelos metabólitos ácidos produzidos pelos microrganismos

no biofilme. Esta condição difere de forma significativa da realidade e, consequentemente, os resultados da perda mineral são superestimados (Florez Salamanca et al.¹²⁵, 2020). Assim, esses tipos de modelos representam processos de degradação bioquímica do dente, também denominados de biocorrosão ou erosão, que estão mais relacionados a ação do ambiente ácido sob a superfície do dente, do que diretamente a influência do biofilme *per se* (Dawes ¹²⁶, 2003; Grippo et al. ¹²⁷, 2012).

3.9 Perspectivas Futuras no Estudo da Cárie

Em 1978 foi descrito por Bill Costeron pela primeira vez como os microrganismos são mais facilmente encontrados nos entornos naturais (riachos, pedras etc), aderidos a superfícies e aderidos entre as células microbianas (Lappin-Scott et al. ¹²⁸, 2014). O entendimento destas complexas comunidades microbianas vivas, requerem estratégias multidisciplinares que visam recriar os entornos naturais conseguindo assim a construção de novos conceitos e desenvolvendo novas hipóteses de como microrganismos sobrevivem e modificam seu microambiente para benefício próprio (Lappin-Scott et al. ¹²⁸, 2014, Azeredo et al. ²⁶, 2017). O estudo de sistemas biológicos complexos parece um desafio difícil, mas não impossível de encarar.

No entanto as técnicas de microbiológicas convencionais oferecem respostas limitadas pois é impossível cultivar, diferenciar e trabalhar com algumas espécies de microrganismos. O desenvolvimento de novos métodos e ferramentas mais tecnológicas entregam um maior volume, melhor qualidade e mais detalhes nos resultados das análises (entre elas as tecnologias "ômicas"). Desta forma a migração para novas tecnologias pode ajudar a avaliar a importância de algumas espécies na formação do biofilme orais e cárie dentária. Os *Next Generation Sequencing* (NGS) em conjunto com ambientes controlados em laboratórios podem fornecer resultados específicos que permitam aos pesquisadores realizar melhores inferências dos resultados obtidos em estudos *in vitro* (Metzker ¹²⁹, 2009; Choi ¹³⁰, 2016; Caselli et al. ¹³¹, 2020). Esta vantagem ajuda a entender melhor a fisiologia das células individuais e as interações que acontecem dentro dos biofilmes, mas pela vasta quantidade de

informação é altamente recomendado o trabalho colaborativo nas mais diversas áreas (Azeredo et al.²⁶, 2017).

Ainda assim, relativamente pouca informação está disponível sobre o comportamento deste microrganismo dentro de populações dinâmicas altamente complexas. Desenvolvimento de modelos de biofilmes orais mais realistas e a comparação com resultados clínicos é fundamental para o entendimento do processo patológico.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Corpos de Prova de Esmalte para Teste Microbiológicos

4.1.1 Seleção de coroas de dentes bovinos

Com aprovação do comitê de ética no uso de animais (CEUA: nº 03/2018 – ANEXO A) foram coletados incisivos centrais permanentes de bovinos que seriam descartados em matadouros. Como critério de seleção foram excluídos dentes com cálculos, fraturas, hipoplasia ou alterações morfológicas. Posteriormente, a porção coronal dos dentes foi fixada no suporte metálico da cortadora metalográfica de alta precisão (Isomet 1000; Buehler Ltd., Lake Bluff, IL, EUA). Com o disco diamantado (11-4254 série 15LC, Diamond Blade, Buehler Ltd., Lake Bluff, IL, EUA), submerso em água, foi realizado um corte na porção cervical para separar as coroas das raízes (Figura 3 A e B).

4.1.2 Corte dos dentes e preparo dos discos

Silicone de condensação densa e o catalisador (Zeta plus, Zhermack SpA, Badia Polesine, RO, Itália) foram misturados manualmente, de acordo com as recomendações do fabricante, e colocados dentro de uma caixa metálica de 6,5 x 3,5 x 1,5 cm. A mistura foi recoberta com papel filme PVC para obter uma moldagem grosseira das fases palatinas das porções coronais dos incisivos bovinos. A fixação destas porções dentro da matriz de silicone foi realizada com godiva (SDS; Kerr Corporation, Brea, CA, EUA) deixando a maior quantidade da face vestibular exposta (Figura 3C). Com o auxílio de furadeira de bancada e uma broca diamantada de diâmetro externo de 8 mm - trefina - (Dinser ferramentas diamantadas; São Paulo, SP, Brasil) (Figura 3D) foram cortadas as faces vestibulares dos dentes, os quais permaneceram imersos em água a 4°C. Foram obtidos discos de 7 mm de diâmetro (Figura 3E), os quais foram mantidos dentro da geladeira (4°C) em tampão de adsorção (tampão AB - 50 mmol L⁻¹ KCl, 1 mmol L⁻¹ KPO₄, 1 mmol L⁻¹ CaCl₂, 1 mmol L⁻¹ MgCl₂, em água deionizada, pH 6,5).

Foram processados um total de 480 dentes bovinos para a obtenção dos 252 corpos de prova para a execução do projeto, os dentes foram obtidos de duas fontes: 250 dentes foram o reaproveitamento de coroas de dentes já obtidos por outro pesquisador que usou apenas as raízes (vide cópia do fornecedor anexada – Frigorífico Terra do Boi, Caçu, Goiás) e 230 dentes foram adquiridos do fornecedor incluído no protocolo inicial (vide cópias anexadas – declaração de origem dos dentes Mondelli e da nota fiscal da Dental Brasil).

Os discos foram encaixados em matrizes para o polimento. As matrizes foram confeccionadas a partir de cilindros metálicos de 30 mm de diâmetro, com um orifício central de 7 mm de diâmetro e 1,5 mm de profundidade (Figura 3F). Entre o disco e a matriz foi adicionado uma folha de papel toalha úmida para melhor fixação do disco. Para remoção da dentina, a face de dentina do disco foi submetida a Politriz (Arapol 2V; Arotec S/A Indústria e comércio, Cotia, SP, Brasil) com lixas de carbetto de silício de granulação 220, 600 e 1500 com constante adição de água pelo sistema (Wetordry; 3M, Maplewood, MN, EUA). Os discos tiveram um diâmetro aproximado de 7 mm (Figura 3G) e uma espessura final de aproximada entre 1 a 1,4 mm (Figura 3H), pois a curvatura do dente e os detalhes morfológicos do esmalte não permitem uma espessura homogênea. Os discos finalizados apresentaram uma superfície plana de “esmalte profundo” para realizar as análises, e no lado oposto, superfície de esmalte superficial intacto, preservou-se a anatomia original do dente (Figura 3I).

4.1.3 Caracterização morfológica e mecânica dos discos

Análise da morfologia e espessura dos tecidos

Um total de seis discos de esmalte bovino foram utilizados para inspeção visual da morfologia com ajuda de estéreo microscópio com lente de magnificação de 0,75x (Leica M80; Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha) e microscópio confocal a laser utilizando uma lente MPLFLN 5x e Zoom 1x (Olympus Ix70 OLS 4000, Olympus, Tóquio, Japão) localizado na UFSCar – São Carlos, no laboratório de caracterização estrutural.

Análise de microdureza

A medição da microdureza (Figura 3J) foi realizada na superfície de esmalte superficial polida fazendo oito indentações, com espaçamento de 1 mm na orientação de um quadrado para obter o valor médio de número de dureza de Vickers (VHN) com ajuda de microdurômetro digital utilizando um diamante Vickers, carregado com 100 g de peso por 10 segundos (MMT - 3, Buehler, Lake Bluff, IL, EUA) (Chuenarrom et al.¹³², 2009) localizado na Faculdade de Odontologia de Araraquara (FOAr –UNESP).

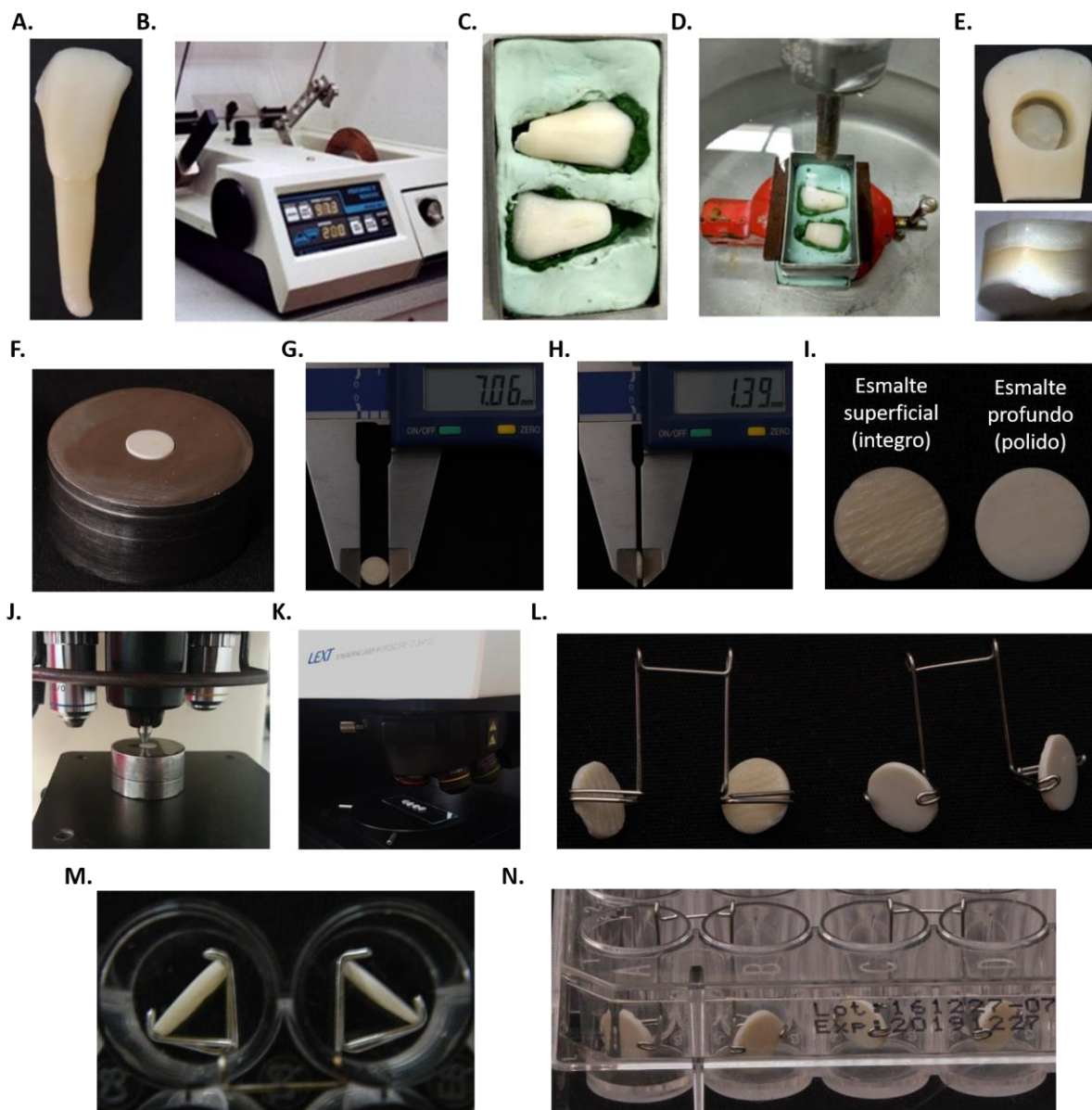
Análise da rugosidade

A rugosidade da superfície de esmalte superficial polida foi calculada indiretamente. As imagens obtidas pelo microscópio confocal (Figura 3K) foram analisadas no software OLS4100 (Olympus lext OLS 4000, Olympus, Tóquio, Japão) localizado na UFSCar – São Carlos, no laboratório de caracterização estrutural. Realizaram-se 10 medições horizontais e 10 verticais para obter o valor médio de rugosidade aritmética Ra (μm) de cada disco.

Análise da morfologia da superfície do esmalte (superficial e profundo) por Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV

Três discos foram separados para esta análise, sendo a superfície interna um disco parcialmente polido, no qual duas cores eram evidentes, a superfície externa de um disco com manchas no esmalte superficial da cor marrom (provavelmente sujeira), e a superfície interna de um disco completamente polido e submetido ao processo de profilaxia (como descrito no próximo item). Os discos foram mantidos por 7 dias em dessecador a vácuo com sílica para remoção da umidade, e posteriormente, foram revestidos por pulverização catódica com ouro.

Figura 3 - Esquema da sequência para obtenção dos discos de esmalte bovino.



O dente bovino (A) foi separado em coroa e raiz utilizando uma cortadora metalográfica e um disco diamantado (B). As porções coronais foram fixadas em matriz de silicone mediante o uso de godiva (C). Com uma furadeira de bancada e broca trefina (D) foram obtidos discos de esmalte/dentina da face vestibular do dente (E). Os discos foram fixados em matriz metálica para o polimento (F). Discos de 7 mm (G) de diâmetro e espessura entre 1 a 1,4 mm (H) foram obtidos. Um lado da anatomia original foi preservado e outro lado de conformação plana (polido) foi utilizada para as análises (I). Na superfície de esmalte polido foram avaliados a microdureza (J) e rugosidade (K). Duplas de discos foram posicionados em dispositivos de fio ortodôntico (L). Os dispositivos permitiam que os discos estivessem firmes dentro das placas de 48 poços, sem encostar nas paredes e no fundo, ao mesmo tempo que se mantinham em posição vertical (M e N).

Fonte: Elaboração própria

As imagens foram adquiridas de diferentes áreas consideradas de interesse com ampliações de 100x e 500x para inspeção da morfologia no Microscópio Eletrônico de Varredura foi realizada (JEOL JSM-6610LV, JEOL, Tóquio, Japão) localizado na Faculdade de Odontologia de Araraquara (FOAr –UNESP). As imagens foram adquiridas para avaliar de forma qualitativa a anatomia que apresentavam as superfícies, e as diferentes tonalidades nos discos tanto na superfície íntegra (antes e após a profilaxia), como na superfície polida (cor branca e cor amarelada).

4.1.4 Limpeza dos discos e posicionamento em dispositivos

A superfície de esmalte superficial foi limpa utilizando micromotor, contra-ângulo, escova de Robson e pasta profilática (Herjos; Coltene Holding AG, Altstätten, Suíça). Os discos que ainda apresentavam manchas ou sujeira foram descartados. Posteriormente, os discos foram posicionados dentro de um frasco Béquer com água deionizada para serem submetidos a banho ultrassônico (Kondortech Digital Ultrasonic cleaner; Kondortech Indústria e Comércio Ltda., São Carlos, SP, Brasil) durante 10 minutos e depois armazenados em tampão AB.

Com fio ortodôntico de CrNi com diâmetro de 0,18 polegadas (Morelli Ortodontia, Sorocaba, Brasil) foram confeccionados dispositivos que sustentavam dois discos de forma estável e perpendicular ao fundo do poço em placas de 48 poços. Os discos foram encaixados de forma que a superfície de esmalte polida ficasse virada para a parte frontal do dispositivo (Figura 3L/M/N).

4.1.5 Esterilização dos discos acoplados nos dispositivos

Foi padronizado que o conjunto dispositivo de fio ortodôntico e discos de esmalte fossem esterilizados em conjunto, e ainda que o disco estivesse submerso em tampão AB, uma vez que os discos de esmalte deveriam ser mantidos hidratados para evitar que ficassem friáveis. Desta forma os discos acoplados nos dispositivos foram posicionados em placas de 48 poços, com 800 µL de tampão AB esterilizado por poço.

A esterilização foi realizada por irradiação gama para preservar as características morfológicas e composição química do esmalte bovino (Viana et al. ¹³³, 2018). Para isso, a placa foi enviada ao Centro de Tecnologia das Radiações-CTR IPEN / CNEN-SP, São Paulo, SP, Brasil) para esterilização por radiação gama com dose de 25 kGr (Irradiador Multipropósito do Co⁶⁰).

Um total de 252 discos de esmalte bovino foram caracterizados e esterilizados. Destes, 72 discos foram utilizados em ensaios para simular uma dieta cariogênica (Objetivo 1: Desenvolver e avaliar diferentes modelos de biofilme) (Florez Salamanca et al. ¹²⁵, 2020); 168 discos foram utilizados em ensaios para simular a colonização secundária e tardia (Objetivo 2: Desenvolver e avaliar estratégias de inoculação). Para descartar possíveis contaminações nos ensaios de colonização foi utilizada uma dupla de discos como controle de qualidade em cada ocasião experimental (apenas meios de cultura sem inóculo microbiano), totalizando 12 discos.

4.2 Inóculo da Microbiota Salivar Humana

4.2.1 Critérios para a seleção de voluntários e coleta da saliva

A saliva foi coletada em três ocasiões nas dependências da Faculdade de Odontologia de Araraquara (FOAr – Araraquara). O material proveniente de uma coleta com nove voluntários (três homens e seis mulheres, $29,2 \pm 5,8$ anos) foi utilizado nos ensaios para simular uma dieta cariogênica. Para obter volume de saliva suficiente para simular a colonização secundária e tardia foram realizados dois dias de coleta. Assim, foram coletados material de 29 voluntários (10 homens e 19 mulheres, $27,3 \pm 5,3$) em um dia, e no outro de 28 voluntários (11 homens e 17 mulheres, $26,6 \pm 3,9$ anos), os quais foram processados como descrito a seguir (Figura 4). A coleta dos nove voluntários foi realizada com a mesma metodologia, sendo o *pool* das amostras processado para obter saliva clarificada e microbiota para a formação de biofilme. Neste caso, a população microbiana não foi avaliada imediatamente após a coleta, como descrito 4.2.2 (Florez Salamanca et al. ¹²⁵, 2020).

Os voluntários selecionados foram aqueles que não apresentavam doenças infecciosas, não estivessem sob administração de antibióticos nos últimos três meses e/ou medicamentos que alterassem o fluxo salivar, não estivessem sob radioterapia ou quimioterapia, mulheres não grávidas, não fumantes e aqueles que não tivessem ingerido bebidas alcoólicas nas últimas 24 horas. Esses voluntários aceitaram permanecer em jejum durante pelo menos 2 horas antes da coleta e aceitaram não realizar procedimentos de higienização oral (escovar os dentes, usar fio/fita dental ou enxaguante bucal) nas últimas 24 horas. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CAAE: 82750117.6.0000.5416 – ANEXO B). A coleta de saliva foi realizada pela manhã. Para isso os voluntários mastigaram um pedaço de parafilme e coletaram entre 20 e 25 mL de saliva em um tubo tipo cônico de 50 mL esterilizado mantido em gelo durante a coleta e transporte.

4.2.2 Processamento da saliva

As amostras de saliva de cada um dos voluntários foram diluídas em uma proporção de 1:1 com tampão AB e centrifugadas (3.942 xg, 4 °C, 20 minutos; Eppendorf 5810 R) para obtenção da porção clarificada e do precipitado.

A porção clarificada, que foi utilizada para a formação da película salivar e como meio de cultura, foi esterilizada em sistema de filtração com filtro de membrana de polietersulfona 0,22 µm de baixa ligação para proteica (Nalgene Rapid-Flow, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). Foi utilizado uma garrafa esterilizada de 2 L para armazenar a saliva de todos os voluntários. Esta foi mantida em gelo durante todo o procedimento. O *pool*, da porção clarificada esterilizada, foi homogeneizado e alíquotado em diferentes volumes de acordo com a necessidade de cada situação experimental, evitando assim o descongelamento e desperdício da saliva. As alíquotas foram identificadas e armazenadas a -80 °C.

Os precipitados, que continham a microbiota e assim foram utilizados para o inóculo, foram ressuspensos em 500 µL de tampão AB, independente do volume e viscosidade, transferidos para um único tubo cônico. Os tubos originais foram lavados

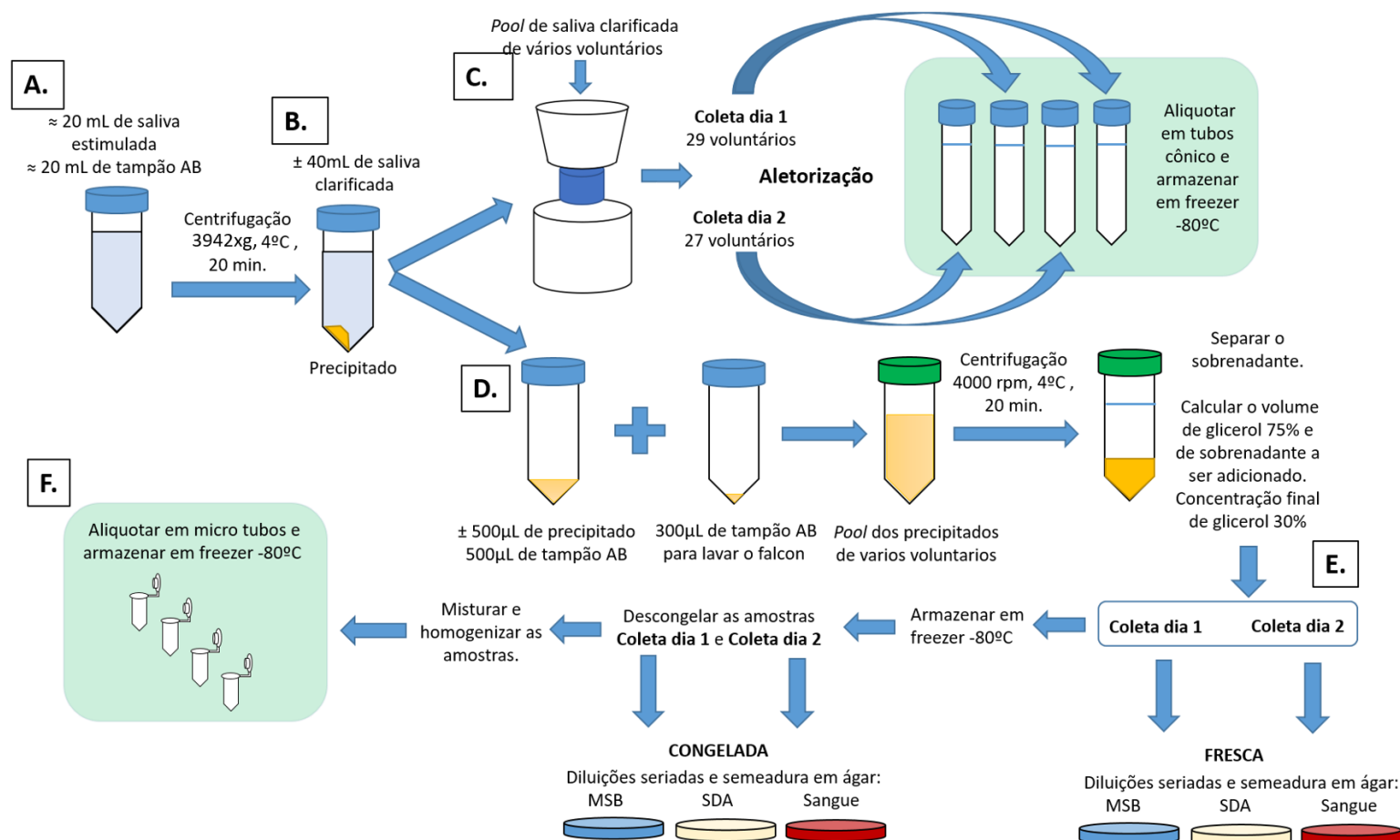
com 300 µL de tampão AB para recuperação do material restante, e transferido para o tubo cônico contendo os precipitados. O tubo cônico, com todos os precipitados, foi centrifugado (3942 x g, 4 °C, 20 minutos; Eppendorf 5810 R). O sobrenadante foi removido e reservado. Para preservar a microbiota, foi adicionado glicerol para uma concentração final de 30 % (Exterkate et al. ¹³⁴, 2010). Para isso partiu-se de solução de glicerol a 75 % e os cálculos foram realizados de acordo com o volume do precipitado obtido. Para otimização da amostra, qualquer ajuste necessário de volume foi utilizado o sobrenadante anteriormente reservado.

4.2.3 Avaliação da microbiota dos precipitados da saliva

Como controle de qualidade, para verificar a microbiota presente na amostra coletada enquanto a variabilidade da população e a influência da metodologia de armazenamento por congelamento (-80 °C por sete dias), uma alíquota de 200 µL das suspensões dos precipitados foi diluída e semeada (duplicata) com 25 µL para cada quadrante (placa dividida em quatro). Foram utilizados diferentes meios de cultura: ágar de dextrose Sabouraud (Neogen) com cloranfenicol 0,001% (Sigma C0378) - (SDA) com diluições de 10^{-1} e 10^0 da suspensão para detectar colônias de *Candida spp.*, ágar Mitis Salivarius (Difco) com bacitracina 0,2 U (Sigma P0125) e telurito de potássio (Sigma P0677) – (MSB) com diluições de 10^{-1} até 10^{-4} para verificar colônias presuntivas de estreptococos do grupo mutans (colônias azul escuro brilhante), e ágar sangue (Sangue) com diluições de 10^{-2} até 10^{-7} para a quantificação de microrganismos totais. Após a incubação, foram realizadas contagens de colônias para cada tipo de meio utilizado e os dados analisados como unidades formadoras de colônia (UFC mL⁻¹). Uma segunda alíquota foi armazenamento a -80 °C e semeadas após sete dias. Desta forma foi avaliado a influência da metodologia de armazenamento na viabilidade dos microrganismos presentes. Após a verificação, as suspensões com os precipitados microbianos coleta 1 e 2 (armazenada a -80 °C) foram descongeladas para serem misturadas e divididas em alíquotas de 1 mL. Estas alíquotas foram armazenadas até o

momento da utilização a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. A cada ocasião uma alíquota foi semeada para controle de qualidade.

Figura 4 - Esquema da sequência para coleta e processamento da saliva.



A) Coleta da saliva em um tubo cônico de 50 mL refrigerado com posterior adição de tampão AB. B) Processamento saliva: C) porção da saliva clarificada foi esterilizada e armazenada a -80°C e D) porção precipitada foi misturada com glicerol com concentração final de 30%. E) Para controle de qualidade da microbiota alíquotas frescas e pós congelamento foram semeadas em ágar Mitis Salivarius com Bacitracina (MSB), ágar de dextrose Sabouraud com cloranfenicol (SDA) e ágar sangue. F) Todas as amostras foram armazenadas a -80°C até o momento do uso.

Fonte: Elaboração própria. Adaptado de Florez Salamanca et al. ¹²⁵, 2020

4.3 Ensaios para Simular Dietas Cariogênicas

Foi idealizado um ensaio com intervalos de tempo com uma duração total de 3 dias (72 horas) para avaliar o crescimento do biofilme em quatro desafios nutricionais (ou seja, modelos de biofilmes, representados na Figura 5) (Florez Salamanca et al. ¹²⁵, 2020). Em todos os modelos o desafio cariogênico é representado pela alternância entre dois diferentes meios de cultura, um com muitas fontes nutricionais (representado com setas vermelhas) e outro com menos (representado com setas azuis). Dois modelos de biofilme foram relatados anteriormente na literatura (McBain et al. ¹³⁵, 2005; Albuquerque et al. ¹³⁶, 2018; Florez Salamanca e Klein ¹⁰⁶, 2018) foram usados como grupos controle. Os outros dois modelos foram projetados para este estudo como grupos experimentais (Florez Salamanca et al. ¹²⁵, 2020).

4.3.1 Modelos de biofilme utilizados para os desafios nutricionais

Modelo 1 ou M1 'Fartura e Miséria' foi baseado em estudos anteriores que utilizaram um caldo de saliva artificial e saliva humana para inoculação (McBain et al. ¹³⁵, 2005). Em 0 horas, o inóculo foi realizado em caldo 'Fartura' (McBain + 0,5% de sacarose) com 25% de saliva e incubado por 6 horas, depois foram alternadas com 18 horas em 'Miséria' (McBain sem sacarose), resultando em um total de duas trocas de meios de cultura por dia (Albuquerque et al. ¹³⁶, 2018).

Modelo 2 ou M2 'Abundância e Escassez' também foi baseada em pesquisas anteriores utilizando biofilmes de espécies mistas, contendo *S. mutans* (Castillo Pedraza et al. ²⁴, 2017; Florez Salamanca e Klein ¹⁰⁶, 2018). As 0 horas, o inóculo foi realizado em caldo 'Escassez' [triptona-extrato de levedura (TY; 2,5% de triptona, 1,5% de extrato de levedura, pH 7,0) + 0,1% de sacarose + 25% de saliva] e incubado por 19 horas. Após esse período o meio foi substituído por 'Escassez' fresco. Dez horas depois (às 29 horas), o meio foi alternado para 'Abundância' (TY + 0,5% de sacarose + 1% de amido + 25% de saliva) e incubado por 14 horas, resultando em um total de duas trocas de meios de cultura por dia. A concentração de saliva também foi baseada

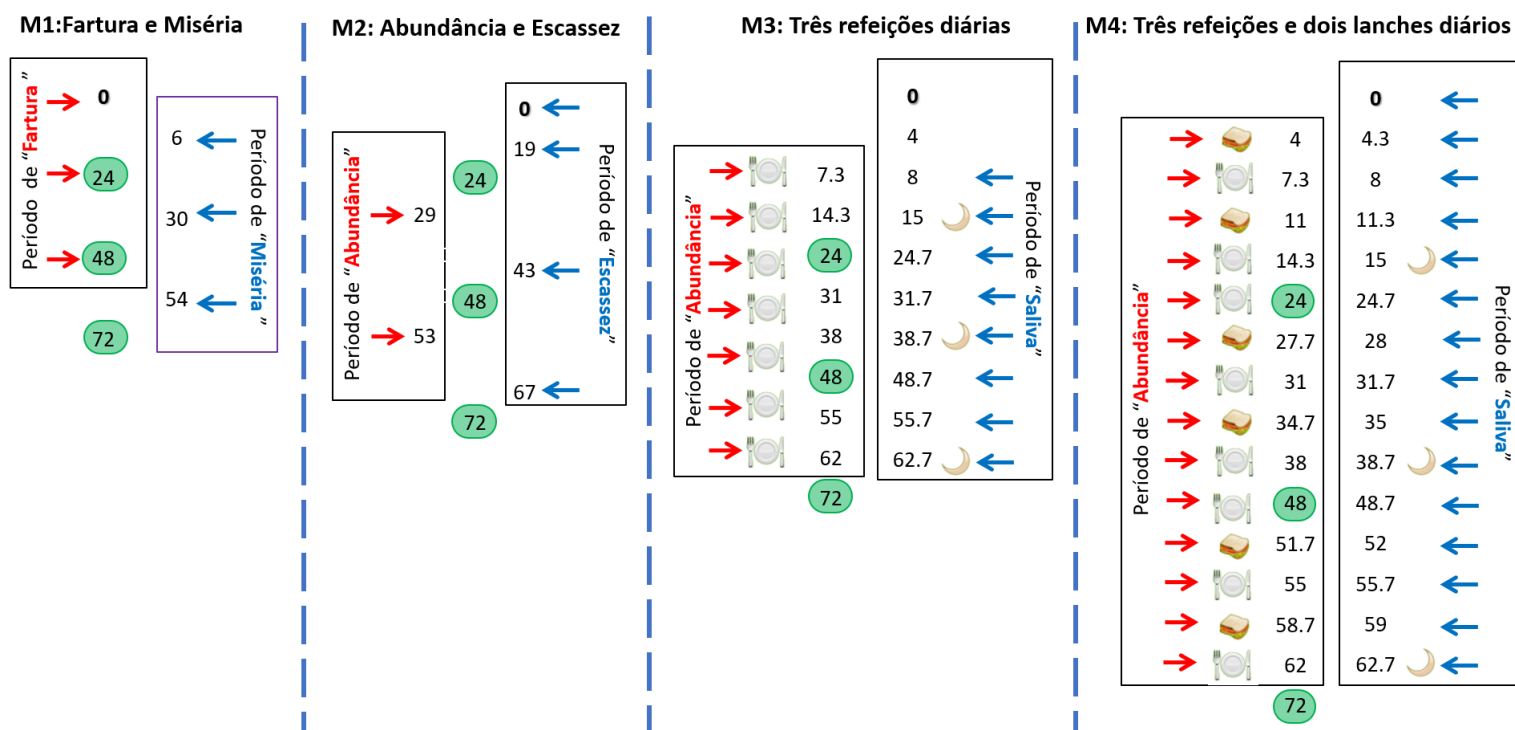
em um estudo anterior e serviu para fornecer hidrolisados de amido para o meio de cultura por meio de hidrólise por α -amilase salivar e fornecer substratos (ureia e arginina) para produção de álcali por algumas espécies microbianas (Rogers et al. ³², 2001).

Modelo 3 ou M3, 'Três refeições diárias', foi desenvolvido no estudo atual. Em 0 horas o inóculo foi realizado em 'Caldo Saliva' (75% de saliva humana clarificada e filtrada + 25% de TY) e incubado por 4 horas, tempo relatado na literatura para colonização microbiana inicial (Brecx et al. ^{137, 138}, 1980, 1981; Kolenbrander et al. ⁹⁹, 2002), seguido por três horas em 'caldo de saliva' fresco (simulando o intervalo entre as refeições). Posteriormente, os discos foram expostos a 40 minutos em 'Abundância' (TY + 0,5% de sacarose + 1% de amido + 25% de saliva), simulando o consumo de uma refeição. Dessa maneira houve uma exposição intermitente de carboidratos diariamente, totalizando três refeições ('Abundância'), alternado com três períodos entre as refeições ('Caldo Saliva'). Para simular o período de descanso/sono a última exposição foi em caldo saliva por 10 horas (Florez Salamanca et al. ¹²⁵, 2020).

Modelo 4 ou M4 'Três refeições e dois lanches diários' foi desenvolvido no estudo atual. A sequência dos meios de cultura utilizados foi semelhante à utilizada para o M3. O inóculo às 0 horas, a colonização inicial e o tempo de descanso/sono permaneceram os mesmos. Porém, foram acrescentados dois períodos de exposição a carboidratos por 20 minutos, simulando o consumo de dois lanches entre as refeições (pela manhã e pela tarde). Assim, houve um total de cinco exposições a carboidratos, três delas consideradas como refeições (40 minutos) e duas como lanches (20 minutos) (Florez Salamanca et al. ¹²⁵, 2020).

A concentração de sacarose e amido para M3 e M4 foi a mesma utilizada em 'Abundância e Escassez', os quais foram baseados em estudos anteriores com biofilmes mistos contendo *S. mutans* (Castillo Pedraza et al. ²⁴, 2017; Florez Salamanca e Klein ¹⁰⁶, 2018).

Figura 5 - Desenho experimental comparando quatro modelos de desafio nutricional para o desenvolvimento de biofilmes cariogênicos.



Como substrato foram utilizados discos de esmalte bovino revestidos com película salivar. Diferentes desafios nutricionais (modelos de biofilme) foram utilizados e foi avaliado a influência na desmineralização do dente, e na biomassa e dinâmica populacional do biofilme. Dois modelos são relatados na literatura e considerados modelos cariogênicos: M1 'Fartura e miséria' (McBain et al. ¹³⁵, 2005; Albuquerque et al. ¹³⁶, 2018) e M2 'Abundância e Escassez' (Florez Salamanca e Klein ¹⁰⁶, 2018). Os outros dois modelos foram sugeridos e formulados neste trabalho para reproduzir de forma geral a cavidade bucal e seu ambiente, e assim o desenvolvimento da cárie dentária: M3 'Três refeições diárias' e M4 'Três refeições e dois lanches diários'. Em todos os modelos, o desafio cariogênico foi representado por uma alternância entre dois meios de cultura diferentes: um rico em fontes nutricionais (setas vermelhas -Período de Fartura ou Abundância), e outro com meio restrito destes (setas azuis - Período de escassez ou Saliva). Antes e após cada troca de meios o pH dos mesmos foi aferido e registrado. Os biofilmes formados e os discos de esmalte foram avaliados nas idades 0, 24, 48 e 72 horas (elipses verdes). Para todos os modelos foi realizado uma única inoculação no tempo inicial, idade 0 horas (negrito).

Fonte: Elaboração própria. Adaptado de Florez Salamanca et al. ¹²⁵, 2020

4.3.2 Formação dos biofilmes

Vinte e quatro discos de esmalte bovino caracterizados, acoplados ao dispositivo metálico, previamente esterilizado, foram aleatorizados entre os quatro modelos de biofilme no início de cada ocasião experimental. Dois discos-biofilme foram usados para analisar cada fase de desenvolvimento do biofilme ou idade (24, 48 e 72 horas). Três ocasiões experimentais independentes foram realizadas, totalizando $n = 6$ por idade por modelo.

Alíquotas de 800 μL da porção clarificada esterilizada foram colocadas em cada poço de placas de 48 poços. Então, cada dispositivo com dois discos de esmalte bovino foi transferido para a placa, seguido por incubação (incubadora orbital a 37 °C, 75 rpm, 1 hora) para formação da película salivar (Lemos et al.⁷⁴, 2010).

O inóculo foi realizado diluindo a solução dos precipitados (nove voluntários) 1:10 em meio de cultura (caldo), o qual era dependente da condição experimental (modelo de biofilme). Em seguida, 800 μL do meio inoculado foram transferidos para cada poço contendo os discos revestidos com saliva. O restante do inóculo foi utilizado para calcular as quantidades de microrganismo no tempo inicial (0 horas) realizando uma diluição em série e plaqueamento nos três tipos de meio de cultura (SDA, MSB e Sangue), seguido de incubação (48 horas, 37 °C, 5% de CO_2). Para o desenvolvimento dos biofilmes os desafios nutricionais foram seguidos, como representado na Figura 5.

Como controle de qualidade para descartar possíveis contaminações foram colocados 800 μL de cada caldo, seguindo toda a sequência das trocas do meio de cultura, mas sem inóculo.

4.3.3 Avaliação da mudança de pH do meio de cultura

Os valores de pH do meio de cultura fresco (sem inóculo) e experimental (com inóculos resultantes das incubações com biofilmes) foram coletados em todos os tempos das substituições de meio utilizando um pHmetro digital (Quaxtron Qx 1500 plus).

4.3.4 Processamento do biofilme

Nas idades de 24, 48 e 72 horas dois discos-biofilme de cada modelo foram lavados três vezes por imersão em solução salina (0,89% NaCl) esterilizado e seguiram a seguinte sequência (Figura 6). Os discos-biofilme foram removidos do dispositivo utilizando pinça esterilizada, cuidadosamente para não tocar na superfície. Cada amostra foi colocada em tubo de vidro esterilizado com 0,5 mL de NaCl 0,89%, submetido à homogeneização em vórtex. Os tubos contendo os discos-biofilme foram transferidos para um frasco béquer com água e gelo para efetuar a remoção da biomassa da superfície, usando banho ultrassônico (Kondortech Digital Ultrasonic Cleaner, Kondortech Indústria e Comércio Ltda., São Carlos, Brasil) durante 10 minutos para o desprendimento do biofilme dos discos. Posteriormente, duas lavagens do tubo contendo o disco foram realizadas com 0,5 mL repetindo a etapa anterior, obtendo-se um volume final de 1,5 mL de suspensão de biofilme (Figura 6).

Cada suspensão de biofilme foi sonicada usando uma sonda (sonicador Q125, Q Sonica, Newtown, CT, USA) a 7 W por 30 segundos para permitir uma homogeneização do biofilme.

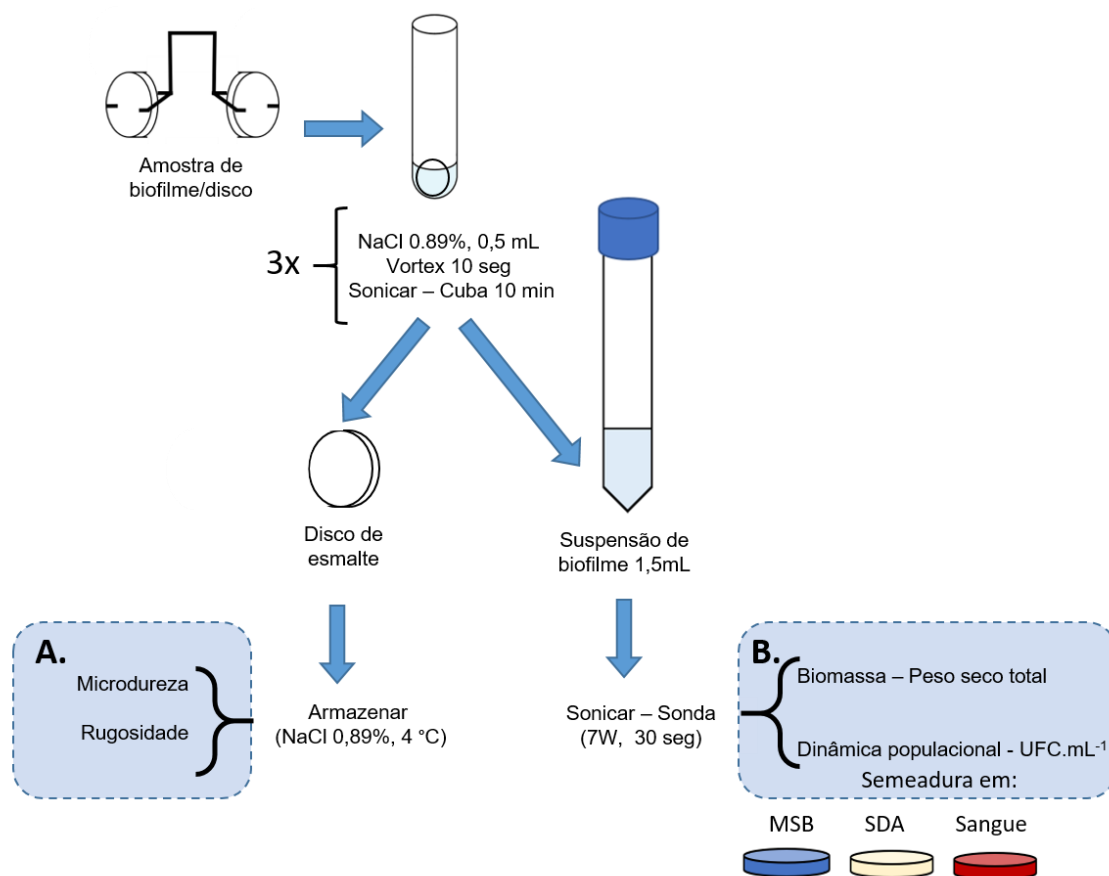
4.3.5 Avaliação da dinâmica da população microbiana

Duas alíquotas de 100 μ L (duplicata) foram tomadas para realizar a diluição seriada para plaqueamento nos três tipos de meio de cultura (SDA, MSB e Sangue), seguido de incubação (48 horas, 37 °C, 5% de CO₂), como descrito no item 4.2.3.). Posteriormente, calcularam-se as UFC.mL⁻¹ dos diferentes grupos nas três idades.

4.3.6 Avaliação da biomassa total

Uma alíquota de 1 mL de cada amostra foi colocada em recipientes de alumínio, previamente pesados, e submetidos a secagem total em estufa (24 horas, 60 °C). Estes recipientes foram pesados novamente para avaliação do peso seco (biomassa). Como controle, o mesmo procedimento foi realizado com 1 mL de NaCl 0,89%, o valor obtido foi subtraído de cada amostra.

Figura 6 - Esquema da sequência do processamento dos discos e biofilmes após diferentes desafios nutricionais.



Nas idades iniciais (0 horas) e finais (24, 48 e 72 horas) os discos de esmalte foram processados e analisados enquanto a microdureza e a rugosidade (A). As suspensões de biofilme resultante do processamento foram submetidas a análise da biomassa total (peso seco total) e da dinâmica populacional por UFC mL⁻¹ (B).

Fonte: Elaboração própria.

4.3.7 Avaliação da dureza e rugosidade superficial do esmalte

Os discos de esmalte provenientes do processamento dos biofilmes foram armazenados em 1 mL de NaCl 0,89% esterilizado. As superfícies planas dos discos de esmalte, previamente caracterizadas, foram submetidas as análises de microdureza para obter o valor médio de VHN (100g, 10 seg, Buehler, Lake Bluff, IL, EUA) e de rugosidade para obter o valor médio de Ra (análise das imagens obtidas no software OLS4100, Olympus lext OLS 4000, Olympus, Tóquio, Japão) como descrito anteriormente (item 4.1.3).

4.4 Ensaio para Simular a Colonização Secundária e Tardia durante a Formação dos Biofilmes

Para esta análise foi utilizado o Modelo 3 - 'Três refeições diárias' para representar a alternância das fontes nutricionais, que configura o desafio nutricional para os microrganismos. Contudo, para simular a introdução dos colonizadores secundários e tardios presentes na microbiota salivar na dinâmica de formação do biofilme, foi idealizado um ensaio para a comparação de duas estratégias de inoculação. Uma foi chamada de estratégia de inoculação única (UNI), a qual foi realizada no momento inicial (0 horas), e a outra de estratégia de inoculações múltiplas (MULTI), realizada tanto no momento inicial como ao longo do experimento (Figura 7).

Assim, nas duas estratégias foi realizado o inóculo inicial (idade 0 horas) em 'caldo de saliva' na diluição de 1:10. Na estratégia MULTI todas as inoculações foram realizadas nas trocas de meio para 'caldo de saliva' (período de saliva), com a ressalva que o inóculo foi diluído 1:20. Na estratégia MULTI foram realizadas um total de 22 inoculações nos 7 dias consecutivos de cada experimento. Os ensaios foram desenvolvidos em duas etapas. A primeira etapa teve o objetivo de avaliar as mudanças de pH do meio de cultura, a arquitetura dos biofilmes, a composição do biofilme (população microbiana e matriz extracelular) e as alterações nas superfícies dos discos de esmalte.

A segunda etapa (APÊNDICE A) teve como objetivo final avaliar a dinâmica da expressão de genes de alguns microrganismos, entre eles *S. mutans* durante o desenvolvimento do biofilme. Foi submetida na FAPESP (processo 2020/04351-6) a proposta para realização de estágio de pesquisa no exterior na *University of Florida College of Dentistry* com orientação por parte da Dra. Jacqueline Abranches com para avaliar o transcriptoma dos biofilmes via RNA-seq dando foco nas principais espécies detectadas nos dados do DNaseq e ainda elucidar o papel de *S. mutans* do biofilme. Porém, infelizmente, a proposta foi cancelada pela decorrente pandemia gerada pelo SAR-CoV-2.

4.4.1 Formação dos biofilmes

Trinta e dois discos de esmalte bovino caracterizados, acoplados ao dispositivo metálico, previamente esterilizado, foram aleatorizados entre as duas estratégias de inoculação. A cada fase de desenvolvimento do biofilme (idade) foram utilizados dois discos-biofilmes. Três ocasiões experimentais independentes foram realizadas, totalizando $n=6$ por idade por grupo. Em todas as ocasiões experimentais uma dupla de discos não foi inoculada e seguiu toda a sequência das trocas do meio de cultura, servindo desta forma como controle de qualidade para descartar possíveis contaminações.

Saliva clarificada esterilizada sem microrganismos foi descongelada e alíquotas de 800 μL foram colocadas em cada poço de placas de 48 poços. Então, cada dispositivo com dois discos de esmalte bovino foi transferido para a placa, seguido por incubação (incubadora orbital a 37 ° C, 75 rpm, 1 hora) para formação da película salivar (Lemos et al.⁷⁴, 2010).

O inóculo foi realizado diluindo a solução dos precipitados (57 voluntários) 1:10 em 'caldo saliva'. Em seguida, 800 μL do meio inoculado foram transferidos para cada poço contendo os discos revestidos com saliva. O restante do inóculo foi utilizado para calcular a quantidade de microrganismo no tempo inicial (0 horas) realizando uma diluição em série e plaqueamento nos meios de cultura MSB, SDA, Sangue e em Ágar infusão de coração e cérebro (*Brain Heart Infusion*) com Ágar de Triptona de Soja com extrato de levedura e hemina acidificado, pH 5,0 (BHI acidificado) (Tanner et al.¹⁰⁹, 2011). No ágar BHI acidificado foram observadas duas morfologias, colônias com maior tamanho as quais foram classificadas como Bacilos Gram positivos e colônias de menor tamanho as quais foram classificadas como Estreptococos Gram positivos. Esta classificação foi confirmada mediante coloração de Gram mediante.

Na idade 48 horas foi necessário juntar o material proveniente do processamento de dois discos-biofilmes para obter amostra suficiente para os ensaios propostos para esta idade, levando em conta que o cálculo final foi ajustado para todos os resultados obtidos.

4.4.2 Avaliação da mudança de pH do meio de cultura

Os valores de pH do meio de cultura fresco (sem inóculo) e experimental (com inóculos resultantes das incubações com biofilmes) foram coletados nos tempos das substituições de meio utilizando um pHmetro digital (Quaxtron Qx 1500 plus).

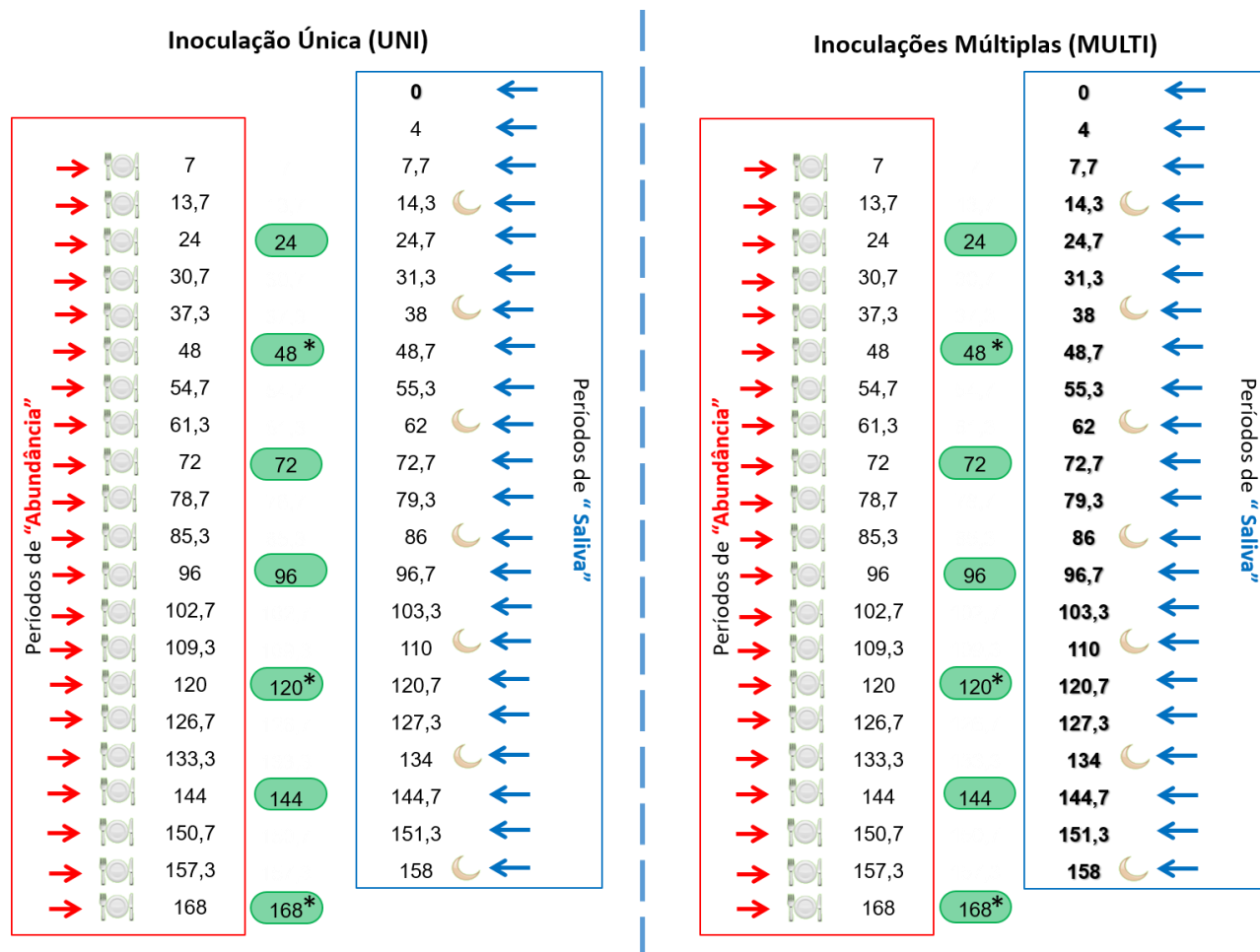
4.4.3 Avaliação da arquitetura de biofilmes por MEV

Nas idades 48, 120 e 168 horas foram utilizados seis discos-biofilmes adicionais para avaliar a arquitetura dos biofilmes utilizando como técnica a microscopia eletrônica de varredura, assim a cada idade foram removidos dois discos-biofilmes de cada grupo para análise.

Ainda acoplados ao dispositivo de fio ortodôntico, os discos-biofilmes foram lavados cuidadosamente por imersão em NaCl 0,89% e transferidos para um poço contendo glutaraldeído 2,5% (pH 7,4) por uma hora em temperatura ambiente para fixação do biofilme. Em seguida, foram realizadas três lavagens por imersão em solução salina tamponada com (PBS – 140 mmol L⁻¹ NaCl, 3 mmol L⁻¹ KCl, 4 mmol L⁻¹ Na₂HPO₄, 1,4 mmol L⁻¹ KH₂PO₄, em água deionizada, pH 7,3), e posteriormente submetidas a uma série gradativa de etanol para a etapa de desidratação (etanol 70% por uma hora; etanol 90% por uma hora e 5 vezes com etanol 100% por 30 minutos) (Tavares et al.¹³⁹, 2018).

As amostras foram mantidas em dessecador a vácuo com sílica para garantir que estivessem livres de umidade, armazenadas por 7 dias ou mais e, em seguida, revestidas por pulverização catódica com ouro. Imagens em alta ampliação (× 5000) foram adquiridas de diferentes áreas dos discos-biofilmes com o Microscópio Eletrônico de Varredura (JEOL JSM-6610LV, JEOL, Tóquio, Japão) localizado na Faculdade de Odontologia (FOAr – UNESP).

Figura 7 - Desenho experimental comparando duas estratégias de inoculação para o desenvolvimento de biofilmes cariogênicos utilizando o desafio nutricional M3 'Três refeições diárias'.



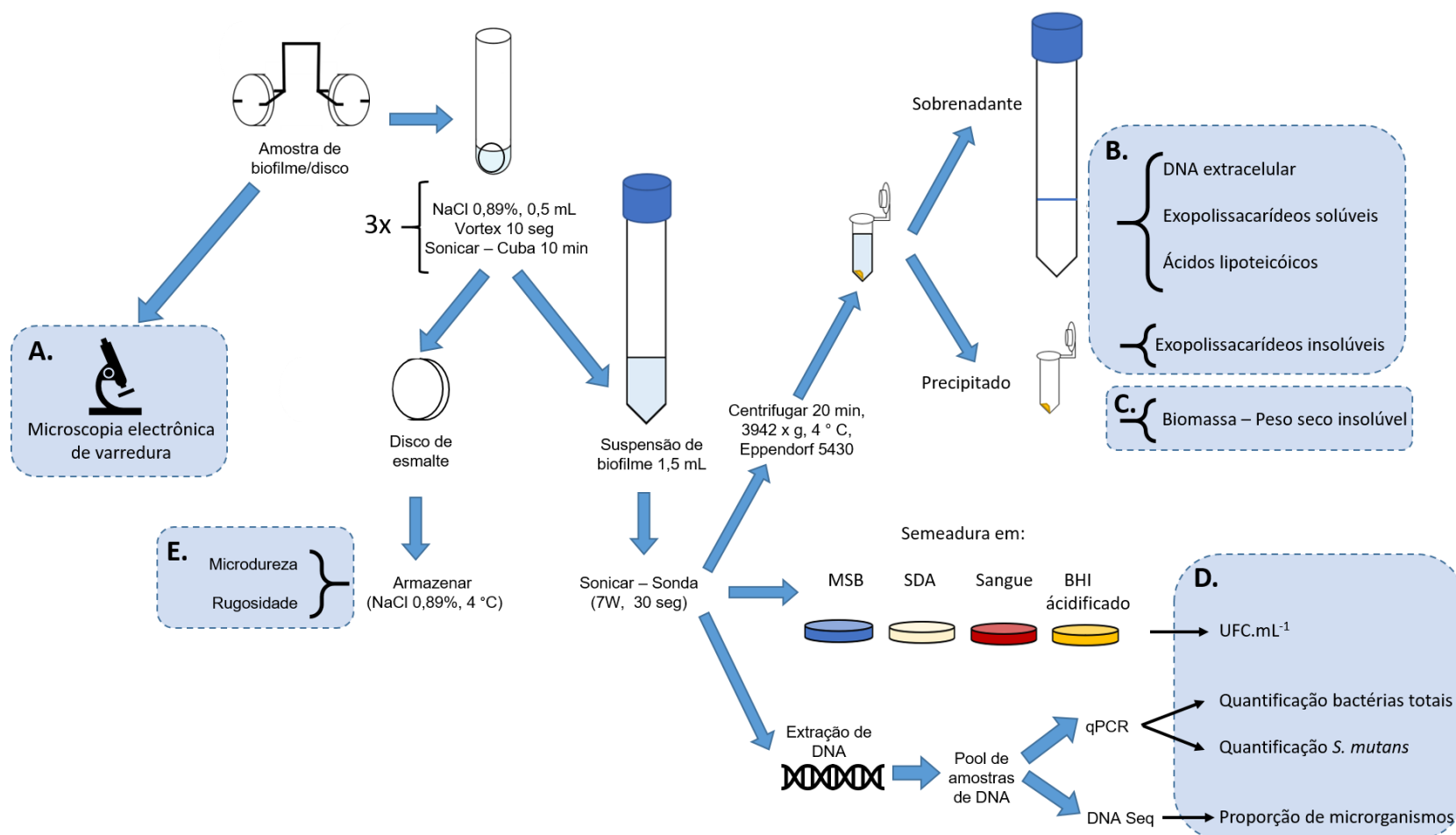
Como substrato foram utilizados discos de esmalte bovino revestidos com película salivar. Foram utilizadas duas estratégias de inoculação para simular a introdução de novos microrganismos no biofilme. Foram avaliados o esmalte bovino (desmineralização) e os biofilmes (biomassa, dinâmica populacional microbiana, arquitetura e composição da matriz extracelular). De acordo com M3, as setas vermelhas indicam períodos de "abundância" (TY + sacarose 0,5% + 1% amido + 25% Saliva), simulando as refeições (total de três refeições com exposição de 40 minutos cada). Estes foram alternados com Períodos de "Saliva" (75% saliva humana clarificada e filtrado + 25% TY), simulando o período entre as refeições (exposição de 6 horas). Após 14,3 horas de protocolo, os biofilmes eram submetidos a um período de descanso/sono (Período de "Saliva" – 10 horas de duração). As idades em negrito representam as inoculações. No modelo Inoculação Única (UNI) foi realizado uma inoculação na idade 0 horas. No modelo Inoculações Múltiplas (MULTI) foi realizado um total de 22 inoculações, as quais coincidem com o Período de "Saliva". Antes e após cada troca de meios o pH dos mesmos foi aferido e registrado. Os biofilmes formados e os discos de esmalte foram avaliados nas idades destacadas pelas elipses verdes. A composição da matriz extracelular e arquitetura do biofilme foram analisadas nas idades 48, 120 e 168 horas, destacadas pelo asterisco.

Fonte: Elaboração própria

4.4.4 Processamento dos biofilmes

Os biofilmes foram removidos dos discos como explicado anteriormente (item 4.3.4) e as suspensões foram sonicadas em sonda (sonicador Q125, Q Sonica, Newtown, CT, EUA) a 7 W de potência por 30 segundos para permitir uma homogeneização do biofilme. As suspensões dos biofilmes e os discos foram utilizados para realizar as análises que serão descritas a seguir (Figura 8).

Figura 8 - Esquema da sequência do processamento dos biofilmes formados em diferentes estratégias de inoculação.



Discos de esmalte com biofilmes intactos nas idades de 48, 120 e 168 horas foram utilizados para analisar a arquitetura dos biofilmes por microscopia eletrônica de varredura (A). Os discos de esmalte foram processados e as suspensões de biofilme, resultante do processamento, foram analisadas para avaliação da composição da matriz extracelular nas idades de 48, 120 e 168 horas (B), biomassa nas idades de 48, 120 e 168 horas (C) e dinâmica populacional nas idades de 0, 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas (D). Nestas idades a microdureza dos discos foi analisada, enquanto a rugosidade foi avaliada unicamente as 0 e as 168h. Estas análises foram realizadas para comparar as mudanças antes e após do crescimento dos biofilmes.

Fonte: Elaboração própria

4.4.5 Avaliação da dinâmica da população microbiana

Avaliação da população via UFC mL⁻¹

Uma alíquota de 150 µL de cada amostra foi utilizada para realizar diluição seriada e plaqueamento em duplicata nos meios de cultura MSB, SDA, Sangue e BHI acidificado. As placas foram incubadas (37 °C, 5% de CO₂) e após 48 horas as colônias foram contadas para realizar o cálculo de UFC mL⁻¹ (item 4.2.3).

Avaliação da população via DNaseq

Para a extração de DNA e o sequenciamento genético para determinar a microbiota bacteriana foram armazenadas a -20 °C alíquotas com um volume maior ou igual a 200 µL. Também foram utilizadas três alíquotas da solução dos precipitados (57 voluntários). As amostras foram tratadas com *propidium monoazide* (PMA) para isolar apenas o DNA genômico de células vivas (Nocker et al. ¹⁴⁰, 2007). Posteriormente, foi realizada a extração e purificação do DNA genômico com o kit MasterPure™ da EPICENTER. Foi utilizada espectrofotometria para avaliar a quantidade (densidade óptica a 260 nm) e pureza (proporção de densidades ópticas a 260 e 280 nm) do DNA total (NanoDrop DS-11 DS-11; Denovix, Wilmington, DE).

Um *pool* do DNA das amostras do mesmo modelo, idade e ocasião foi realizado utilizando a mesma quantidade de material genético (n= 3 por idade por grupo). A concentração final foi de 100 ng/µL, em um volume de 50 µL (Tabelas 1, 2 e 3). As amostras foram desidratadas a 25 °C por aproximadamente 4 horas em concentrador de amostras (RVC 2–18 CD Plus, Christ) e armazenadas até envio por FedEx para análise de sequenciamento e o restante do material genético foi armazenado.

Tabela 1 - Rendimento do DNA de amostras de biofilme do grupo UNI e cálculo para *pool*.

Idade	Amostra UNI	Quantidade (ng/μl)	Volume de cada amostra para <i>pool</i>		Quantidade (ng/μl) no <i>pool</i>	Volume do <i>pool</i>	Rendimento (μg)
			DNA 1	DNA 2			
24	I 1	412,7	5,5	8,3	85,0	50	4,3
	I 2	271,1					
	II 1	252,3	8,9	5,1	84,9	50	4,2
	II 2	440,4					
	III 1	227,3	9,9	5,4	85,2	50	4,3
	III 2	413,8					
48	I 1	799,5	2,8	3,2	94,2	50	4,7
	I 2	702,6					
	II 1	334,1	6,7	6,2	80,6	50	4,0
	II 2	361,0					
	III 1	465,3	4,8	2,6	84,2	50	4,2
	III 2	856,9					
72	I 1	703,7	3,2	3,3	87,0	50	4,4
	I 2	675,5					
	II 1	643,3	3,5	3,0	79,4	50	4,0
	II 2	745,1					
	III 1	1521,3	1,5	1,5	86,8	50	4,3
	III 2	1549,0					
96	I 1	1636,4	1,4	1,6	96,0	50	4,8
	I 2	1390,8					
	II 1	1069,0	2,1	1,6	84,3	50	4,2
	II 2	1442,0					
	III 1	680,2	3,3	-	42,9	50	2,1
	-	-					
120	III 2	415,8	5,4	2,6			
	I 2	852,7			93,6	50	4,7
	II 1	638,4	3,5	2,9			
	II 2	782,5			79,2	50	4,0
	III 1	828,9	2,7	3,8			
	III 2	585,7			84,3	50	4,2
144	I 1	3426,5	1,3	1,7			
	I 2	2589,7			93,0	100	9,3
	II 1	1417,6	1,6	1,7			
	II 2	1359,2			80,9	100	8,1
	III 1	2205,0	2,0	1,9			
	III 2	2396,1			91,2	100	9,1
168	I 1	754,9	3,0	1,7			
	I 2	1318,0			86,3	50	4,3
	II 1	658,5	3,4	3,6			
	II 2	633,1			80,1	50	4,0
	III 1	1066,1	2,1	2,5			
	III 2	901,1			87,9	50	4,4

Números romanos representam a ocasião, números arábicos as duplicatas. Fonte: Elaboração própria.

Tabela 2 - Rendimento do DNA de amostras de biofilme do grupo MULTI e cálculo para *pool*.

Idade	Amostra MULTI	Quantidade (ng/μl)	Volume de cada amostra para <i>pool</i>		Quantidade (ng/μl) no <i>pool</i>	Volume do <i>pool</i>	Rendimento (μg)
			DNA 1	DNA 2			
24	I 1	126.6	11.4	12.3	105.3	32	
	I 2	116.9					3,4
	II 1	171.7	8.4	17.2	88.5	32	0,0
	II 2	83.6					2,8
	III 1	201.7	11.2	12.1	89.4	50	0,0
	III 2	186.0					4,5
48	I 1	290.6	7.7	8.8	86.9	50	0,0
	I 2	254.4					4,3
	II 1	84.7	17.0	12.3	80.1	32	0,0
	II 2	117.0					2,6
	III 1	315.5	7.1	7.1	79.0	50	0,0
	III 2	315.7					4,0
72	I 1	1648.0	1.4	1.3	84.3	50	0,0
	I 2	1686.5					4,2
	II 1	279.6	8.0	7.9	86.2	50	0,0
	II 2	286.5					4,3
	III 1	524.3	4.3	6.8	83.6	50	0,0
	III 2	329.4					4,2
96	I 1	1500.0	1.5	2.4	91.8	50	0,0
	I 2	928.4					4,6
	II 1	362.0	6.2	2.9	96.3	50	0,0
	II 2	768.3					4,8
	III 1	1328.6	1.7	1.8	84.3	50	0,0
	III 2	1222.3					4,2
120	III 2	1326.9	1.7	2.0	87.4	50	0,0
	I 2	1132.9					4,4
	II 1	524.5	4.3	5.8	87.9	50	0,0
	II 2	390.4					4,4
	III 1	457.2	4.9	4.1	80.6	50	0,0
	III 2	548.5					4,0
144	I 1	2485.4	1.8	2.4	90.7	100	0,0
	I 2	1874.6					9,1
	II 1	563.0	4.0	2.8	82.6	50	0,0
	II 2	810.5					4,1
	III 1	1896.2	1.2	1.6	87.6	50	0,0
	III 2	1375.1					4,4
168	I 1	532.0	4.2	3.1	83.0	50	0,0
	I 2	728.2					4,2
	II 1	505.5	4.5	5.9	82.0	50	0,0
	II 2	383.1					4,1
	III 1	605.6	3.7	2.4	83.3	50	0,0
	III 2	941.4					4,2

Números romanos representam a ocasião, números arábicos as duplicatas. Fonte: Elaboração própria.

Tabela 3 - Rendimento do DNA das amostras de *pool* de microbiota de 57 voluntários e de controle de que não existia material genético que interferisse nos caldos de cultura.

Idade	Amostra UNI	Quantidade (ng/μl)	Volume de amostra para <i>pool</i>	Quantidade (ng/μl) no <i>pool</i>	Volume do <i>pool</i>	Rendimento
	I	3533,3	1,3	42,4	100	4,2
	I	3066,5	1,5	42,6	100	4,3
Inóculo	III	3457,6	1,3	41,6	100	4,2
	Abundância	9,3				
Caldo	Saliva	14,5				

Números romanos representam a ocasião, números arábicos as duplicatas. Fonte: Elaboração própria.

Posteriormente foi enviando um relatório pela empresa explicando o processamento realizado e os resultados obtidos (BGI ²⁰⁰, 2020). Uma vez que a empresa BGI Co., Ltd. recebeu as amostras de DNA, foi realizado um teste de qualidade. Todas as amostras apresentaram DNA apto para construção de uma biblioteca de 16S rRNA da região V1-V3. Essa região foi utilizada por ser a mesma utilizada nos estudos com *Human Oral Microbe Identification using Next Generation Sequencing* (HOMINGS) <https://homings.forsyth.org/> (que seria a metodologia proposta inicialmente no projeto). Para o produto de PCR, as extremidades denteadas do DNA fragmento seria convertido em extremidades cegas usando polimerase de DNA de T4, fragmento de Klenow e polinucleotídeo quinase de T4. Em seguida, foi adicionado uma base 'A' a cada extremidade 3' para facilitar a adição adaptadores. Depois de tudo isso, fragmentos muito curtos foram removidos por esferas Ampure. Para DNA genômico, foi utilizado *primer* de fusão com índice duplo e adaptadores para PCR, fragmentos muito curtos foram também removidos por esferas Ampure. Em ambos os casos, apenas a biblioteca qualificada pode ser usada para sequenciamento.

Os dados brutos foram filtrados para eliminar a poluição do adaptador e a baixa qualidade, obtendo leituras limpas. Em seguida, as leituras emparelhadas com sobreposição foram mescladas às *tags*, as quais foram agrupadas em Unidades Taxonômicas Operativas (*Operational Taxonomic Unit* - OTU) em 97% de similaridade de sequência. As classificações taxonômicas foram atribuídas à sequência representativa da OTU usando o *Ribosomal Database Project* (RDP) *Naive Bayesian Classifier* v.2.2. Por fim, diversidade alfa, a diversidade beta e a seleção de diferentes espécies foram analisadas com base em OTU e classificações taxonômicas.

A fim de obter resultados mais precisos e confiáveis em análises de bioinformática subsequentes, os dados brutos foram pré-processados para obter dados limpos (Fadrosh et al. ¹⁴¹, 2014). As leituras emparelhadas foram geradas com a plataforma *Illumina HiSeq / MiSeq*, em seguida, as leituras com adaptadores de sequenciamento, base N, base poli, baixa qualidade etc. foram filtradas. Quando duas leituras emparelhadas se sobrepuseram, a sequência de consenso foi gerada por Ajuste rápido de comprimento de leituras curtas, (*Fast Length Adjustment of Short reads* - FLASH v1.2.11) tendo comprimento mínimo de sobreposição: 15 bp e razão de incompatibilidade da região sobreposta: $\leq 0,1$ (Mogoč e Salzberg ¹⁴², 2011).

As leituras emparelhadas de alta qualidade foram combinadas as *tags* com base em sobreposições. 3192.983 *tags* foram obtidas no total com 66.520 *tags* por amostra em média, e comprimento médio de 534 bp. Após a remoção das sequências de iniciadores, os marcadores sem iniciadores foram 314.4513 no total, com 65.510 marcadores por amostra em média, e o comprimento médio é de 497 pb. As *tags* foram agrupadas em OTU por scripts do *software* USEARCH (v7.0.1090).

As sequências representativas de OTU foram classificadas taxonomicamente usando o classificador do *Ribosomal Database Project* (RDP) v.2.2 no banco de dados *Greengenes*, usando valores de confiança de 0,6 como corte. Foram utilizados os bancos de dados usados para anotação de espécies de comunidade bacteriana e arquea 16S rDNA: Greengene (default): V201305 (DeSantis et al. ¹⁴³, 2006); RDP: Release9 201203 (Cole et al. ¹⁴⁴, 2006). As *tags* filtradas foram agrupadas em OTU com 97% de similaridade e foram removidos OTUs não atribuídos.

A análise de componente principal (*Principal component analysis* - PCA) foi usada para construir um gráfico 2-D resumindo os fatores principalmente responsáveis pelas diferenças de composição de OTU em diferentes amostras. Com base nas informações de abundância de OTU, a abundância relativa de cada OTU em cada amostra foi calculada, e o PCA de OTU foi feito com o valor de abundância relativa. O *software* utilizado nesta etapa foi o pacote 'ade4' do *software* R (v3.1.1).

O número de *tags* de cada classificação taxonômica (Filo, Classe, Ordem, Família, Gênero, Espécie) ou OTU em diferentes amostras foi resumido em uma tabela de perfil ou histograma, o qual foi desenhado com o *software* R (v3.1.1).

As sequências representativas foram alinhadas contra o conjunto principal Silva (Silva_108_core_aligned_seqs) usando PyNAST por 'align_seqs.py'. Uma árvore filogenética OTU representativa foi construído usando os scripts integrados QIIME (v1.80), incluindo o método *fasttree* para construção de dendrograma. As marcas com maior abundância de cada gênero foram escolhidas como o gênero correspondente sequências representativas, e árvore filogenética em nível de gênero foi obtida com ajuda do software R (v3.1.1).

Avaliação da população via qPCR

Para quantificar bactérias totais e da espécie *S. mutans* nos biofilmes foi realizada uma reação de PCR quantitativo seguindo as diretrizes do *Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments* - MIQE (Bustin et al. ¹⁴⁵, 2009).

Para quantificação do total de bactérias foi utilizado Eub338 sense: ACTCCTACGGGAGGCAGCAG e Eub518 antisense: ATTACCGCGGCTGCTGG, com tamanho aproximado do produto de PCR de 200 bp e temperatura de anelamento 53°C (Fierer et al. ¹⁴⁶, 2005). Para a quantificação de *S. mutans* os *primers* utilizados foram Sm479 sense: TCGCGAAAAAGATAACAAACA e Sm479 antisense: GCCCCTTCACAGTTGGTTAG, com tamanho de produto de PCR de 479 bp e temperatura de anelamento 60 °C e 55 °C, respectivamente (Chen et al. ¹⁴⁷, 2007)

Utilizaram-se 0,5 µL de amostra de *pool* DNA nas concentrações de 1 ng/µL para bactérias totais e 100 ng/µL para *S. mutans*, mais os componentes da reação. Cada reação continha 250nM cada par de primer (0,625 µl de solução a 10 µM); 12,5 µL de 2X SYBR Green Supermix (BioRad, Hercules, CA, EUA) e água de grau molecular para completar 25 µL (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). As reações foram submetidas ao equipamento CFX96 *Touch™ Real-Time PCR Detection System* (BioRad, Hercules, CA, EUA) no seguinte ciclo: (1X) 95 °C por 3 minutos; (39X) 94 °C por 30 segundos, 58 °C por 30 segundos, 68 °C por 1 minuto (neste momento foi realizado a leitura da placa e coleta de dados para as análises em tempo real); seguido de (1X) de 55 °C até 95 °C 55 tendo um aumento gradativo de 0,5 °C cada 5 segundos (neste momento foi realizado a leitura da placa e coleta de dados para as análises de *Melt Curve*).

Na placa para bactérias totais a curva padrão foi elaborada com base ao tamanho médio dos genomas de bactérias sequenciadas disponíveis em 21/05/2020 no site do

Human Oral Microbiome Database. Esse valor era 2,76 Mb. Uma cópia corresponde a uma célula, assim, os dados são reportados como número de células de bactérias no biofilme. Na placa para *S. mutans*, a curva foi elaborada com base no tamanho do genoma da cepa UA159, 2,03 Mb (Klein et al. ¹⁴⁸, 2012). Uma cópia do genoma corresponde a uma célula, consequentemente os dados são reportados como número de células de *S. mutans* no biofilme. Finalmente a quantificação de células bactérias totais e de células de *S. mutans* foi ajustada com base no volume de cada amostra. Os dados obtidos foram números de células por biofilme e foi calculada a proporção de *S. mutans* em relação ao total de bactérias presentes na amostra.

4.4.6 Avaliação da matriz extracelular do biofilme e da biomassa da porção insolúvel do biofilme

Separação da porção solúvel e insolúvel

Um volume de 1000 µL foi adicionado em microtubo previamente pesado. O tubo foi centrifugado (10640 xg, 4 °C, 10 minutos; Eppendorf 5430 R), para separar os componentes solúveis dos insolúveis. O sobrenadante foi armazenado em tubo cônico, o precipitado que se encontrava no microtubo foi lavado duas vezes utilizando 250 µL de água deionizada e esterilizada. Os sobrenadantes das duas lavagens foram misturados com o sobrenadante inicial obtendo um volume final de 1,5 mL de sobrenadante (porção solúvel) que foi distribuído para extração e análise de DNA extracelular, ácidos lipoteicóicos e exopolissacarídeos solúveis em água. O precipitado (porção insolúvel) foi utilizado para calcular a biomassa e os exopolissacarídeos insolúveis em água ou solúveis em álcali.

Quantificação de DNA extracelular na porção solúvel

Para extração do DNA extracelular foram utilizados 300 µL do sobrenadante das amostras de 48 horas e 150 µL do sobrenadante das amostras de 120 e 168 horas. Primeiro foi adicionado o mesmo volume de 2X TCL (kit *MasterPure™ Purification*, Epicentre), seguido foi feita incubação em banho seco (300 rpm, 65 °C, 15 minutos,

Isotemp™ Shake Touch High Speed Shakers, Fisherbrand™). As amostras foram resfriadas por 15 minutos, após foi adicionado o 90 µL para a amostra de 48 horas e 45 µL para as amostras de 120 e 168 horas de MPC (kit *MasterPure™ Purification*, Epicentre). As amostras foram homogeneizadas e centrifugadas (15294 xg, 4 °C, 10 minutos; Eppendorf 5430 R).

Os sobrenadantes foram transferidos para tubos novos e 600 µL, para a amostra de 48 horas, e 300 µL, para as amostras de 120 e 168 horas, de isopropanol foram adicionados. A seguir, as amostras foram homogeneizadas por inversão dos tubos 40 vezes. As amostras foram armazenadas em a -20 °C por no mínimo 18h para a precipitação dos ácidos nucleicos. As amostras foram centrifugadas (15294 xg, 4 °C, 20 minutos; Eppendorf 5430 R), o isopropanol descartado. Os precipitados foram lavados duas vezes com 200 µL de etanol 75% (sem ser desprendidos dos tubos). Os tubos com os precipitados foram deixados sobre bancada por 15 - 20 minutos para evaporação, uma vez secos 30 µL de TE (kit *MasterPure™ Purification*, Epicentre), foram adicionaram para hidratação do precipitado. Foi utilizada espectrofotometria para avaliar a quantidade (densidade óptica a 260 nm) e pureza (proporção de densidades ópticas a 260 e 280 nm) (Castillo Pedraza et al.²⁴, 2017).

Quantificação de Ácidos Lipoteicóicos na porção solúvel

Primeiramente foi realizado o isolamento dos ácidos lipoteicóicos da cepa parental *S. mutans* UA159 para a construção da curva padrão (Sutcliffe e Hogg¹⁴⁹, 1993). Foram utilizados 900 µL do sobrenadante das amostras de 48 horas e 450 µL do sobrenadante das amostras de 120 e 168 horas. O método baseado em incubação em 5 % de ácido tricloroacético (TCA, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) foi utilizado para o isolamento dos ácidos lipotécicóicos (Castillo Pedraza et al.²⁴, 2017). Finalmente os ácidos lipoteicóicos, tanto da curva padrão como do sobrenadante das amostras, foram marcados com anticorpos primário (anticorpo LTA de bactérias Gram positivas, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), seguido de marcação com anticorpos secundários marcado com Alexa Fluor 405 (ab175660, Abcam) diluído 1:500 foi acrescentado, com incubação por 2 horas. Foi realizada de forma indireta utilizando um leitor de placas (FLUOstar Omega, BMG LABTECH) (Castillo Pedraza et al.²⁴, 2017).

Quantificação de exopolissacarídeos na porção solúvel

Para extração de exopolissacarídeos solúveis em água foram utilizados 900 µL do sobrenadante das amostras de 48 horas, e 450 µL do sobrenadante das amostras de 120 e 168 horas. Etanol 99 % foi adicionado (3 vezes o volume do sobrenadante) para ter uma concentração final de 70 %. As amostras foram armazenadas em freezer -20 °C por no mínimo 18 horas para a precipitação dos polissacarídeos. As amostras foram centrifugadas (7232 xg, 4 °C, 20 minutos; Eppendorf 5810 R). Os sobrenadantes foram descartados, e os precipitados foram suspensos em 7 mL de etanol 75 % e centrifugados novamente. Este procedimento de lavagem foi repetido duas vezes. Na última centrifugação os precipitados foram deixados sobre bancada por 15 - 20 minutos para evaporação. Foi adicionado a cada tubo 1 mL de água destilada e deionizada, os tubos foram armazenados em geladeira.

Foi elaborada uma curva padrão com glicose oito concentrações (de 0,625 µg até 25 µg), seguidamente foi realizado um ensaio colorimétrico para quantificação de polissacarídeos baseado na reação de fenol - ácido sulfúrico e após de 20 minutos foram realizadas as leituras para quantificar (densidade óptica a 490 nm) (Dubois ¹⁵⁰, 1956).

Quantificação da biomassa na porção insolúvel

Os *precipitados* formados nos microtubos foram desidratadas a 45 °C por aproximadamente 4 horas em concentrador de amostras (RVC 2–18 CD Plus, Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen, Osterode am Harz, NI, Alemanha). Uma vez seco o material, os microtubos foram pesados e o peso inicial foi descontado.

Quantificação de exopolissacarídeos na porção insolúvel

Para extrair os exopolissacarídeos insolúveis em água, foram adicionados nos microtubos 375,5 µl de NaOH 1 M por cada mg de peso seco. Foram homogeneizados em vórtex e incubados por 2 horas em agitação orbital (37 °C, 75 rpm). Posteriormente os tubos foram centrifugados (10640 xg, 4 °C, 10 minutos, Eppendorf 5430 R). O procedimento foi repetido duas vezes. O volume da extração foi o total dos três sobrenadante de cada amostra e foi armazenado em tubo cônico de 15 mL. Foi

adicionado etanol 99 % (3 vezes o volume do sobrenadante) para ter uma concentração final de 70 %. As amostras foram armazenadas em freezer -20 °C por no mínimo 18 horas para a precipitação dos polissacarídeos. Após o período de precipitação as amostras foram homogeneizadas e centrifugadas (7232 xg, 4 °C, 20 minutos; Eppendorf 5810 R). Os sobrenadantes foram descartados, e os precipitados foram suspensos em 7 mL de etanol 75 % e centrifugados novamente. Este procedimento de lavagem se repetiu duas vezes e na última centrifugação os precipitados foram deixados sobre bancada por 15 - 20 minutos para evaporação. Quando os tubos e precipitados estavam secos, foi adicionado NaOH 1 M utilizando o mesmo volume da extração. Os tubos foram armazenados a 4 °C até a realização do ensaio colorimétrico para quantificação dos polissacarídeos como descrito anteriormente (Dubois ¹⁵⁰, 1956).

4.4.7 Avaliação superficial do disco de esmalte

Os discos provenientes do processamento dos biofilmes foram armazenados em 1 mL de NaCl 0,89% esterilizado. As superfícies planas dos discos de esmalte, previamente caracterizadas, foram submetidas a análise da microdureza e da rugosidade como descrito anteriormente (item 4.1.3), mas utilizando uma magnificação da lente MPLFLN 10x (Olympus lext OLS 4000, Olympus, Tóquio, Japão), realizando três imagens por disco em duas idades as 0h (antes do biofilme) e as 168h (após do biofilme).

4.5 Análise Estatística

Primeiramente foi realizada uma análise exploratória de todos os dados, e posteriormente a normalidade e distribuição homogênea das variâncias foi analisada. Dependendo destas análises foram escolhidos os testes e pós-testes estatísticos. O nível de significância foi fixado em 5%. A seguir está o detalhamento por desfecho:

- Microbiota salivar dos voluntários. Tamanho amostral pequeno, foi assumida distribuição não normal. Comparação entre as coletas frescas, seguido de comparação entre fresca e sua respectiva congelada utilizando teste *U* Mann-Whitney. Adicionalmente foram comparadas as salivas congeladas com teste Kruskal-Wallis, seguido de pós-teste de Dunn.

- Foi calculada a média e desvio padrão dos dados de pH do meio de cultura foram calculados por idade do biofilme e por modelo; nenhuma análise estatística inferencial foi realizada.
- Dinâmica população microbiana dos modelos de biofilme cariogênicos. Distribuição normal, para o fator idade do biofilme e para o fator modelo foi realizada separadamente one-way ANOVA, seguida do pós-teste de Tukey ou Games-Howell.
- Biomassa total dos modelos de biofilmes cariogênicos. Distribuição normal, para o fator idade do biofilme e para o fator modelo foi realizada separadamente one-way ANOVA, seguida do pós-teste de Tukey ou Games-Howell, correlação de Persson entre o valor médio da biomassa e UFC.mL⁻¹.
- Microdureza da superfície de esmalte após crescimento dos modelos de biofilme cariogênicos. Distribuição normal, para o fator idade do biofilme e para o fator modelo foi realizada separadamente one-way ANOVA, seguida do pós-teste de Tukey ou Games-Howell. Correlação de Persson entre o valor médio da microdureza e a idade do biofilme.
- Rugosidade da superfície de esmalte após crescimento dos modelos de biofilme cariogênicos. Distribuição não normal, teste de Kruskal-Wallis, seguido de pós-teste de Dunn.
- Dinâmica populacional microbiana dos biofilmes cariogênicos baseado nas UFC.mL⁻¹ segundo a estratégia de inoculação. Distribuição não normal. Para o fator idade teste Kruskal-Wallis seguido de pós-teste de Dunn. Para o fator modelo teste *U* Mann-Whitney em cada uma das idades. Foi calculada a proporção de cada grupo microbiano dentro de microbiota total.
- Dinâmica populacional microbiana dos biofilmes cariogênicos baseado no número de células bacterianas via qPCR segundo a estratégia de inoculação. Distribuição não normal. Para o fator idade teste de Kruskal-Wallis, seguido de pós-teste de Dunn. Para o fator estratégia teste *U* de Mann-Whitney
- Biomassa insolúvel dos modelos de biofilmes cariogênicos. Distribuição não normal. O fator idade foi analisado utilizando teste de Kruskal-Wallis seguido de

pós-teste de Dunn para as comparações. O fator estratégia de inoculação foi analisado utilizando teste *U* de Mann-Whitney.

- Quantificação componente da matriz extracelular dos biofilmes cariogênicos segundo a estratégia de inoculação. Distribuição não normal, fator idade teste Kruskal-Wallis, seguido de pós-teste de Dunn. Para o fator estratégia teste *U* Mann-Whitney.
- Correlação de Pearson entre os valores de biomassa insolúvel e exopolissacarídeos insolúveis.
- Microdureza do esmalte após crescimento dos biofilmes cariogênicos segundo a estratégia de inoculação. Distribuição normal, fator idade one-way ANOVA seguido de pós-teste de Tukey. Para o fator modelo teste *t* Student homocedástico ou heterocedástico segundo fosse necessário em cada uma das idades. Correlação de Persson entre o valor médio da microdureza e a idade do biofilme.
- Rugosidade da superfície de esmalte após crescimento dos biofilmes cariogênicos segundo a estratégia de inoculação. Distribuição não normal, para os dois fatores teste *U* Mann-Whitney.

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização de Corpos de Prova de Esmalte Bovino para Testes Microbiológicos

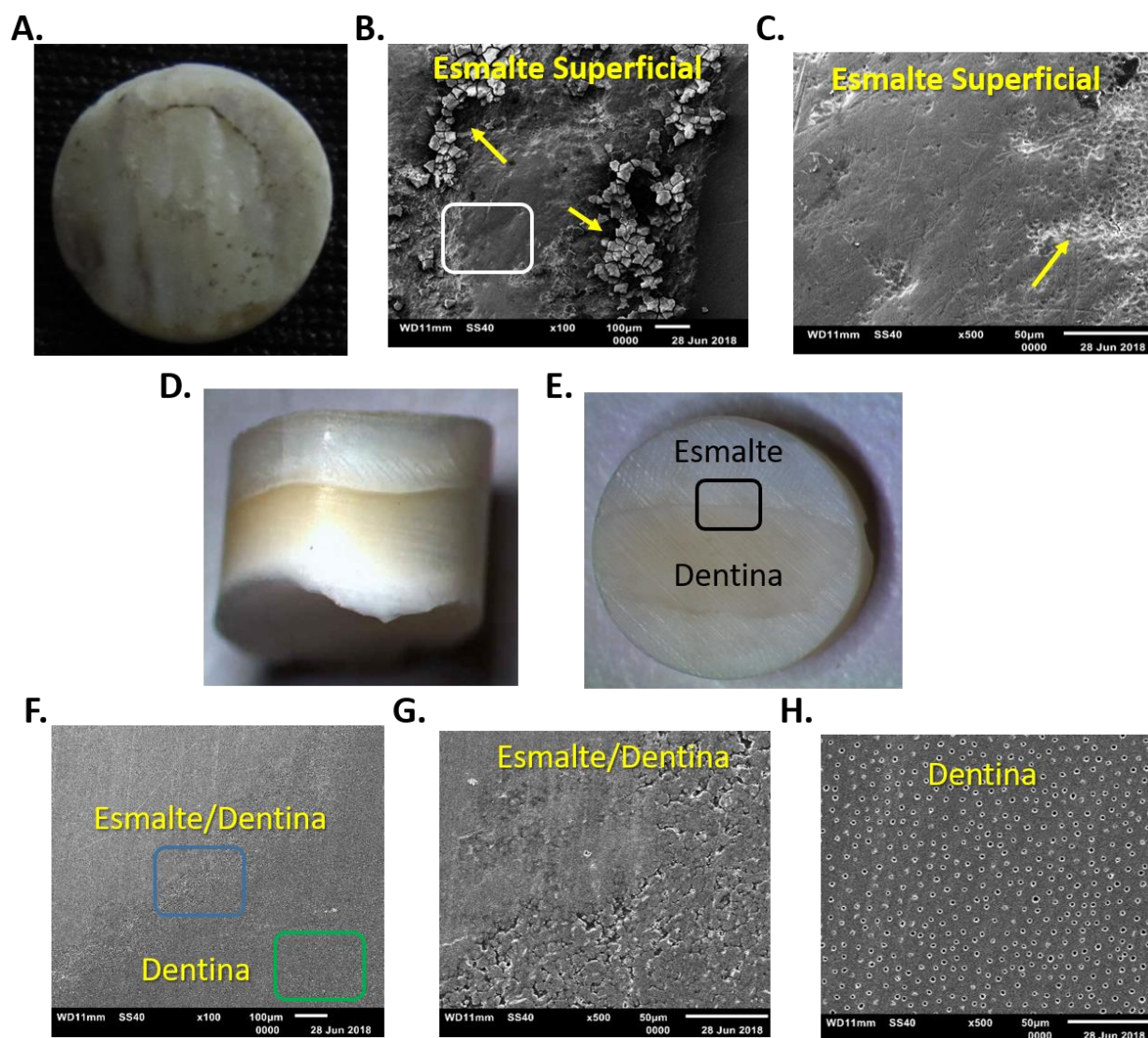
Durante o desenvolvimento da metodologia para confeccionar discos observou-se que as superfícies intactas de alguns dentes apresentavam pigmentações visualmente evidentes (Figura 9A). Ao analisar com magnificação, identificaram-se depósitos de algum tipo de material, provavelmente resíduos alimentares e/ou biofilmes microbianos originais, principalmente nas regiões mais deprimidas (Figura 9B), sendo quase ausentes em regiões mais elevadas (Figura 9C). Evidenciou-se a necessidade de realizar uma limpeza no esmalte superficial dos discos, e foram excluídos os discos que apresentavam pigmentações ainda após a limpeza.

As características anatômicas de cada dente (curvaturas meso-distal e cervico-incisal, formato da câmara pulpar etc.) forneciam diversas espessuras de esmalte dentro de cada disco (Figura 9D). Com base na espessura de esmalte observada nos discos, confeccionaram-se as matrizes metálicas como suporte para submeter a superfície ao polimento e assim eliminar a dentina, obtendo assim uma superfície plana que fosse apta para realizar a avaliação da microdureza. Após a eliminação da dentina em alguns discos ainda era visualmente evidente a presença de duas cores (Figura 9E). As imagens de microscopia confirmaram a presença de dentina (Figuras 9F/G) e uma região de transição entre esmalte profundo e dentina (Figura 9G/H).

Todos os discos que apresentavam este padrão foram submetidos novamente ao polimento até eliminar a dentina, no entanto, muitas vezes os discos terminavam muito fragilizados, apresentando trincas ou fraturas, estes discos foram descartados. De forma geral uma vez finalizados os discos apresentaram duas superfícies. Uma com o esmalte superficial com todas suas características morfológicas intactas, o qual representa a superfície onde os microrganismos formam os biofilmes no ambiente natural (Figura 10 A/B/C), e outra com o esmalte profundo, que fornece uma superfície plana para realizar a avaliação da microdureza (Figura 10 D/E/F). Devido a rugosidade, características anatômicas e espessura dos discos, a área total varia de espécime para espécime, mas de forma geral entendemos que é a somatória da área do esmalte profundo ($38,5 \text{ mm}^2$) +

área do esmalte superficial ($38,5 \text{ mm}^2$) + área da borda do disco (22 mm^2), o qual totaliza de forma aproximada 99 mm^2 .

Figura 9 - Padronização da metodologia para confecção de discos de esmalte bovino.



Discos antes da profilaxia, apresentavam superfícies com pigmentações (A). Estes foram avaliados por microscopia eletrônica de varredura (MEV), pela qual foram adquiridas imagens com magnificação de 100X observados depósitos nas regiões mais depressivas da superfície (setas amarelas) (B). A região destacada com um quadrado branco da imagem B aparentemente se apresentava limpa, porém após esta região ser ampliada 500X, foram observados depósitos (C). O dente foi higienizado e polido. A curvatura do dente (D) dificultou a obtenção de discos livres de dentina e foi necessário realizar novamente o polimento (E). A região destacada com um quadrado preto na imagem E foi analisada por MEV, com magnificação de 100X. Nesta foi possível observar a transição entre esmalte e dentina (F). Em uma análise com magnificação de 500X da região destacada em azul na imagem F, foi possível observar material remanescente de dentina, apresentando característica amorfa (G). A região destacada em verde apresenta dentina intertubular e o lúmen dos túbulos dentinários (H).

Fonte: Elaboração própria

Figura 10 - Discos de esmalte bovino finalizados.

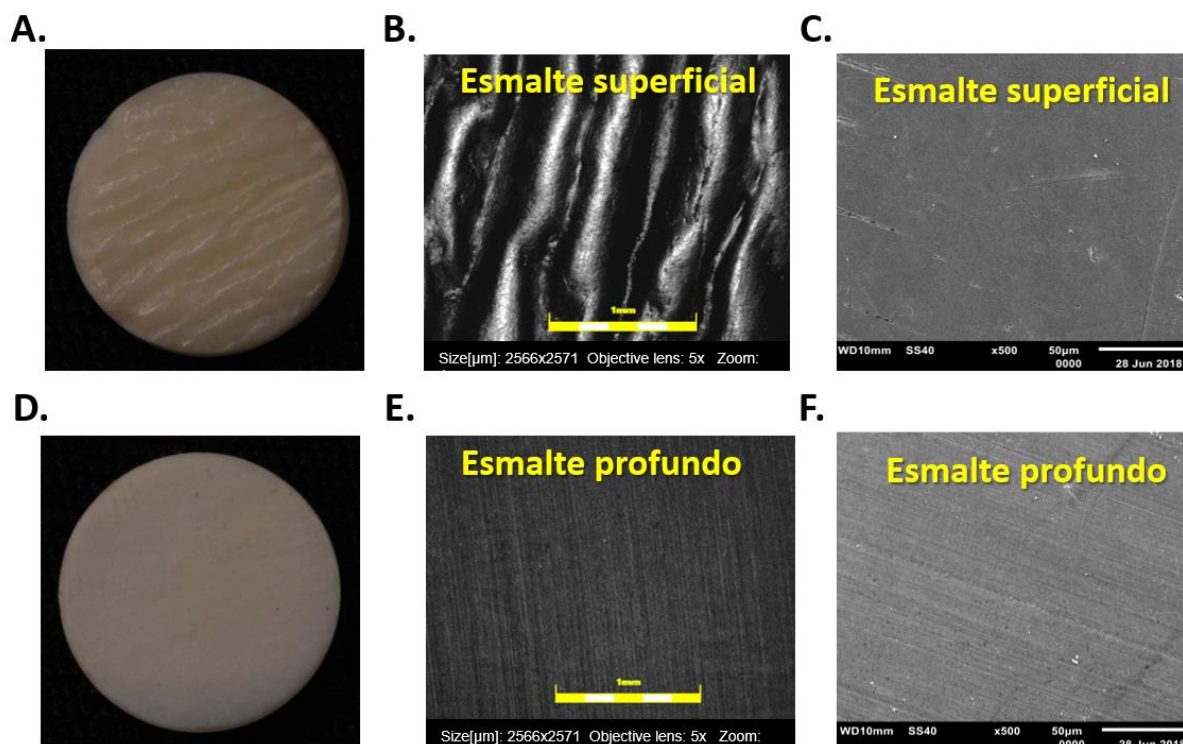


Imagem do disco com o esmalte superficial com anatomia intacta (A) e pós polimento (D). Através de uma análise por microscopia de confocal, com magnificação de 5X, foi possível observar regiões deprimidas e elevadas na superfície do esmalte superficial (não polido) (B). Porém, pós polimento o esmalte profundo foi exposto, observando-se uma superfície plana (E). Quando analisamos estas superfícies por microscopia eletrônica de varredura em uma magnificação de 500X, observamos que os detalhes anatômicos não são perceptíveis, aparentando ser uma superfície plana (C e F).

Fonte: Elaboração própria

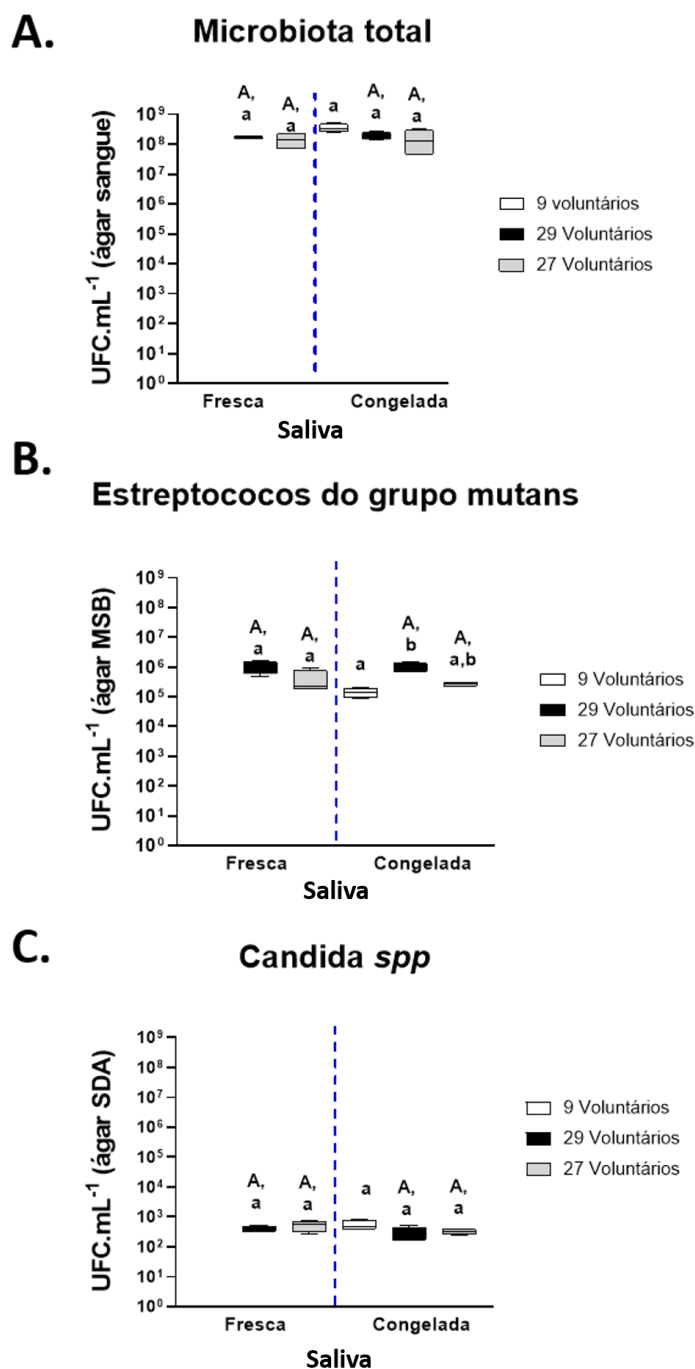
Na análise da microdureza, foi realizada a média das oito medições adquiridas em cada corpo de prova, o esmalte profundo o valor médio registrado foi de $156,6 \pm 9,074$ VHN apresentando uma variação entre 141,7 e 167,6. Para a rugosidade aritmética do esmalte profundo os valores variaram entre 1,15 e 1,35 μm tendo uma média de $1,233 \pm 0,08$.

5.2 Microbiota Salivar dos Voluntários

Os microrganismos presentes na saliva dos voluntários foram quantificados com a ajuda de três tipos de meio de cultura diferentes. O valor de $\text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$ obtido do meio ágar sangue foi considerado como microbiota total cultivável (Figura 11A). Não foi

detectada diferença estatística entre as coletas 1 e 2 (29 e 27 voluntários respectivamente) nas sementeiras realizadas nas amostras frescas. A técnica de armazenamento (glicerol 30%, freezer -80 ° C, 7 dias) não interferiu na viabilidade das células microbianas. No caso da coleta dos 9 voluntários, a quantificação foi realizada apenas após do congelamento e teve um perfil semelhante.

Figura 11 - Microorganismos presentes na saliva dos voluntários.



Representação gráfica dos valores de UFC.mL⁻¹ (no eixo Y) dos microrganismos da saliva recuperados em diferentes meios de cultura. Para microbiota total a quantificação foi realizada a partir da recuperação em ágar sangue (A), para estreptococos do grupo mutans em ágar MSB (B) e para *Candida spp.* em ágar Sabouraud (SDA) (C). Fator amostra: Comparação entre os grupos com 9, 29 e 28 voluntários (representado por letras minúsculas). Fator condição de semeadura: Comparação entre as amostras que foram semeadas no momento após coleta (fresca) e pós congelamento (congelada) (representado por letras maiúsculas). A análise estatística assumiu-se distribuição não normal (n=4) e foi aplicado o teste estatístico Kruskal-Wallis seguido de pós-teste de Dunn. Letras iguais representam semelhança (p > 0,05), n=2. Para o grupo de 9 voluntários não houve semeadura da amostra fresca.

Fonte: Elaboração própria

O ágar MSB foi utilizado como meio presuntivo para selecionar os estreptococos do grupo mutans (Figura 11B). Na coleta 2 houve uma maior variabilidade, no entanto não houve diferença entre fresco e congelado. A quantidade de microrganismo deste grupo foi menor nos 9 voluntários, apresentado uma diferença com a coleta 1.

Os fungos do gênero *Candida* também foram quantificados (Figura 11C) e foram o grupo de microrganismos com menos representação. Não existiu diferença entre as coletas antes e após do congelamento

5.3 Estabelecimento de Modelos de Biofilme de Microcosmo que Reproduzem a Ingestão de uma Dieta Cariogênica ¹²⁵

5.3.1 Perfil do valor de pH frente diferentes dietas cariogênicas

Os valores de pH do meio de cultura fresco e experimental dos quatro modelos foram dispostos na Figura 12. O valor crítico de pH considerado como o limite de desmineralização do esmalte foi representado como uma linha pontilhada vermelha (pH 5,5) (Bowen ⁸⁶, 2013). Em M1 (Figura 12A) foi observado uma constante queda do valor de pH após 6 horas de incubação (nas idades 6, 30 e 54 h) em caldo 'Fartura', com um valor do pH inicial de $7,05 \pm 0,13$ atingindo $4,39 \pm 0,19$. Quando o meio de cultura foi alternado para caldo 'Miséria', com valor de pH começando com $7,09 \pm 0,09$, foi observado uma diminuição menor do valor após 18 horas de incubação (nas idades 24, 48 e 72 h), com um valor médio de pH de $6,10 \pm 0,26$.

Em M2 (Figura 12B) o caldo 'Escassez' teve o ponto de partida com valor de pH $6,98 \pm 0,12$, e com 19 horas de incubação para a fase de adesão microbiana valor de pH atingiu $6,35 \pm 0,21$. Nos outros períodos de 'Escassez', com incubação de 10 horas (29 e 53 horas), foi observado um valor médio de pH de $5,83 \pm 0,33$. O caldo de 'Abundância' fresco apresentava um pH $6,98 \pm 0,06$, e após incubação por 14 h (nas idades 43 e 67 horas), mostrou uma queda de pH que atingiu $4,29 \pm 0,08$.

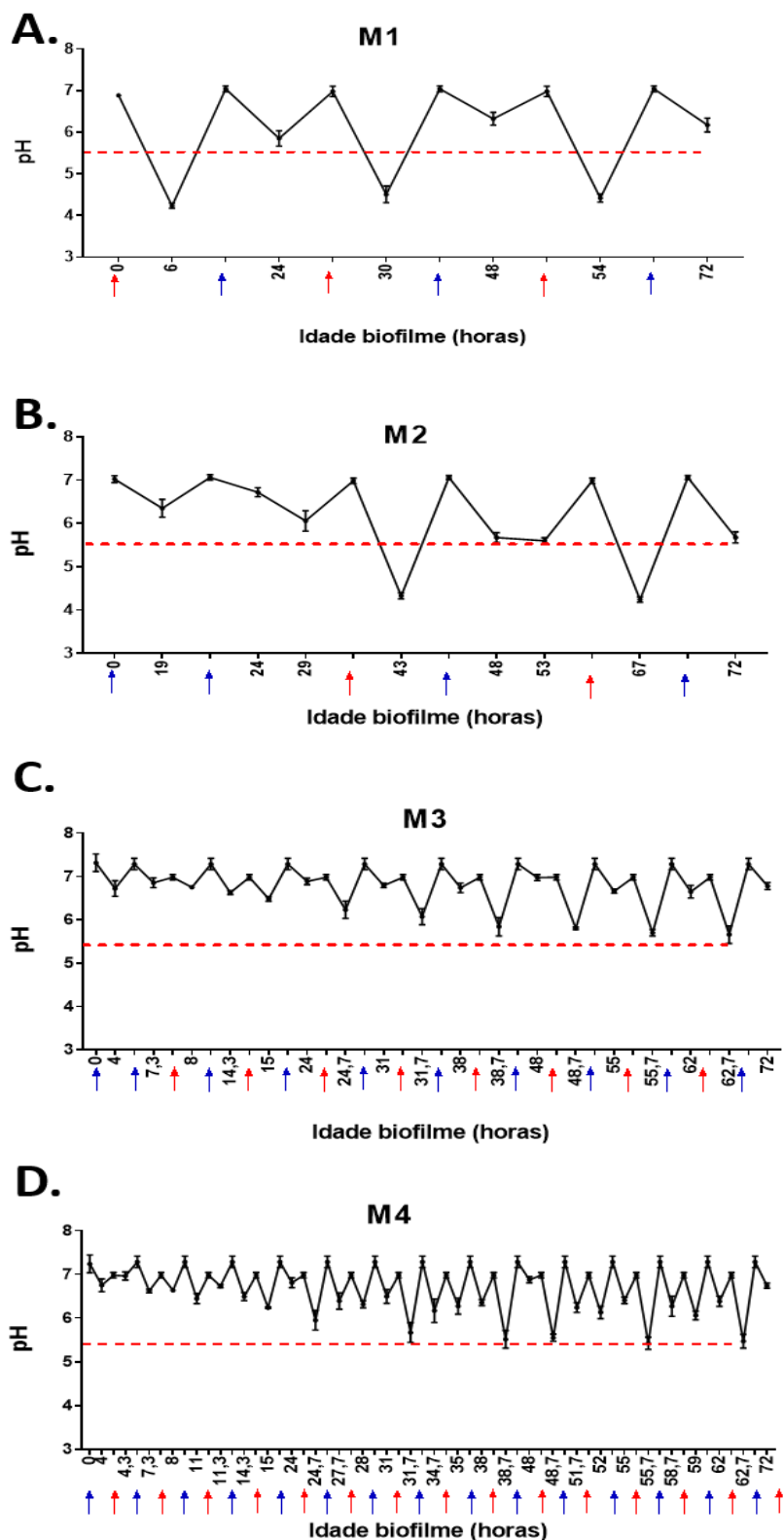
Em M3 (Figura 12C), os discos permaneceram principalmente no "caldo de saliva" (pH inicial $7,29 \pm 0,13$), após a incubação (nas idades 4; 7,3; 14,7; 24; 31; 38; 48; 55; 62

e 72 h) com uma ligeira diminuição nos valores médios de pH, $6,78 \pm 0,14$. No entanto, quando exposto a 'Refeições' 40 minutos em 'Abundância' (nas idades 8; 15; 24,3; 31,7; 38,7; 48,7; 55,7 e 62,7 horas), a queda do pH foi mais rápida com um pH de $6,15 \pm 0,39$, sem exceder o limiar crítico. No entanto, com o envelhecimento do biofilme, os valores registrados foram menores.

Em M4 (Figura 12C), o comportamento observado foi muito semelhante ao M3, após incubação em 'caldo de saliva' (nas idades 4; 7,3; 11; 14,3; 24; 27,7; 31; 34,7; 38; 48; 51,7; 55; 58,7; 62 e 72 h) o pH foi $6,51 \pm 0,25$. As maiores e mais rápidas quedas de pH foram encontradas após as 'Refeições' (nas idades 8; 15; 24,3; 31,7; 38,7; 48,7; 55,7 e 62,7 horas) com valores de $5,87 \pm 0,45$, e também houve uma diminuição progressiva do pH conforme o biofilme amadureceu. No entanto, a exposição a 'Lanches' 20 minutos em 'Abundância' (nas idades 4,3; 11,3; 28; 35; 52 e 59 horas) não mostrou uma alteração substancial do pH, começando com $6,98 \pm 0,06$ e terminando com $6,47 \pm 0,34$.

No geral, em M1 e M2, as trocas do meio de cultura foram mais espaçadas; consequentemente, os discos permaneceram imersos por períodos mais longos em ambiente ácido, mesmo sem exposição a carboidratos. Em contraste, em M3 e M4, os valores de pH mostraram mais flutuações devido ao maior número de "ingestão de alimentos". As quedas de pH foram evidentes em M3 e M4, mas com menor magnitude do que em M1 e M2 porque as exposições foram mais curtas para M3 e M4. Assim, em M3 e M4, os valores de pH apresentaram acidificação mais fraca em relação a M1 e M2 e um ambiente mais neutro, pois após esses períodos ácidos, os discos/biofilmes sempre foram devolvidos ao "caldo de saliva".

Figura 12 - Perfil do pH de meios de cultura (fresco e experimental) frente aos quatro modelos de desafio nutricional para o desenvolvimento de biofilmes cariogênicos.



Em todos os modelos, M1 (A), M2 (B), M3 (C) e M4 (D), o desafio cariogênico foi realizado pela alternância entre dois meios de cultura diferentes, um com muitas fontes nutricionais (setas vermelhas) e outro com menos fontes (setas azuis). M1-‘Fartura e Miséria’. M2-‘Abundância e Escassez’. M3-‘Três refeições diárias’. M4-‘Três refeições e dois lanches diários’. A cada alternância de meio, o pH do meio de cultura do biofilme (experimental) e do meio a ser repostado (fresco) foram aferidos e registrados. No eixo x estão representados os valores da média e desvio padrão do pH em relação a cada idade do biofilme (eixo x). A linha pontilhada vermelha ressalta o valor de pH 5,5, crítico para a desmineralização dentária (Bowen⁸⁶, 2013), n=6.

Fonte: Elaboração própria. Adaptado de Florez Salamanca et al.¹²⁵, 2020

5.3.2 Dinâmica populacional microbiana dos modelos de biofilme cariogênicos

A Figura 13A apresenta os valores médios e desvio padrão da microbiota cultivável total. Ao comparar as diferentes idades (letras minúsculas) dentro dos modelos de biofilme, em M1 e M2, a viabilidade dos microrganismos manteve-se semelhante ao longo do tempo, com exceção de 0 horas até 24 horas em M1, para os quais foi observado uma diminuição. Nos modelos M3 e M4, houve aumento da população microbiana de 0 a 72 h. Para M3, esse aumento foi gradativo até a última idade, mas para M4, houve maior variabilidade.

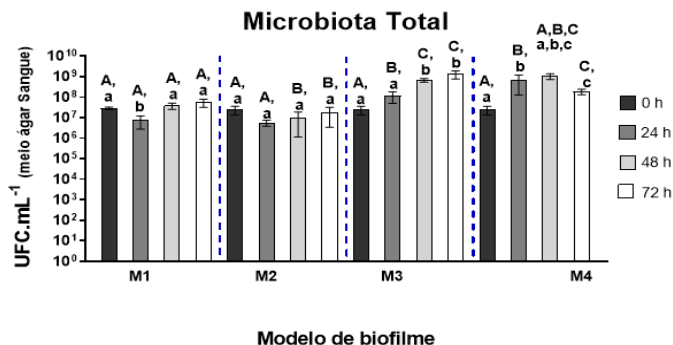
Além disso, na comparação de grupos de mesma idade (letras maiúsculas), observaram-se semelhanças em todas as idades do biofilme entre os grupos M3 e M4, mas, para os grupos M1 e M2, houve diferença às 48 e 72 h. Apesar das diferenças pontuais esses modelos foram denominados, conforme descrito na seção de pH, como um ambiente ácido (M1 e M2) e um ambiente mais neutro (M3 e M4).

O comportamento foi semelhante em todos os modelos para as contagens de *Streptococcus* do grupo mutans em diferentes idades do biofilme (letras maiúsculas; Figura 13B); apenas M2 apresentou valores mais elevados com 24 horas. Além disso, dentro de cada modelo, a população apresentou aumento com o envelhecimento do biofilme, apresentando diferenças entre o inóculo (0 horas) e as idades finais (48 e 72 horas).

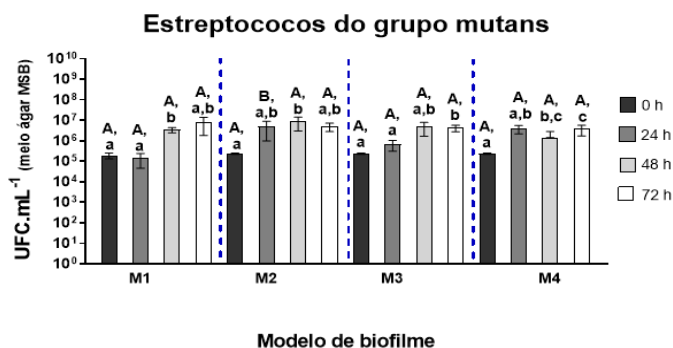
Considerando o valor de $\text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$ da microbiota total (água sangue) como 100 %, foi calculada a porcentagem de *Streptococcus* do grupo mutans (Figura 13C). No início do experimento (0 horas), este grupo $1,1 \% \pm 0,7$ da microbiota cultivável total. Um aumento progressivo foi observado no M1 e um aumento drástico no M2 ao longo do tempo. Em contraste, M3 e M4 mantiveram uma baixa proporção do grupo em todas as idades do biofilme avaliadas (Figura 13D). Os modelos de ambiente neutro, M3 e M4, apresentaram maior proporção da microbiota total. No entanto, as técnicas de cultura não incluem todos os microrganismos no biofilme. Em relação aos dados para *Candida* spp., o valor de $\text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$ do inóculo foi de $60 (\pm 30)$; entretanto, nenhuma colônia de fungo foi detectada em nenhum modelo durante as diferentes idades de desenvolvimento do biofilme (24, 48 e 72 horas).

Figura 13 - Dinâmica populacional nos quatro modelos de desafio nutricional para o desenvolvimento de biofilmes cariogênicos (UFC mL⁻¹).

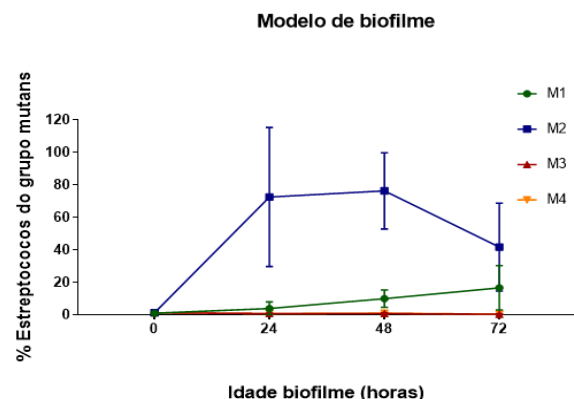
A.



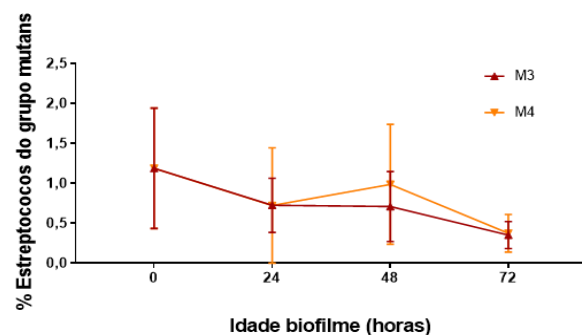
B.



C.



D.



Representação gráfica dos valores de UFC mL⁻¹ (eixo Y) dos microrganismos do biofilme recuperados dos quatro modelos (M1, M2 M3 e M4) em diferentes meios de cultura para as idades 0h, 24 h, 48 e 72 h. Para microbiota total a quantificação foi realizada a partir da recuperação em ágar sangue (A), e para *Estreptococos* do grupo mutans em ágar MSB (B). Fator idade: em uma única idade os modelos foram comparados (representados pelas letras maiúsculas). Fator modelo: em um único modelo as idades foram comparadas (representado por letras minúsculas). A análise estatística para o fator idade do biofilme foi aplicado one-way ANOVA, seguido do pós-teste de Tukey ou Games-Howell, dependendo da homogeneidade das variâncias. Para o fator modelo foi aplicado one-way ANOVA, seguido de um pós-teste de Tukey para M2 e M4 e Games-Howell para M1 e M2. Letras iguais denotam similaridade ($p > 0,05$). A porcentagem de *Estreptococos* do grupo mutans (eixo Y) em relação a microbiota total foi calculada para os modelos M1, M2, M3 e M4 (C) para cada idade do biofilme (eixo X). Destaque da representação gráfica da porcentagem de *Estreptococos* do grupo mutans em relação a microbiota total para os modelos M3 e M4 (D). Letras iguais representam semelhança ($p > 0,05$), $n=6$.

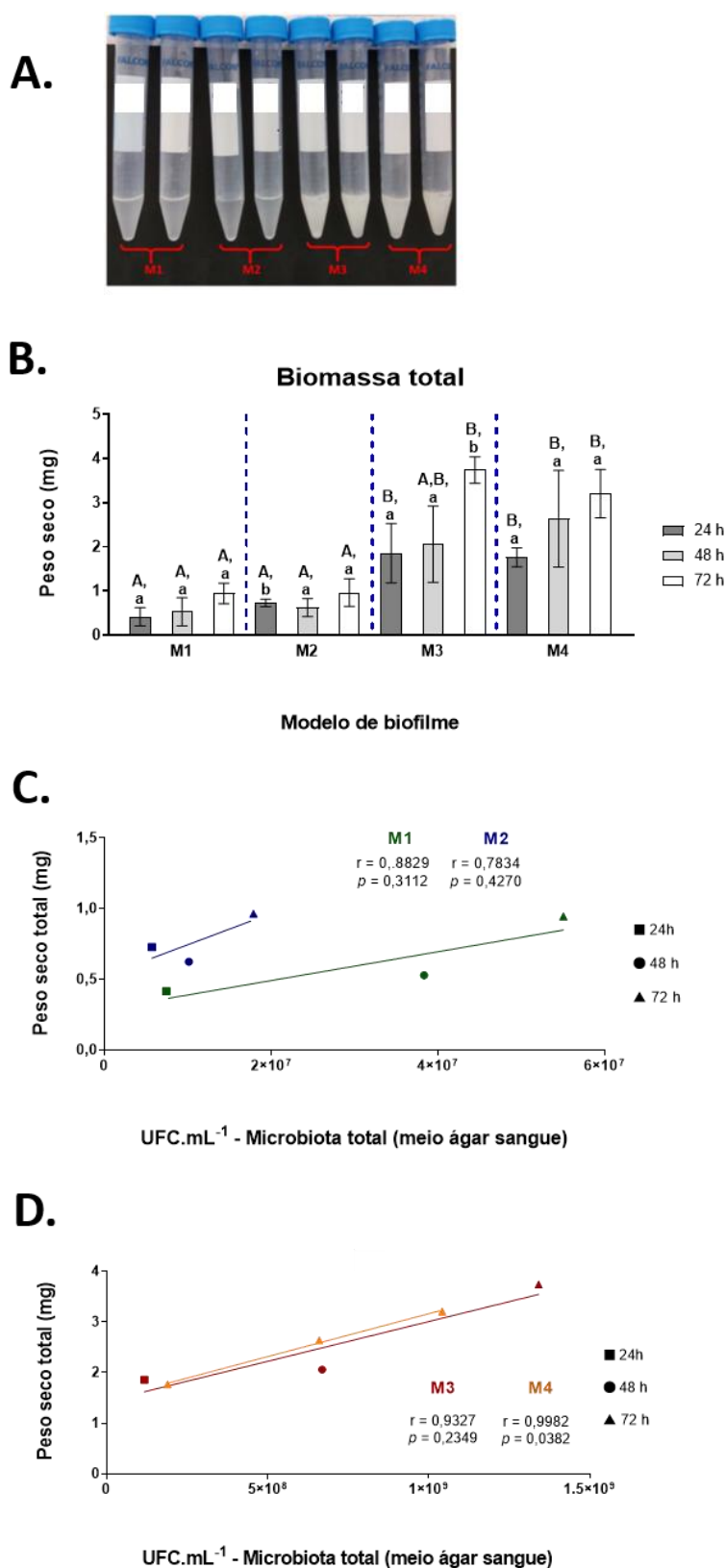
Fonte: Elaboração própria. Adaptado de Florez Salamanca et al.¹²⁵, 2020

5.3.3 Biomassa total dos modelos de biofilme cariogênicos

A Figura 14A apresenta as suspensões de biofilme obtidas às 72 horas, as quais apresentavam visualmente aparência diferentes: M1 e M2 eram translúcidos, enquanto M3 e M4 eram mais turvos que os dois primeiros. Essas observações foram confirmadas pela biomassa (Figura 14B). Uma diferença estatística entre os grupos de 'ambiente ácido' e os grupos de 'ambiente neutro' foi detectada quando diferentes modelos foram comparados nas mesmas idades de biofilme (letras maiúsculas).

É importante notar que houve uma variabilidade considerável nos dados registrados. Gráficos de dispersão foram realizados para verificar se houve associação entre as variáveis peso seco e microbiota total. Nos modelos de ambiente ácido, M1 e M2, correlações positivas fortes foram observadas, mas não apresentaram significância estatística (Figura 14C). Além disso, nos modelos de ambiente neutro, M3 e M4, foram encontradas correlações positivas muito fortes, com significância estatística em M4 (Figura 14D). A informação pode parecer paradoxal, mas ao trabalhar dados reduzidos e variáveis (um total de três médias da biomassa e três medias de microbiota total para cada idade e modelo de biofilme) não há informações suficientes para fazer uma inferência sobre a população em geral e o teste da hipótese foi considerado mais conservador.

Figura 14 - Biomassa total dos biofilmes cariogênicos formados nos quatro modelos de desafio nutricional.



A imagem A corresponde à suspensão do biofilme na idade 72 h. De cada suspensão foi obtido a biomassa através do peso seco total. Representação gráfica (B) dos valores de Peso seco total (mg) (eixo Y) dos quatro modelos (M1, M2, M3 e M4) para as idades 0h, 24 h, 48 h e 72 h. Fator idade: em uma única idade os modelos foram comparados (representados pelas letras maiúsculas). Fator modelo: em um único modelo as idades foram comparadas (representado por letras minúsculas). A análise estatística para o fator idade do biofilme foi aplicado one-way ANOVA, seguido do pós-teste de Tukey para as idades 48 e 72 h, e Games-Howell para 24 h (com correção de Welch). Para o fator do modelo foi aplicado one-way ANOVA, seguido do pós-teste de Tukey para os quatro modelos. Letras iguais denotam similaridade ($p > 0,05$). Gráficos de dispersão foram plotados com as médias dos valores de peso seco total (mg) (eixo Y) em relação as médias dos valores de UFC.mL⁻¹ da microbiota total (eixo X) para cada idade. A correlação de Pearson foi aplicada para os modelos de biofilme M1 e M2 (C), e para M3 e M4 (D), e os valores de r e p foram apresentados nos gráficos. Letras iguais representam semelhança ($p > 0,05$), $n=6$.

Fonte: Elaboração própria. Adaptado de Florez Salamanca et al.¹²⁵, 2020.

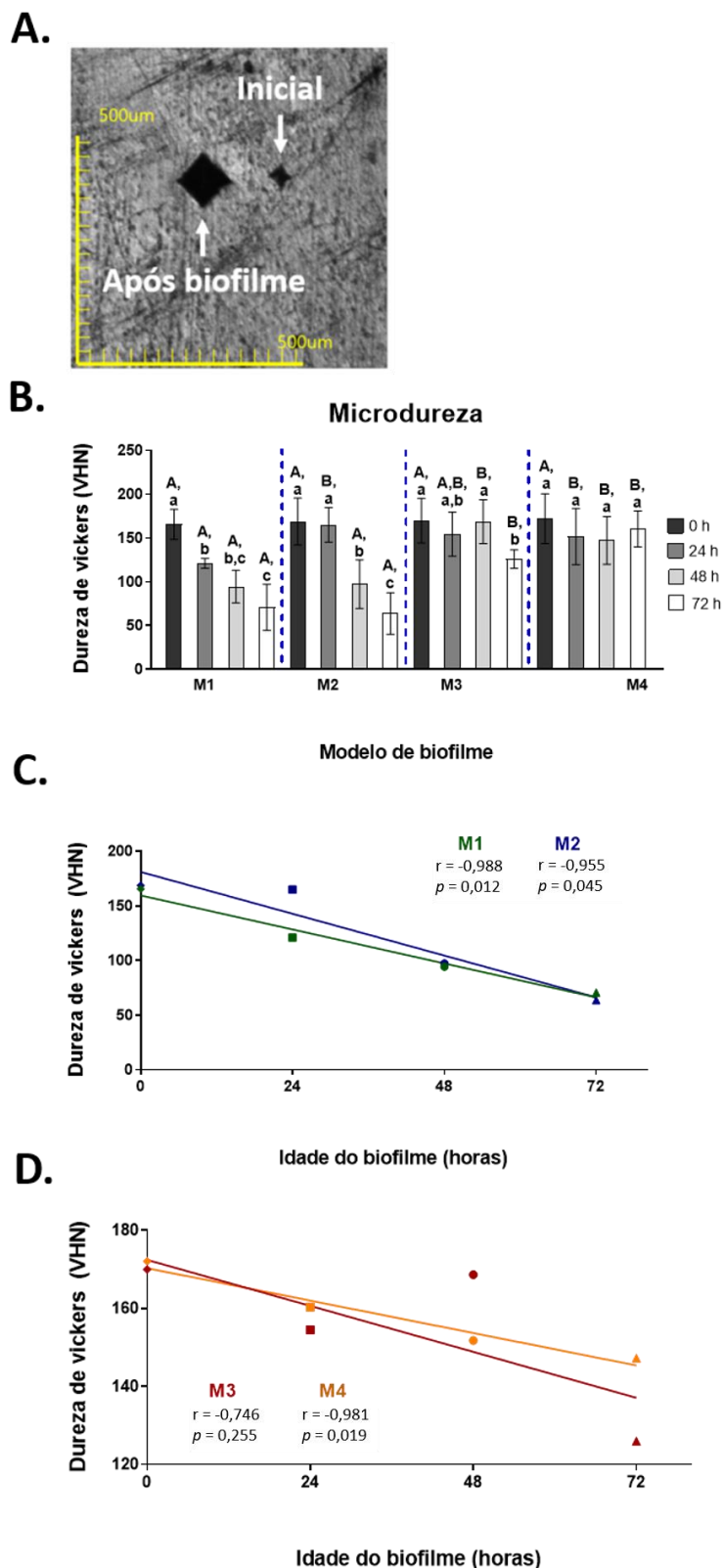
5.3.4 Microdureza e rugosidade da superfície do disco de esmalte onde se formaram os biofilmes cariogênicos

A microdureza é apenas um indicador de desmineralização, uma vez que os discos de esmalte são substratos heterogêneos. Os dentes não são fabricados na indústria e por fazerem parte de sistemas biológicos (bovinos), apresentam alta variabilidade. Após a randomização, foi calculada a microdureza inicial média dos discos de esmalte de cada modelo de biofilme. Todos os modelos de biofilme começaram (0 horas) com uma microdureza semelhante (M1 $165,5 \pm 17,3$; M2 $168,8 \pm 26,8$; M3 $169,9 \pm 25,5$ e M4 $172,1 \pm 28,4$ VHN). No entanto, cada modelo teve um comportamento diferente. Foi disposta uma imagem de um disco com duas indentações. Ambas as indentações foram realizadas com os mesmos parâmetros para a obtenção da microdureza (Figura 15A). A diferença entre os tamanhos da indentação (antes e depois) exemplifica a perda de mineral (Figura 15B).

Em M1, uma diminuição maior e mais rápida da microdureza foi observada com o tempo. Em M2, a queda mais significativa ocorreu de 24 para 48 horas. As 72 horas, os dois modelos apresentaram perda de 60 % da microdureza original, atingindo $70,7 \pm 26,5$ para M1 e $63,7 \pm 23,7$ valores de VHN. Ao comparar os modelos na mesma idade (letras maiúsculas), observou-se que M1 e M2 apresentaram diferença às 24 horas; ambos estavam associados a um ambiente ácido.

No M3, foi observada perda de 25 % da microdureza original após 72 horas com valor de $125,9 \pm 10,5$ VHN; sendo confirmado por uma diferença estatística. A microdureza de 24 horas foi semelhante a 72 horas; entretanto, sua perda foi de apenas 10 %. Para M4, todas as idades foram semelhantes, mesmo havendo uma diminuição sutil com valor de $147,2 \pm 27,2$ VHN às 72 horas, o que significou uma perda de 15 % da microdureza original. Ao comparar os modelos de mesma idade (letras maiúsculas), observou-se que M3 e M4 foram iguais em todas as idades do biofilme. Este perfil reforça os dados de pH, agrupando os modelos novamente dentro do ambiente mais neutro. Nos modelos M1 e M2, foram detectadas correlações negativas muito fortes sendo estatisticamente significantes (Figura 15C). Nos modelos M3 e M4, foram encontradas correlações negativas fortes e muito fortes, com significância estatística em M4 (Figura 15D).

Figura 15 - Microdureza da superfície de esmalte após remoção dos biofilmes cariogênicos formados a partir de quatro modelos de desafio nutricional.

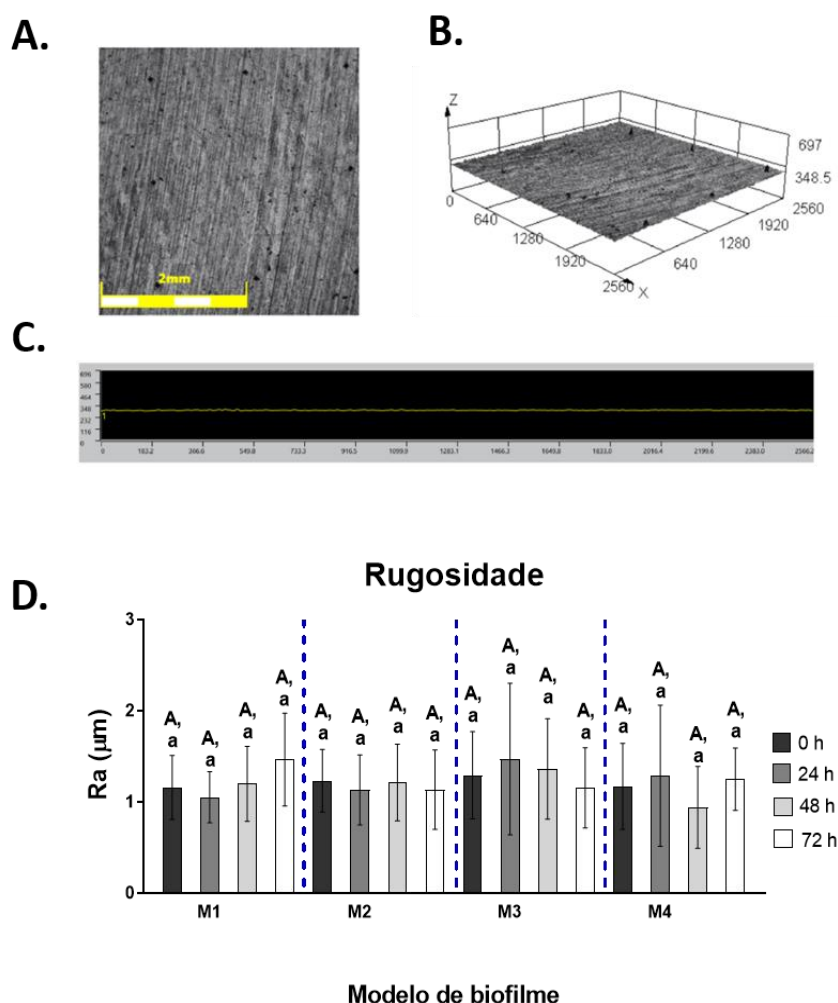


Em imagem de microscopia confocal a laser adquirida com magnificação de 5X (A). Observam-se duas indentações realizadas em momentos distintos: Inicial (0 h) e após biofilme (72h). As duas indentações foram realizadas no mesmo disco de esmalte com os mesmos parâmetros. Representação gráfica (B) dos valores de dureza de Vickers (VHN) nos discos de esmalte antes e depois da formação do biofilme (eixo Y) para os quatro modelos (M1, M2, M3 e M4) nas idades 0h, 24 h, 48 h e 72 h. Fator idade: em uma única idade os modelos foram comparados (representados pelas letras maiúsculas). Fator modelo: em um único modelo as idades foram comparadas (representado por letras minúsculas). A análise estatística para o fator de idade do biofilme, foi aplicado one-way ANOVA, seguida de um pós-teste de Tukey para as idades 0, 48 e 72 h, e Games-Howell para 24 h (com correção de Welch). Para o fator do modelo foi aplicado one-way ANOVA, seguido do pós-teste de Tukey em M2, M3 e M4 e teste de Games-Howell para M1 (com correção de Welch). Letras iguais denotam similaridade ($p > 0,05$). Gráficos de dispersão foram plotados com as médias dos valores de dureza de Vickers (VHN) (eixo Y) em relação as idades 0, 24, 48 e 72 h (eixo X). A correlação de Pearson foi aplicada para os modelos de biofilme M1 e M2 (C), e para M3 e M4 (D), e os valores de r e p foram apresentados nos gráficos. Letras iguais representam semelhança ($p > 0,05$), $n=6$.

Fonte: Elaboração própria. Adaptado de Florez Salamanca et al.¹²⁵, 2020

Nas imagens microscópicas (Figura 16A) se observa uma superfície plana, no entanto identificam-se alguns sulcos, deixados no processo de polimento (com a granulação mais fina, lixa 1.500). As imagens 3-D e os perfis de rugosidade (Figura 16 B e C) confirmaram que as superfícies do esmalte eram planas; portanto, os sulcos não eram profundos. Houve uma variação entre as diferentes amostras; isso foi consistente em todas as idades avaliadas e todos os modelos avaliados. Portanto, não houve diferenças estatísticas antes e após a formação do biofilme (Figura 16D).

Figura 16 - Rugosidade das superfícies de esmalte após remoção dos biofilmes cariogênicos formados a partir de quatro modelos de desafio nutricional.



(A) Imagem representativa obtida com um microscópio confocal a laser Olympus lext 4000 usando uma lente MPLFLN5x. (B) Reconstrução 3-D representativa da imagem no software OLS4100. (C) Representação do perfil de uma medição de rugosidade média (Ra). (D) Representação gráfica dos valores Ra (μm) dos discos de esmalte medidos antes e depois da formação do biofilme (eixo Y), para cada idade do biofilme (eixo X). Às 0 h, havia 18 discos, dos quais 6 discos para cada idade foram removidos: 24, 48 e 72 h. Fator idade: em uma única idade os modelos foram comparados (representados pelas letras maiúsculas). Fator modelo: em um único modelo as idades foram comparadas (representado por letras minúsculas). A análise estatística os dados apresentam distribuição não normal, e foi aplicado teste de Kruskal-Wallis seguido de pós-teste de Dunn. Letras iguais denotam similaridade ($p > 0,05$), $n=6$.

Fonte: Elaboração própria
Adaptado de Florez Salamanca et al.¹²⁵, 2020

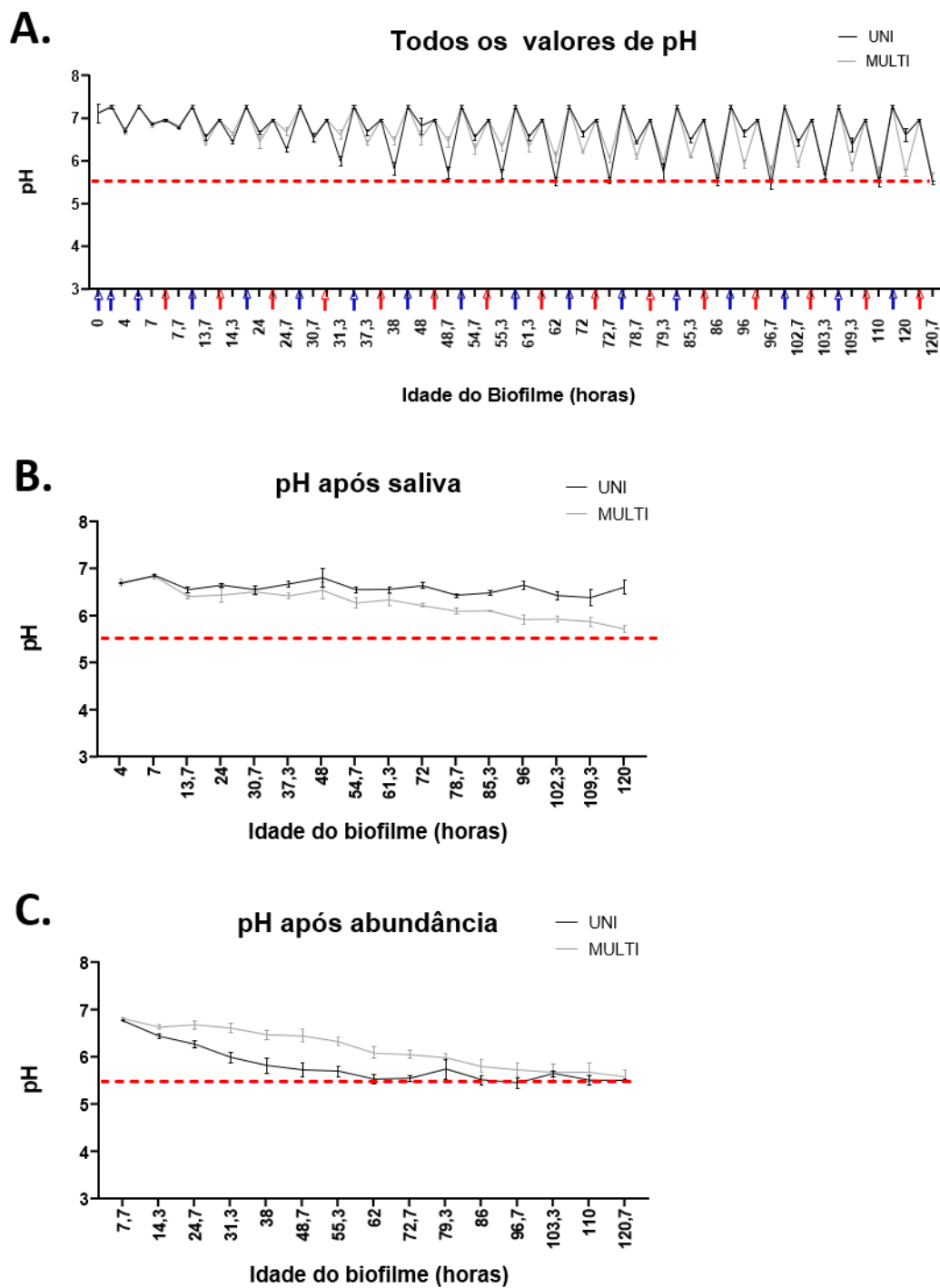
5.4 Ensaio para Simular a Colonização Secundária e Tardia Durante a Formação dos Biofilmes

5.4.1 Perfil de pH do meio de cultura segundo a estratégia de inoculação

As duas estratégias de inoculação apresentaram características semelhantes (Figura 17A). As constantes trocas de meio resultaram em flutuações no pH. O caldo 'abundância' quando recém preparado apresentava um valor de pH de $6,96 \pm 0,03$ e o 'caldo saliva' apresentava um valor de pH de $7,27 \pm 0,05$. Após todos os períodos de incubação, o pH do meio de cultura apresentou uma diminuição. O ambiente se manteve neutro na maioria do tempo, pois os períodos de caldo saliva tinham uma maior duração e após de várias horas de se manter nesta condição o pH não tinha uma queda drástica (Figura 17B). Ao visualizar isoladamente o pH após a exposição ao 'caldo saliva' observou-se uma diminuição conforme o biofilme envelheceu, isto é mais evidente em MULTI a partir das 96 horas.

Em contrapartida ao visualizar isoladamente o pH após exposição a 'abundância' observou-se uma diminuição nos valores de pH conforme o biofilme envelheceu. Durante o envelhecimento do biofilme, o ambiente tornou-se cada vez mais ácido com a exposição de curta duração (40 minutos) (Figura 17C), sendo mais acelerado em UNI. Nas primeiras idades do biofilme (nas duas estratégias de inoculação UNI e MULTI) o pH ainda não se aproximou do valor crítico para a desmineralização de esmalte dentário (i.e., pH 5,5; Bowen ⁸⁶, 2013), porém em idades maiores a queda de pH foi maior. Em UNI na idade 62 horas os valores ultrapassaram este limiar (linha pontilhada vermelha), por outro lado em MULTI isto ocorreu em uma idade maior, 127 horas.

Figura 17 - Perfil do pH dos meios de cultura (fresco e experimental) frente a diferentes estratégias de inoculação.



Em ambas as estratégias foi realizado alternância entre dois meios de cultura diferentes, de acordo com M3-‘Três refeições diárias’. A cada alternância de meio, o pH do meio de cultura do biofilme (experimental) e do meio a ser reposto (fresco) foram aferidos e registrados. No eixo Y estão representados os valores das médias e desvio padrão do pH em relação a cada idade do biofilme (eixo x). (A) Representação gráfica de todos os valores de pH. (B) Representação gráfica dos valores de pH do meio após “Período Saliva”. (C) Representação gráfica dos valores de pH do meio após “Período Abundância”. A linha pontilhada vermelha ressalta o valor de pH 5,5, ponto crítico para a desmineralização dentária (Bowen ⁸⁶, 2013).

Fonte: Elaboração própria.

5.4.2 Arquitetura do biofilme segundo a estratégia de inoculação

Foram realizadas fotografias dos discos-biofilmes enquanto estavam em formação e com o tempo foi observado que as superfícies (disco de esmalte e aparelho de fio ortodôntico) foram colonizadas e cobertas pelo biofilme. As imagens de MEV forneceram uma melhor perspectiva da organização espacial que existiu.

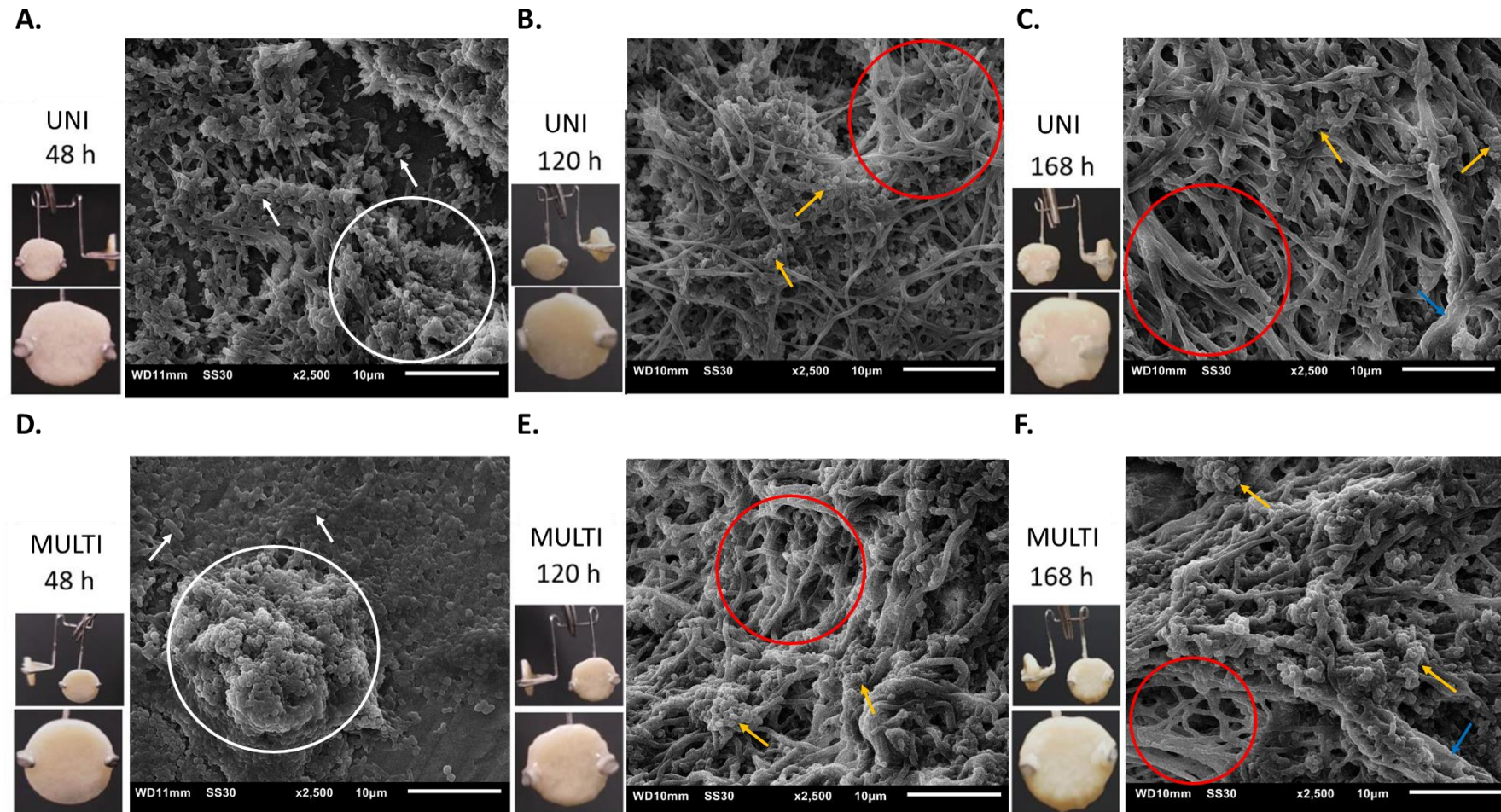
Na estratégia UNI observamos na idade de 48 horas (Figura 18A) a predominância de células com formato esférico que parecem relacionar-se com células de formato alongado, ambas com tamanhos similares. Foi observado que em algumas superfícies do disco eram visíveis, pois não foram colonizadas pelos microrganismos. Na mesma idade na estratégia MULTI (Figura 18D) se observou uma microcolônia de células esféricas. Sua formação apresentou uma aparência elevada, mas na base evidenciou-se uma região do esmalte que ainda não havia sido colonizada.

Na idade 120 horas na estratégia UNI (Figura 18B) as células se apresentaram alongadas, com um maior comprimento e espalhadas em todas as direções, conformando estruturas semelhantes a *hedgehogs*. Também foi observada que células de menor tamanho e formato esférico recobriram as células alongadas formando estruturas semelhante a *corncobs* (Mark Welch et al. ⁴⁹, 2016; Kim et al. ⁵⁰, 2020). No biofilme MULTI (Figura 18E) também foram observadas estas estruturas, sendo mais predominante células alongadas recobertas por esféricas.

Nas duas estratégias na idade 168 horas (Figura 18C e 18F) também foram identificadas *hedgehogs* e *corncobs*, no entanto, conforme o envelhecimento do biofilme, mais complicado foi identificar os formatos esféricos e alongados das células

individualmente. Provavelmente fragmentos de células lisadas e componentes da matriz extracelular do biofilme estavam mais presentes no biofilme, dificultando a visualização. Também foi observado que os microrganismos filamentosos apresentavam uma aparência mais robusta, provavelmente acontece a união entre várias células que estão organizadas na mesma direção e foram sendo recobertas pela matriz extracelular do biofilme.

Figura 18 - Análise da arquitetura dos biofilmes frente a diferentes estratégias de inoculação.



Imagens representativas dos discos acoplados aos aparatos metálicos encobertos pelo biofilme nas idades de 48, 120 e 168 h. Imagens representativas dos biofilmes obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) em uma magnificação de 2.500X. Na idade 48 h (A e D) há presença de microcolônias (destaque círculo branco) formadas por microrganismos com formato variando de esférico a alongados (setas brancas). Algumas superfícies dos discos apresentam-se sem a presença de microrganismos. As 120 (B e E) e 168 h (C e F) os diferentes tipos de microrganismos apresentam-se mais intimamente relacionados, com a presença de estruturas mais complexas em formatos de *cornucopia* (seta amarela) e *hedgehogs* (destaque círculo vermelho). Adicionalmente para 168 h há a presença de estruturas longas e espessas (seta azul) que parecem conectar e envolver os microrganismos presentes, dificultando a visualização de sua morfologia.

Fonte: Elaboração própria.

5.4.3 Dinâmica populacional microbiana

Microrganismos cultiváveis (UFC mL⁻¹) segundo a estratégia de inoculação

Os microrganismos presentes no inóculo (0 horas) e nas diferentes idades do biofilme foram quantificados em 4 tipos de meio de cultura para analisar grupos microbianos diferentes. As contagens de colônias obtidas em meio ágar sangue foi considerada como microbiota total cultivável (Figura 19 A/a). Ao comparar dentro da estratégia UNI foi observada semelhança entre as idades iniciais 24 e 48 horas e o inóculo. Nos horários de 48 e 72 horas apresentou-se um aumento da população, sendo detectada uma diferença entre 72 horas e o inóculo. Outro aumento foi detectado a partir das 96 e o valor se manteve semelhante até 168 horas, apenas foi detectada uma diferença entre 72 e 144 horas.

Na estratégia MULTI foi observado que as 24 horas os microrganismos que se aderiram as superfícies foram menos do que os existentes no inóculo, no entanto não foram detectadas diferenças. De 24 até 72 horas houve um aumento gradativo da microbiota mantendo semelhança com o inóculo. A partir das 72 horas a população de microrganismos se manteve constante até as 168 horas, unicamente foi detectada uma diferença entre 72 e 168 horas. Quando avaliado o fator idade foram detectadas diferenças estatísticas as 24, 48, 72, 144 e 168 horas entre as duas estratégias de inoculação.

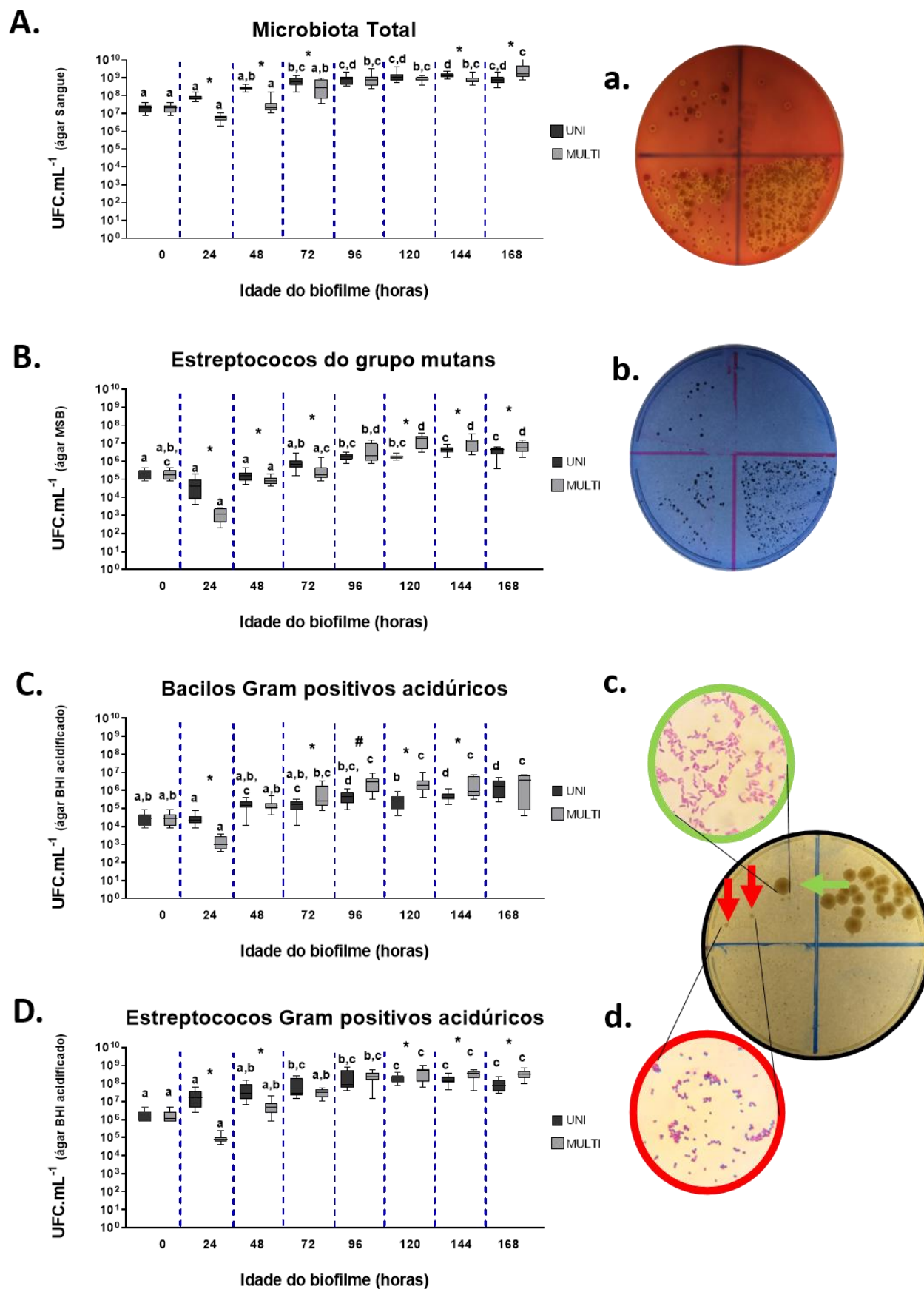
Ao ser avaliados os estreptococos do grupo mutans dentro da estratégia UNI (Figura 19B/b) foi observada uma semelhança da população entre o inóculo com as idades de 24 até 72 horas. Para essa estratégia, entre as 72 e 96 apresentou-se um aumento na população e depois o valor se manteve estável até as 168 horas. Foi detectada uma diferença entre 72 horas com as duas últimas idades. Na estratégia MULTI as 24 e 48 horas foram quantificados menos microrganismos do que os presente no inóculo, porém não houve diferença estatística. De 24 até 96 horas existiu um aumento gradativo da microbiota, forma detectadas diferenças entre as idades inferiores a 72 horas com idades superiores a 96 horas. O inóculo apresentou diferença com 120, 144 e 168 horas. Ao serem comparadas as duas estratégias de inoculação em cada uma das idades foram detectadas diferenças nas idades de 24, 48, 72, 120 e 144 horas.

No meio de cultura BHI acidificado foram identificados dois tipos de colônias, amostras delas foram isoladas do meio de cultura para realizar coloração de Gram e foram identificadas duas morfologias. As colônias que apresentavam maior tamanho e uma superfície lisa foram identificadas como bacilos Gram positivos (Figura 25c). As colônias que apresentavam um menor tamanho e um formato de ponto foram identificadas como estreptococos Gram positivos (Figura 25d). As UFC.mL⁻¹ dos dois grupos microbianos acidúricos foram contadas separadamente.

Na estratégia UNI foi observado que os bacilos Gram positivos acidúricos (Figura 24C) conseguiram formar biofilme sobre a superfície apresentando valores semelhante desde as 24 até as 72 horas. A idade de 96 horas apresentou um aumento e foi detectada uma diferença ao ser comparado com 24 horas. Os valores das seguintes idades não apresentaram diferenças com as 96 horas, no entanto 120 horas foi diferente com 144 e 168 horas. Na estratégia MULTI as 24 foi detectada a menor quantidade de bacilos, no entanto não existiu diferença estatística com o inóculo. De 24 para 72 horas houve um aumento gradativo da população apresentando diferença entre 24 e 72 horas. Após das 72 horas os valores se mantiveram estáveis até chegar as 168 horas, unicamente o valor de 72 horas foi semelhante com o inóculo. Ao serem comparadas as duas estratégias de inoculação na mesma idade foram detectadas diferenças, com exceção de 48 e 168 horas.

Na estratégia UNI os estreptococos Gram positivos acidúricos (Figura 25D) detectados na primeira idade do biofilme (as 24 horas) apresentaram um valor semelhante ao inóculo. Entre as 48 e 72 foi detectado um aumento da população e os valores mantiveram-se estáveis até a finalização do experimento. Foram detectadas diferença estatística entre as idades superiores a 72 horas com o inóculo e as 24 horas. Já para a estratégia MULTI foi observada que os microrganismos que colonizaram as 24 horas eram menos do que os presentes no inóculo. Depois foi observado um aumento gradativo da população até as 96 horas, porém não existiu diferença estatística entre as primeiras três idades do biofilme, nem com o inóculo. Após de 96 horas o valor manteve-se estável até as 168 horas, sem ser detectadas diferenças estatísticas. Quando avaliado o fator idade foram detectadas diferenças estatísticas as 24, 48, 120, 144 e 168 horas entre as duas estratégias de inoculação.

Figura 19 - Dinâmica populacional microbiana por UFC mL⁻¹ dos biofilmes frente a duas diferentes estratégias de inoculação.



Representação gráfica dos valores de UFC mL⁻¹ (eixo Y) dos microrganismos do biofilme recuperados dos biofilmes em relação as estratégias de inoculação única (UNI – barra preta) e múltipla (MULTI – barra cinza) para as idades 0, 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h (eixo X). Para microbiota total a quantificação foi realizada a partir da recuperação em ágar sangue (A/a), e para *Streptococcus* do grupo mutans em ágar MSB (B/b). As colônias com maior tamanho (c) encontradas no ágar BHI ácido foram classificadas como Bacilos Gram positivos (D). As colônias de menor tamanho (d) encontradas no ágar BHI ácido foram classificadas como Bacilos Gram positivos (d), a dinâmica populacional destes microrganismos foi representada (D) e calculada a sua proporção com referência a microbiota total (E). Para o fator idade do biofilme foi realizada one-way ANOVA seguido de pós-teste de Tukey ou Games-Howell dependendo da homogeneidade das variâncias apresentado dentro de cada estratégia de inoculação. Para o fator modelo de biofilme se realizou teste *t* Student homocedástico ou heterocedástico segundo fosse necessário em cada uma das idades. Quando os dados apresentaram distribuição não normal, foi realizado o teste de Kruskal-Wallis seguido de pós-teste de Dunn para as comparações entre as idades e teste *U* de Mann-Whitney para a comparação das estratégias. As mesmas letras minúsculas representam igualdade dentro do fator idade ($p > 0,05$), asteriscos representa diferença no fator estratégia de inoculação ($p < 0,05$), $n=6$.

Fonte: Elaboração própria.

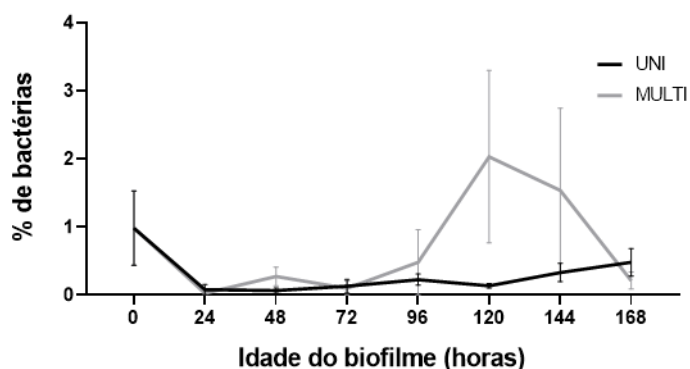
De forma global, as duas estratégias apresentaram um aumento da população de todos os grupos microbianos com o passar do tempo. As principais diferenças estatísticas foram detectadas entre as primeiras idades (24 e 48 horas) com as idades finais (144 e 168 horas), o período compreendido entre 76 a 96 horas sempre registrou pequenos aumentos e foi a fase de transição. Adicionalmente foram detectadas diferenças entre as estratégias de inoculação sendo que nas primeiras idades do biofilme MULTI sempre apresentou uma menor população e nas últimas idades uma maior população. Entretanto, colônias de fungos do gênero *Candida* foram detectadas somente no inóculo, assim, posteriormente não houve contagem de colônias no meio de cultura SDA.

Considerando o valor de UFC.mL⁻¹ da microbiota total (ágar sangue) como 100%, foi calculada a porcentagem de cada grupo bacteriano. As bactérias pertencentes aos estreptococos do grupo mutans tiveram uma baixa representatividade para as duas estratégias (Figura 20 A), em torno de 1 % no total do inóculo, posteriormente esse valor diminuiu nas suspensões do biofilme, unicamente na estratégia MULTI nas idades de 120 e 144 horas foram registrados uma maior proporção gerando altas variabilidades, no entanto a média da proporção foi próxima de 2 e 1,5 % respectivamente. A porcentagem de bacilos Gram positivos na microbiota total (Figura 20B), representou entorno do 0,15 % no total do inóculo, durante todo o desenvolvimento do biofilme continuou tendo uma baixa representatividade para as duas estratégias, < 0,5 % no total do inóculo e das suspensões do biofilme. Finalmente a proporção de estreptococos Gram positivos

acidúricos na microbiota total (Figura 20C) foi a que mais apresentou variabilidade ao longo do experimento, mas sempre foi o grupo mais representativo nas duas estratégias de inoculação. Na estratégia UNI chegou a representar entorno de 32 % em 96 horas e em MULTI entorno de 54 % em 120 horas.

Figura 20 - Porcentagem da dinâmica populacional da microbiota nos biofilmes frente a diferentes estratégias de inoculação.

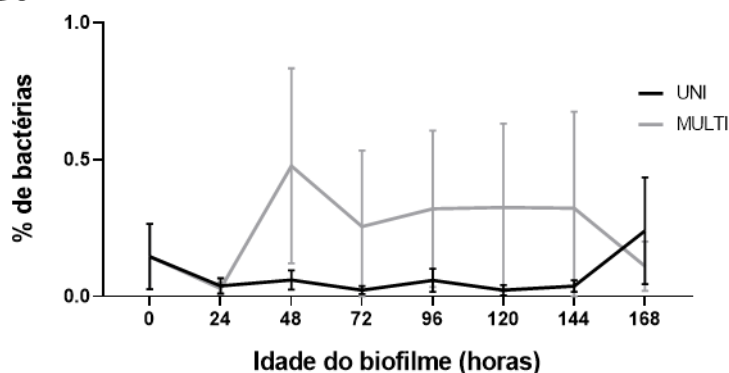
A. Estreptococos do grupo mutans



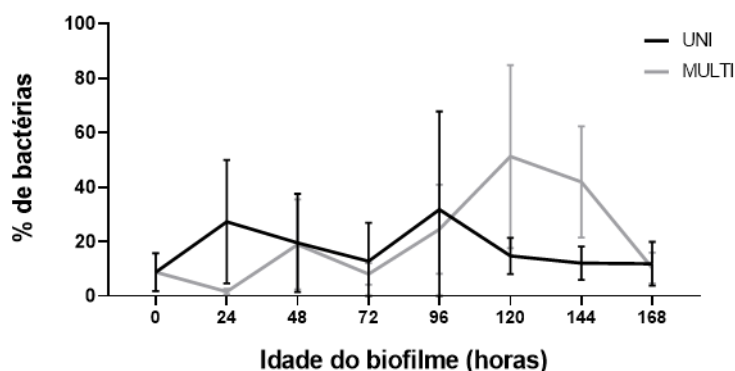
Representação gráfica em porcentagem dos valores de UFC mL^{-1} (eixo Y) dos microrganismos recuperados dos biofilmes com referência a microbiota total. Estratégias de inoculação única (UNI) e múltipla (MULTI) para as idades 0, 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h (eixo X). Estreptococos do grupo mutans (A). Bacilos Gram positivos acidúricos (B). Estreptococos Gram positivos acidúricos (C).

Fonte: Elaboração própria

B. Bacilos Gram positivos acidúricos



C. Estreptococos Gram positivos acidúricos

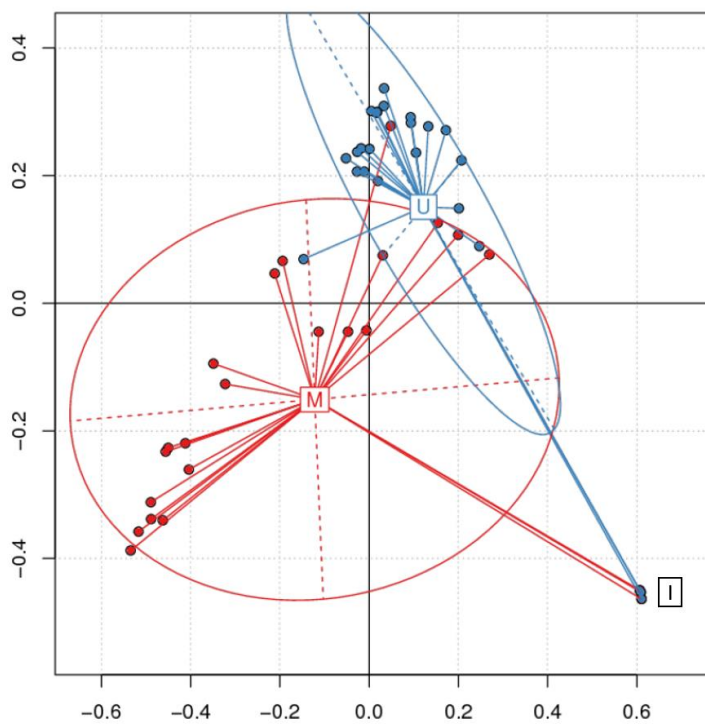


Abundância relativa via DNAseq segundo a estratégia de inoculação

Nos dados obtidos por técnicas cultivo a população da microbiota total sempre foi muito maior do que qualquer grupo microbiano específico, de forma geral houve um aumento da população nos três subgrupos de microrganismos conforme envelhecia o biofilme, e as duas estratégias de inoculação apresentaram um comportamento e valores semelhantes. No entanto no sequenciamento (Figura 21), fica evidenciado que houve um ponto de origem comum (inóculo) e conforme o biofilme envelheceu a abundância das espécies detectadas foi mudando. As duas estratégias conformaram agrupamentos que se diferenciaram, embora alguns pontos tivessem apresentado muita proximidade e existisse uma região de interseção entre as duas estratégias. Adicionalmente foi observado que em UNI houve mais agrupamento, enquanto em MULTI houve mais dispersão entre as amostras, demonstrando maiores mudanças na diversidade provavelmente pela introdução de novos microrganismos pelas múltiplas inoculações. Embora tenham sido avaliados vários níveis taxonômicos, são apresentadas as análises nos níveis gênero e espécie.

Ao observar a distribuição dos gêneros nas amostras (Figura 22A) foi detectado que o inóculo de *pool* de 57 voluntários apresentava a maior diversidade em comparação a todas as amostras analisadas. Vale a pena ressaltar que este foi seria exatamente o mesmo inóculo utilizado para as duas estratégias. Foram detectados 23 gêneros bacterianos nas amostras e ainda existiram um grupo de não classificados e outros gêneros.

Figura 21 - A análise de componentes principais (PAC) com base na abundância em unidades taxonômicas operacionais (OTU).



Um ponto representa cada amostra. A letra M em vermelho representa a estratégia MULTI e a letra U em azul representa a estratégia UNI, o ponto de partida das duas amostras foi o mesmo (o inóculo microbiano) representado com um I em preto. O primeiro componente principal localizado no eixo X componente explica 43,58% da variância e o segundo componente localizado no eixo Y representa 31,05%.

Fonte: Elaboração própria, adaptado de BGI ²⁰⁰, 2020

No inóculo foram detectadas altas proporções de 10 espécies (Figura 22B), os valores aproximados da proporção foram: 18 % *Haemophilus pareinfluenzae*, 11 % *Prevotella melaninogenica*, 6,5 % *Veillonella dispar*, 5 % *Neisseria subflava*, 4 % *Rothia mucilaginosa*, 1,5 % *Prevotella nansceincis*, 1,5 % *Veillonella parvula*, 0,5 % *Prevotella pallens*, 0,5 % *Rothia aeria*, <0,5 % *Shuttleworthia satellites*, <0,5 % *Streptococcus anginosus*, 49,5 % espécies não classificadas e 0,5% outras espécies. Conforme os biofilmes se tornavam mais maduros a proporção das espécies foi mudando de uma forma diferente para cada estratégia de inoculação. Os microrganismos que conseguiram se aderir as superfícies e ter uma alta representatividade ao longo do experimento foram principalmente os gêneros *Veillonella*, *Streptococcus*, *Prevotella* e *Peptostreptococcus*.

Isto aconteceu em todas as idades e para as duas estratégias, mas apresentado diferentes proporções.

Nas duas estratégias de inoculação foi observado que a diversidade de microrganismos mudou do inóculo para a primeira idade avaliadas (as 24 horas), isto devido que nem todos os microrganismos presentes no inóculo conseguiram se aderir as superfícies e formar biofilmes. Desta forma alguns microrganismos aumentaram a sua abundância relativa e outros diminuíram. A espécie *V. dispar* teve uma maior abundância nos biofilmes ao ser comparado com os inóculos, representando entorno de 15 % a 20 %, e manteve esta proporção praticamente constante ao longo dos períodos avaliado nas duas estratégias avaliadas. A espécie *P. melaninogenica* também foi um microrganismo encontrado constantemente nas duas estratégias de inoculação, no entanto a sua proporção nos biofilmes foi menor do que no inóculo, registrando valores entorno de 7 a 10 %. A espécie *V. parvula* também foi detectada tanto no inóculo, como em todas as idades do biofilme e nas duas estratégias de inoculação. Para a UNI representou entorno de um 2 % e para MULTI entorno de 4 %, nas idades de 24, 48 e 72 horas, posteriormente houve uma redução pela metade nas seguintes idades e nas duas estratégias.

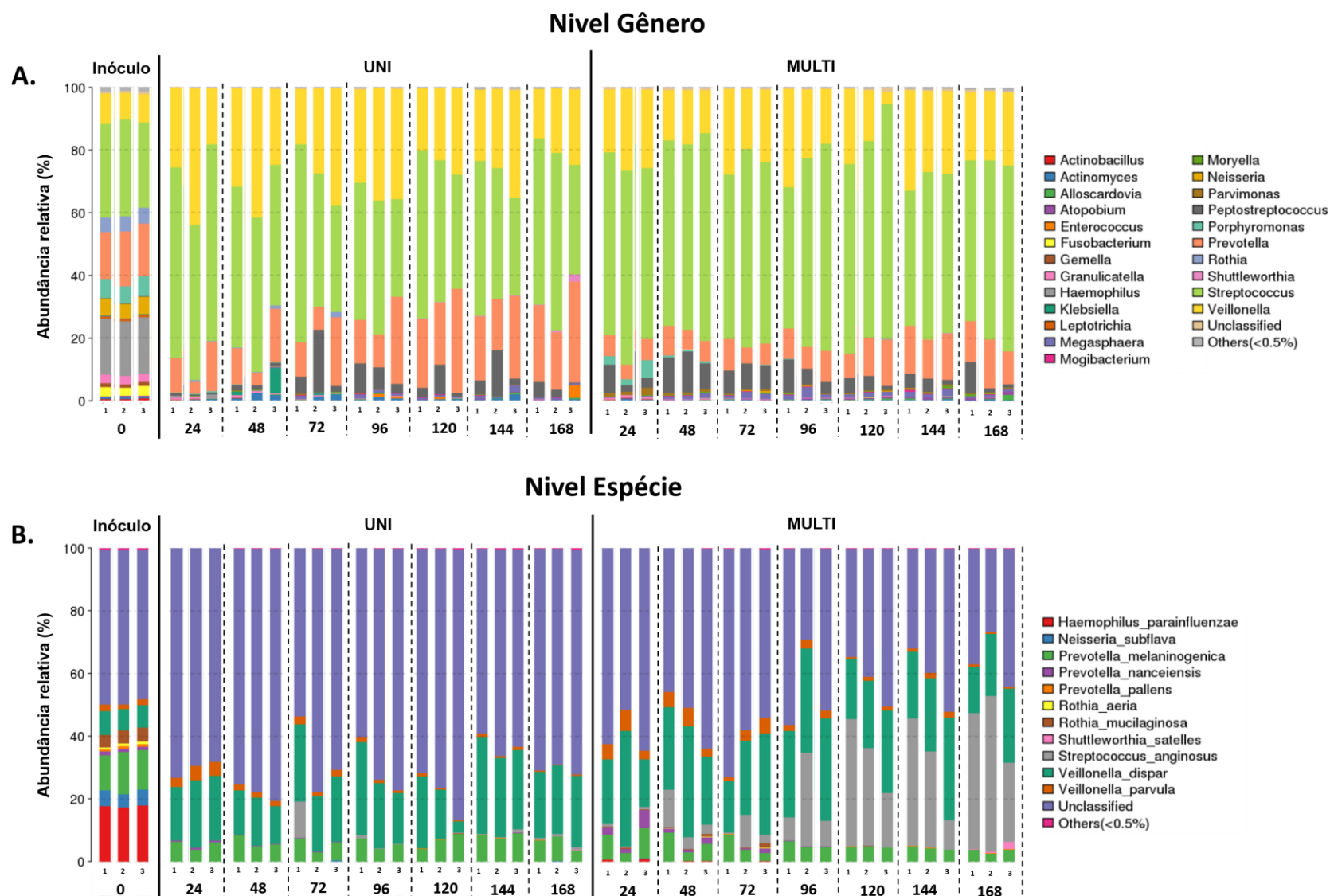
De forma geral na estratégia UNI os microrganismos que conseguiram colonizar os discos, se mantiveram e preservaram suas proporções até o final; já para a estratégia MULTI a diversidade microbiana se manteve maior. Nas primeiras idades em MULTI se observou que os microrganismos com representação minoritária garantiram um espaço no biofilme. A espécies *P. nansceincis* se mostrou evidente em 24 horas, em relação ao inóculo, e manteve uma proporção de aproximadamente 3 % até as 96 horas. A espécie *H. pareinfluenzae* foi detectada em proporções inferiores a 1 % até as 72 horas. As espécies *R. aeiria* e *R. mucilaginsa* foram detectadas em proporções inferiores a 1% as 24 e 48 horas. A espécie *S. anginosus* foi detectada em proporções muito baixas nas idades de 24 e 48 horas, após deste horário foi ganhando mais espaço até chegar a representar em torno de 30 %. As espécies *P. pallens* e *S. satellites*, que foram detectadas no inóculo, e posteriormente as idades de 144 e 168 horas, tendo uma representatividade inferior a 1 %. Finalmente o grupo de espécie não classificadas foi o mais predominante tanto nos inóculos, como nos biofilmes. Na estratégia UNI representam em torno de 75%

em todas as idades, no grupo MULTI a abundância relativa deste grupo foi diminuindo a partir das 96 horas, sendo de aproximadamente 40 %.

Os três gêneros que apresentaram uma maior abundância relativa nos biofilmes (Figura 22A) foram identificados também no nível taxonômico de espécie (Figura 22B). O gênero *Streptococcus* apresentou uma alta proporção, aproximadamente 50%, em relação aos outros microrganismos ao longo de todas as idades e nas duas estratégias.

No entanto no nível espécie não foi detectada essa mesma quantidade. Esta relação paradoxal é facilmente evidenciada no grupo UNI, pois, a espécie *S. anginosus* apresentou pouquíssima abundância e não foram nomeadas outras espécies para *Streptococcus*. Por outro lado, para a estratégia UNI o grupo de microrganismos não classificados manteve-se ainda abundante, ao longo do experimento, representando entre 50 e 60 %. Isto pode porque a abordagem metodológica utilizada não conseguiu diferenciar as espécies do gênero.

Figura 22 - Dinâmica populacional bacteriana por DNaseq no inóculo e nas suspensões de biofilme frente a duas diferentes estratégias de inoculação.



Representação gráfica da abundância relativa (%) de microrganismos identificados através do sequenciamento em nível gênero (A) e espécie (B) a partir de 3 pools de amostras (1, 2 e 3) de cada idade do biofilme.

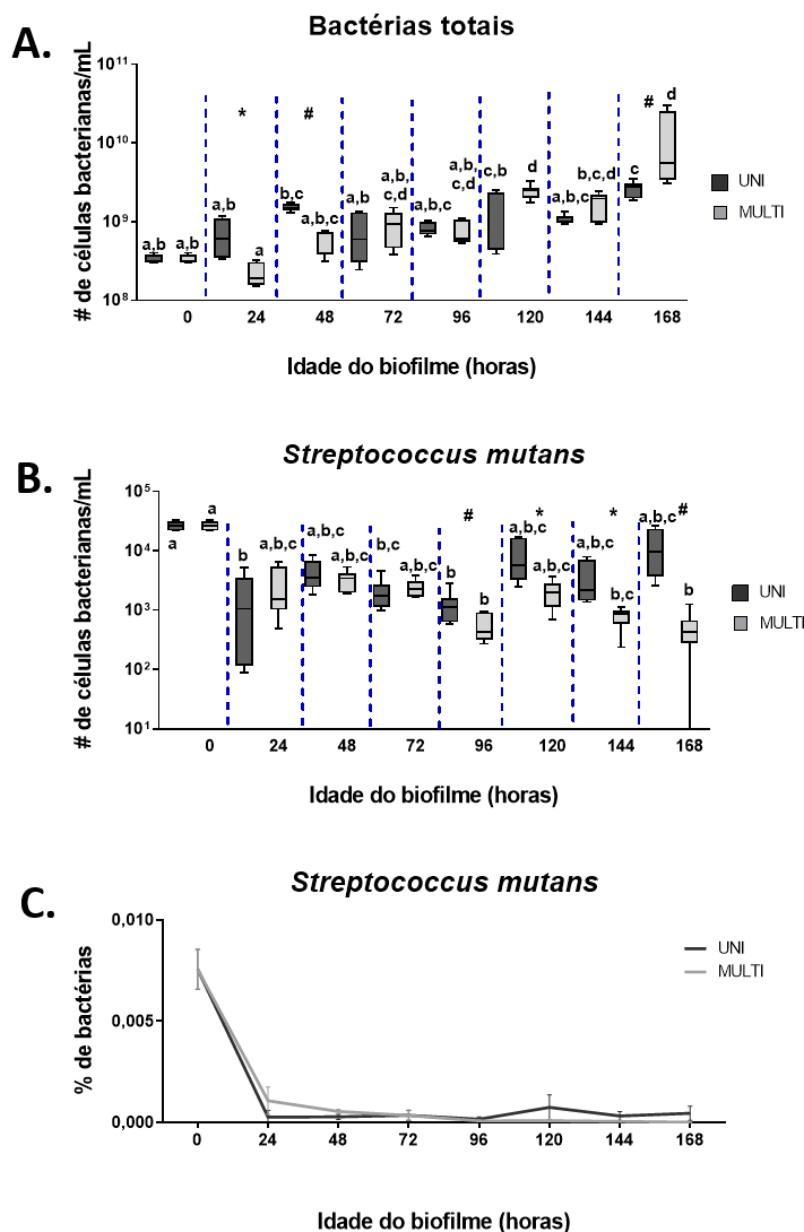
Fonte:
Elaboração própria.
Adaptado de BGI²⁰⁰, 2020.

Quantificação de células bacterianas via qPCR segundo a estratégia de inoculação

A quantificação do número de células de bactérias totais e de *S. mutans* foi uma complementação para os dados de sequenciamento porque *S. mutans* não foi detectado por tal metodologia (Figura 23A). Ao analisar a estratégia UNI foi observado que o número de células presente no inóculo foi superado pelo número de células presente nas suspensões de biofilme em todas as idades analisadas. Com o tempo um aumento gradativo deste grupo foi observado, com diferença entre a idade 24 e 168 horas. Dentro do grupo MULTI foi observado que as 24 horas os microrganismos que se aderiram as superfícies foram menores do que os existentes no inóculo, a partir das 24 horas se observou um aumento constante na da população até a finalização do experimento (168 horas). Ao comparar dentro de cada idade as duas estratégias foram detectadas diferenças nas idades de 24, 48 e 168 horas. De forma geral o número de bactérias/mL teve um comportamento semelhante ao observado na análise da microbiota total por UFC mL⁻¹, um aumento progressivo com o tempo.

Ao ser avaliados o número de microrganismos da espécie *S. mutans* (Figura 23B) foi observado nas duas estratégias que um valor alto se encontrava no inóculo, mas com o tempo, apesar desta espécie bacteriana ter conseguido se aderir ao biofilme, em nenhum momento registrou um valor maior do que o observado no tempo 0 horas. Na estratégia UNI o valor se manteve constante ao longo do tempo, já para o grupo MULTI observou-se uma diminuição após as 96 horas. Considerando o número de bactérias totais como 100%, foi calculada a porcentagem que representavam o número de células de *S. mutans* na microbiota total (Figura 23C) durante todo o desenvolvimento do biofilme. Observou-se uma baixa representatividade para as duas estratégias, começando em um valor < 0,01 % no inóculo e diminuindo a valores em torno de 0,001% após 24 horas.

Figura 23 - Dinâmica populacional bacteriana nos biofilmes por qPCR frente às duas diferentes estratégias de inoculação: Quantificação de células bacterianas totais e de *S. mutans* nos biofilmes.



Representação gráfica do número de células mL^{-1} (eixo Y) do *pool* de DNA dos biofilmes para cada idade (h) do biofilme (eixo X) frente a duas estratégias (UNI: Inóculo Único e MULTI: Múltiplos Inóculos). O número de bactérias totais (A) dos microrganismos foi aumentando conforme o biofilme envelheceu. O número de bactérias de *S. mutans* (B) se manteve sempre inferior ao tempo inicial 0h. No cálculo da proporção de *S. mutans* com relação as bactérias totais, observou-se uma diminuição para todas as idades comparadas com o inóculo (C). Os dados apresentaram distribuição não normal, foi realizado o teste de Kruskal-Wallis seguido de pós-teste de Dunn para as comparações entre as idades e teste *U* de Mann-Whitney para a comparação das estratégias. As mesmas letras minúsculas representam igualdade dentro do fator idade ($p > 0,05$), asteriscos representa diferença no fator estratégia de inoculação ($p < 0,05$). Foram utilizados 3 *pool*s para cada idade.

Fonte: Elaboração própria.

5.4.4 Matriz extracelular e biomassa dos biofilmes cariogênicos segundo a estratégia de inoculação

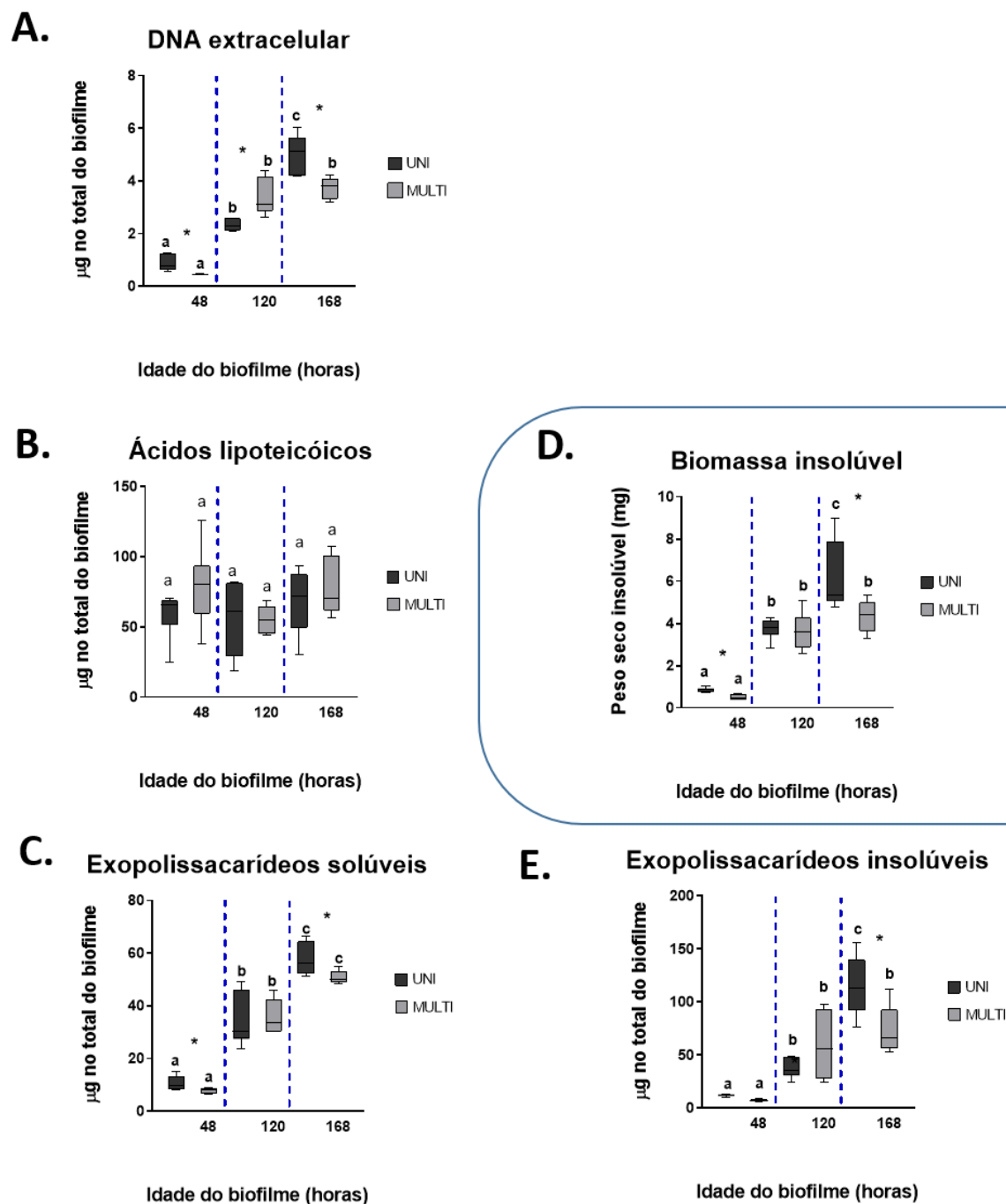
Na quantificação de eDNA (Figura 24A) ao comprar as diferentes idades dentro das duas estratégias de inoculação observou-se um aumento deste componente na porção solúvel da matriz extracelular do biofilme. Na estratégia MULTI o maior aumento foi de 48 para 120 horas, já para UNI o aumento foi gradual e as três idades apresentaram diferenças. Ao serem comparadas as duas estratégias em cada idade, observou-se uma diferença estatística, sendo sempre maior a quantidade de eDNA na estratégia UNI.

Foram detectadas quantidades semelhantes de ácidos lipoteicóicos na porção solúvel da matriz extracelular do biofilme (Figura 24B) em todas as idades do biofilme tanto para UNI como para MULTI. Ao serem comparadas as duas estratégias nas idades avaliadas, não foram detectadas diferenças.

Na quantificação de exopolissacarídeos solúveis em água observou-se que conforme o biofilme envelhecia, um aumento na quantidade deste componente aumentava (Figura 24C). O comportamento nas estratégias UNI e MULTI foi semelhante, e se detectaram diferenças entre todas as idades. Ao comprar as duas estratégias nas diferentes idades se detectaram diferenças significantes as 48 e 168 horas.

A biomassa foi expressa em mg, apesar de sugerir um valor muito elevado, pois os componentes da matriz extracelular do biofilme foram expressos em μg (Figura 24D), nesta quantificação também foram contabilizados os precipitados das suspensões de biofilme, consequentemente, esta representa o peso das células bacterianas e demais componentes insolúveis. Os valores de biomassa apresentaram alta variabilidade. No decorrer do tempo o biofilme foi adquirindo um maior número de microrganismos (item 5.4.2) e foi observada uma tendência de aumento da biomassa de 48 para 168 horas. Na estratégia MULTI foi detectado uma diferença entre a 48 horas e as idades 120 e 168 horas, já para UNI não houve diferença. Ao serem comparadas as duas estratégias foi detectada uma diferença unicamente na idade de 168 horas.

Figura 24 - Quantidade de componentes da matriz e de biomassa dos biofilmes frente às duas diferentes estratégias de inoculação.



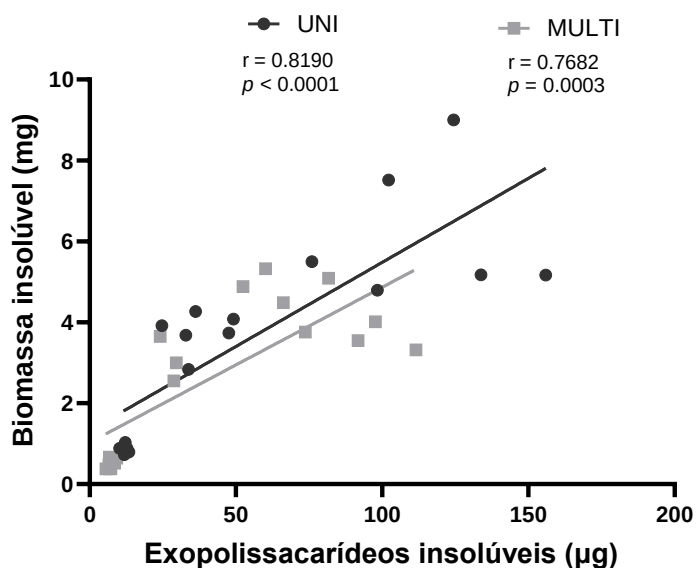
Representação gráfica no eixo Y dos valores dos componentes da matriz e do peso seco em relação as estratégias de inoculação única (UNI – barra preta) e múltipla (MULTI – barra cinza) para as idades 48, 120 e 168 h. Componentes solúveis: DNA extracelular (A), exopolissacarídeos solúvel (B) e ácidos lipoteicóicos (C). Componentes insolúveis: exopolissacarídeos insolúveis (D). A análise estatística para o fator idade do biofilme foi aplicado one-way ANOVA seguido do pós-teste de Tukey ou Games-Howell, dependendo da homogeneidade das variâncias apresentado dentro de cada estratégia de inoculação. Para o fator estratégia de inoculação foi aplicado teste *t* Student, homocedástico ou heterocedástico, de acordo com

cada idade. A biomassa insolúvel (E) foi analisado utilizando teste de Kruskal-Wallis seguido de pós-teste de Dunn para as comparações entre as idades e teste *U* de Mann-Whitney para a comparação das estratégias (distribuição não normal). Letras minúsculas representam igualdade dentro do fator idade ($p > 0,05$). Asteriscos representa diferença no fator estratégia de inoculação ($p < 0,05$), $n=6$.

Fonte: Elaboração própria

A quantificação de exopolissacarídeos insolúveis (Figura 24E) depende diretamente do cálculo da biomassa. Conforme existiu um aumento da idade os valores de biomassa insolúvel e de exopolissacarídeos insolúveis foram aumentando. Este comportamento semelhante nas das confirmou a presença de correlações positivas fortes entre estas duas variáveis (Figura 25). Na estratégia UNI foram detectadas diferenças entre todas as idades avaliadas, já para MULTI um aumento de 48 para 120 horas, e posteriormente, uma estabilização foram observados. Ao serem comparadas as duas estratégias, o comportamento também foi semelhante com a biomassa e foi detectada uma diferença as 168 horas.

Figura 25 - Correlação de Pearson entre biomassa e exopolissacarídeos insolúveis.



Representação gráfica dos valores registrados para as duas variáveis. Foram observadas correlações positivas fortes com significância estatística aplicada para as duas estratégias de inoculação, UNI (linha preta) e MULTI (linha cinza), e os valores de r e p foram apresentados no gráfico.

Fonte: Elaboração própria

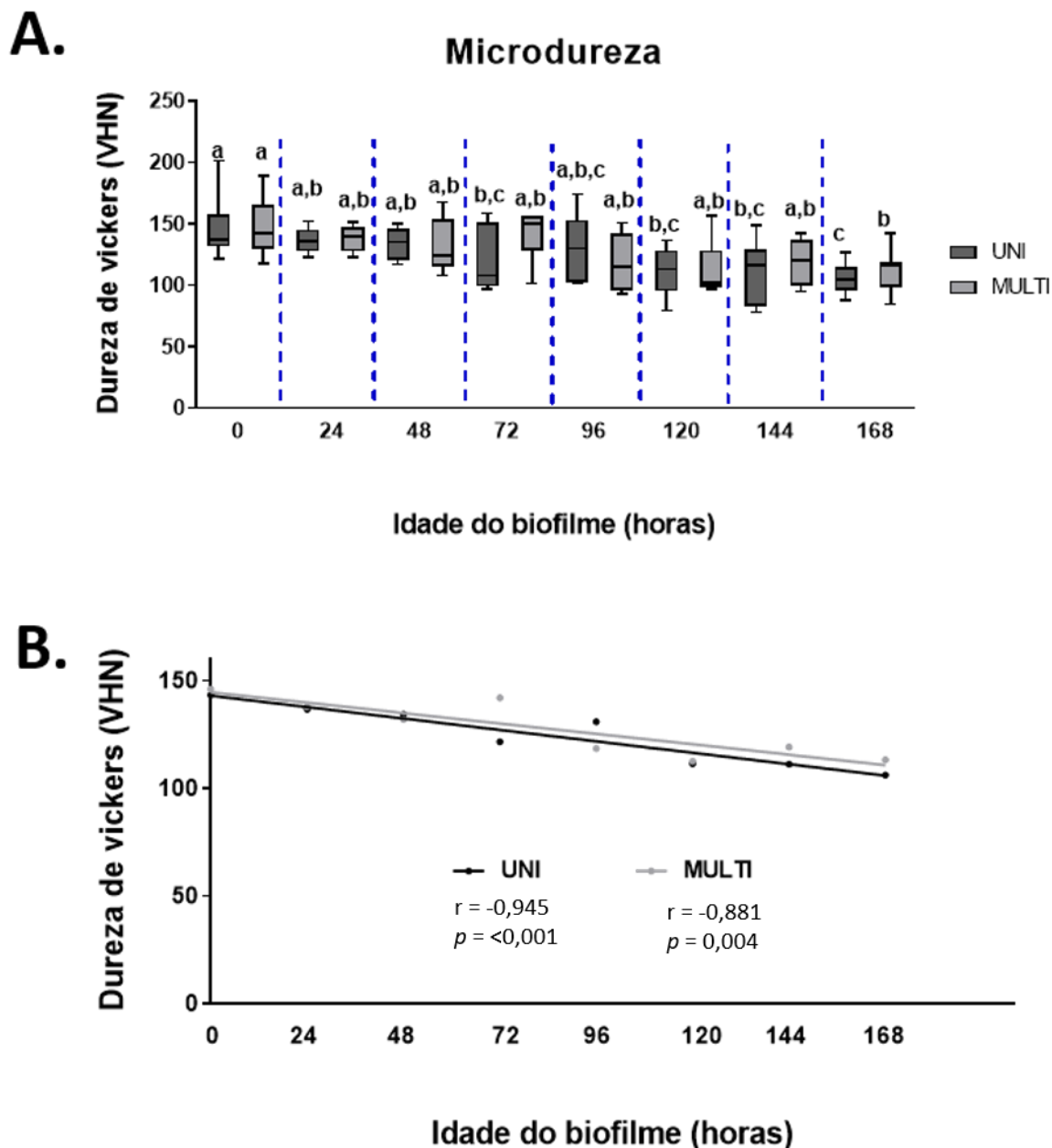
Finalmente, foi quantificado o quão representativo eram os exopolissacarídeos insolúveis no total do peso seco insolúvel do biofilme. O cálculo foi realizado para cada idade e estratégias de inoculação de forma separada. O valor de peso seco insolúvel foi considerado como 100 % e mediante regra de três se chegou na estimativa para cada um dos pontos (utilizando o valor de exopolissacarídeos insolúveis como referência), observou-se que esses exopolissacarídeos representam entre 1 e 2 % do peso seco insolúvel, existindo pequenas variações entre as duas estratégias e nas diversas idades do biofilme.

5.4.5 Microdureza e rugosidade da superfície do disco de esmalte após crescimento dos biofilmes cariogênicos segundo a estratégia de inoculação

A leitura da microdureza inicial nos discos de esmalte bovino utilizados para o crescimento dos biofilmes tiveram uma média de $143,2 \pm 19,9$ VHN para UNI e $146,1 \pm 21,9$ VHN para MULTI. Conforme o tempo, uma diminuição gradual da microdureza foi observada (Figura 26A). Na estratégia UNI foram detectadas diferenças após das 120 horas e para MULTI as diferenças foram detectadas a partir das 168 horas. O padrão foi muito semelhante nas duas estratégias de inoculação e não foram detectadas diferenças entre as idades.

Gráficos de dispersão foram realizados com o valor da média da microdureza para verificar se havia associação entre as variáveis peso seco e idade do biofilme (Figura 26B). Foram observadas correlações negativas muito fortes tendo significância estatística. Após de 168 os discos da estratégia UNI perderam em média 26 % e os da MULTI perderam 23 %.

Figura 26 - Microdureza da superfície de esmalte antes e após remoção dos biofilmes cariogênicos formados a partir de duas diferentes estratégias de inoculação.

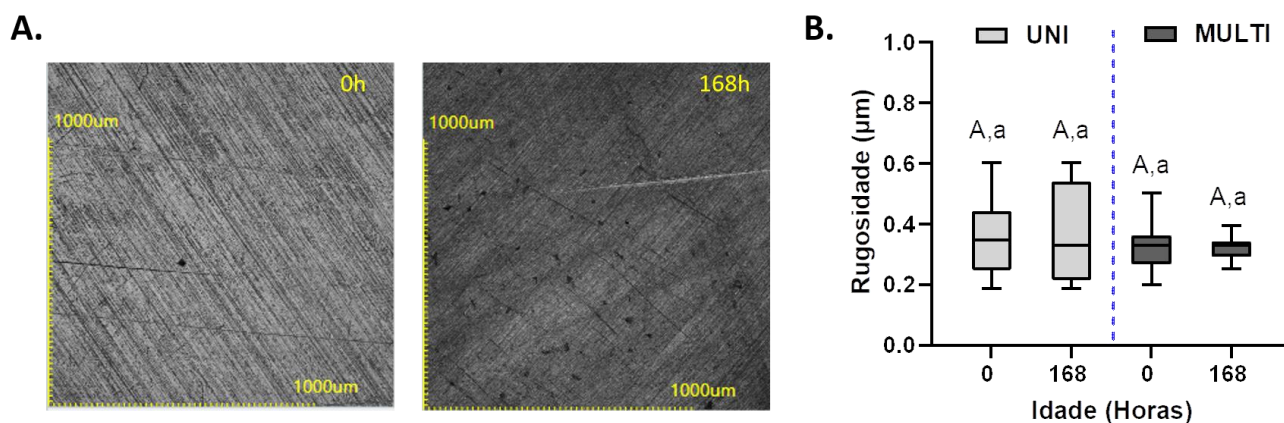


Representação gráfica dos valores de microdureza dos discos de esmalte bovino (eixo Y) para cada idade do biofilme (eixo X). Letras iguais denotam similaridade. Para o fator idade do biofilme foi realizada one-way ANOVA seguido de pós-teste de Tukey ou Games-Howell dependendo da homogeneidade das variâncias apresentado dentro de cada estratégia de inoculação. Para o fator modelo de biofilme se realizou teste *t* Student homocedástico ou heterocedástico segundo fosse necessário em cada uma das idades., $p < 0,05$, $n=6$. Na parte inferior representação gráfica dos valores de média de % de microdureza (no eixo Y) para cada idade do biofilme (no eixo X) nos dois modelos de biofilme.

Fonte: Elaboração própria.

As imagens registradas apresentaram superfícies planas, nas quais foram identificados alguns sulcos provenientes do processo de polimento (Figura 27A). As 0 horas era claramente visualizada a endentação proveniente do teste de microdureza, enquanto as 168 horas existiam mais variações topográficas que aparentemente são arranhões e buracos. A leitura da rugosidade inicial nos discos de esmalte apresentou uma média de $0,36 \pm 0,12 \mu\text{m}$ para UNI e $0,34 \pm 0,09 \mu\text{m}$ para MULTI. Os valores registrados após de 168h de crescimento e remoção do biofilme foram $0,36 \pm 0,15 \mu\text{m}$ para UNI e $0,32 \pm 0,04 \mu\text{m}$ para MULTI. Não foram detectadas diferenças estatísticas ao comparar as estratégias de inoculação, nem ao comparar as idades avaliadas, embora que visualmente existissem diferenças (Figura 27B).

Figura 27 - Rugosidade da superfície de esmalte antes e após remoção dos biofilmes cariogênicos formados a partir de duas diferentes estratégias de inoculação.



(A) Imagens representativa obtida com um microscópio confocal a laser Olympus lext 4000 usando uma lente MPLFLN10x. Se observam amostras as 0 e 168 horas. (B) Representação gráfica dos valores Ra (μm) dos discos de esmalte medidos antes e depois da formação do biofilme (eixo Y), para as duas idades (eixo X). Para o fator estratégia de inoculação foi aplicado teste *t* Student as 0 horas e *U* Mann-Whitney as 168 horas (representado por letras maiúsculas). Para o fator idade foi aplicado teste *U* Mann-Whitney para UNI e *t* Student para MULTI (representado por letras minúsculas). Letras iguais denotam similaridade ($p > 0,05$), $n=6$.

Fonte: Elaboração própria

6 DISCUSSÃO

Vários fatores estão envolvidos no desenvolvimento da cárie dentária e muitos modelos *in vitro* são utilizados para simular e compreender a doença (Maske et al. ¹⁸, 2017; McBain ⁷⁸, 2009, Sim et al. ⁷⁵, 2016). No entanto, a complexidade real da doença foi subestimada pela simplificação na interpretação dos resultados obtidos por metodologias que utilizam microrganismos específicos, sendo estes apresentados como sinônimo de 'cárie'. Consequentemente, surge o questionamento: "Estamos representando a cárie com modelos *in vitro*?". Para esta questão, durante o desenvolvimento do presente estudo, foram incluídos fatores que estão diretamente envolvidos com a progressão da doença (dente, microrganismos e dieta) para poder assim avaliar, em novos modelos de biofilme, algumas características consideradas importantes no desenvolvimento da cárie.

Entre as metodologias mais amplamente utilizada para avaliar o início da cárie está a confecção de blocos de esmalte bovino e o isolamento da dentina mediante a utilização de barreiras mecânicas, como o verniz de unhas. Com esta metodologia se obtém uma área de 9 ou 16 mm² de esmalte para o crescimento dos biofilmes (Vieira et al. ¹⁵¹, 2005). Porém, compostos como os ftalatos, benzenos e toluenos, que muitas vezes estão presentes em vernizes para unhas, tem apresentado efeitos tóxicos em humanos (Bang et al. ¹⁵², 2011), pelo qual poderiam influenciar no desenvolvimento fidedigno dos biofilmes orais. No presente trabalho, foi sugerido e padronizado a confecção de discos que apresentavam unicamente esmalte na sua composição, diminuindo a interferência de outros substratos.

Preservar intacto o esmalte superficial, tanto na sua anatomia como na sua organização histológica, permitiu que os microrganismos se organizassem de uma forma semelhante como poderia acontecer no ambiente oral (Simmer et al. ¹¹⁹, 2010). Embora que os microrganismos tenham a facilidade de colonizar diversas superfícies, os vidros e plásticos diferem muito das superfícies encontradas na cavidade bucal (Brecx et al. ¹³⁷, ¹³⁸, 1980, 1981). Adicionalmente, a utilização de corpos de prova em formato de disco e com duas faces (esmalte superficial e profundo) permitiu aumentar a área de esmalte para o crescimento do biofilme de 9 ou 16mm² para 99 mm², ao mesmo tempo que forneceu uma superfície plana para avaliar a microdureza e rugosidade, no entanto

apresentou-se a desvantagem de não existir valores de referência previamente relatados na literatura.

Dessa maneira, os discos de esmalte foram expostos a saliva, para gerar uma interação entre macromoléculas salivares e a formação de uma película (Hannig e Joiner ⁴², 2006; Siqueira et al. ⁹⁷, 2007). Posteriormente, foram introduzidos microrganismos pelo inóculo saliva, permitindo que estes colonizassem as superfícies (Rickards ⁶, 2003). As semelhanças encontradas entre os tecidos dentários dos bovinos com os tecidos de humanos (Teruel et al. ¹²⁰, 2015), permitiu uma representação mais próxima do local onde a doença cárie é encontrada. Além disso, o aproveitamento de dentes de animais remanescentes da indústria alimentícia, representa uma opção viável e de fácil acesso para a realização de pesquisas.

Desta maneira, a diversidade da cavidade bucal pode ser melhor compreendida mediante a utilização de amostras clínicas de humanos, como é realizado nos modelos de biofilme microcosmo (McBain ⁷⁸, 2009; Maske et al. ⁷⁹, 2017; Azeredo et al. ²⁶, 2017). Porém, muitos microrganismos não têm a facilidade de serem preservados com os métodos de cultura convencionais presentes nos laboratórios de pesquisa, por este motivo neste estudo foi utilizado a saliva como caldo de cultura. Para reduzir a variabilidade, naturalmente oferecida pela microbiota de cada voluntário, foi realizado um *pool* das amostras de saliva dos voluntários, o qual foi congelado para evitar modificações da população inicial (Exterkate et al. ¹³⁴, 2010).

A utilização desta metodologia resultou em um inóculo com uma ampla biodiversidade pois a saliva inclui representantes das várias superfícies encontradas na cavidade bucal. Este inóculo permitiu a formação de biofilme *in vitro* que apresentava gêneros e espécies microbianos comumente encontrados nos biofilmes dentais (Rosier et al. ¹¹, 2018; Lynge Pedersen e Belstrom ⁹⁵, 2019). Compreendemos que o *pool* das amostras não pode ser considerado como representativo de um indivíduo, uma vez que o microbioma oral humano apresenta uma alta variação interindividual na diversidade microbiana, porém alguns grupos microbianos sempre estão presentes e são predominantes, estas características são mantidas no *pool* representando assim à população de estudo como um todo. Além disso, esta estratégia permite uma melhor reprodutibilidade dos biofilmes *in vitro* (Kristen et al. ¹⁵³, 2015).

Dois tipos de modelos de desafio nutricional foram avaliados com outros dois modelos já amplamente utilizados na literatura, para comparar a sobrevivência dos microrganismos. Estes modelos foram baseados em estratégias de troca do caldo de cultura para a simulação da frequência da ingestão de alimentos em humanos (Florez Salamanca et al.¹²⁵, 2020).

Nos modelos propostos a saliva também foi utilizada como meio de cultura durante a maioria do tempo experimental. Existiram períodos de exposição a carboidratos de curta duração. Algo semelhante acontece nos humanos, pois o consumo de alimentos tem uma curta duração e está seguido de períodos prolongados de jejum. Nutricionalmente, é recomendado realizar várias refeições ao longo do dia (Jenkins et al.³⁰, 1989; Nyström et al.⁸⁷, 1993; Franko et al.³¹, 2008). A combinação de carboidratos utilizada foi de sacarose e amido, uma vez que estes favorecem os microrganismos considerados cariogênicos, e consequentemente, levam a formação da doença cárie (Duarte et al.¹⁰⁴, 2008; Klein et al.²¹, 2009). Em contrapartida a ausência de carboidratos nos períodos de jejum permite que os microrganismos utilizem como recursos nutricionais as glicoproteínas salivares, os restos de células lisadas, os componentes depositados na matriz extracelular, entre outros (Bowden⁹², 1997; Fleming et al.⁵¹, 2007; Wimppeny⁵², 2009; Inui et al.⁹³, 2015).

No entanto, em muitos experimentos *in vitro* a estratégia mais utilizada é a exposição a um caldo de cultura contendo diferentes tipos e concentrações de carboidratos (Maske et al.⁷⁹, 2017; Azeredo et al.²⁶, 2017). Desta maneira, os microrganismos consomem os recursos nos primeiros horários resultando em um caldo de cultura saturado de resíduos metabólicos. Tais resíduos muitas vezes são ácidos, levando os microrganismos presentes a sobreviverem em um entorno ácido por horas, situação que difere muito do que acontece na cavidade bucal e gerando uma pressão seletiva de grupos microbianos específicos (Marsh^{36,13}, 1994, 2003; Takahashi¹⁷, 2015), como ocorreu para M1 e M2. Para contornar este fator, nestes modelos propostos M3 e M4 foram realizadas trocas do meio de cultura com uma maior frequência deixando intervalos de tempo mais realistas. Estas trocas simulariam a refeição finalizada, etapa na qual a saliva e os movimentos das mucosas orais ajudam

na remoção de resíduos dos alimentos, na neutralização do pH da cavidade bucal e na remineralização do esmalte (Hicks et al.⁴³, 2003, Buzalaf et al.¹²³, 2012).

Nos modelos M1 e M2 foi observado que os microrganismos utilizaram os carboidratos que estavam presentes nos caldos de cultura e tornaram o meio de cultura ácido, favorecendo assim algumas espécies específicas, principalmente aos correspondem ao grupo mutans (Marsh^{36, 13}, 1994, 2003; Takahashi¹⁷, 2015). Já nos Modelos M3 e M4 foi observado a progressão de outros grupos microbianos e não só de estreptococos do grupo mutans, provavelmente diversas rotas metabólicas foram ativadas quando houve pouca disponibilidade de nutrientes provenientes da dieta do hospedeiro para obter energia da saliva (Nyström et al.⁸⁷, 1993; Carlsson et al.¹⁵⁴, 1997; Rudney¹⁵⁵, 2000). Os valores de pH apresentados neste estudo representam o ambiente externo do biofilme, o que é equivalente ao pH da saliva e da cavidade bucal; desta forma os modelos M1 e M2 geram um entorno hostil que não é comum para a cavidade bucal e resulta na morte de muitas espécies, gerando uma superestimação dos dados da população microbiana (Florez Salamanca et al.¹²⁵, 2020).

Outra superestimação que pode ocorrer é enquanto o perfil da perda de minerais, a qual pode ser avaliada por ensaios de microdureza. A má interpretação pode ocorrer em diversos estudos *in vitro* que apresentam desafios nutricionais semelhantes com M1 e M2. Nestes modelos não há chance para que os biofilmes e os corpos de prova de esmalte retornem a valores de pH neutro, além de não oferecerem os eletrólitos e as proteínas necessárias no processo de remineralização (Richardson et al.¹²¹, 1993; Hicks et al.¹⁶, 2004; Florez Salamanca et al.¹²⁵, 2020). Desta forma estes modelos apresentam de forma prolongada um entono ácido, o que favorece a degradação bioquímica do dente (biocorrosão) afetando de uma forma mais agressiva e indiscriminada quase a totalidade das estruturas dentárias (Dawes¹²⁶, 2003; Grippo et al.¹²⁷, 2012). Este perfil foi observado nos discos utilizados em M1, os quais perderam entorno de 27 % do valor da dureza inicial ao serem avaliados na idade 24 horas, quando somente tinham sido expostos uma vez aos carboidratos. Já para M2 a primeira exposição aconteceu a idade 29 horas, isto representou uma perda aproximada do 57% da dureza. A perda total de microdureza após 72 horas foi de aproximadamente 60% para M1 e M2, enquanto para M3 e M4 foi de aproximadamente 20% sendo mais sutil e progressiva. Este perfil é mais

semelhante com o que acontece nas lesões subclínicas, uma desmineralização de dimensões microscópicas causado pela interação entre a superfície dos dentes e o fluído ácido interno do biofilme (Gao et al. ¹⁵⁶, 2001).

Outro ensaio utilizado para avaliar a influência deste entorno na superfície do dente é a avaliação da rugosidade das superfícies polidas dos discos de esmalte pela técnica de microscopia confocal. A utilização desta técnica fornece uma região de análise de aproximadamente 17 % da superfície, sendo mais representativa em relação a outras técnicas utilizadas. Para isso foram adquiridas imagens com menores magnificações para o entendimento dos materiais, pois medições com maiores magnificações de pequenas áreas podem sugerir a impressão de que a superfície é plana (Florez Salamanca et al. ¹²⁵, 2020). Na literatura tem sido relatado que a rugosidade das superfícies intraorais é $\leq 0,2 \mu\text{m}$, porém as metodologias utilizadas empregavam comprimentos curtos e aparelhos pouco sensíveis (Bollen et al. ¹⁵⁷, 1997). No presente estudo a média obtida para a rugosidade aritmética dos corpos de prova foi de $1,3 \mu\text{m}$ sendo inferior aos valores encontrados em procedimentos clínicos odontológicos de rotina, como cimentações, ajustes e polimentos, os quais atingem uma escala superior a $15 \mu\text{m}$ (Janiszewska-olszowska et al. ¹⁵⁸, 2020; Incesu et al. ¹⁵⁹, 2020). Desta forma consideramos que após a padronização, este material era apto para ser utilizado no estudo. Além disso, consideramos que a etapa da formação da película salivar foi de extrema importância, pois as proteínas presentes na saliva fornecem locais de clivagem para que os microrganismos colonizem as superfícies (Hannig e Joiner ⁴², 2006).

De modo geral, os valores de rugosidade apresentaram uma alta variabilidade ao longo do experimento, porém não foram observadas diferenças estatísticas entre as idades. Para este resultado, uma hipótese é que a ação mecânica para a remoção do biofilme dos discos (homogeneização com vórtex e banho ultrassônico) resulta na normalização das irregularidades que conferem a rugosidade. Em modelos *in vivo* de lesão ativa do esmalte existe a dissolução dos cristais mais externos, porém a exposição a forças mecânicas orais (incluindo escovação dos dentes) são gerados micro-desgaste que normalizam as irregularidades da superfície (Thylstrup et al. ³³, 1994). Outra hipótese sugerida é que ocorreu uma desmineralização subsuperficial, a qual não gerou

alterações na integridade dos dentes, algo semelhante com as lesões manchas brancas (Kleter ⁴¹, 1998).

Algumas características dos modelos M3 e M4 foram mais semelhantes com o que acontece *in vivo*. A constante troca de meios de caldo de cultura manteve um pH próximo ao do ambiente oral (Anderson et al. ¹⁶⁰, 2001). Esta dinâmica favoreceu a formação e o acúmulo de biofilme sem gerar uma pressão seletiva que superestimasse a proporção de estreptococos do grupo mutans, ou seja, possivelmente em estes modelos não foi gerado uma seleção de um único grupo microbiano e ao mesmo tempo permitiu uma desmineralização sutil e progressiva do esmalte (Marsh ^{36, 13}, 1994, 2003).

Consideramos que os dois modelos propostos podem ser melhores alternativas laboratoriais para compreender os biofilmes orais e as patologias que eles geram. Contudo, o modelo M3 'Três refeições diárias' apresentou uma menor dificuldade metodológica, uma vez que envolve menos trocas de meios por dia, o que reduz a possibilidade de contaminação, além de utilizar um menor volume de saliva (Florez Salamanca et al. ¹²⁵, 2020). A saliva é um recurso escasso ao ser comparado com um meio de cultura fornecido por um fabricante, pois depende da participação de voluntários que doam pequenos volumes, adicionalmente este fluido pode ser um veículo de transmissão de patógenos incluindo o SAR-CoV-2.

Posteriormente, o modelo M3 foi utilizado para os ensaios de comparação entre duas estratégias de inoculação. Estes ensaios tiveram como objetivo verificar se a introdução de novos microrganismos em momentos diferentes do biofilme, resultaria na colonização secundária e tardia de microrganismos. Para isso foi utilizado um inóculo saliva constituído do *pool* de precipitados microbiano de 57 voluntários. Este inóculo se apresentou satisfatório uma vez que apresentou uma diversidade microbiana semelhante ao relatado outros estudos da microbiota salivar (Ortiz et al. ¹⁶¹, 2019; Hurley et al. ¹⁶², 2019). No presente estudo, foi observado que os valores de UFC.mL⁻¹ dos inóculos utilizados para comparar os 4 modelos e as duas estratégias foram semelhantes tanto para a microbiota total como para os estreptococos do grupo mutans, apresentando uma boa reprodutibilidade já que teve uma baixa variabilidade entre as diferentes ocasiões de coleta de saliva. Adicionalmente os valores de pH detectados na estratégia UNI e em M3 apresentaram um perfil idêntico. Podemos concluir que existiu uma reprodutibilidade na

técnica desenvolvida para formação de biofilme, para M3 em diferentes abordagens experimentais.

Os valores de pH dos meios de cultura registrados nas duas estratégias de inoculação apresentaram um perfil semelhante, mantendo na maioria do tempo um ambiente neutro, algo semelhante ao que acontece em cavidade bucal (Anderson et al.¹⁶⁰, 2001). Os períodos de ‘abundância’ tiveram uma curta duração e consequentemente a exposição a um entorno ácido foi mais restrito. Existiu uma desmineralização do esmalte dentário sendo independente a exposição prolongada a valores de pH inferiores a 5,5 já que estes foram registrados após 62 horas para UNI e 127 horas para MULTI. Assim, é confirmado que não é o ambiente externo do biofilme como a saliva presente na cavidade bucal ou o caldo de cultura utilizado laboratorialmente o que deve estar ácido, é sim o ‘fluido da placa’ (os produtos metabólicos dentro do biofilme, não avaliados no presente estudo). Tais fluídos e a dinâmica dos mesmos configuram os nichos ácidos na interface biofilme/superfície dentária e ajudam na formação de lesões de cárie (Bowen⁸⁶, 2013). Da mesma forma foi observada que não é unicamente na presença de carboidratos que existe uma diminuição de pH, na estratégia MULTI após de cultivo em ‘caldo saliva’ e inoculação foram detectados menores valores do que os observados para estratégia UNI e conforme passava o tempo foram se aproximando a 5,5, principalmente a partir das 96 horas de idade (Figura 23C).

Ao avaliar a dinâmica populacional observou-se que os valores de UFC.mL⁻¹ aumentaram tanto para a microbiota total como para os demais microrganismos, conforme o amadurecimento do biofilme. Ao comparar as duas estratégias na idade 24 horas, observou-se uma diminuição na contagem de alguns grupos de microrganismos para MULTI. Estes dados podem sugerir que alguns microrganismos conseguiram realizar a colonização inicial, porém o fato de realizar novas inoculações (4; 7,7 e 14,3 horas) resultou na introdução de novas espécies gerando uma concorrência aos colonizadores iniciais (Marsh¹³, 2003; Takahashi e Nyvad¹⁴, 2011; Bowen et al.¹⁶³, 2018).

Para UNI na mesma idade o número de microrganismos que conformaram o biofilme foi maior, isso sugere que nesta estratégia temos um biofilme de colonizadores iniciais que vai envelhecendo com o passar do tempo, mas em nenhum momento

permitimos o ingresso de novas espécies no sistema como colonizadores secundários ou tardios (Rickard et al. ⁶, 2003; Mark Welch et al. ⁴⁹, 2016). A não introdução de novos microrganismos pode ocasionar uma seleção de algumas espécies, de preferência aquelas que tem facilidade com o metabolismo da sacarose e na hidrólise de amido. Ou ainda na seleção daquela que tem tolerância ao estresse ácido, pois desde idades iniciais (7 horas) conseguiram sobreviver a este tipo de desafios. Embora sejam realizadas múltiplas inoculações muitos microrganismos não conseguem ganhar um espaço no biofilme pré-existente, e terminam perdendo a viabilidade. Estas mortes disponibilizam componentes estruturais das células transformando-se em recursos nutricionais para outros microrganismos (Bayles ¹⁶⁴, 2007) ou mesmo arcabouços na matriz extracelular.

No presente estudo, a espécie de *Veillonella parvula* foi encontrada em uma proporção aproximada de 5 % no início dos biofilmes e conforme seu amadurecimento esta proporção foi diminuindo até ser < 1 %, isto aconteceu para as duas estratégias de inoculação. A literatura apresenta que esta espécie tem sido detectada em baixas proporções (< 0,1 %) em amostras de cáries ativa (Ortiz et al. ¹⁶¹, 2019; Qudeimat et al. ¹⁶⁵, 2021). Adicionalmente tem sido relatado que a espécie *V. díspar* constitui aproximadamente 3 % da microbiota de adultos jovens, os quais apresentam um consumo de açúcar livre ≥ 5 % do consumo total de energia diário (Keller et al. ¹⁶⁶, 2017). Sua proporção em pacientes com lesões de cáries ativas representa entre um 2,6 a 5 %, porém há estudo que demonstram uma representatividade de 19 % da microbiota total (Agnello et al. ¹⁶⁷, 2017; Hurley et al. ¹⁶², 2019; Qudeimat et al. ¹⁶⁵, 2021). Embora que *V. díspar* não seja considerada um colonizador inicial, a espécie foi detectada desde a idade 24 horas nos biofilmes e manteve uma abundância relativa > 15 % ao longo das idades avaliadas, isto aconteceu de forma independente a estratégia de inoculação utilizada.

A presença de *Veillonella* na cavidade bucal é considerada como normal, pois este gênero de microrganismos está entre os principais anaeróbios da cavidade bucal (Aas et al. ¹⁶⁸, 2005). Estes microrganismos possuem a capacidade de utilizar o ácido láctico convertendo-o em ácidos mais fracos, adicionalmente converter nitrato (NO_3^-) em nitrito (NO_2^-). Estas duas características provavelmente favorecem a manutenção de um pH mais neutro e termina beneficiando inúmeras espécies de bactérias,

provavelmente outros produtores de ácidos fracos que são intolerantes a condições de baixo pH (Stephen e Hamilton ¹⁶⁹, 1971; Wicaksono et al.¹⁷⁰, 2020). Inclusive a alimentação cruzada poderia estar beneficiando indiretamente espécies consideradas cariogênica (Miller et al. ⁹⁴, 2019; Noorda et al. ¹⁷¹, 1988). Em amostras de saliva de pacientes com e sem lesões de cárie foi detectada a presença deste gênero (Jiang et al. ¹⁷², 2016). Adicionalmente em amostras provenientes de lesões de cárie de mancha branca, de camada profunda de cavidades com comprometimento dentinário e de cavidades dentinárias ocultas, tem sido identificado o gênero *Veillonella* em grande proporção (Simon-Soro e Mira ¹¹⁷, 2015). No entanto ainda não está bem compreendida a contribuição deste gênero no processo de cárie.

No presente estudo foi identificada a *P. nanceiense* na saliva e nas primeiras idades do biofilme MULTI, tendo uma abundância relativa inferior a 3 % na idade 24 horas e diminuindo até ser < 1 % na idade 72 horas. Já a espécie *P. melaninogenica* foi detectada em todas as idades do biofilme e nas duas estratégias de inoculação, com uma proporção aproximada de 5 %. Esta proporção foi considerada um pouco superior ao encontrado em amostras de biofilme coletado de lesões de cárie, nas quais foi encontrado uma proporção de aproximadamente 3 % (Hurley et al. ¹⁶², 2019; Qudeimat et al. ¹⁶⁵, 2021). Adicionalmente a espécie *P. melaninogenica* teve uma maior abundância relativa em adultos jovens que apresentavam elevado consumo de açúcar livre ao ser comprados com aqueles que tinham menor consumo (Keller et al. ¹⁶⁶, 2017).

As espécies pertencentes ao gênero *Prevotella* são bactérias Gram negativas, anaeróbias estritas, sacarolítica e proteolíticas comumente detectadas em diversos locais da cavidade bucal (Aas et al. ¹⁶⁸, 2005). São considerados como microbiota normal da saliva em paciente com ou sem cárie (Jiang et al. ¹⁷², 2016). Embora não sejam considerados agentes etiológicos da cárie, este gênero bacteriano tem a facilidade de produzir ácidos pela fermentação de carboidratos como a celobiose, D-frutose, Inulina, D-maltose, D-manose, D-rafinose, D-ribose, melibiose, amido, entre outros (Wu et al. ¹⁷³, 1992). Sua presença foi detectada na metade das amostras de lesões de cárie com exposição de dentina, e sua abundância relativa foi de aproximadamente 5 % e 10 %, (Simon-Soro e Mira ¹¹⁷, 2015; Hurley et al. ¹⁶², 2019).

Além disso, foram detectados nas amostras de saliva e biofilme dos pacientes com cárie na primeira infância (Hurley et al. ¹⁶², 2019; Tanner et al. ¹⁷⁴, 2011). Embora que os biofilmes foram cultivados em ambiente com 5 % CO₂, houve presença de espécies Gram negativas anaeróbias. Isso demonstra que houve colaboração entre espécies durante a colonização da superfície de esmalte e o desenvolvimento do biofilme pode gerar áreas dentro do mesmo com menor tensão de oxigênio e favorecer o crescimento de espécies com menor tolerância a ele.

Outro gênero detectado foi o *Streptococcus*, o qual é considerado como um dos mais abundante na cavidade bucal. Este pode ser encontrado tanto na saliva, como em amostras de biofilme coletados em diferentes nichos de cavidades orais com e sem cárie. No entanto, a abundância relativa apresenta uma altíssima variabilidade (de 5 a 70%) que depende do paciente, do tipo de coleta, da localização, entre outros (Simon-Soro e Mira ¹¹⁷, 2015; Jiang et al. ¹⁷², 2016; Agnello et al. ¹⁶⁷, 2017; Hurley et al. ¹⁶², 2019; Ortiz et al. ¹⁶¹, 2019; Qudeimat et al. ¹⁶⁵, 2021). No presente estudo a abundância relativa determinada deste gênero foi alta em todas as idades do biofilme e nas duas estratégias. Conforme o biofilme se tornou maduro alguns microrganismos perderam representatividade, enquanto outros ganharam espaço. O caso pontual de *S. anginosus* foi um achado interessante. Embora este microrganismo não seja amplamente relacionado com a cárie, em 1991 foi realizado o primeiro relato onde se associava ele como um potencial microrganismo preditor de cáries, pois foi possível isolá-lo em meio de cultura MSB modificado (Kimmel e Tinanoff ¹⁷⁵, 1991). A presença deste microrganismo também foi verificada em amostras clínicas de dentina cariada. *S. anginosus* foi descrito como pertencente a uma flora mais diversa associada a regiões de pH neutro de lesões cariosas (Kianoush et al. ¹⁷⁶, 2014). Finalmente este microrganismo foi identificado em biofilmes dentários de paciente que tinham história de cárie e foi considerado como um microrganismo potencialmente patogênico associado à cárie dentária (Xiuquin et al. ¹⁷⁷, 2020). Entretanto, a análise da região 16S rRNA v1-v3 pode dificultar a diferenciação entre espécies de estreptococos e pode ter superestimado esta espécie.

As técnicas microbiológicas convencionais baseadas na identificação de microrganismos em meios de cultura seletivos ou presuntivos carecem da sensibilidade

necessária para afirmar que estamos quantificando uma espécie de microrganismo. Entretanto, as técnicas de sequenciamento também têm limitações como: alinhamento em regiões repetitivas no genoma de referência; alto grau de variabilidade na cobertura e representatividade; software limitados que têm informações incompletas dos genomas microbianos; identificação de bactérias até o nível de espécie (não é possível identificar bactérias no nível de subespécies); dificuldade para evidenciar simultaneamente os componentes não bacterianos do microbioma oral tais como fungos, protozoários e vírus (Metzker ¹²⁹, 2009; Caselli et al. ¹³¹, 2020).

Diversos estudos que utilizaram técnicas mais específicas têm demonstrado proporções baixíssimas de *S. mutans* em amostras clínicas de lesões de cárie (Kressier et al. ¹⁷⁸, 2017, Agnello et al. ¹⁶⁷, 2017; Qudeimat et al. ¹⁶⁵, 2021). No entanto, *S. mutans* é o microrganismo cariogênico aceito unanimemente. Porém, diferentes estudos têm demonstrado que a cárie não é causada por um microrganismo e sim por desbalanços nas complexas comunidades polimicrobianas (Marsh ¹³, 2003; Samaranayake e Matsaruba ¹⁰, 2017; Rosier et al. ¹¹, 2018). Estes resultados clínicos contradizem uma vasta literatura desenvolvida sobre modelos laboratoriais, diminuindo o protagonismo de uma única espécie no desenvolvimento da doença cárie. No presente estudo a espécie *S. mutans* não foi detectado pelo sequenciamento, adicionalmente ao ser avaliada a sua presença via qPCR as proporções detectadas foram inferiores a 0,01 %, provavelmente este achado laboratorial seja mais semelhante ao que acontece na cavidade bucal.

No presente estudo também foram detectados em menores proporções outros gêneros bacterianos como *Rothia*, *Haemophilus* e *Neisseria* principalmente no inóculo, este dado é semelhante ao encontrado em amostras de saliva de pacientes com e sem cárie (Jiang et al. ¹⁷², 2016; Hurley et al. ¹⁶², 2019; Ortiz et al. ¹⁶¹, 2019). *Rothia* é um gênero de cocos Gram positivas, porém apresentam morfologias variadas, são bactéria não esporuladas e não moveis. Estes microrganismos fermentam carboidratos e são amplamente detectados em cavidade bucal e trato respiratório superior (Kim et al. ¹⁷⁹, 2014; Maraki et al. ¹⁸⁰, 2015). *Haemophilus* são cocobacilos Gram negativos, no entanto são considerados pleomórficos. São aeróbios e anaeróbio facultativos detectados em membranas mucosas do trato respiratório superior e boca (Musher et al.

¹⁸¹, 1996). *Neisseria* é um gênero de cocóides Gram negativos, podem fermentar carboidratos como glucose e maltose produzindo ácido como metabólicos. Por exemplo, *N. gonorrhoeae* produz ácido apenas a partir da glicose, mas *N. meningitidis* produz ácido a partir da glicose e da maltose. A maioria destes microrganismos são considerados comensais da nasofaringe humana (Liu et al. ¹⁸², 2015).

Na estratégia MULTI foi observada uma maior diversidade, pois nas primeiras idades do biofilme (de 24 até 72 horas) espécies como *R. aeiria*, *R. mucilaginosa*, *H. pareinfluenzae* e *N. subflava* foram detectadas. A maioria destes microrganismos tem sido detectados em baixas proporções em amostras clínicas. No caso do gênero *Rothia* sua proporção foi maior nos grupos livres de cárie (Kressier et al.¹⁷⁸, 2017; Agnello et al. ¹⁶⁷, 2017; Ortiz et al. ¹⁶¹, 2019; Hurley et al. ¹⁶², 2019). Algo semelhante aconteceu com as espécies *H. pareinfluenzae* e *N. subflava*, pois estão mais associadas a pacientes livres de cárie (Ortiz et al. ¹⁶¹, 2019; Hurley et al. ¹⁶², 2019). Na idade de 168 horas foi detectado no biofilme MULTI a presença de *Shuttleworthia satellites*, no entanto a relação deste microrganismo com a cárie não está esclarecida, uma vez que os únicos dois relatos encontrados na literatura trazem informações opostas (ElSalhy et al. ¹⁸³, 2016; Wang et al. ¹⁸⁴, 2019). Este gênero bacteriano é Gram positivo, anaeróbias estrito, não formador de esporos, não móvel, com uma morfologia ligeiramente curvas conformando cadeias curtas. Tem a facilidade de fermentar diversos carboidratos e tem sido isolado da cavidade bucal (Downes et al. ¹⁸⁵, 2002).

O rápido crescimento da bioinformática tem fornecido informações da diversidade e abundância de microrganismos presentes em biofilmes orais, mas ainda é necessário a compreensão de como estes estão dispostos dentro destas comunidades complexas. A organização estrutural no nível micrométrico apresenta limitações na marcação dos microrganismos e aquisição de imagens (Valm et al. ⁴⁸, 2010). Baseado em análises de amostras de biofilmes dentários humanos foi proposto um consórcio que ilustra a complexa organização biogeográfica e como ela pode estar associada com as lesões de cárie (Mark Welch et al. ⁴⁹, 2016). No presente estudo as imagens adquiridas foram de menor complexidade metodológica e não fornecem informação suficiente para a identificação dos microrganismos presentes, mostrando

somente a morfologia das células dos microrganismos presente, assim como estrutura e configuração do biofilme.

De forma geral a partir da idade de 120 horas foram visualizadas formações semelhantes a *corncocks* e *hedgehogs*. Em estudo anterior foi proposto que microrganismos filamentosos pertencentes aos gêneros *Corynebacterium*, *Fusobacterium* e *Leptotrichia* teriam um papel fundamental na configuração espacial dos biofilmes, principalmente o *Corynebacterium*, o qual forneceria um link físico para os outros microrganismos que conformam os ouriços (*hedgehogs*) e seriam o filamento central sobre o qual se conformam as espigas de milho (*corncocks*) (Mark Welch et al.⁴⁹, 2016). No entanto *Corynebacterium* não foi detectado no presente estudo, e em sequenciamentos de amostras de cárie esse gênero foi detectado em algumas amostras, tendo pequenas proporções entre 0 e 5 % (Simon-Soro e Mira¹¹⁷, 2015; Kressier et al.¹⁷⁸, 2017, Agnello et al.¹⁶⁷, 2017).

Embora o sequenciamento não tenha detectado microrganismos do gênero *Corynebacterium* e tenha detectado baixas quantidades de *Fusobacterium*; provavelmente as estruturas semelhantes a filamentos são formadas por cadeias de bacilos ou de cocos embebidas de matriz extracelular. Futuros estudos que utilizem a metodologia de hibridização fluorescente *in situ* (*Fluorescence In Situ Hybridization* - FISH) poderiam ser direcionados para comparar a organização espacial dos biofilmes provenientes de amostras clínica com biofilmes polimicrobianos crescidos em ambientes laboratoriais.

Adicionalmente também poderiam ser utilizadas técnicas de microscopia onde o foco seja a marcação dos componentes estruturais da matriz extracelular do biofilme, principalmente dos exopolissacarídeos. No presente estudo, como citado anteriormente, o gênero *Streptococcus* foi o mais predominante. Esta informação sugere que estes tiveram uma alta influência na construção do biofilme mediante a produção de exopolissacarídeos, assim como citado na literatura. Espécies como *S. sanguinis*, *S. gordonii* e *S. mutans* secretam as enzimas glucosiltransferases (Gtfs) que servem como reserva de energia e ajudam as células no processo de adesão as superfícies, e assim de forma geral a construir a matriz extracelular do biofilme (Lemos et al.¹⁸⁶, 2005). No presente estudo foi observado um aumento gradativo nas

quantidades de exopolissacarídeos conforme o desenvolvimento do biofilme. No entanto, não é possível diferenciar quais microrganismos estão relacionados com a sua produção. Na literatura não há relatos de ensaios que utilizem a microbiota oral como inóculo e realizem a quantificação dos exopolissacarídeos presente na matriz extracelular do biofilme. Em um ensaio *in situ* foi demonstrado que a quantidade de exopolissacarídeos no biofilme era maior frente a exposição a sacarose várias vezes por dia, do que quando comparado a exposições de glucose e frutose ou controle negativo (Tenuta et al. ¹⁸⁷, 2006). No entanto, não foi determinado como acontece o acúmulo o longo do tempo.

Outro componente relacionado a matriz extracelular é o eDNA (DNA extracelular), o qual no presente estudo foi observado um aumento gradativo no decorrer das idades. Quando os exopolissacarídeos interagem com eDNA, formam estruturas que fornecem mais estabilidade e viscosidade a matriz extracelular do biofilme, configurando biofilmes mais coesos. Em estudo *in situ* foi demonstrada a importância do eDNA na formação do biofilme, com redução significativa do biovolume quando o eDNA foi removido (Schlafer et al. ¹⁸⁸, 2017). Adicionalmente em modelos de biofilme microcosmo e em amostras provenientes de biofilmes orais (coletados em superfícies coronal, subgengival, resina composta provisória e *abutments* de implantes) foi detectada a presença de eDNA, postulando que é um componente onipresente em toda a cavidade bucal (Rostami et al. ¹⁸⁹, 2016). O eDNA pode ser liberado por células microbianas de diversos gêneros como *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Porphyromonas*, *Enterococcus* por meio de vesículas de membrana e por lise celular (Allesen-Holm et al. ¹⁹⁰, 2006; Perry et al. ¹⁹¹, 2009; Liao et al. ²³, 2014; Rostami et al. ¹⁸⁹, 2016; Turnbull et al. ¹⁹², 2016). Outra evidencia indireta que demonstra a liberação de DNA no ambiente extracelular é o fato de que muitas sequências do genoma têm sido transferidas horizontalmente entre diferentes microrganismos orais (Juhas et al. ¹⁹³, 2009; Bedoya et al. ¹⁹⁴, 2018). Assim, o aumento gradativo de eDNA observado neste estudo pode ser consequência de muitos microrganismos utilizando as duas vias conhecidas de liberação por vesículas e lise.

Os ácidos lipoteicóicos também são constituintes da matriz extracelular do biofilme, no entanto são pouco estudados. Na literatura não há referência da sua

quantificação em biofilmes *in vivo*, *in situ* ou microcosmo. Neste estudo, a quantificação demonstrou que desde a primeira idade avaliada os valores eram altos, representando um dos maiores componentes da matriz extracelular, o que refletiu na morte celular ou remodelagem da parede celular de espécies Gram positivas. No entanto, este componente se manteve estável e não apresentou nenhuma diferença entre idades ou estratégias. Em estudo anterior, foi verificado que em biofilmes mistos com *S. mutans*, o operon *lrgAB*, associado a remodelagem da membrana celular e autólise, apresentou uma alta expressão em idades inferiores a 29 horas. Posteriormente sua expressão permaneceu em níveis baixos, na presença ou ausência de estímulo nutricional (Florez Salamanca et al.¹⁰⁶, 2018).

Adicionalmente, os operons *cidAB* e *lrgAB* de *S. mutans* estão associados com a resposta ao estresse oxidativo, autólise e desenvolvimento de biofilme (Ahn et al.¹⁹⁵,¹⁹⁶, 2010, 2016). Provavelmente existam genes homólogos que realizem funções semelhantes em outros microrganismos Gram positivos. Uma hipótese é que nas primeiras 48 horas microrganismos do gênero *Streptococcus* (que foram os mais abundantes no biofilme) apresentaram um comportamento altruísta e realizaram autólise para contribuir na adesão, desenvolvimento e maturação do biofilme, aumentando a chance de sobrevivência de populações de microrganismos pois disponibilizavam outros recursos que podiam ser utilizadas pelas células “famintas” (Nyström et al., 1993⁸⁷; Bayles¹⁶⁴, 2007). Baseado nessa hipótese e em achados prévios, postula-se que após terem conseguido o estabelecimento inicial do biofilme as espécies do gênero *Streptococcus* não precisaram que mais células expressassem genes relacionados com autólise e desta forma a concentração de ácidos lipoteicóicos permanecesse constante (Florez Salamanca et al.¹⁰⁶, 2018). No entanto serão necessários mais estudos com biofilmes polimicrobianos para esclarecer a importância de ácidos lipoteicóicos em idades inferiores a 48 horas. Também, houve proporção considerável de espécies Gram negativas que não possuem este componente na parede celular.

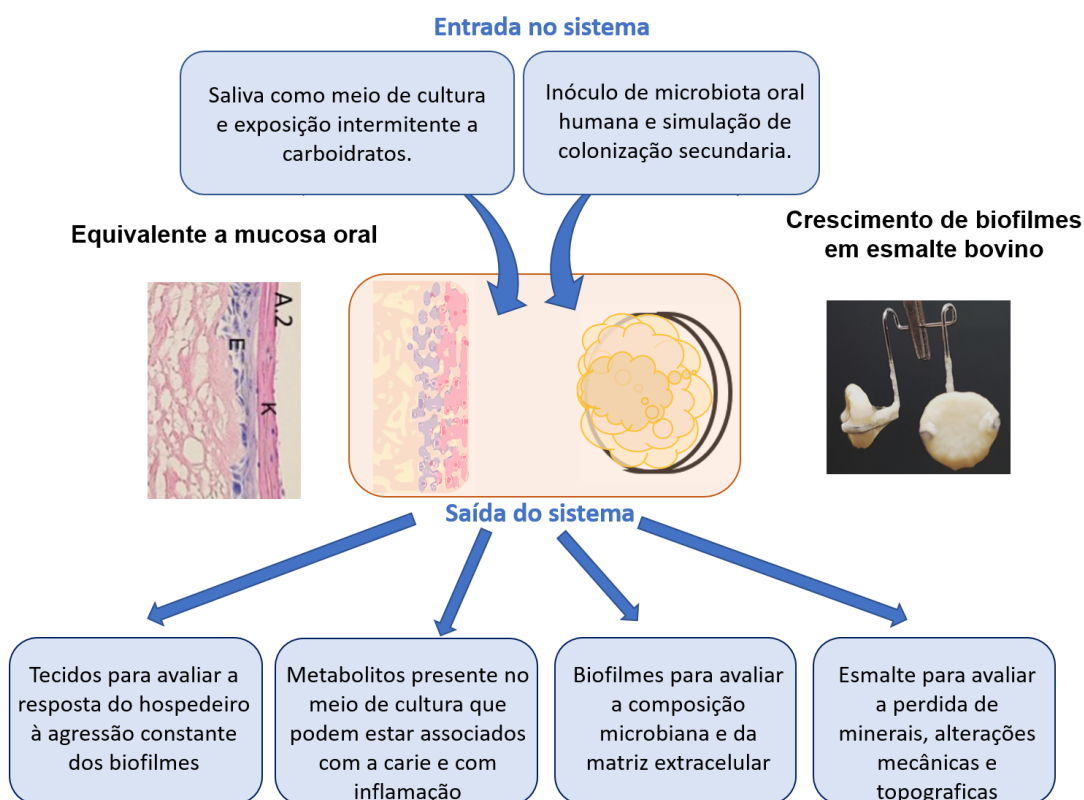
Os dados de microdureza das duas estratégias de inoculação foram muito semelhantes ao encontrado em M3 ao avaliar os diferentes desafios nutricionais, o que sustenta a hipótese que estamos conseguindo gerar desmineralização pela interação

entre dos ácidos no interior do biofilme com a superfície dos dentes, tendo mais semelhança com o que acontece nas lesões subclínicas (Gao et al. ¹⁵⁶, 2001). Para comparar as duas estratégias de inoculação foram adquiridas três imagens de microscopia confocal e tiveram uma área de 1,64 mm², a somatória das três áreas forneceram uma região de análise de aproximadamente 12% da superfície total do disco. Embora tenha sido utilizada a mesma técnica para confecção dos discos de esmalte, os valores de rugosidade foram aproximadamente 4 vezes inferiores ao observado com a magnificação de 5x, medições com maior magnificação dão a impressão de que a superfície é plana, semelhante perceber que Terra é plana desde do ponto de vista da escala humana (Florez Salamanca et al. ¹²⁵, 2020). Não foram detectadas diferenças entre as idades avaliadas e as estratégias de inoculação, provavelmente as magnificações utilizadas são insuficientes para fornecer uma resposta clara, adicionalmente a remoção mecânica do biofilme pode estar interferindo nos resultados.

O presente estudo oferece suporte para a hipótese que não existe um microrganismo protagonista no desenvolvimento da cárie dental, e deixa o convite para que os pesquisadores comecem a mudar o paradigma. É fundamental pesquisar outras espécies que participam na construção dos biofilmes e principalmente é necessário realizar análises funcionais que ajudem a desvelar o comportamento destas complexas comunidades polimicrobianas. As pesquisas clínicas e laboratoriais estão cada vez mais próximas da utilização correta das recentes ferramentas tecnológicas, complementando assim dados já existentes. Apesar dos modelos de biofilmes *in vitro* apresentarem diversas limitações, com baixa representatividade da cárie dentária, consideramos que esta nova abordagem pode aproximar um pouco ao entendimento da fisiopatologia da doença. Acredita-se que a utilização do conjunto: discos de esmalte bovino, inóculo de microbiota humana, exposição intermitente a combinação de carboidratos, saliva como meio de cultura e múltiplas inoculações, aproxima um pouco mais as pesquisas laboratoriais da realidade que pode ser encontrada na clínica. Futuros estudos em ambientes controlados podem ser de utilidade para o entendimento do complexo processo fisiopatológico que origina as lesões de cárie.

Simular a cavidade bucal é um desafio considerável da bioengenharia porque requer a integração de sistemas biológicos muito complexos e heterogêneos (o hospedeiro e o microbioma oral). Na atualidade pode parecer uma utopia, mas o ideal seria realizar a junção entre tecnologia já existentes, como sistemas de perfusão (Tang et al. ¹⁹⁷, 2003), equipamentos rotativos para controle de tensão de cisalhamento (Rickard et al. ¹⁹⁸, 2004), mucosas orais e biofilmes microcosmos (Basso et al. ¹⁹⁹, 2017), com os modelos de biofilme microcosmo que simulem uma dieta cariogênica (Florez Salamanca et al. ¹²⁵, 2020). Desta forma a união de tecnologias, conceitos e realização de trabalhos interdisciplinares entre as mais diversas áreas do conhecimento possam tornar realidade o estudo da cárie em ambientes laboratoriais, conseguindo quase mimetizar o entorno clínico onde este complexo processo acontece (Figura 27).

Figura 27 - Esquema de como poderiam ser integradas tecnologias atualmente existentes para o desenvolvimento de modelos de bocas artificiais para o estudo de doenças orais.



Fonte: Elaboração própria. Imagem histológica adaptada de Basso et al. ¹⁹⁹, 2017

7 CONCLUSÃO

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

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

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

REFERENCIAS*

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

* De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/Home/Biblioteca/guia-de-normalizacao-marco-2015.pdf> .

17. Takahashi N. Oral microbiome metabolism: From “who are they?” to “what are they doing?” *J Dent Res*. 2015; 94 (12): 1628–37.
18. Maske TT, van de Sande FH, Arthur RA, Huysmans MCDNJM, Cenci MS. In vitro biofilm models to study dental caries: a systematic review. *Biofouling*. 2017; 33 (8): 661–75.
19. Wimpenny JWT. Spatial order in microbial ecosystems. *Biol Rev Camb Philos Soc*. 1981; 56: 295–342.
20. Bowen WH, Koo H. Biology of streptococcus mutans-derived glucosyltransferases: Role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms. *Caries Res*. 2011; 45 (1): 69–86.
21. Klein MI, Duarte S, Xiao J, Mitra S, Foster TH, Koo H. Structural and molecular basis of the role of starch and sucrose in streptococcus mutans biofilm development. *Appl Environ Microbiol*. 2009; 75 (3): 837–41.
22. Koo H, Falsetta ML, Klein MI. The xopolysaccharide Matrix: a virulence determinant of cariogenic biofilm. *J Dent Res*. 2013; 92 (12): 1065–73.
23. Liao S, Klein MI, Heim KP, Fan Y, Bitoun JP, Ahn SJ, et al. Streptococcus mutans extracellular DNA is upregulated during growth in biofilms, actively released via membrane vesicles, and influenced by components of the protein secretion machinery. *J Bacteriol*. 2014; 196 (13): 2355–66.
24. Castillo Pedraza MC, Novais TF, Faustoferri RC, Quivey RG, Terekhov A, Hamaker BR, et al. Extracellular DNA and lipoteichoic acids interact with exopolysaccharides in the extracellular matrix of Streptococcus mutans biofilms. *Biofouling*. 2017; 33 (9): 722–40.
25. Xiao J, Klein MI, Falsetta ML, Lu B, Delahunty CM, Yates JR, et al. The exopolysaccharide matrix modulates the interaction between 3D architecture and virulence of a mixed-species oral biofilm. *PLoS Pathogens*. 2012; 8 (4): e1002623.
26. Azeredo J, Azevedo NF, Briandet R, Cerca N, Coenye T, Costa AR, et al. Critical review on biofilm methods. *Crit Rev Microbiol*. 2017; 43 (3): 313–51.
27. Marsh PD. In sickness and in health- what does the oral microbiome mean to us? An Ecological Perspective. *Adv Dent Res*. 2018; 29 (1): 60–5.
28. Featherstone JD., ten Cate JM, Shariati M, Arends J. Comparison of artificial caries-like lesions by quantitative microradiography and microhardness profiles. *Caries Res*. 1983; 17: 385–91.
29. Firestone A, Schmid R, Muhlemann R. Effects of cooked wheat frequency-controlled. *Arch Oral Biol*. 1982; 27: 759–63.
30. Jenkins DJA, Wolever T, Vuksan V, Brighenti F, Cunnane SC, Rao V, et al. Nibbling versus Gorging: Metabolic advantages of increased meal frequency. *N Engl J Med*. 1989; 321: 929–34.
31. Franko DL, Striegel-Moore RH, Thompson D, Affenito SG, Schreiber GB, Daniels SR, et al. The relationship between meal frequency and body mass index in black and white adolescent girls: more is less. *Int J Obes*. 2008; 32 (1): 23–9.

32. Rogers JD, Palmer J, Kolenbrander PE, Scannapieco FA. Role of *Streptococcus gordonii* amylase-binding protein A in adhesion to hydroxyapatite, starch metabolism, and biofilm formation. *Infect Immun*. 2001; 69 (11): 7046–56.
33. Thylstrup A, Bruun C, Holmen L. In vivo caries models - mechanisms for caries initiation and arrestment. *Adv Dent Res*. 1994; 8: 144–57.
34. Bagramian RA, Garcia-Godoy F, Volpe AR. The global increase in dental caries. A pending public health crisis. *Am J Dent*. 2009; 22 (1): 3–8.
35. Dye BA, Thornton-Evans G. Trends in oral health by poverty status as measured by Healthy People 2010 objectives. *Public Health Rep*. 2010; 125 (6): 817–30.
36. Marsh PD. Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. *Adv Dent Res*. 1994; 8 (2): 263–71.
37. Sissons CH. Artificial dental plaque biofilm model systems. *Adv Dent Res*. 1997; 11 (1): 110–26.
38. Jakubovics NS, Kolenbrander PE. The road to ruin: The formation of disease-associated oral biofilms. *Oral Dis*. 2010; 16 (8): 729–39.
39. Bowen WH. Dental caries – not just holes in teeth! A perspective. *Mol Oral Microbiol*. 2016; 31 (3): 228–33.
40. Kidd EAM, Fejerskov O. What constitutes dental caries? Histopathology of carious enamel and dentin related to the action of cariogenic biofilms. *J Dent Res*. 2004; 83 (Suppl 1): C35 - 8.
41. Kleter GA. Discoloration of dental carious lesions (a review). *Arch Oral Biol*. 1998; 43: 629–32.
42. Hannig M, Joiner A. The structure, function and properties of the acquired pellicle. *Monogr Oral Sci*. 2006; 19: 29–64.
43. Hicks J, Garcia-godoy F, Catherine FG. Plaque in the dynamic process of demineralization and remineralization (part 1). *J Clin Pediatr Dent*. 2003; 28 (1): 47–52.
44. Simón-Soro Á, Tomás I, Cabrera-Rubio R, Catalan MD, Nyvad B, Mira A. Microbial geography of the oral cavity. *J Dent Res*. 2013; 92 (7): 616–21.
45. Xu X, He J, Xue J, Wang Y, Li K, Zhang K, et al. Oral cavity contains distinct niches with dynamic microbial communities. *Environ Microbiol*. 2014; 17 (3): 699–710.
46. Kilian M, Chapple ILC, Hannig M, Marsh PD, Meuric V, Pedersen AML, et al. The oral microbiome - an update for oral healthcare professionals. *Br Dent J*. 2016; 221 (10): 657–66.
47. Falsetta ML, Klein MI, Colonne PM, Scott-Anne K, Gregoire S, Pai CH, et al. Symbiotic relationship between *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* synergizes virulence of plaque biofilms in vivo. *Infect Immun*. 2014; 82 (5): 1968–81.
48. Valm AM, Mark Welch JL, Rieken CW, Hasegawa Y, Sogin ML, Oldenbourg R, et al. Systems-level analysis of microbial community organization through combinatorial labeling and spectral imaging. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011; 108 (10): 4152–7.

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

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

85. Vacca Smith AM, Scott-Anne KM, Whelehan MT, Berkowitz RJ, Feng C, Bowen WH. Salivary glucosyltransferase B as a possible marker for caries activity. *Caries Res.* 2007; 41 (6): 445–50.
86. Bowen WH. The Stephan curve revisited. *Odontology.* 2013; 101 (1): 2–8.
87. Nyström T. Global systems approach to the physiology of the starved cell. In: Kjelleberg S, editor. *Starvation in bacteria.* New York: Springer; 1993. p. 129–50.
88. Carlsson J. Regulation of sugar metabolism in relation to the feast-and-famine existence of plaque. *Cariol Today.* 1984; 211: 205–11.
89. McBain AJ, Bartolo RG, Catrenich CE, Charbonneau D, Ledder RG, Gilbert P. Growth and molecular characterization of dental plaque microcosms. *J Appl Microbiol.* 2003; 94 (4): 655–64.
90. Lemos JA, Burne RA. A model of efficiency: Stress tolerance by *Streptococcus mutans*. *Microbiology.* 2008; 154 (11): 3247–55.
91. de Oliveira Duque CC, Soares DG, Basso FG, Hebling J, de Souza Costa CA. Influence of enamel/dentin thickness on the toxic and esthetic effects of experimental in-office bleaching protocols. *Clin Oral Investig.* 2017; 21 (8): 2509–20.
92. Bowden GH. Nutritional influences on biofilm development. *Adv Dent Res.* 1997; 11 (1): 81–99.
93. Inui T, Walker LC, Dodds MWJ, Bryan A. Extracellular glycoside hydrolase activities in the human oral cavity. *Appl Environ Microbiol.* 2015; 81 (16): 5471–6.
94. Miller DP, Fitzsimonds ZR, Lamont RJ. Metabolic signaling and spatial interactions in the oral polymicrobial community. *J Dent Res.* 2019; 98 (12): 1308 - 14.
95. Lynge Pedersen AM, Belstrøm D. The role of natural salivary defences in maintaining a healthy oral microbiota. *J Dent.* 2019; 80: S3–12.
96. Marsh PD, Do T, Beighton D, Devine D. Influence of saliva on the oral microbiota. *Periodontol 2000.* 2015; 70: 80–92.
97. Siqueira WL, Helmerhorst EJ, Zhang W, Salih E, Oppenheim FG. Acquired enamel pellicle and its potential role in oral diagnostics. *Ann N Y Acad Sci.* 2007; 1098: 504–9.
98. Hannig C, Hannig M. The oral cavity - a key system to understand substratum-dependent bioadhesion on solid surfaces in man. *Clin Oral Investig.* 2009; 13 (2): 123–39.
99. Kolenbrander PE, Andersen RN, Blehert DS, Egland PG, Foster JS, Palmer RJ. Communication among oral bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2002; 66 (3): 486–505.
100. Hamada S, Slade HD. Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiol Rev.* 1980; 44 (2): 331–84.
101. Grönroos L, Saarela M, Mättö J, Tanner-Salo U, Vuorela A, Alaluusua S. Mutacin production by *Streptococcus mutans* may promote transmission of bacteria from mother to child. *Infect Immun.* 1998; 66 (6): 2595–600.
102. Banas JA. Virulence properties of *streptococcus mutans*. *Front Biosci.* 2004; 9: 1267–77.

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

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

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

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

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

- multi-habitat, diverse genus. *Microbiol.* 2015; 161 (7): 1297–312.
183. ElSalhy M, Söderling E, Honkala E, Fontana M, Flannagan S, Kokaras A, et al. Salivary microbiota and caries occurrence in Mutans Streptococci- positive school children. *Eur J Paediatr Dent.* 2016; 17 (3): 188–92.
 184. Wang Y, Wang S, Wu C, Chen X, Duan Z, Xu Q, et al. Oral microbiome alterations associated with early childhood caries highlight the importance of carbohydrate metabolic. *mSystems.* 2019;4 (6): e00450.
 185. Downes J, Munson MA, Radford DR, Spratt DA, Wade WG. Isolated from the human oral cavity. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2002; 52 (5): 1469–75.
 186. Lemos JAC, Abranches J, Burne RA. Responses of cariogenic streptococci to environmental stresses. *Curr Issues Mol Biol.* 2005; 7 (1): 95–108.
 187. Tenuta LMA, Ricomini Filho AP, Del Bel Cury AA, Cury JA. Effect of sucrose on the selection of mutans streptococci and lactobacilli in dental biofilm formed in situ. *Caries Res.* 2006; 40 (6): 546–9.
 188. Schlafer S, Meyer RL, Dige I, Regina VR. Extracellular DNA contributes to dental biofilm stability. *Caries Res.* 2017; 51 (4): 436–42.
 189. Rostami N, Shields RC, Yassin SA, Hawkins AR, Bowen L, Luo TL, et al. A Critical role for extracellular DNA in dental plaque formation. *J Dent Res.* 2016; 96 (2): 208–16.
 190. Allesen-Holm M, Barken KB, Yang L, Klausen M, Webb JS, Kjelleberg S, et al. A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms. *Mol Microbiol.* 2006; 59 (4): 1114–28.
 191. Perry JA, Cvitkovitch DG, Lévesque CM. Cell death in *Streptococcus mutans* biofilms: a link between CSP and extracellular DNA. *FEMS Microbiol Lett.* 2009; 299 (2): 261–6.
 192. Turnbull L, Toyofuku M, Hynen AL, Kurosawa M, Pessi G, Gloag ES, et al. Explosive cell lysis as a mechanism for the biogenesis of bacterial membrane vesicles and biofilms. *Nat Commun.* 2016; 7: 11220.
 193. Juhas M, Van Der Meer JR, Gaillard M, Harding RM, Hood DW, Crook DW. Genomic islands: tools of bacterial horizontal gene transfer and evolution. *FEMS Microbiol Rev.* 2009; 33 (2): 376–93.
 194. Bedoya-Correa CM, Rincón Rodríguez RJ, Parada-Sanchez MT. Genomic and phenotypic diversity of *Streptococcus mutans*. *J Oral Biosci.* 2019; 61 (1): 22–31.
 195. Ahn SJ, Rice KC, Oleas J, Bayles KW, Burne RA. The *Streptococcus mutans* Cid and Lrg systems modulate virulence traits in response to multiple environmental signals. *Microbiology.* 2010; 156 (10): 3136–47.
 196. Ahn SJ, Rice KC. Understanding the *Streptococcus mutans* Cid/Lrg system through CidB function. *Appl Environ Microbiol.* 2016; 82 (20): 6189–203.
 197. Tang G, Yip HK, Cutress TW, Samaranayake LP. Artificial mouth model systems and their contribution to caries research: a review. *J Dent.* 2003; 31 (3): 161–71.
 198. Rickard AH, McBain AJ, Stead AT, Gilbert P. Shear rate moderates community diversity in freshwater biofilms. *Appl Environ Microbiol.* 2004; 70 (12): 7426–35.

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

APÊNDICE A

SEGUNDA ETAPA DOS ENSAIO PARA SIMULAR A COLONIZAÇÃO SECUNDÁRIA E TARDIA DURANTE A FORMAÇÃO DOS BIOFILMES.

Proposta estágio pesquisa no exterior: *University of Florida College of Dentistry.* Orientação Professora Dra. Jacqueline Abranches. FAPESP com número de processo 2020/04351-6 (estágio não realizado devido a pandemia).

Objetivo: Avaliar por transcriptoma via RNA-seq as principais espécies detectadas por sequenciamento do DNA pela empresa BGI Co., Ltd. Dependendo destes resultados, ainda seria avaliado a expressão gênica das amostras utilizando como metodologia RT-qPCR e *primers* específicos para genes de *S. mutans*, e assim corroborar os resultados em uma tentativa de entender o papel da espécie *S. mutans* na construção do biofilme. Para isso seriam avaliados a expressão de três grupos de genes associados com componentes estruturais da matriz (Tabela A1):

- *lytST / lrgAB*: associados com o a disponibilização de DNA extracelular na matriz
- *dltABCD*: associado com o metabolismo e disponibilização de ácidos lipoteicóicos na matriz
- *gtfBCD*: associado a síntese de exopolissacarídeos,
dexA: associado com a remodelação da matriz do biofilme
gbpB: associado a ligação de glicanos.

Tabela A1- Relação dos genes selecionados para o estudo com a proteína sintetizada e sua função em relação a alguns componentes da matriz extracelular do biofilme cariogênico.

Associados com	Gene	Proteína	Função
Exopolissacarídeos	<i>gtfB, gtfC, gtfD</i> <i>gbpB</i> <i>dexA</i>	Glucosiltransferases B, C e D Proteína de ligação de glucanos Dextranase A	-Síntese de exopolissacarídeos -Configuração 3D dos exopolissacarídeos -Remodelação dos exopolissacarídeos
DNA extracelular	<i>lrgAB</i>	Proteínas associada a membrana LrgA/B	-Autólise
	<i>lytTS</i>	Sensor de estímulo / resposta TCS LytT/S	-Regulador da transcrição
	<i>ccpA</i>	Proteína de controle catabólico	-Regulador da transcrição
Ácidos lipoteicóicos	<i>dltABCD</i> <i>SMU_775c</i>	Proteínas Dcl, DltB, Dcp, DltD Proteína hipotética	-D-alanização de ácidos lipoteicóicos -Semelhante com enzima de síntese de ácidos lipoteicóicos de <i>S. aureus</i>

Fonte: Elaboração própria.

Etapas realizadas no Brasil (Laboratório de Biologia Molecular – Faculdade de Odontologia – UNESP)

Metodologia e Resultados

Biofilmes cariogênicos: desenvolvimento e processamento

Os biofilmes cariogênicos foram desenvolvidos de acordo com o item 4.4. (Materiais e Métodos). Assim, vinte discos de esmalte bovino devidamente moldados, higienizados, caracterizados, acoplados aos dispositivos metálicos apropriados e esterilizados. Os biofilmes formados sob estes discos (aleatorizados) seguiram o desafio nutricional Modelo 3 - 'Três refeições diárias', sob comparativo das duas estratégias de inoculação (UNI e MULTI). Foi preconizado que a análise da expressão de genes de interesse seria na fase inicial do desenvolvimento e na fase madura do biofilme, antes e após a exposição aos carboidratos. Para isso foi estabelecido que as idades de 48 e 48,7 horas representariam um biofilme inicial, com 10h de incubação em um caldo com poucos recursos nutricionais e com 40 min com um meio com abundância de recursos,

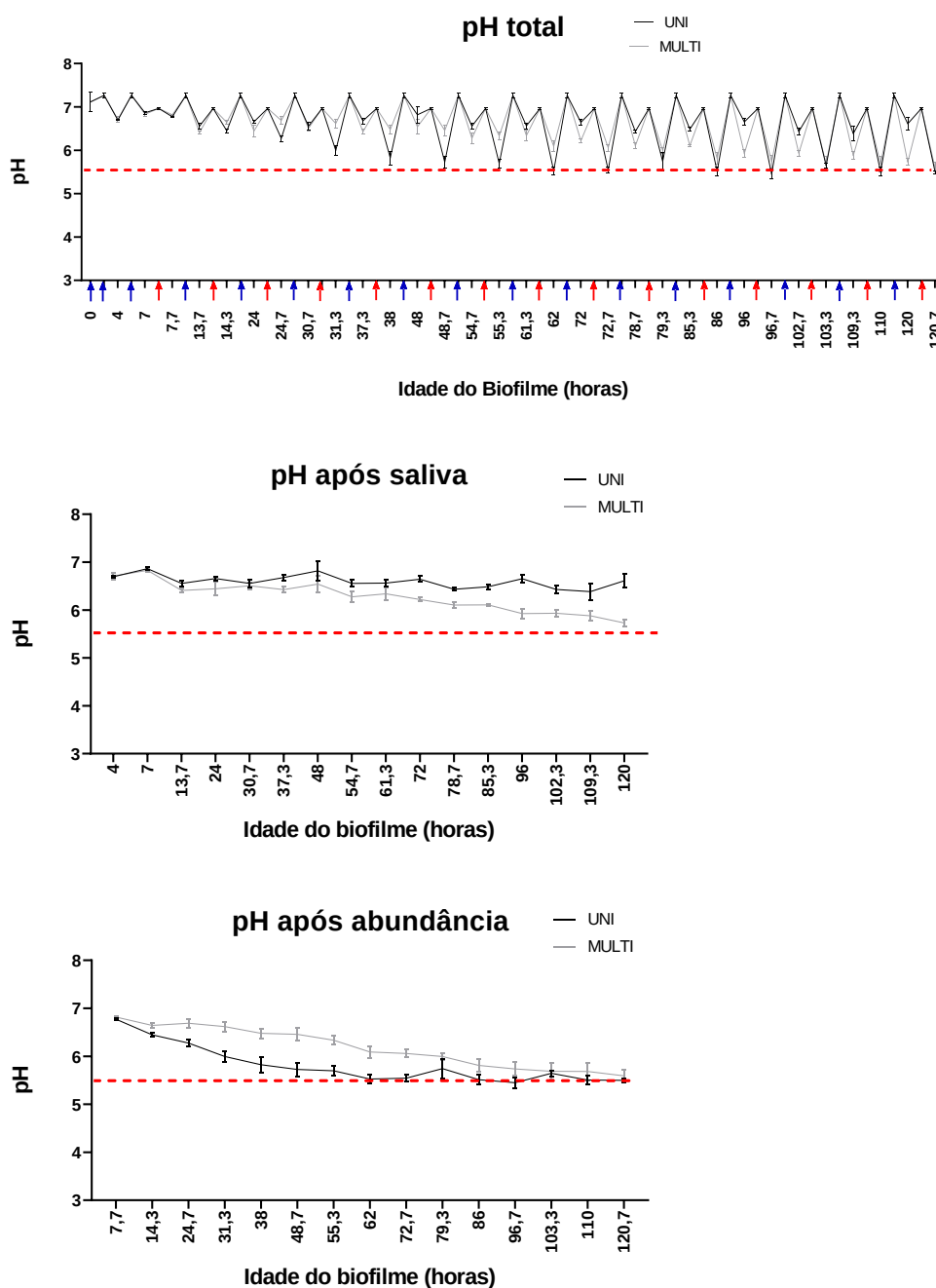
respectivamente. Já as idades de 120 e 120,7 h, representam um biofilme maduro, nos mesmos moldes de exposição de recursos nutricionais.

Para as idades iniciais (48 e 48,7 h) foram utilizados 3 discos-biofilme para obter material suficiente e para as idades maduras (120 e 120,7 h) foram utilizados 2 discos-biofilmes. Três ocasiões experimentais independentes foram realizadas, totalizando $n=3$ por idade por grupo. Adicionalmente em todas as ocasiões experimentais uma dupla de discos não foi inoculada e seguiu toda a sequência das trocas do meio de cultura para o controle de qualidade e descartar possíveis contaminações.

A formação da película salivar, os inóculos com a solução dos *pellets* (57 voluntários) e a quantificação de microrganismo no tempo inicial (0 h) foi realizando como descrito anteriormente (item 4.4.1).

Os valores de pH do meio de cultura fresco (sem inóculo) e experimental (com inóculos resultantes das incubações com biofilmes) foram coletados nos tempos das substituições de meio como controle de qualidade do experimento. O perfil observado durante todo experimento foi igual ao observado nos ensaios da avaliação das estratégias de inoculação, garantindo assim que o experimento foi conduzido de maneira padronizada.

Figura A1 - Perfil do pH dos meios de cultura (fresco e experimental) frente a diferentes estratégias de inoculação.



Em ambas as estratégias foi realizado alternância entre dois meios de cultura diferentes, de acordo com M3-‘Três refeições diárias’. A cada alternância de meio, o pH do meio de cultura do biofilme (experimental) e do meio a ser repostado (fresco) foram coletados e registrados. No eixo Y estão representados os valores das médias e desvio padrão do pH em relação a cada idade do biofilme (eixo x). (A) Representação gráfica de todos os valores de pH (pH total). (B) Representação gráfica dos valores de pH do meio após “Período Saliva”. (C) Representação gráfica dos valores de pH do meio após “Período Abundância”. A linha

pontilhada vermelha ressalta o valor de pH 5,5, ponto crítico para a desmineralização dentária (Bowen ¹, 2013).

Fonte: Elaboração própria

Os biofilmes foram removidos dos discos como explicado anteriormente (item 4.3.4), porém as pinças e tubos estéreis estavam livres de material genético. Para eliminação do material genético das pinças e tubos foram realizadas lavagens com RNaseZAP (Ambion™, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e lavados 3 vezes com água destilada e deionizada. A solução de estabilização - *RNAlater* (Ambion™, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) foi utilizada para a remoção do biofilme do disco, obtendo-se um volume final de 1,5 mL de suspensão de biofilme. A suspensão de cada biofilme foi coletada em tubos cônicos 15 ml e mantidas constantemente em gelo durante todo o processo, o material foi armazenado a -80 °C até o isolamento de RNA.

Os discos foram descartados uma vez que microdureza dos discos de esmalte poderia ser afetada devido a solução ácida de *RNAlater*, levando a possível perda de minerais.

Isolamento e verificação da integridade e do rendimento de RNA

O RNA foi extraído usando o método de separação fenol-clorofórmio (usando a capela de exaustão de gases), e purificado via tratamento com DNase em coluna (RNeasy Micro Kit, Qiagen, Hilden, NW, Alemanha) e em solução (TURBO DNase; Ambion™, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) (Cury e Koo ², 2007). A DNase foi removida usando o RNeasy MinElute clean-up kit (Qiagen, Hilden, NW, Alemanha).

A integridade do RNA purificado dos biofilmes foi determinada por eletroforese em gel de agarose 2 % com a presença de duas bandas (superior a 23S RNA e a inferior a 16S RNA) observadas em imagens adquiridas por fotodocumentação no equipamento Bio-Rad Chemi XRS *Gel Documentation system*. Para as corridas dos géis os ácidos nucleicos (1 µg RNA/canaleta) foram corados com brometo de etídio e foi utilizado um padrão de peso molecular de 1 K pb DNA (Invitrogen).

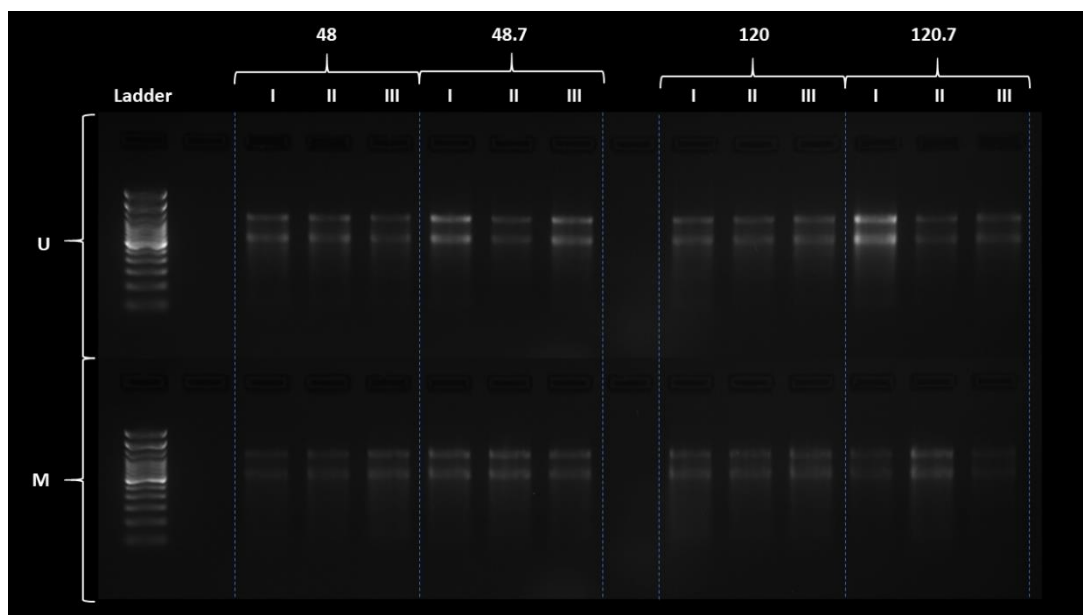
Figura A2 - Integridade do RNA purificado.

Imagem de eletroforese do gel de agarose 2% com amostras de RNA purificados dos biofilmes *Ladder*: peso padrão. U: UNI; M: MULTI. I, II e III: referente a cada ocasião experimental. 48 e 48,7: idades em horas do biofilme em fase inicial. 120 e 120,7: idades em horas do biofilme em fase madura.

Fonte: Elaboração própria.

Foi utilizada espectrofotometria para avaliar a quantidade (densidade óptica a 260 nm) e pureza (proporção de densidades ópticas a 260 e 280 nm) do RNA total (NanoDrop DS-11 DS-11; Denovix, Wilmington, DE). As concentrações de RNA de cada uma das amostras foram apresentadas na Tabela A2, também se apresenta o cálculo dos valores necessários para realizar o *pool* de RNA e o rendimento.

Tabela A2 - Rendimento do RNA de amostras de biofilme dos dois grupos e cálculo para *pool*.

Idade (horas)	Amostra	ng/μL	Rendimento (μg)	Volumes (μL) utilizados para pool de RNA - concentração final 200 ng/μL				
				RNA I	RNA II	RNA III	H ₂ O	Volume final
48	UI	648,0	10,4	2,07				
	UII	947,6	15,2		1,41		14,59	20
	UIII	695,8	11,1			1,93		
48,7	UI	1456,0	23,3	0,92				
	UII	713,4	11,4		1,88		15,35	20
	UIII	724,2	11,6			1,85		
120	UI	655,8	10,5	2,04				
	UII	783,0	12,5		1,71		14,03	20
	UIII	605,2	9,7			2,21		
120,7	UI	865,2	13,8	1,55				
	UII	894,4	14,3		1,50		15,16	20
	UIII	747,8	12,0			1,79		
48	MI	684,0	10,9	1,96				
	MII	730,2	11,7		1,84		14,61	20
	MIII	837,2	13,4			1,60		
48,7	MI	1171,5	18,7	1,14				
	MII	814,0	13,0		1,65		15,80	20
	MIII	951,6	15,2			1,41		
120	MI	1018,5	16,3	1,32				
	MII	807,4	12,9		1,66		15,50	20
	MIII	877,2	14,0			1,53		
120,7	MI	1023,0	16,4	1,31				
	MII	1125,0	18,0		1,19		16,18	20
	MIII	1017,0	16,3			1,32		

Números romanos representam cada ocasião experimental, Letra U representa a estratégia de inóculo único, letra M representa múltiplas inoculações.

Fonte: Elaboração própria

Um *pool* do RNA por estratégia e idade, na mesma quantidade de material genético de cada uma das ocasiões será utilizado. A concentração final foi de 200 $\eta\text{g}/\mu\text{L}$, em um volume de 20 μL totalizando 4 μg de material. As amostras foram armazenadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para posterior realização das análises de RNA seq.

REFERÊNCIAS A *

1. Bowen WH. The Stephan curve revisited. *Odontology*. 2013; 101 (1): 2–8.
2. Cury JA, Koo H. Extraction and purification of total RNA from *Streptococcus mutans* biofilms. *Anal Biochem*. 2007; 365 (2):208-14.

* De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/Home/Biblioteca/guia-de-normalizacao-marco-2015.pdf> .

ANEXO A

COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS Nº 03/2018



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Araraquara



FACULDADE DE ODONTOLOGIA

CERTIFICADO

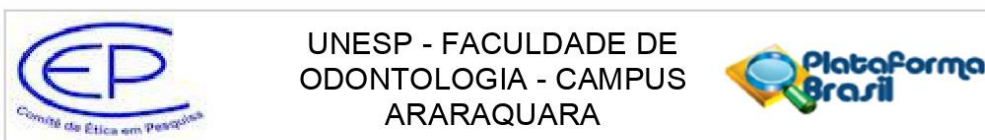
Certificamos que a proposta intitulada ***"INFLUÊNCIA DE STREPTOCOCCUS MUTANS NA CONSTRUÇÃO DA MATRIZ DURANTE O DESENVOLVIMENTO DE BIOFILMES MICROCOSMOS EXPOSTOS A DESAFIO NUTRICIONAL"***, registrada com o nº 03/2018, sob a responsabilidade do(a) **Dr(a). Marlise Inez Klein Furlan** – que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA** em reunião de 23/02/2018.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Julho/2020
Espécie/linhagem/raça	Gado Nelore
Nº de animais	198 dentes
Peso/Idade	250 Kg/ 03 anos
Sexo	-
Origem	Mondelli Indústria de Alimentos S/A.


Profa. Dra. CARINA APARECIDA FABRÍCIO DE ANDRADE
Coordenadora da CEUA

ANEXO B

CAAE: 82750117.6.0000.5416



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: INFLUÊNCIA DE *Streptococcus mutans* NA CONSTRUÇÃO DA MATRIZ DURANTE O DESENVOLVIMENTO DE BIOFILMES MICROCOSMOS EXPOSTOS A DESAFIO NUTRICIONAL

Pesquisador: MARLISE INEZ KLEIN

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 82750117.6.0000.5416

Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.531.480

Apresentação do Projeto:

O projeto "Influência de *Streptococcus mutans* na construção da matriz durante o desenvolvimento de biofilmes microcosmos expostos a desafio nutricional" foi devidamente apresentado. O estudo propõe investigar o desenvolvimento, a padronização e a caracterização de dois modelos de biofilmes microcosmos formados por constantes re-inoculações de saliva e inóculo único de saliva submetidos a desafios nutricionais definidos como "fartura e miséria" que são semelhantes à ingestão de carboidratos (sacarose e amido) na dieta de humanos, além de avaliar a importância do microrganismo *Streptococcus mutans* na construção da matriz extracelular e na estruturação do biofilme cariogênico. Para realização dessa pesquisa será coletado amostras de saliva de 60 voluntários saudáveis que aceitem não realizar procedimentos de higienização bucal por 24 horas. Para isso será necessária a assinatura dos voluntários no TCLE elaborado pela pesquisadora. Além disso, essa pesquisa contará com a utilização de incisivos bovinos e para tanto, será enviado o projeto ao comitê de ética no uso de animais (CEUA). A responsável pelo projeto possui autorização de outros laboratórios da faculdade para utilização das dependências destes laboratórios, necessários para realização da pesquisa. O projeto aguarda aprovação de agência de fomento para financiamento do projeto proposto bem como dos materiais que serão utilizados na pesquisa.

Endereço: HUMAITA 1680

Bairro: CENTRO

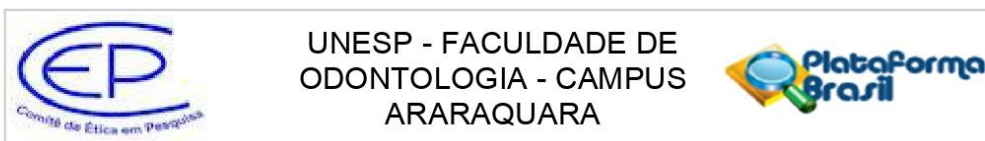
CEP: 14.801-903

UF: SP

Município: ARARAQUARA

Telefone: (16)3301-6459

E-mail: cep@foar.unesp.br



Continuação do Parecer: 2.531.480

Objetivo da Pesquisa:

Os objetivos estão descritos corretamente.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Benefícios:

Os voluntários da pesquisa não terão benefícios diretos com o estudo, entretanto, o estudo visa o entendimento da importância do microrganismo *S. mutans* na construção da matriz extracelular e estruturação do biofilme cariogênico em modelo microcosmo. Esse conhecimento poderá gerar diretrizes para a concepção e implementação de medidas preventivas e terapêuticas na área que se aplica.

Riscos:

O projeto possui riscos mínimos aos voluntários da pesquisa, uma vez que, esses voluntários doarão a saliva formada após a mastigação de pedaço de filme de parafina que induz a formação da saliva. Caso esse filme seja engolido pelo voluntário, este se desintegra quando em contato com o conteúdo gástrico do estômago.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto trará contribuição para a área ao qual se aplica.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos foram apresentados.

Recomendações:

- TCLE:

É necessário modificar no TCLE no item RISCOS DA PARTICIPAÇÃO que os riscos associados a pesquisa são mínimos. Sugiro que a frase seja construída da seguinte maneira "Os riscos sociais ou físicos são mínimos para a doação de saliva. O único risco é que você poderá engolir o pedaço de filme de parafina. Se isso acontecer, o filme se dissolverá no estômago do mesmo modo como uma goma de mascar se dissolve".

Não ficou claro no TCLE (e no próprio projeto também não) em que momento esses voluntários irão coletar a amostra de saliva, uma vez que eles necessitam ficar 24 horas sem higienizar a boca. A pesquisadora informou que serão recrutados voluntários que estejam nas dependências da faculdade, entretanto, caso esses voluntários optem por participar da pesquisa, estes terão que retornar em outro dia para fazer a coleta já que precisam ficar 24 horas sem higienizar a boca?

Endereço: HUMAITA 1680

Bairro: CENTRO

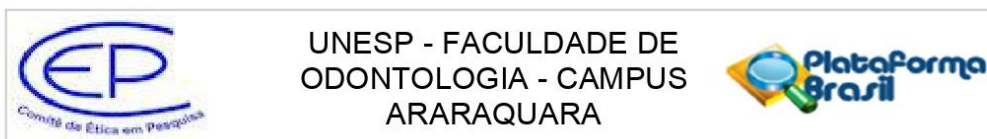
CEP: 14.801-903

UF: SP

Município: ARARAQUARA

Telefone: (16)3301-6459

E-mail: cep@foar.unesp.br



Continuação do Parecer: 2.531.480

Caso eles retornem em um dia que não haverá outro tratamento clínico agendado para este voluntário ele poderá pedir ressarcimento de valores como o valor gasto em transporte? Caso isso ocorra, será necessário informar no TCLE que “as despesas referentes a sua participação serão ressarcidas quando solicitadas”.

- Informações básicas do projeto

Orçamento Financeiro:

O apoio financeiro nas informações básicas do projeto está constando como financiamento próprio, entretanto, a pesquisadora informou um termo de ciência onde diz que os recursos necessários para desenvolver essa pesquisa serão provenientes da reserva técnica da bolsa FAPESP solicitada. A pergunta que surge é, caso a bolsa não seja aprovada, qual será a fonte de verba para a pesquisa, uma vez que o valor do orçamento da pesquisa é alto para ser considerado como financiamento próprio?

Riscos:

Como solicitado no TCLE, por favor, dizer que os riscos são mínimos associados a pesquisa pois, sempre há riscos, entretanto estes podem ser mínimos e caso ocorra, a pesquisadora tem a solução para tais riscos.

Cronograma:

Sugiro alterar a data de início do projeto para 01/04/2018 uma vez que, o projeto ainda se encontra em análise pelo comitê de ética de humanos.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto encontra-se bem estruturado com uma proposta de pesquisa clara. Entretanto ainda necessitada da aprovação de agência de fomento para financiar o projeto. O Orçamento financeiro precisa ser esclarecido quanto ao fato de ocorrer a não aprovação da bolsa pela FAPESP. O TCLE precisa ser ajustado conforme descrito acima. O item riscos precisar ser reescrito. Solicito o esclarecimento sobre o momento que será feita a coleta de saliva uma vez que serão utilizados voluntários que estejam em tratamento em outras clínicas da faculdade. A adequação do cronograma nas informações básicas do projeto apresentados na plataforma Brasil se faz necessária.

Considerações Finais a critério do CEP:

Encaminhe-se ao pesquisador para atender recomendações do relator.

Endereço: HUMAITA 1680

Bairro: CENTRO

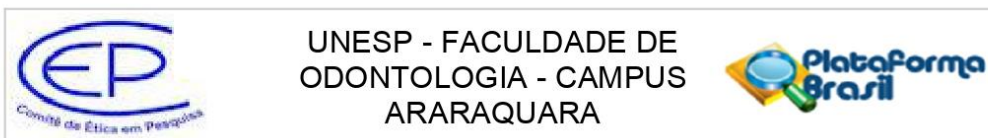
CEP: 14.801-903

UF: SP

Município: ARARAQUARA

Telefone: (16)3301-6459

E-mail: cep@foar.unesp.br



Continuação do Parecer: 2.531.480

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1050353.pdf	01/02/2018 18:28:01		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Projeto_Elkin_2018.pdf	01/02/2018 18:27:22	MARLISE INEZ KLEIN	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo_de_cumprimento_das_normas_do_CEP.pdf	01/02/2018 18:25:19	MARLISE INEZ KLEIN	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Previsao_de_ressarcimento_de_gastos.pdf	18/12/2017 11:28:43	MARLISE INEZ KLEIN	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Autorizacao_para_utilizacao_de_laboratorio.pdf	18/12/2017 11:28:27	MARLISE INEZ KLEIN	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Autorizacao_clinica_para_coleta_de_saliva.pdf	18/12/2017 11:28:06	MARLISE INEZ KLEIN	Aceito
Cronograma	cronograma.pdf	18/12/2017 11:27:49	MARLISE INEZ KLEIN	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto revisado CEP.pdf	18/12/2017 11:26:30	MARLISE INEZ KLEIN	Aceito
Orçamento	termo_de_ciencia_orcamento_Elkin_2017.pdf	18/12/2017 11:26:09	MARLISE INEZ KLEIN	Aceito
Folha de Rosto	folhaDeRosto_Elkin_assinada.pdf	18/12/2017 11:19:56	MARLISE INEZ KLEIN	Aceito

Situação do Parecer:

Pendente

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

ARARAQUARA, 07 de Março de 2018

Assinado por:
Lígia Antunes Pereira Pinelli
(Coordenador)

Endereço: HUMAITA 1680

Bairro: CENTRO

CEP: 14.801-903

UF: SP

Município: ARARAQUARA

Telefone: (16)3301-6459

E-mail: cep@foar.unesp.br

Não autorizo a publicação deste trabalho até 30/03/2023

(Direitos de publicação reservado ao autor)

Araraquara, 30 de março de 2021.

Elkin Jahir Florez Salamanca