

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**  
**Faculdade de Odontologia**  
**Programa de Pós-Graduação em Odontologia**



**Dissertação**

**Potencial cariogênico do biofilme originado de inóculos de origem salivar e da placa dental de indivíduos livres de cárie e com lesões ativas de cárie**

**Cácia Signori**

**Pelotas, 2015**

**Cácia Signori**

**Potencial cariogênico do biofilme originado de inóculos de origem salivar e da placa dental de indivíduos livres de cárie e com lesões ativas de cárie**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da Faculdade Odontologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Odontologia, área de concentração Dentística.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elenara Ferreira de Oliveira  
Co-Orientadores: Dr<sup>a</sup>. Françoise Hélène van de Sande Leite  
Prof.Dr. Maximiliano Sérgio Cenci

Pelotas, 2015

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas  
Catalogação na Publicação

S578p Signori, Cácia

Potencial cariogênico do biofilme originado de inóculos de origem salivar e da placa dental de indivíduos livres de cárie e com lesões ativas de cárie / Cácia Signori ; Elenara Ferreira de Oliveira, orientadora ; Françoise Hélène van de Sande, Maximiliano Sérgio Cenci, coorientadores. — Pelotas, 2015.

80 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Dentística, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Pelotas, 2015.

1. Placa dental. 2. Saliva. 3. Biofilme. 4. Microcosmos. 5. Cárie dentária. I. Oliveira, Elenara Ferreira de, orient. II. Sande, Françoise Hélène van de, coorient. III. Cenci, Maximiliano Sérgio, coorient. IV. Título.

Black : D631

## **Cácia Signori**

### **Potencial cariogênico do biofilme originado de inóculos de origem salivar e da placa dental de indivíduos livres de cárie e com lesões ativas de cárie**

Dissertação aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre em Odontologia, área de concentração Dentística, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 19/02/2015

Banca examinadora:

---

Professora Doutora Elenara Ferreira de Oliveira (Orientadora)  
Doutora em Dentística pela Universidade Federal de Pelotas, Brasil (2006).

---

Professora Doutora Marina Sousa Azevedo  
Doutora em Odontologia pela Universidade Federal de Pelotas, Brasil (2012).

---

Professora Doutor Thiago Marchi Martins  
Doutor em Odontologia Periodontia pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Brasil (2009).

---

Professora Doutora Renata Dornelles Morgental (Suplente)  
Doutora em Endodontia pela Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Brasil (2012).

Dedico este trabalho aos meus pais,  
**Domingos e Sônia**, a quem tenho profunda  
gratidão pelo amor e educação recebidos.

## **AGRADECIMENTOS**

À **Deus**, por iluminar o meu caminho e o das pessoas que me cercam, me encorajando na realização de uma certeza: a docência.

À minha orientadora **Elenara Ferreira de Oliveira**, por me receber junto ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Agradeço pela atenção, apoio e paciência, e por ter me permitido crescer e amadurecer nessa caminhada.

À **Françoise Hélène van de Sande**, minha co-orientadora, admirável pela dedicação, determinação e empenho. A quem tenho profunda gratidão pelas orientações, explicações, e por ter me acompanhado, lado a lado, do início ao fim desse percurso. Agradeço por ter me acolhido tão bem, pela paciência, e pelo seu perfil exigente, fundamental à concretização deste trabalho.

Ao **Max**, meu co-orientador, pelo espírito de pesquisador inquieto, colocando a pesquisa a mando da odontologia. Agradeço pela disponibilidade de sempre, pelas ideias compartilhadas, e pelo suporte para a realização desta pesquisa.

À **Tamires**, pela imensa generosidade em partilhar seus conhecimentos. Obrigada por me apontar o caminho quando foi preciso e por me encorajar a descobrir o novo. Agradeço pela amizade e companheirismo nos momentos de tensão e nervosismo, mas também pelas risadas, e boas histórias. Com certeza, o mestrado não seria o mesmo sem você por perto, sempre pronta a ajudar.

À **Alexandra**, pela amizade e companheirismo ao longo de toda essa trajetória. Obrigada pela ajuda e pelo apoio em todos os momentos.

À **Katielle, Leina, Fernanda Cunha, Chayane, Karen, Márcia, Clarissa, Caroline e Tássia**, não só pela ajuda nas etapas pré-laboratoriais e laboratoriais, como pelas conversas e pelo apoio. Vocês foram fundamentais.

À **Carmen e a Lizângela**, pelo carinho e suporte, de essencial importância para a realização dessa pesquisa.

À **Professora Tânia**, e às **diretoras** das escolas a que visitei, pelo acolhimento. E, em especial, aos **pais e estudantes** que participaram desta

pesquisa, agradeço pela receptividade e carinho com que interpretaram a participação na mesma.

Ao meu pai **Domingos**, meu maior incentivador e motivador, praticamente um integrante dessa dissertação, sempre interessado em solucionar os imprevistos até a conclusão da mesma. Pai, obrigada por me dar o impulso necessário para tornar realidade uma meta que muitas vezes parecia distante.

À minha mãe **Sônia**, pelo carinho e confiança depositados, mesmo de longe. Obrigada por sempre acreditar que tudo daria certo, e pelo incentivo na busca do meu crescimento pessoal e profissional. E à minha **irmã**, pelas longas conversas e por estar sempre ao meu lado.

À **Tia Rosa**, exemplo de cirurgiã-dentista, por ter me influenciado na escolha da minha profissão, e à **Tia Salete**, por me encorajar a seguir a carreira acadêmica.

Às **famílias Rebelo e Signori**, verdadeiras instituições de afeto e amor, pelo suporte familiar em todos os momentos. É um orgulho fazer parte dessa turma.

À **Fernanda**, por ter me acompanhado, da graduação a pós-graduação, agradeço pela amizade, pelas visitas ao laboratório, pelos desabafos compartilhados. Sua presença tornou essa estadia prolongada em Pelotas, com certeza mais fácil. Devo essa conquista a você também.

Aos **amigos**, próximos e distantes, pelo afeto sincero, por acreditarem, muitas vezes, mais em mim do que eu mesma.

À cooperativa **Uniodonto Rio Grande Litoral**, meu primeiro local de trabalho, pela compreensão em relação ao tempo dedicado ao mestrado, pelo convívio com excelentes profissionais e, sobretudo, pela experiência e amadurecimento profissional.

À **Faculdade de Odontologia**, por ser um lugar de bom convívio, e ter me recebido por mais 2 anos.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Odontologia**, pelos aprendizados e suporte.

E, por fim, aos **docentes e discentes** da Faculdade de Odontologia, pelo respeito e troca de conhecimentos, muito obrigada.

## RESUMO

SIGNORI, Cácia. **Potencial cariogênico do biofilme originado de inóculos de origem salivar e da placa dental de indivíduos livres de cárie e com lesões ativas de cárie.** 2015. 80f. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Modelos de biofilmes de microcosmos *in vitro* originados de inóculos salivares ou da placa dental demonstraram que o tipo de inóculo leva a diferentes microcosmos, o que poderia influenciar o potencial cariogênico dos biofilmes *in vitro*. Dessa forma, o presente estudo investigou o potencial cariogênico de biofilmes originados de diferentes tipos de inóculo (saliva e placa dental), de indivíduos cárie-ativos e livres de cárie, em um modelo de biofilme de microcosmos. Dez voluntários foram selecionados de cada condição de cárie (livres de cárie e cárie-ativos) para coleta pareada de placa dental e saliva. Biofilmes de microcosmos foram iniciados, a partir do inóculo, sobre espécimes de esmalte individualmente dispostos em placas de 24 poços. Os biofilmes cresceram em meio definido enriquecido com mucina (DMM), e foram submetidos a desafio cariogênico (DMM suplementado com sacarose à 1%) por 6h/dia. Após 10 dias, os biofilmes foram coletados para análise das variáveis de desfecho: perda mineral (porcentagem de mudança de dureza de superfície) e composição microbiológica dos biofilmes (contagem das UFCs – Unidades Formadoras de Colônias). Análise estatística foi realizada com testes T, Modelo de Análise Multivariada Linear e coeficiente de correlação de Pearson. A análise comparativa entre os dados microbiológicos de baseline para os tipos de inóculos (saliva e placa dental) não mostrou diferença estatística para os indivíduos livres de cárie, já para cárie-ativos foi estatisticamente significante somente para estreptococos mutans. Quanto à comparação entre indivíduos com diferentes condições de cárie, houve diferença estatisticamente significante para estreptococos mutans e microrganismos ácido-tolerantes nas amostras de placa dental, e para ácido-tolerantes na saliva. Após 10 dias de crescimento dos biofilmes, sob desafio cariogênico, os valores para microrganismos totais, lactobacilos, estreptococos mutans, ácido-tolerantes; e ainda, para a perda de dureza de superfície (%PDS), não foram estatisticamente significantes, considerando o tipo de inóculo e a condição de cárie. Correlação positiva foi encontrada para %PDS e contagem de UFCs das bactérias ácido-tolerantes ( $r=0.406$ ) e lactobacilos ( $r=0.379$ ). Dentro das limitações do presente estudo pode-se concluir que, independente de diferenças iniciais entre a origem e o tipo de inóculo, o potencial cariogênico de biofilmes formados sob condições idênticas neste modelo de biofilme de microcosmos é similar.

Palavras-chave: placa dental; saliva; biofilme; microcosmos; cárie dentária.

## ABSTRACT

SIGNORI, Cácia. **Cariogenic potential of biofilm originated from inoculum of salivary origin and dental plaque of caries-free individuals and individuals with active caries lesions.** 2015. 80p. Dissertation (Master). Graduate Program in Dentistry. Federal University of Pelotas, Pelotas.

*In vitro* microcosm's biofilm models originated from salivary or plaque inoculum demonstrated that the type of inoculum leads to different microcosms, which could influence the cariogenic potential of *in vitro* biofilms. Thus, the aim of this study was to investigated the cariogenic potential of biofilms originating from different types of inoculum (saliva and dental plaque) from individuals with active caries and caries-free, in a microcosm biofilm model. Ten volunteers were selected from each caries condition (caries-free and caries-active) for paired collecting of saliva and dental plaque. Biofilm microcosms were originated from the inoculum on enamel specimens arranged individually in 24-well plates. Biofilms grown in defined medium enriched with mucin (DMM), and were subjected to cariogenic challenge (DMM supplemented with sucrose at 1%) for 6h/day. After 10 days, the biofilms were collected for analysis of outcome variables: mineral loss (percentage of surface hardness change) and microbiological composition of biofilms (count of CFUs - Colony Forming Units). Statistical analysis was performed using t-test, Linear Multivariate Analysis Model and Pearson's correlation coefficient. The comparative analysis between microbiological baseline data for types of inoculum (saliva and dental plaque) was not significantly different for individuals free of caries, and for caries-active was statistically significant only for mutans streptococci. Comparison between individuals with different caries conditions, was statistically significant for mutans streptococci and acid-tolerant microorganisms in dental plaque samples, and acid-tolerant in saliva. After 10 days of growth of biofilms under cariogenic challenge, the values for total microorganisms, lactobacilli, streptococci mutans, acid-tolerant; and also to the surface hardness change (% SHC), were not statistically significant, considering the type of inoculum and the caries condition. Positive correlation was found for % SHC and CFUs counts of acid-tolerant bacteria ( $r=0.406$ ) and lactobacilli ( $r=0.379$ ). Under the limits of this study, the cariogenic potential of biofilms, formed under identical conditions *in vitro* on this microcosm biofilm model is similar, regardless of initial differences found between the source and type of inoculum.

Keywords: dental plaque; saliva; biofilm; microcosms; tooth decay.

## **LISTA DE FIGURAS**

### **Projeto**

Quadro 1	Estratégia de Busca MEDLINE .....	22
Figura 1	PRISMA <i>Flow Diagram</i> .....	23

### **Relatório de Campo**

Quadro 1	Estratégia de Busca MEDLINE .....	36
Figura 1	Gráficos das contagens microbianas para diferentes possibilidades de substâncias formadoras da película adquirida.....	39
Figura 2	Gráfico da contagem de microrganismos para diferentes inóculos (saliva e placa dental), advindos de um único doador.....	40
Figura 3	Desenho esquemático do preparo da amostra de saliva.....	43
Figura 4	Desenho esquemático do preparo da amostra de placa dental.....	43
Figura 5	Ilustração do passo-a-passo da inoculação a partir da placa dental.....	44
Figura 6	Ilustração do passo-a-passo da inoculação a partir da saliva ajustada.....	45
Figura 7	Ilustração das trocas dos meios.....	45

### **Artigo**

Figure 1	Baseline CFU counts according to the type and source of the inoculum.....	54
Figure 2	Microcosm biofilm CFU counts according to the type and source of the inoculum.....	55

- Figure 3 Mean values and SD of the percentage of Surface Hardness Change (%SHC) for different types (dental plaque and saliva) and sources (with caries and caries-free) of inoculum..... 55

## **LISTA DE TABELAS**

### **Artigo**

Table 1 Pearson correlation coefficients among the response variables..... 56

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%	Percentual
ANOVA	Analysis of Variance - Análise de Variância
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
°C	Graus Celsius
CFU	Colony Forming Unit
CKB	<i>Checkerboard DNA–DNA hybridization</i>
DMM	<i>Defined medium with mucin</i> – meio definido enriquecido com mucina
FO	Faculdade de Odontologia
HOMIM	<i>Human Oral Microbial Identification Microarray</i>
ICDAS	<i>International Caries Detection and Assessment System</i>
µL	MicroLitro
µm	Micrometro
mL	Mililitros
Mm	Milímetro
MST	Microdureza de secção transversal
PDS	Perda de dureza de superfície
pH	Potencial de hidrogênio iônico
PLADECOM	Planejando, Avaliando e Desenvolvendo Ações em uma Comunidade
RPM	Rotação por minuto
RTF	<i>Reduced transport fluid</i> - meio de transporte reduzido
S	Segundo
SD	Standard Deviation
SHC	Surface Hardness Change
UFPel	Universidade Federal de Pelotas
UFC	Unidade Formadora de Colônias

## **SUMÁRIO**

<b>1 INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>13</b>
<b>2 PROJETO DE PESQUISA.....</b>	<b>15</b>
<b>3 RELATÓRIO DE CAMPO .....</b>	<b>36</b>
<b>3.1 Aspectos éticos.....</b>	<b>36</b>
<b>3.2 Modificações gerais .....</b>	<b>36</b>
<b>3.2.1 Parte 1 – Revisão Sistemática.....</b>	<b>36</b>
<b>3.2.2 Parte 2 – Experimento Laboratorial .....</b>	<b>36</b>
<b>3.3 Piloto 1 .....</b>	<b>38</b>
<b>3.4 Piloto 2 .....</b>	<b>39</b>
<b>3.5 Seleção dos doadores .....</b>	<b>40</b>
<b>3.6 Experimento.....</b>	<b>41</b>
<b>3.7 Coleta das amostras (inóculos) .....</b>	<b>41</b>
<b>3.8 Crescimento dos biofilmes.....</b>	<b>42</b>
<b>3.9 Intercorrências .....</b>	<b>46</b>
<b>4 ARTIGO .....</b>	<b>48</b>
<b>5 CONCLUSÃO .....</b>	<b>61</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>62</b>
<b>APÊNDICES .....</b>	<b>67</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>73</b>

## **1 INTRODUÇÃO GERAL**

A cárie dental representa o reflexo do processo que ocorre no biofilme, ou seja, é o resultado da interação do biofilme com a superfície dentária. O metabolismo natural do biofilme, com bactérias metabolicamente ativas, causa flutuações de pH, as quais ocasionalmente, quando em estado de desequilíbrio, implicam na formação de lesões cariosas (KIDD, 2011). A cariogenicidade da placa dental pode sofrer variações entre diferentes indivíduos, podendo ser atribuída a fatores como dentição, dieta, saliva e higiene oral (PRETTY et al., 2005), ou mesmo entre sítios da mesma cavidade bucal.

Embora microrganismos patógenos possam ser encontrados comumente em sítios saudáveis em pequeno número, há diferenças na predominância de espécies de sítios dentais cárie-ativos, comparados a sítios livres de cárie. A exposição regular a baixo pH na placa dental promove a seleção de microrganismos como estreptococos do grupo mutans e lactobacilos. Isso vai ao encontro da Hipótese da Placa Ecológica, onde mudanças no ambiente oral, devido à produção de ácido advinda da fermentação de carboidratos, selecionam espécies acidogênicas e ácido-tolerantes (MARSH, 2010).

Modelos de biofilmes de microcosmos têm sido amplamente utilizados por fornecerem uma versão *in vitro* da placa dental, sob condições altamente controladas (TANG et al., 2003). Esses modelos constituem uma alternativa aos modelos de monoculturas, ou mesmo consórcios de bactérias, os quais não representam a diversidade da microbiota bucal (FILOCHE; SOMA; SISSONS, 2007), dado a detecção de mais de 700 espécies de bactérias na cavidade oral (AAS et al., 2005). Por essa razão, modelos de biofilmes de microcosmos são formados a partir de inóculos salivares e/ou da placa dental, os quais são recursos naturais da microflora oral (FILOCHE; WONG; SISSONS, 2010; RUDNEY et al., 2012; LEE et al., 2013; AZEVEDO et al., 2014).

A característica chave de um sistema experimental de microcosmos é a complexidade ecológica, visto que a microbiota e ecologia oral é intrinsecamente diferente entre indivíduos. No entanto, respostas microbianas similares estão

relacionadas com a suplementação de sacarose (FILOCHE; SOMA; SISSONS, 2007; FILOCHE et al., 2008) A relação da presença e frequência de exposição à sacarose com a composição da microbiota dos biofilmes é demonstrada *in vitro* (Filoche, 2007), acarretando redução da capacidade protetora mineral (PEARCE et al., 2002). Sugere-se que o grau de resposta à exposição à sacarose é hospedeiro-específico, propondo a possibilidade de diferenças na progressão da lesão de cárie (FILOCHE; WONG; SISSONS, 2010).

No entanto, estudos relatam a mesma resposta cariogênica de biofilmes, submetidos à exposição regular a sacarose, com produção similar de perda mineral, independentemente das características individuais dos doadores, e fonte do inóculo, ou seja, inóculos advindos de indivíduos cárie-ativos e livres de cárie (AZEVEDO et al., 2014). Similar cariogenicidade foi observada em biofilmes de microcosmos originados a partir da saliva de crianças com diferentes experiências de cárie, independentemente da fonte do inóculo dos biofilmes (AZEVEDO et al., 2011). Entretanto, essa resposta pode ter sido influenciada pela natureza do inóculo de origem, salivar ou advindo da placa dental (NYVAD et al., 2013), já que inóculos advindos da saliva e da placa dental não são inteiramente similares, mesmo que provenientes do mesmo indivíduo. E cada tipo de inóculo irá levar a uma composição de microcosmos singular (RUDNEY et al., 2012).

A manutenção, em condições *in vitro*, das diferenças de cariogenicidade da placa dental existentes *in vivo*, e o potencial cariogênico de biofilmes de microcosmos derivados da placa dental de sítios distintos da cavidade oral ou da saliva, sob condições controladas, ainda não está bem esclarecida. Nesse contexto, o presente estudo visou investigar o potencial cariogênico de biofilmes originados de indivíduos com diferentes experiências de cárie, obtendo como inóculo a saliva e a placa dental de sítios dentais específicos (com e sem lesões ativas de cárie) em um modelo de biofilme de microcosmos.

## **2 PROJETO**

### **1 ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVA**

A cárie dentária representa uma das doenças infecciosas de maior prevalência a nível mundial (SELWITZ; ISMAIL; PITTS, 2007). O papel do biofilme dental no desenvolvimento da doença cárie, resultante de um desequilíbrio na atividade metabólica do biofilme, necessita de conhecimentos complementares, que podem ser viabilizados através do estudo das funções biológicas e metabólicas envolvidas neste processo (NYVAD *et al.*, 2013).

O biofilme dental constitui um ecossistema oral complexo e extremamente dinâmico (BEIGHTON, 2005; AAS *et al.*, 2005). Mudanças de caráter bioquímico e microbiológico do biofilme, como a elevação do número de espécies bacterianas patogênicas e a cariogenicidade do mesmo, podem ser atribuídas a condições como a exposição frequente ao alto consumo de carboidratos (TAKAHASHI; NYVAD, 2008).

O biofilme naturalmente desenvolvido “*in vivo*” é difícil de investigar devido à complexidade do ambiente oral, à heterogeneidade da placa dental, limitação de acesso e de quantidade amostral, às dificuldades de controlar variáveis no ambiente oral e aos entraves éticos relacionados a estudos em seres humanos (WONG; SISSONS, 2001; TANG *et al.*, 2003). Uma alternativa a esse segmento de estudo são os estudos “*in situ*”, com o uso de dispositivos intra-orais que permitem a remoção das amostras do estudo de interesse em períodos determinados de tempo, viabilizando o acesso às características do biofilme e perfil de desmineralização (CENCI *et al.*, 2009). No entanto, a utilização dos mesmos pode gerar desconforto e é dependente da colaboração dos participantes durante o desenvolvimento do estudo. Essa soma de fatores justifica o desenvolvimento de modelos laboratoriais que objetivam simular *in vitro* o ambiente oral (RUDNEY *et al.*, 2012).

Uma alternativa a modelos de estudos que utilizam biofilmes fundamentados no uso de uma única espécie, ou de um consórcio de espécies de microrganismos, é a utilização de um inóculo oral com o objetivo de gerar um modelo de microcosmos *in vitro*, o qual apesar de ser mais difícil de caracterizar, é bastante diverso. Esse modelo é sustentado pela razão que biofilmes de monocultura, ou mesmo consórcios de bactérias não concebem amostras representativas da diversidade da microbiota bucal de placas dentárias naturais (FILOCHE; SOMA; SISSONS, 2007; RUDNEY *et al.*, 2012), dado a detecção de mais de 700 espécies de bactérias na cavidade oral (AAS *et al.*, 2005).

O modelo de biofilme de microcosmos, portanto, é uma versão *in vitro* da placa natural, em um ambiente de condições controladas, e reflete a diversidade, complexidade e heterogeneidade dos biofilmes originados “*in vivo*” (SISSONS, 1997; WONG; SISSONS, 2001). No entanto, a real representatividade da microbiota oral fornecida por esse modelo continua a constituir um alvo para a pesquisa (RUDNEY *et al.*, 2012).

Em uma gama variada de estudos o inóculo de escolha utilizado nos experimentos de microcosmos tem sido a saliva, advinda de um único doador ou de diferentes doadores. Nestes modelos, utiliza-se saliva artificial com ou sem sacarose como meio de cultivo dos biofilmes, o que permite o controle de condições, como a intensidade de exposição à dieta cariogênica (PEARCE *et al.*, 2002; FILOCHE; SOMA; SISSONS, 2007; CENCI *et al.*, 2009; AZEVEDO *et al.*, 2011, VAN DE SANDE *et al.*, 2011; RUDNEY *et al.*, 2012). O aumento da freqüência da exposição à sacarose promove alterações no biofilme dental resultando na redução da capacidade protetora mineral (PEARCE *et al.*, 2002). O modelo demonstra o dinamismo da comunidade microbiológica, e reflete a maturação das placas naturais, sua composição cariogênica e mudanças de pH (FILOCHE; SOMA; SISSONS, 2007).

A validade e reproduzibilidade de modelos de microcosmos orais originados a partir de inóculos salivar e de placa dental, verificadas por meio do “*Human Oral Microbial Identification Microarray*” (HOMIM), demonstraram que o modelo estabelecido é reproduzível e representativo da microbiota oral (RUDNEY *et al.*, 2012). No entanto, foi verificado por MAGER *et al.* (2003) a similaridade maior da microbiota salivar com a microbiota encontrada na língua, do que se comparada a placa dental, através do uso de “*Checkerboard DNA–DNA hybridization*” (CKB).

Além disso, é indicado que os inóculos de origem salivar não são completamente similares aos inóculos advindos da placa dental, e que cada tipo de inóculo irá induzir a um microcosmo diferenciado (RUDNEY *et al.*, 2012).

A característica chave em um sistema experimental de microcosmos é a complexidade ecológica, visto que a microbiota e ecologia oral é intrinsecamente diferente entre indivíduos (FILOCHE, 2007). Logo, o perfil bacteriano salivar, determinado por “Checkerboard DNA–DNA hybridization”, de cada indivíduo varia dependendo da prevalência de patógenos associados à cárie ou doença periodontal; e em acréscimo a isso, a resposta do biofilme *in vitro*, produção de biomassa e pH, sob exposição a sacarose, à distintas formas de tratamentos, demonstrou ter comportamento diferente entre indivíduos (FILOCHE *et al.*, 2008). Portanto, sugere-se que o grau de resposta à exposição à sacarose é hospedeiro-específico, aferido pela elevação dos patógenos associados à cárie, o que poderia gerar diferenças não só na progressão da lesão de cárie, como também nas respostas aos tratamentos utilizados (FILOCHE; WONG; SISSONS, 2010).

Em adição a isso, foi determinado, via métodos moleculares, que o perfil bacteriológico do biofilme dental varia entre as dentições decíduas e permanentes, e entre sítios com diferentes estágios de lesão de cárie dentária (AAS *et al.*, 2008). Incorporar essa característica de variação da microbiota em modelos laboratoriais de biofilme é altamente desejável (LEDDER *et al.*, 2006).

Em 2011, Azevedo *et al.*, ao compararem a cariogenicidade do microcosmo de biofilme originado de saliva de crianças livres de cárie, com cárie e com cárie severa, sob exposição regular a sacarose, concluíram que a exposição a sacarose determinou a cariogenicidade dos biofilmes. É fato que a lesão de cárie manifesta-se de forma localizada em sítios específicos, deste modo a representatividade dos inóculos advindos da saliva demonstra apenas o reflexo do dinamismo e complexidade dos microrganismos envolvidos no processo, o que sugere que esses modelos de biofilmes não reproduzem com fidelidade os processos microbianos e metabólicos atuantes na doença a nível de cada sítio (NYVAD *et al.*, 2013). Isso pode ser ilustrado, de certo modo, pelo estudo anterior, de Azevedo *et al.* (2011), onde a maior atividade de cárie de crianças doadoras do inóculo salivar, não foi capaz de promover um aumento da cariogenicidade do biofilme, em um modelo de microcosmos, quando comparado com crianças cárie inativas.

Nesse contexto, destaca-se a importância de investigar a utilização de amostras de comunidades microbianas de sítios específicos em estudos relacionados ao biofilme dental.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Avaliar o potencial cariogênico do biofilme originado de inóculos de sítios dentais com e sem lesões ativas de cárie, através de um modelo de microcosmos de biofilme.

### **2.2 Objetivos específicos**

- a) Realizar uma revisão sistemática com o objetivo de avaliar estudos que tenham investigado a influência do inóculo no perfil microbiano e/ou potencial cariogênico do biofilme;
- b) comparar o potencial cariogênico do biofilme advindo de inóculos de origem salivar e da placa dental de superfícies dentárias com lesões não cavitadas ativas de cárie e superfícies hígidas;
- c) analisar o perfil microbiológico resultante de biofilmes de diferentes inóculos submetidos ao desafio cariogênico.

### **3 HIPÓTESE**

Não haverá diferença entre o potencial cariogênico e perfil microbiológico dos biofilmes originados a partir da placa dental de sítios com lesão não cavitada ativa de cárie e sítios sem lesão de cárie, em um modelo experimental de microcosmos.

## **4 METODOLOGIA**

### **4.1 Metodologia para realização da revisão sistemática**

#### **4.1.1 Critérios de inclusão**

Estudos *in vitro* que abordem o tipo de inóculo, e sua influência acerca do potencial cariogênico e/ou perfil microbiano do biofilme. Os estudos incluídos deverão apresentar como inóculo de origem, para modelos experimentais de biofilmes *in vitro*, a placa dental ou/e o fluido salivar.

A qualificação metodológica dos estudos será realizada através de uma escala de indicadores de qualidade da evidência científica apresentada pelos artigos, a ser definida e adaptada para sua utilização em estudos *in vitro*.

#### **4.1.2 Desfechos avaliados**

##### **4.1.2.1 Desfechos primários**

- a) Desmineralização (perda de dureza) dentária;
- b) perfil microbiológico.

##### **4.1.2.2 Desfechos secundários**

- a) Variação de pH.

#### **4.1.3 Estratégia de busca dos estudos**

A estratégia de busca para a identificação dos estudos a serem incluídos nesta revisão contemplará as seguintes bases de dados: PUBMED, SCOPUS e *ISI Web of Knowledge*. A data da busca e estratégia correspondente a cada base de dados serão registradas com o intuito de permitir a reproduzibilidade da sistemática

de busca utilizada. Uma busca manual ainda será realizada em publicações não indexadas, anais de congressos, teses e dissertações.

Para a construção de uma estratégia de pesquisa detalhada optou-se pelo desenvolvimento de uma estratégia de busca inicial no MEDLINE (Pubmed), baseada em artigos sobre o tema de interesse, palavras contidas nos títulos e resumos, e ainda nos termos de indexação e correspondentes. Somando-se às palavras-chave de escolha, com a finalidade de restringir e/ou ampliar a busca foram utilizados operadores booleanos (ex.: AND e OR). Não haverá restrição de busca em relação ao idioma ou ano de publicação dos artigos.

A resultante dessa construção (Quadro 1) foi a interação das seguintes palavras-chave: “placa dental” (Dental Plaque), “biofilme” (Biofilm), “sacarose” (Sucrose), “desmineralização” (Tooth Demineralization) e “cárie dental” (Dental Caries); correspondendo a um total de 389 estudos encontrados. Essa estratégia será aplicada e revisada de forma apropriada de acordo com as características das bases de dados SCOPUS e *ISI Web of Knowledge*.

```
((((((("Dental Plaque"[Mesh] OR "Plaque, Dental")))) OR ((("Biofilms"[Mesh] OR "Biofilm")))) AND ((("Sucrose"[Mesh] OR "Saccharose" OR "Dietary Sucrose"[Mesh] OR "Table Sugar" OR "Sucrose, Dietary" OR "Sugars, Dietary" OR "Dietary Sugars")))) AND ((("Tooth Demineralization"[Mesh] OR "Tooth Hypomineralization" OR "Hypomineralization, Tooth" OR "Hypomineralizations, Tooth" OR "Tooth Hypomineralizations" OR "Demineralization, Tooth")))) AND ((("Dental Caries"[Mesh] OR "Decay, Dental" OR "Dental Decay" OR "Caries, Dental" OR "Dental White Spot" OR "White Spots, Dental" OR "White Spots" OR "Spot, White" OR "Spots, White" OR "White Spot" OR "Dental White Spots" OR "White Spot, Dental"))))
```

Quadro 1 - Estratégia de Busca MEDLINE.

#### **4.1.4 Seleção dos estudos**

Inicialmente, os estudos encontrados serão dispostos em um banco de dados para a exclusão de duplicatas no programa gerenciador de referências bibliográficas EndNote X5 para Windows. Após, de acordo com as principais características de interesse: tipo de inóculo, modelos experimentais de biofilmes *in vitro* e desfechos avaliados, os títulos serão analisados, seguidos dos resumos dos títulos, e posteriormente, os artigos na íntegra (Figura1). Essa avaliação será realizada de maneira independente por dois avaliadores. Cada revisor encaminhará os estudos

para fins de inclusão e exclusão. Artigos que despertarem encaminhamentos discordantes serão discutidos entre os revisores até que se estabeleça um consenso. Caso necessário, um terceiro revisor deverá ser consultado.

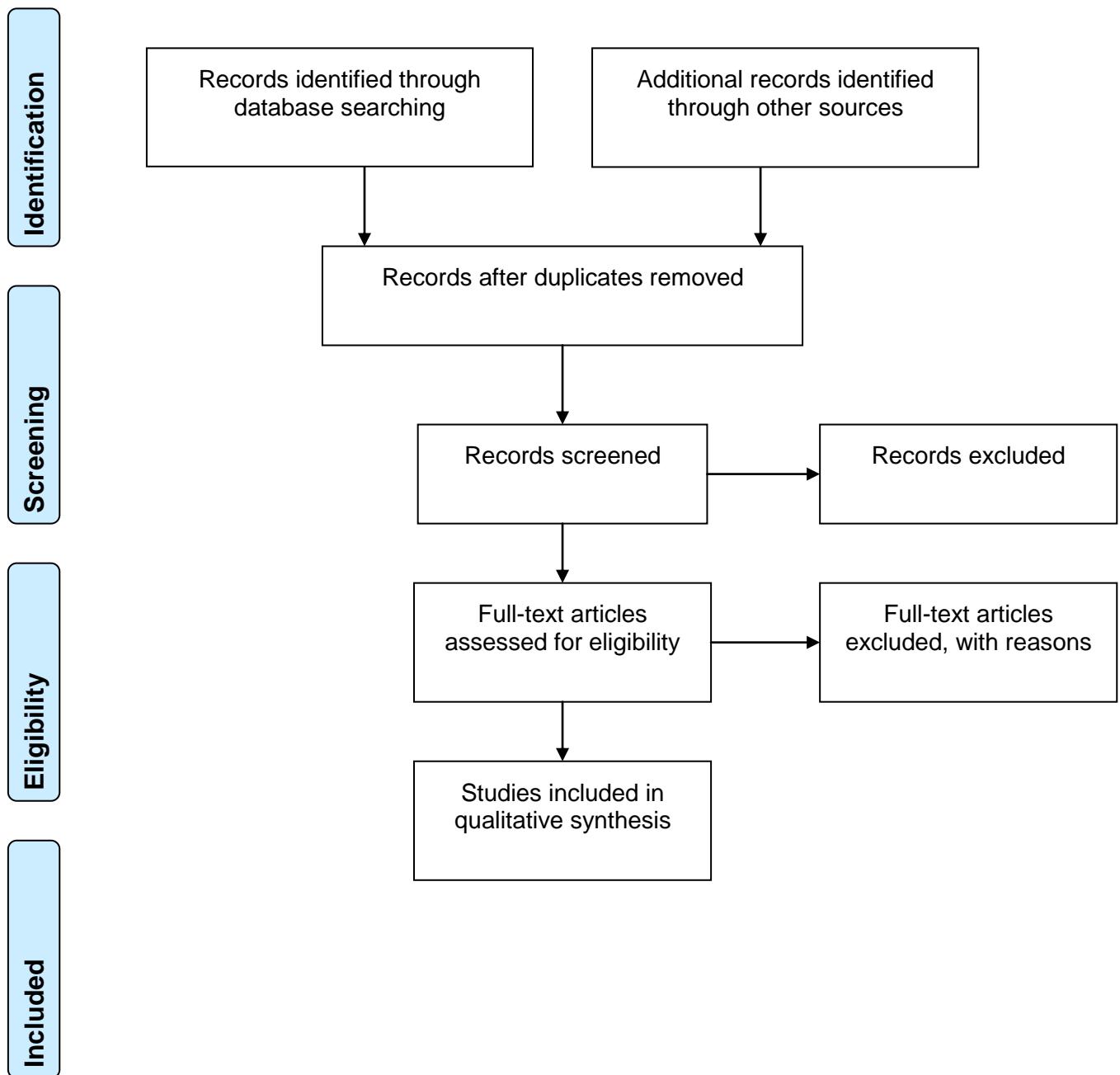


Figura 1 – PRISMA *Flow Diagram*.

#### **4.1.5 Extração de dados**

Serão extraídos dados dos desfechos primários e secundários investigados, informações referentes ao estudo como forma de delineamento, perfil do doador, restrição aos sujeitos da amostra referente à utilização de antibióticos, tipo de inóculo utilizado, objetivo do estudo, metodologia e formas de aferição dos resultados, como também conclusões. A extração de dados será realizada por um dos revisores e posteriormente reavaliada por um segundo revisor.

#### **4.1.6 Síntese e análise dos dados**

Os principais itens de interesse referentes a cada estudo, autoria, publicação, tipo de inóculo, modelo de biofilme utilizado, desfechos avaliados, serão dispostos no formato de tabela. Estudos não selecionados para a revisão serão acompanhados dos respectivos motivos de exclusão.

Por se tratar de uma investigação de estudos *in vitro*, e devido à variabilidade metodológica encontrada nesses tipos de estudos, uma análise estatística possivelmente será inviabilizada, nesse caso irá ser aplicada uma análise descritiva qualitativa dos resultados encontrados.

### **4.2 Metodologia para avaliação do potencial cariogênico de biofilmes desenvolvidos *in vitro***

#### **4.2.1 Aspectos éticos**

O presente projeto de pesquisa será submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Pelotas (FO-UFPel) para aprovação. Os responsáveis legais pelos sujeitos da amostra assinarão um termo de consentimento livre e esclarecido (Apêndice A), com a finalidade de permitir a participação no estudo. Como benefício imediato os participantes serão diretamente beneficiados pela garantia de tratamento das alterações bucais diagnosticadas (independente do tipo de alteração). Os riscos aos sujeitos da amostra são mínimos, pois a participação do sujeito da pesquisa implica somente

que os mesmos deverão abster-se de qualquer método de higiene oral por um período de 24 horas anterior a coleta das amostras, e de alimentação 2 horas previamente ao procedimento. Tais riscos são contornáveis através do reestabelecimento de uma adequada higiene oral.

#### **4.2.2 Cálculo da amostra**

O cálculo amostral foi realizado (Power and Sample Size Calculation Program, v. 3.0, DUPONT e PLUMMER, 1990) observando os dados de perda mineral obtidos no estudo de Azevedo et al. (2011). A diferença nas médias para diferentes inóculos (*paired t-test*) foi estimada em 20% para Perda de Dureza de Superfície (PDS), enquanto a diferença no desvio-padrão foi estimada em 20%. Com base nesta estimativa, 10 indivíduos (inóculos pareados) seriam necessários para observar diferenças em %PDS utilizando critérios de poder de estudo de 80%, e erro tipo alfa de 5%.

#### **4.2.3 Critérios de inclusão e exclusão**

Dez indivíduos, faixa etária entre 12 e 18 anos de idade, serão selecionados na Unidade Clínica Odontológica I da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Pelotas (FO-UFPel).

Para inclusão os indivíduos deverão apresentar lesão de cárie não cavitada ativa em pelo menos três superfícies livres dentárias. O grupo controle será representado por pacientes livres de lesão de cárie dental.

Indivíduos submetidos a tratamento com antimicrobianos, nos últimos três meses, e indivíduos que apresentarem dentes decíduos remanescentes, serão excluídos da amostra.

#### **4.2.4 Delineamento experimental**

Para o presente estudo, biofilmes de microcosmos serão formados sobre discos de esmalte bovino. O estudo será *in vitro*, cego (análise estatística) e aleatorizado (distribuição dos espécimes de esmalte). O efeito da utilização de

inóculos distintos de um mesmo indivíduo será investigado em relação ao perfil microbiológico e o potencial cariogênico dos biofilmes formados. Dez indivíduos serão selecionados para as avaliações comparativas pareadas (placa dentária de superfície com lesão de cárie e saliva). O grupo controle corresponderá à placa e saliva coletadas de dez indivíduos livres de cárie. Os fatores em estudo serão: o tipo de inóculo em três níveis (placa dentária de superfície com cárie, placa dentária de superfície hígida, saliva) e o tempo de formação dos biofilmes em cinco níveis (24h, 72h, 120h, 168h e 14 dias). As variáveis de desfecho avaliadas serão a perda mineral [percentual de perda de dureza de superfície (todos os tempos) e dureza interna (14 dias)] e composição microbiológica do biofilme (UFC). O experimento será realizado em triplicata, as médias serão obtidas e utilizadas na análise.

#### **4.2.5 Piloto**

Previamente a execução do estudo será feito um experimento piloto com a finalidade de estabelecer um padrão quantitativo de placa dental, e representativo da microbiota específica do sítio de escolha.

O estudo piloto compreenderá a formação de biofilmes *in vitro*, em placas de micro-poços sobre discos de esmalte bovino a partir do inóculo da placa dental. Serão coletadas duas amostras de placa dental, sendo que a segunda amostra deverá corresponder ao dobro da inicial, de um voluntário saudável previamente orientado a não realizar nenhum tipo de higiene oral num período de 24 horas. As amostras serão depositadas em solução salina e a densidade microbiana aferida com auxílio de espectrofotômetro. O mesmo indivíduo fornecerá uma amostra de saliva, resultando em três grupos de inóculos para comparação do perfil microbiológico. Os biofilmes serão desenvolvidos sobre três discos de esmalte para cada grupo ( $n=3$ ), por cinco dias.

A análise do estudo piloto será feita por meio da aferição de microdureza de superfície, por medições diárias de pH, e pela contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) dos meios de cultura para quantificação de microrganismos totais, estreptococos do grupo mutans, bifidobacterium e acidúricos totais.

#### **4.2.6 Obtenção e preparo dos discos de esmalte**

As amostras de esmalte serão obtidas de incisivos bovinos, livres de falhas, provenientes de um frigorífico local. Os dentes serão previamente raspados, limpos e armazenados em água destilada (-20°C). Posteriormente discos de esmalte de 5mm de diâmetro e 2,5mm de espessura serão confeccionados através do uso de uma furadeira industrial com broca de núcleo de diamante (tipo trefina) em velocidade de 400 RPM, a qual seccionará o terço médio vestibular do dente. Os procedimentos durante a confecção dos discos serão realizados sob refrigeração. Após, será feita planificação da superfície com discos de lixa (granulometria 600, 1200, e 1500) e polimento com feltro e pasta diamantada em politriz. A base e as laterais do disco serão isoladas com esmalte para unhas, deixando apenas a superfície do esmalte exposta. Ao final, as amostras serão autoclavadas e armazenadas em solução estéril a -20°C até utilização. A esterilização em autoclave será procedida conforme protocolo padrão, à 121°C por 15 a 30 minutos, a 15 libras de pressão.

#### **4.2.7 Coleta de saliva e placa dental**

O exame clínico para inclusão dos pacientes na amostra será realizado por dois examinadores previamente calibrados e seguirá os critérios do ICDAS (International Caries Detection and Assessment System). Os sujeitos da pesquisa deverão abster-se de qualquer método de higiene oral por um período de 24 horas anterior a coleta das amostras, e de alimentação 2 horas previamente ao procedimento. Dez indivíduos doarão 2 amostras para iniciar o crescimento dos biofilmes *in vitro*, uma advinda da saliva, e outra de placa supra-gengival de superfície com lesão de mancha branca ativa em esmalte. Os dez indivíduos do grupo controle doarão um inóculo da placa dental supra-gengival proveniente de superfície dentária hígida e uma amostra salivar.

## 4.2.8 Crescimento microbiano

### 4.2.8.1 Formação de biofilme a partir da saliva

A saliva, estimulada por filme de parafina (Parafilm "M"®, American National CanTM, Chicago, IL, EUA), será coletada e armazenada em frascos estéreis totalizando 20mL por amostra. As amostras serão transportadas em gelo ao Laboratório de Microbiologia da FO-UFPel.

Após, parte do fluído salivar (2mL) será destinado ao plaqueamento imediato dos meios de cultura e uma alíquota será congelada para futuras análises. Outra parte (6mL) será filtrada por meio de lã de vidro estéril, contido em um frasco estéril, e irá se proceder à homogeneização em vortex (FILOCHE; SOMA; SISSONS, 2007). Os discos de esmalte, dispostos em placas de 24 poços, serão inoculados pela saliva obtida através da deposição de 400µL por poço. Os biofilmes serão formados em triplicatas para cada condição experimental. Percorrido o tempo de 1 hora, se procederá à aspiração cautelosa da saliva, e cada micro-poço receberá 1,8mL de saliva artificial, ou seja, meio definido enriquecido com mucina (DMM - *Defined medium with mucin*). O DMM corresponde a um meio de cultura semi-definido formado por íons, mucina, vitaminas, aminoácidos e fatores de crescimento (WONG; SISSONS, 2001). O desafio cariogênico se efetuará pela adição de DMM enriquecido com sacarose a 1% nos micro-poços durante 6 horas.

Em seguida, procedesse a incubação em 5-10% CO<sub>2</sub>, < 1% O<sub>2</sub> (Anaerobac – Probac do Brasil produtos Bacteriológicos Ltda, Santa Cecília, SP, Brazil), em jarras de anaerobiose, a 37°C, por 14 dias. A renovação do meio DMM será mantida diariamente, e previamente a cada troca as placas serão levemente agitadas, o sobrenadante removido e os valores de pH aferidos.

### 4.2.8.2 Formação de biofilme a partir da placa dental

Os inóculos de placa dental serão coletados das superfícies hígidas, como também de superfícies com lesão de cárie (mancha branca ativa) em esmalte com o auxílio de uma cureta de dentina estéril. Cada amostra será imediatamente depositada em um frasco contendo 1ml de meio de transporte reduzido (RTF).

Parte da amostra de saliva previamente reservada para este fim (12mL) será clarificada por centrifugação, diluída duplamente em um tampão capaz de simular a composição iônica da saliva (GIBBONS; ETHERDEN, 1985), e então esterilizada através de um filtro de 0-2µm. A amostra correspondente de placa será dispersa por sonicação. Os discos de esmalte bovino serão previamente revestidos com a saliva esterilizada, com a finalidade de formar uma película. Será dispensado 30µl da suspensão de placa correspondente sobre cada disco (RUDNEY *et al.*, 2012).

Decorrido o tempo de 1 hora os poços serão cuidadosamente aspirados e a cada poço serão adicionadas 1,8ml de meio de cultura DMM. Diariamente os biofilmes serão submetidos ao desafio cariogênico (DMM+sacarose), durante um período de 6 horas.

As placas serão incubadas em uma atmosfera de anaerobiose (5-10% CO<sub>2</sub>, < 1% O<sub>2</sub>) durante 14 dias, em uma temperatura de 37°C, onde ficarão em repouso na incubadora. Diariamente, o meio de cultura (DMM) será renovado e os valores de pH aferidos.

#### **4.2.9 Perfil microbiano e crescimento dos biofilmes**

Para a avaliação do crescimento dos biofilmes, os discos de esmalte serão removidos com pinças estéreis, de forma individual para tubos com 1mL de meio de transporte reduzido. As células não aderidas serão removidas cuidadosamente através de lavagem em solução salina estéril (2mL) (THURNHEER *et al.*, 2003). Com a finalidade de se obter uma suspensão homogênea, os tubos serão sonicados (Sonicador Vibra Cell - Sonics and Materials, Danbury, CT, USA), na potência de 40W, amplitude de 5%, utilizando 6 pulsos de 9,9s cada (BOWEN; PRUCHNO; BELLONE, 1986).

As suspensões serão diluídas em RTF até 1:10<sup>7</sup> e em seguida inoculadas em duplicata nos respectivos meios de cultura: Ágar sangue, para quantificação de microrganismos totais; Ágar mitis salivarius com 0,2 unidades de bacitracina/mL (MSB), para contagem de estreptococos do grupo mutans; BHI com pH ajustado a 4,7 para quantificação de microorganismos totais acidúricos e Ágar seletivo para bifidobacterium.

Após, as placas preparadas serão incubadas em atmosfera de anaerobiose

(5-10% CO<sub>2</sub>, < 1% O<sub>2</sub>), a 37°C durante 96 horas. Como forma de análise as unidades formadoras de colônia (UFC) serão contabilizadas e expressas em UFC/mg de espécime de biofilme (peso seco) e em porcentagem dos respectivos grupos isolados (estreptococos do grupo mutans, microrganismos acidúricos, e bifidobacterium) em relação aos microrganismos totais acidúricos.

A cada triplicata, dois espécimes serão destinados à técnica microbiológica convencional e o terceiro espécime será congelado para futuras análises moleculares.

#### **4.2.10 Análise da microdureza do esmalte**

Previamente à inoculação dos espécimes será realizada análise da microdureza de superfície inicial, obtendo-se média e valores referenciais iniciais na busca de uma padronização das amostras de esmalte. A microdureza de superfície será novamente aferida a cada fase de crescimento dos biofilmes, estabelecendo-se uma média para cada espécime. As análises serão estruturadas segundo Cury et al. (2000) e a perda de dureza de superfície (%PDS) será calculada em percentual. A microdureza de secção transversal (MST) também será calculada através da secção longitudinal no centro dos discos (CURY; REBELLO; DEL BEL CURY, 1997). As indentações serão realizadas em 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180 e 200 µm da superfície externa do esmalte. Para o cálculo da área integrada de desmineralização ( $\Delta S$ ) serão usados os valores de MST (SOUZA et al., 2009). As análises serão realizadas com a utilização de um microdorômetro (Future-Tech FM) acoplado a um endentador Knoop. As indentações serão feitas com cargas de 50 gramas para avaliação da perda de dureza de superfície (%PDS) e de 25 gramas para análise da microdureza de secção transversal (MST), ambas durante 5 s.

#### **4.2.11 Análise estatística**

Os dados obtidos serão submetidos à análise prévia para escolha do método estatístico adequado, considerando-se para todos os testes o valor  $p<0,05$  como estatisticamente significante. Com a finalidade de reduzir a variabilidade do experimento, os indivíduos da amostra serão considerados como blocos estatísticos.

## 5 ORÇAMENTO

<b>MATERIAIS DE CONSUMO ODONTOLÓGICO</b>	<b>QUANTIDADE</b>	<b>VALOR UNITÁRIO (R\$)</b>	<b>VALOR TOTAL (R\$)</b>
Luvas de Procedimentos (Supermax)	3 caixas	16,90	50,70
Máscaras descartáveis (Fava)	150 uni	0,20	30,00
Gorro franzido	1 saco de 100 unidades	0,07	7,00
<b>VALOR TOTAL</b>			<b>87,70</b>
<b>MATERIAIS DE USO LABORATORIAL</b>	<b>QUANTIDADE</b>	<b>VALOR UNITÁRIO (R\$)</b>	<b>VALOR TOTAL (R\$)</b>
Placa p/ cultura de tecidos fundo chato c/ tampa estéril 24 poços, TPP	500 unidades	7,87	3.935,00
Anaerobac c/ 10, Probac	22 caixas	101,40	2.230,80
Placa de petri descartável 90X15mm c/ 10,J, Prolab	135 pacotes	2,98	402,30
Ponteira cor amarela 20 a 200µl pct. c/ 1000, Axygen T200Y	3 pacotes	54,80	164,40
Ponteira cor azul 100 a 1000µl pct. c/ 1000, Axygen T1000-B	1 pacote	59,00	59,00
Filtro Millex GV 0,22µm 25mm c/ 25, Millipore JBR610021	2 unidades	264,60	529,20
Tubo microcentrífuga (eppendorf) 1,5mL c/ 1000	3 pacotes	27,30	81,90
Agar Mitis Salivarius c/ 500g, Acumedia	1 unidade	360,30	360,30
Agar cérebro e coração (BHI) c/ 500g, Acumedia	1 unidade	288,70	288,70
Placas Agar sangue	45 pacotes	24,35	1.095,75
Reagentes para confecção de DMM – saliva artificial	-	4.010,00	4.010,00
Tubos tipo Falcon 15 mL c/50	1 unidade	12,70	12,70
Tubos tipo Falcon 50 mL c/50	1 unidade	17,30	17,30
Agar BMS (Bifidus Agar Seletivo) Fr. c/ 500g.	1 unidade	733,30	733,70
<b>VALOR TOTAL</b>			<b>13.921,05</b>

## 6 CRONOGRAMA

ATIVIDADES	PERÍODO																								
	2013												2014												
	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez			
Pesquisa bibliográfica	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X			
Qualificação do projeto e Correções						X	X	X																	
Submissão ao CEP											X														
Piloto													X	X											
Identificação e Seleção de Estudos (RV)									X	X	X														
Execução Etapas Laboratoriais												X	X	X	X	X	X	X							
Coleta de Dados (RV)										X	X	X	X												
Tabulação dos dados															X	X									
Análise estatística																	X	X							
Interpretação dos dados																		X							
Redação dos artigos																			X	X	X				
Defesa da dissertação																								X	
Envio para publicação																									X

Revisão Sistemática (RV).

## REFERÊNCIAS

AAS, J. A.; GRIFFEN, A. L.; DARDIS, S. R.; LEE, A. M.; OLSEN, I.; DEWHIRST, F. E.; LEYS, E. J.; PASTER, B. J. Bacteria of dental caries in primary and permanent teeth in children and young adults. **Journal of Clinical Microbiology**, v.46, n.4, p.1407-17, 2008.

AAS, J. A.; PASTER, B. J.; STOKES, L. N.; OLSEN, I.; DEWHIRST, F. E. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, n.11, p.5721-5732, 2005.

AZEVEDO, M. S.; VAN DE SANDE, F. H.; ROMANO, A. R.; CENCI, M. S. Microcosm biofilms originating from children with different caries experience have similar cariogenicity under successive sucrose challenges. **Caries Research**, v.45, n.6, p.510-7, 2011.

BIGHTON, D. The complex oral microflora of high-risk individuals and groups and its role in the caries process. **Community Dentistry Oral Epidemiology**, v.33, n.4, p.248-255, 2005.

BOWEN, M. B.; PRUCHNO, C.; BELLONE, C. J. Characterization of a concanavalin A supernatant-derived idiotype-specific T helper cell factor. **Journal of Immunology**, v.136, n.4, p.1295-1302, 1986.

CENCI, M. S.; PEREIRA-CENCI, T.; CURY, J. A.; TEN CATE, J. M. Relationship between gap size and dentine secondary caries formation assessed in a microcosm biofilm model. **Caries Research**, v.43, n.2, p.97-102, 2009.

CURY, J. A.; REBELLO, M. A.; DEL BEL CURY, A. A. In situ relationship between sucrose exposure and the composition of dental plaque. **Caries Research**, v.31, n.5, p.356-360. 1997.

CURY, J. A.; REBELO, M. A. B.; DEL BEL CURY, A. A.; DERBYSHIRE, M. T. V. C.; TABCHOURY, C. P. M. Biochemical Composition and Cariogenicity of Dental Plaque Formed in the Presence of Sucrose or Glucose and Fructose. **Caries Research**, v.34, n.6, p.491-7. 2000.

DUPONT, W. D.; PLUMMER, W. D. Power and Sample Size Calculations: A Review and Computer Program. **Controlled Clinical Trials**, v.11, p.116-28.1990.

FILOCHE, S. K.; SOMA, D.; VAN BEKKUM, M.; SISSONS, C. H. Plaques from different individuals yield different microbiota responses to oral-antiseptic treatment. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, 2008.

FILOCHE, S. K.; SOMA, K. J.; SISSONS, C. H. Caries-related plaque microcosm biofilms developed in microplates. **Oral Microbiology Immunology**, v.22, n.2, p.73-79, 2007.

FILOCHE, S.; WONG, L.; SISSONS, C. H. Oral Biofilms: Emerging Concepts in Microbial Ecology. **Journal of Dental Research**, v.89, n.1, p.8-18, 2010.

GIBBONS, R. J.; ETHERDEN, I. Albumin as a Blocking Agent in Studies of Streptococcal Adsorption to Experimental Salivary Pellicles. **Infection and immunity**, v.50, n.2, p.592-594, 1995.

LEDDER, R. G.; GILBERT, P.; PLUEN, A.; SREENIVASAN, P. K.; DE VIZIO, W.; MCBAIN, A. J. Individual microflora beget unique oral microcosms. **Journal of Applied Microbiology**, v.100, n.5, p.1123-31, 2006.

MAGER, D. L.; XIMENEZ-FYVIE, L. A.; HAFFAJEE, A. D.; SOCRANSKY, S. S. Distribution of selected bacterial species on intraoral surfaces. **Journal of Clinical Periodontology**, v.30, n.7, p.644-54, 2003.

NYVAD, B.; CRIELAARD, W.; MIRA, A.; TAKAHASHI, N.; BEIGHTON, D. Dental caries from a molecular microbiological perspective. **Caries Research**, v.47, n.2, p.89-102, 2013.

PEARCE, E. I.; SISSONS, C. H.; COLEMAN, M.; WANG, X.; ANDERSON, S. A.; WONG, L. The effect of sucrose application frequency and basal nutrient conditions on the calcium and phosphate content of experimental dental plaque. **Caries Research**, v.36, n.2, p.87-92, 2002.

PRISMA *Flow Diagram*. Disponível em:  
<<http://www.prisma-statement.org/statement.htm>> Acesso em: 13 ago. 2013.

RUDNEY, J. D.; CHEN, P.; LENTON, J.; LI, J.; LI, Y.; JONES, R. S.; REILLY, C.; FOK, A. S.; APARICIO, C. A reproducible oral microcosm biofilm model for testing dental materials. **Journal of Applied Microbiology**, v.113, n.6, p.1540-1553, 2012.

SELWITZ, R. H.; ISMAIL A. I.; PITTS N. B. Dental caries. **Lancet**, v.369,n.9555, p.51-59, 2007.

SISSONS, C. H. Artificial dental plaque biofilm model systems. **Advances in Dental Research**, v.11, n.1, p.110-126, 1997.

SOUZA, R. P.; ZANIN, I. C.; LIMA, J. P.; VASCONCELOS, S. M.; MELO, M. A.; BELTRAO, H. C.; RODRIGUES, L. K. In situ effects of restorative materials on dental biofilm and enamel demineralisation. **Journal of Dentistry**, v.37, n.1, p.44-51, 2009.

TAKAHASHI, N.; NYVAD, B. Caries Ecology Revisited: Microbial Dynamics and the Caries Process. **Caries Research**, v.42, n.6, p.409-418, 2008.

TANG, G.; YIP, H. K.; CUTRESS, T. W.; SAMARANAYAKE, L. P. Artificial mouth model systems and their contribution to caries research: a review. **Journal of Dentistry**, v.31, n.3, p.161-171, 2003.

THURNHEER, T.; GMUR, R.; SHAPIRO, S.; GUGGENHEIM, B. Mass transport of macromolecules within an in vitro model of supragingival plaque. **Applied and Environment Microbiology**, v.69, n.3, p.1702-1709, 2003.

VAN DE SANDE, F. H.; AZEVEDO, M. S.; LUND, R. G.; HUYSMANS, M. C.; CENCI, M. S. An in vitro biofilm model for enamel demineralization and antimicrobial dose-response studies. **Biofouling**, v.27, n.9, p.1057-63, 2011.

WONG, L.; SISSONS, C. A comparison of human dental plaque microcosm biofilms grown in an undefined medium and a chemically defined artificial saliva. **Archives of Oral Biology**, v.46, n.6, p.477-486, 2001.

### **3 RELATÓRIO DE CAMPO**

#### **3.1 Aspectos éticos**

O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Pelotas (UFPel) sob o parecer nº556.676/2014 (Anexo A).

#### **3.2 Modificações Gerais**

##### **3.2.1 Parte 1 – Revisão Sistemática**

A revisão sistemática foi retirada do presente trabalho, dando-se prioridade ao experimento laboratorial. Essa decisão foi tomada devido ao limitado número de estudos para fundamentar a mesma. Diversas tentativas de estratégias de busca foram realizadas, e a final, que acabou sendo descartada devido à justificativa acima, é apresentada no quadro abaixo, correspondendo a um total de 322 estudos, dos quais apenas 3 (FILOCHE;SOMA;SISSONS, 2007; AZEVEDO et al.,2011; RUDNEY et al., 2012) atendiam aos critérios de inclusão, com a investigação e/ou discussão da influência do tipo de inóculo (saliva ou placa), no potencial cariogênico e/ou perfil microbiano, em modelos de biofilmes de microcosmos. A busca atendeu à restrição de data do ano de 1990 a 2014.

```
((((((("Dental Plaque"[Mesh] OR "Plaque, Dental")))) OR ((("Biofilms"[Mesh] OR "Biofilm")))) AND "Microcosm") AND ((("Tooth Demineralization"[Mesh] OR "Tooth Hypomineralization" OR "Hypomineralization, Tooth" OR "Hypomineralizations, Tooth" OR "Tooth Hypomineralizations" OR "Demineralization, Tooth")))) OR ((("Saliva"[Mesh] OR "Saliva"))))) AND ("Sucrose"[Mesh] OR "Saccharose")
```

Quadro 1 - Estratégia de Busca MEDLINE.

##### **3.2.2 Parte 2 – Experimento Laboratorial**

Os fatores em estudo eram originalmente: o tipo de inóculo em três níveis (placa dentária de superfície com cárie, placa dentária de superfície hígida, saliva) e o tempo de formação dos biofilmes em cinco níveis (24h, 72h, 120h, 168h e 14 dias). No entanto, devido ao tamanho do experimento [(20 indivíduos (grupo com

cárie/controle) x 2 inóculos (placa e saliva) x 5 tempos x 3 (triplicata)]; e ainda, considerando as limitações de estrutura do laboratório de microbiologia e de tempo para realização do experimento, o delineamento foi alterado. Determinou-se a exclusão do nível dos 5 tempos de análise (24h, 72h, 120h, 168h e 14 dias), uma vez que, para avaliar o potencial cariogênico dos biofilmes bastaria a avaliação em um único tempo.

Dessa forma, as variáveis de interesse foram o tipo de inóculo em 2 níveis (saliva e placa dental) e a fonte do inóculo em 2 níveis (indivíduos livres de cárie e cárie-ativos). Dez voluntários foram selecionados de cada condição de cárie para a coleta de placa dental e saliva. O experimento ocorreu em triplicata. As médias foram obtidas e usadas na análise estatística. As variáveis de desfecho investigadas foram a perda mineral (porcentagem de mudança de dureza de superfície) e composição microbiológica do biofilme (contagem de UFCs). A dureza interna não foi aferida, mas os espécimes foram armazenados para futuras análises, se necessário.

Originalmente, de cada triplicata, os biofilmes advindos de dois espécimes seriam destinados à técnica microbiológica convencional e o do terceiro espécime seria congelado para futuras análises moleculares. No entanto, considerando-se a metodologia empregada para avaliação dos microrganismos (elevado desvio-padrão em microbiologia), optou-se por destinar os 3 espécimes (triplicata) à análise microbiológica. Assim, as amostras para análises futuras foram obtidas conservando-se uma alíquota de cada amostra (suspensão em RTF de cada biofilme coletado, 1:1), que foi centrifugada, o sobrenadante dispensado e o pellet preservado. Os pellets foram armazenados em solução estabilizadora (200 µL - RNAlater, Ambion®, EUA) a -20ºC.

Os meios de cultura para leitura dos microrganismos indicados no projeto de pesquisa eram a princípio: ágar sangue, para quantificação de microrganismos totais; ágar mitis salivarius com 0,2 unidades de bacitracina/mL (MSB), para contagem de estreptococos do grupo mutans; BHI com pH ajustado a 4,8 para quantificação de microrganismos totais acidúricos e ágar seletivo para bifidobacterium. O ágar seletivo para bifidobacterium (BEIGHTON et al.,2008) foi substituído pelo ágar rogosa (lactobacilos), devido a dificuldade de manejo do protocolo, necessidade de confirmação das colônias por métodos moleculares e alto valor dos reagentes.

O experimento foi realizado em 4 rodadas por motivo de logística (espaço físico e disponibilidade de equipamentos), no Laboratório de Microbiologia, pois outros experimentos foram realizados simultaneamente ao presente estudo.

### **3.3 Piloto 1**

O Piloto 1 teve como objetivo definir a substância utilizada para formação da película adquirida nos casos em que a placa dental correspondesse ao inóculo de origem dos biofilmes. Três formatos de película foram eleitos como possíveis alternativas: saliva artificial (Natura Farmácia, Pelotas), DMM (Meio definido enriquecido com mucina) e saliva natural processada (Rudney et al.,2012). O experimento foi realizado em quadruplicada, e avaliado em 2 diferentes tempos (24h e 120h).

Primeiramente, a saliva natural foi processada através da clarificação por centrifugação (10.000 x g por 10min), diluição dupla em solução tampão, simulando a composição iônica da saliva, e esterilizada em filtro de 0-2 µm. Após, alíquotas (50µL) de cada uma das três substâncias foram adicionadas a uma placa de 24 poços (24-well tissue culture plate; TPP - Techno Plastic Products, Trasadingen, SU), de acordo com os poços correspondentes a cada substância. Em seguida, prosseguiu-se a inoculação (30 µL) de suspensão de placa para cada um dos poços.

Após 1 hora à 37°C, adicionou-se DMM enriquecido com 1% de sacarose. As placas foram incubadas em atmosfera de anaerobiose (5-10% CO<sub>2</sub>, < 1% O<sub>2</sub>). Os biofilmes cresceram nas superfícies das placas de 24 poços, perante exposição à sacarose de 6 horas diárias, durante 5 dias. O perfil microbiológico, referente a lactobacilos e estreptococos mutans, foi avaliado em 2 tempos (24h e 120h). Os biofilmes foram coletados, e adicionados a tubos de eppendorfs contendo salina, sonicados (Sonicador Vibra Cell - Sonics and Materials, Danbury, CT, USA), e as suspensões diluídas em salina (1:10<sup>7</sup>). Em seguida, inoculadas em duplicata nos meios de cultura ágar rogosa (lactobacilos) e ágar mitis salivarius com 0,2 unidades de bacitracina/mL (MSB), para contagem de estreptococos mutans.

Em seguida, os meios foram incubados em jarras de anaerobiose, a 37°C durante 96 horas. Como forma de análise as unidades formadoras de colônia (UFC) foram contabilizadas e expressas em UFC/mg de espécime de biofilme (peso seco).

As diferentes substâncias apresentaram desempenho similar (Figura 1). No entanto, apesar de a saliva artificial ter demonstrado capacidade de formação de

película adquirida, assim como o DMM, acabou-se por descartá-las como possibilidade devido à variada composição química dessas substâncias, evitando futuros vieses ao estudo. Dessa forma, assim como no estudo de Rudney et al. (2012), a saliva natural foi escolhida como alternativa mais aceitável, com o intuito de evitar possíveis interferências externas.

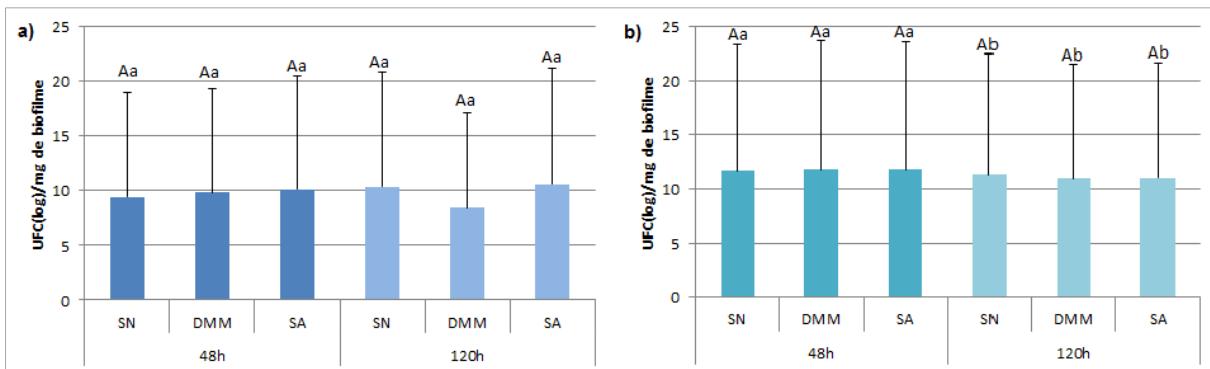


Figura 1 - Gráficos das contagens microbianas para diferentes possibilidades de substâncias formadoras da película adquirida. (a) lactobacilos, (b) estreptococos mutans, (SN) saliva natural, (DMM) meio definido com mucina e saliva artificial (SA). Letras maiúsculas referem-se aos tipos de substâncias e letras minúsculas aos diferentes tempos. Análise estatística: Anova de dois fatores, e teste de Tukey.

No entanto, para o experimento, o protocolo de processamento da saliva foi simplificado (KOO et al., 2005), baseando-se apenas na clarificação em centrífuga refrigerada da mesma (10,000g por 5 minutos, a 4°C).

### 3.4 Piloto 2

O objetivo do piloto 2 foi definir e padronizar a quantidade amostral para o inóculo de placa dental. Para isso foram coletadas saliva e placa dental (sítios dentais hígidos), de um indivíduo saudável de 24 anos, que se absteve da realização de higiene oral por 24 horas. A placa dental foi depositada em dois eppendorfs e o peso aferido em balança de precisão (AUW220D; Shimadzu, Japão), até a obtenção das quantidades amostrais, 2mg e 5mg, respectivamente. Após, prosseguiu-se a adição de RTF (meio de transporte reduzido), com finalidade de obter as proporções 2mg/mL e 5mg/mL. Foram realizadas diluição ( $10^1$ - $10^7$ ) e plaqueamento da amostra de saliva, e das suspensões de placa. Os meios de cultura utilizados foram: ágar sangue, para quantificação de microrganismos totais; ágar mitis salivarius, para estreptococos totais e ágar mitis salivarius com 0,2 unidades de bacitracina/mL.

(MSB), para contagem de estreptococos mutans. Como resultado, de caráter descritivo, visualizou-se crescimento microbiano semelhante da suspensão de placa de 2mg/mL, quando comparado a de 5mg/mL (Figura 2); o que sustentou a escolha da concentração de inóculo (suspensão de placa) de 2mg/mL para o experimento.

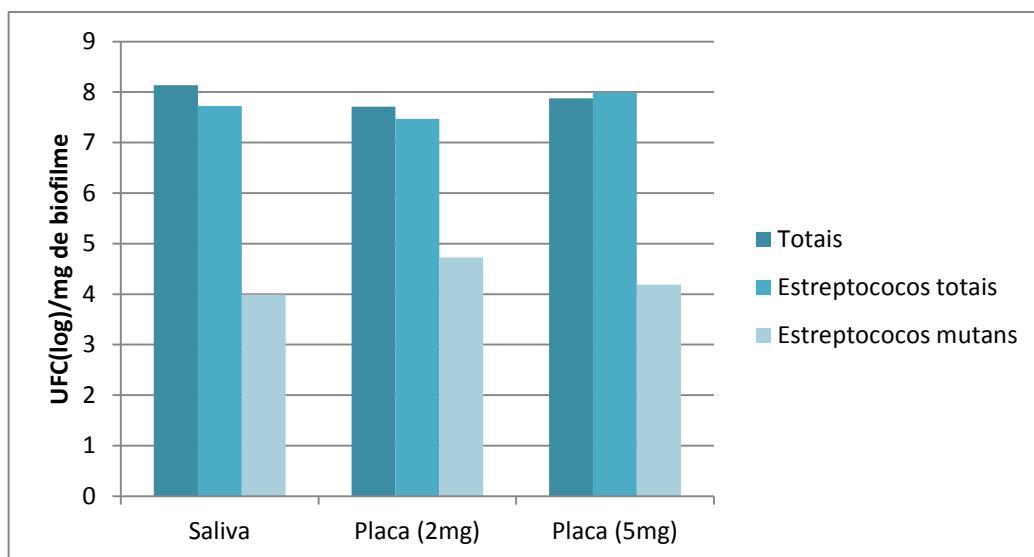


Figura 2 - Gráfico da contagem de microrganismos para diferentes inóculos (saliva e placa dental), advindos de um único doador.

Nota. Contagens da saliva são expressas em UFC (log10)/mL.

### 3.5 Seleção dos doadores

Para a seleção da amostra final, foram realizadas triagens em 3 escolas do município de Pelotas (Brasil): Escola Municipal de Ensino Fundamental Núcleo Habitacional Dunas, Escola Municipal de Ensino Fundamental Ferreira Viana, e Escola Estadual de Ensino Fundamental Rachel Mello. As turmas triadas compreendiam alunos com idade entre 12 e 15 anos. O exame clínico foi realizado mediante autorização dos pais (Apêndice B), por dois pesquisadores treinados, com auxílio de espelho, sonda e iluminação natural. As fichas de triagem de risco (Apêndice C) eram preenchidas conforme o exame, e escolares que apresentassem pelo menos 3 lesões de mancha branca ativa de cárie, na face vestibular de incisivos, caninos e/ou pré-molares; e escolares livres de cárie, eram adicionados à lista de possíveis pacientes a participarem do estudo. Pacientes com dentição mista foram excluídos da amostra. Após o exame, os escolares receberam uma escova de dentes, como forma de agradecimento pela participação.

Ao final das triagens, com o objetivo de homogeneizar a amostra, 20 alunos (amostra necessária ao estudo), 10 cárie-ativos e 10 livres de cárie, acabaram por ser selecionadas do mesmo local: Escola Estadual de Ensino Fundamental Rachel Mello. O local selecionado faz parte do projeto de extensão PLADECOM (Planejando, Avaliando e Desenvolvendo Ações em uma Comunidade), sob coordenação da Professora Doutora Tânia Izabel Bighetti, o qual desenvolve atividades como triagens de risco de cárie e ações educativas de prevenção. Isso permitiu a melhor receptividade por parte da escola ao projeto de pesquisa.

Os Termos de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice A) foram entregues aos pais, aproximadamente uma semana antes dos procedimentos de coleta. Ligações telefônicas também foram realizadas com o intuito de esclarecer possíveis dúvidas e confirmar a participação dos filhos na pesquisa.

Todos os participantes da pesquisa (doadores) foram encaminhados para atendimento no Projeto Pró-Sorriso, sob coordenação da Professora Doutora Elenara Ferreira de Oliveira. A possibilidade de atendimento foi estendida aos pais.

### **3.6 Experimento**

O experimento foi realizado conforme descrito no projeto de pesquisa, com as modificações acima citadas. Como mencionado, o experimento foi fragmentado em 4 rodadas, compreendendo a coleta de amostras de 5 indivíduos por rodada, crescimento dos biofilmes por 10 dias, e coleta dos mesmos para análise microbiológica e de perda de dureza dos espécimes.

### **3.7 Coleta das amostras (inóculos)**

A coleta das amostras ocorreu na escola estadual, no Laboratório de Ciências da mesma. Duas pesquisadoras foram responsáveis pela coleta. Os escolares foram orientados a não realizar nenhum tipo de higiene bucal por um período de 24 horas anterior a coleta, e não ingerir alimentos 2 horas antes da mesma. Os alunos foram dispostos em cadeiras enfileiradas, e primeiramente foi realizada a coleta de saliva (8mL) estimulada por filme de parafina (Parafilm "M"®, American National CanTM, Chicago, IL, EUA) em tubos falcon estéreis identificados. Após, prosseguiu-se a coleta da placa dental através de colheres de dentina estéreis (aproximadamente 3 colheres de dentina cheias) das superfícies vestibulares de dentes previamente determinados, e armazenamento em eppendorfs numerados de

acordo com o respectivo doador. Dos mesmos sítios, procedeu-se a coleta de amostra, para futuras análises moleculares, através da fricção com microbrush esterilizado, armazenamento em eppendorfs, e posterior adição de solução estabilizadora (80µL - RNA/ater, Ambion®, EUA) e congelamento. Em seguida à coleta, as amostras eram imediatamente dispostas no gelo até o transporte ao Laboratório de Microbiologia da FO-UFPel.

Após a coleta, cada aluno recebeu um kit café da manhã, contendo um suco de laranja e um pequeno bolo, e ainda, escova de dentes e creme dental para realização da higiene bucal.

### 3.8 Crescimento dos Biofilmes

As amostras de saliva foram divididas em duas partes (Figura 3). Para ser usado como inóculo 2mL de saliva foram diluídos em RTF (meio de transporte reduzido), na proporção de 2(mL/saliva):1(mL/RTF). A outra parte (6mL) foi clarificada por centrifugação (10.000g, por 5 minutos, a 4°C) para uso na formação da película adquirida, onde a placa dental seria utilizada como inóculo. A amostra correspondente de placa também foi diluída em RTF da mesma maneira que a saliva (Figura 4), na proporção 2(mg/placa):1(mL/RTF). Após, a placa foi suspensa por agitação em vórtex, e dispersa por sonicação.

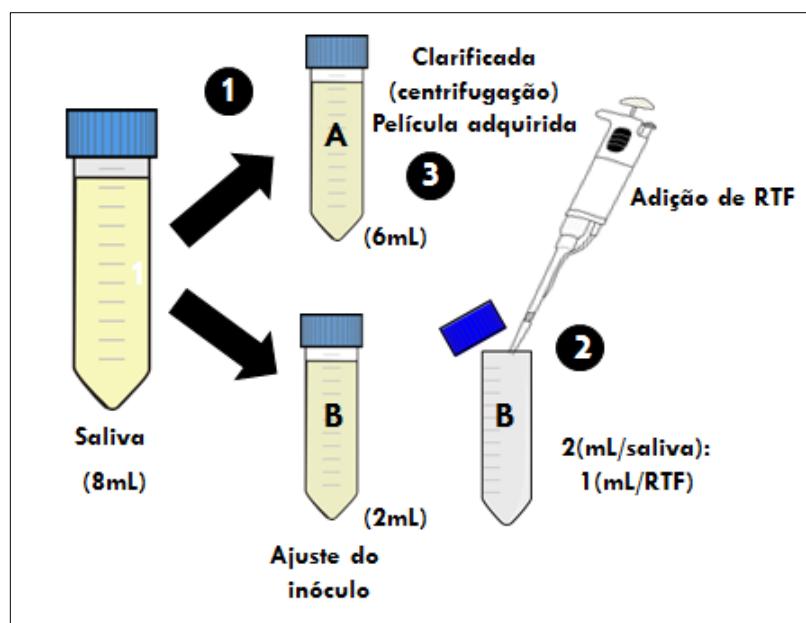


Figura 3 - Desenho esquemático do preparo da amostra de saliva. (1) Fragmentação da amostra, (2) Ajuste do inóculo, (3) Amostra destinada a clarificação por centrifugação para formação da película adquirida.

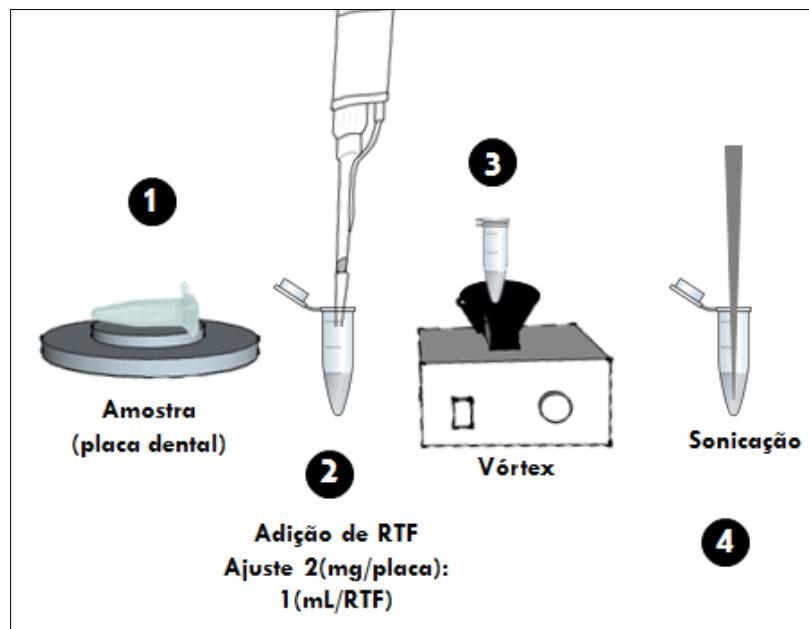


Figura 4 - Desenho esquemático do preparo da amostra de placa dental. (1) Pesagem em balança de precisão, (2) Ajuste do inóculo, (3) Agitação em vórtex, (4) Sonicação.

Como demonstrado na Figura 5, primeiramente, realizou-se a deposição de saliva clarificada sobre os espécimes, com permanência por 20 minutos em estufa a 37°C, para formação da película adquirida. Após, aspiração cuidadosa da mesma e inoculação com suspensão de placa (260µL) dos respectivos pares (placa-saliva clarificada) do mesmo indivíduo, sobre os discos de esmalte destinados a inoculação com placa.

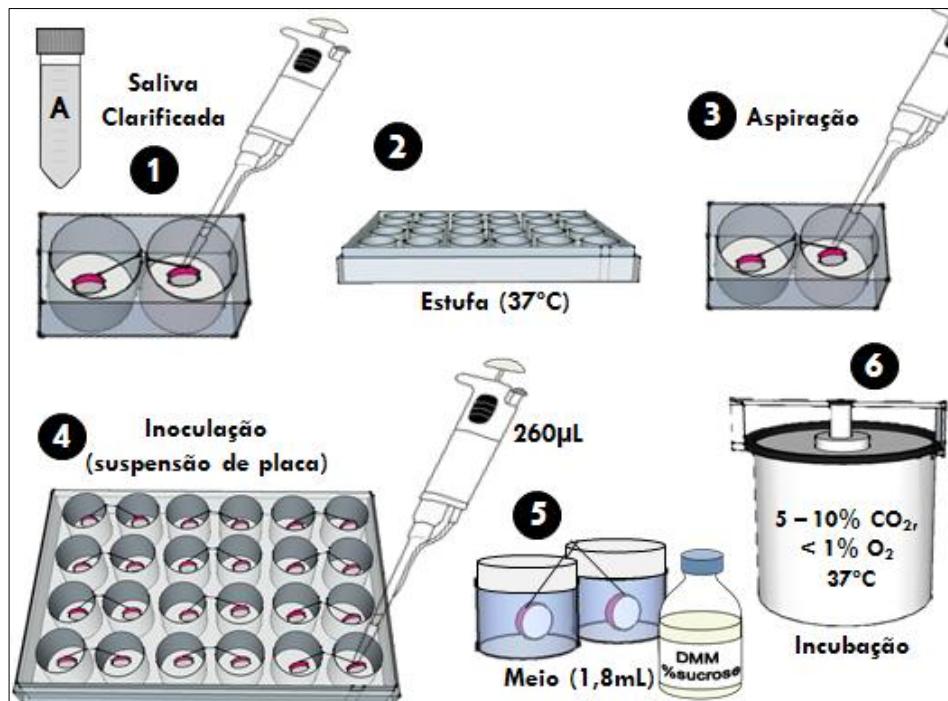


Figura 5 - Ilustração do passo-a-passo da inoculação a partir da placa dental. (1) Adição de saliva clarificada, (2) Permanência em estufa por 20 minutos, (3) Aspiração da saliva, (4) Inoculação da suspensão de placa, (5) Após 1 hora em estufa, adição de meio definido com mucina enriquecido com sacarose a 1%, (6) Incubação em atmosfera de anaerobiose.

Aos discos de esmalte, cuja inoculação seria a partir do fluido salivar (Figura 6), nenhum tratamento prévio para formação da película adquirida foi feito. Uma alíquota ( $260\mu\text{L}$ ) da saliva ajustada 2(mL/saliva):1(mL/RTF) correspondente a cada doador foram dispensados sobre os discos de esmalte. Após 1 hora, em estufa, um meio definido com mucina (DMM) enriquecido com 1% de sacarose foi adicionado aos poços.

Desafios de 6h diárias de exposição à sacarose foram promovidos, com renovação periódica e alternância dos meios (sem e com sacarose), como ilustrado na Figura 7. Para controle do experimento, o pH do sobrenadante dos poços foi aferido ao final de cada troca de meio. As placas foram incubadas em jarras de anaerobiose, a  $37^\circ\text{C}$ , por 10 dias (Apêndice D).

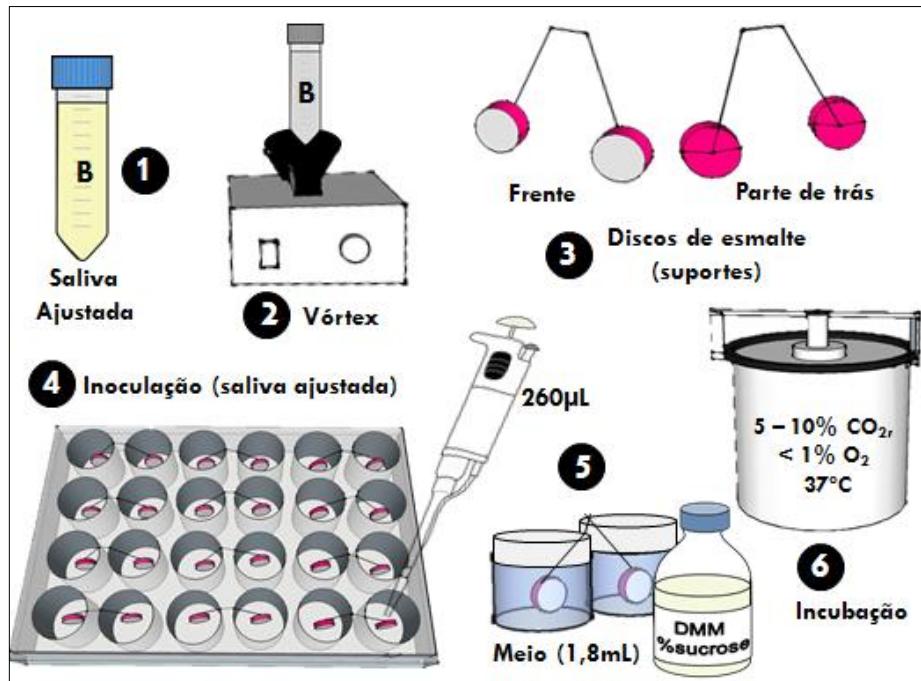


Figura 6 - Ilustração do passo-a-passo da inoculação a partir da saliva ajustada. (1) Saliva ajustada, (2) Agitação em vórtex, (3) Espécimes de esmalte (vista frontal e da parte de trás), (4) Inoculação da saliva ajustada, (5) Após 1 hora em estufa, adição de meio definido com mucina enriquecido com sacarose a 1%, (6) Incubação em atmosfera de anaerobiose.

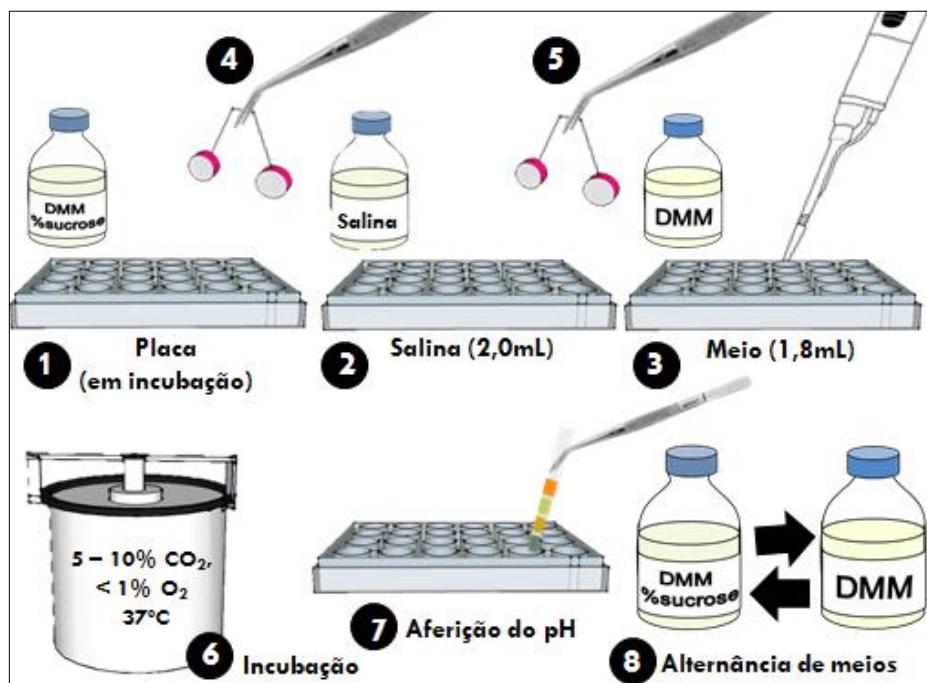


Figura 7 - Ilustração das trocas dos meios. (1) Placa com espécimes, (2) Placa preenchida com salina, (3) Placa preenchida com novo meio, (4) Lavagem em solução salina, (5) Após lavagem, espécimes eram depositados em placa contendo meio novo, (6) Incubação das placas em atmosfera de anaerobiose, (7) Aferição do pH do sobrenadante, (8) A cada troca - alternância de meios (DMM+sacarose – 6h / DMM – 18h).

Para o controle do baseline, uma alíquota dos inóculos originais, saliva ajustada e suspensão de placa, foi diluída ( $10^1$ - $10^7$ ) em solução salina, e plaqueada nos meio de cultura ágar sangue, ágar mitis salivarius com bacitracina e BHI com pH ajustado a 4,8. Em adição a isso, uma alíquota da amostra de saliva original de cada indivíduo foi armazenada em RNA/*later*, em freezer a -20°C.

Após 10 dias, para a avaliação do crescimento dos biofilmes, os discos de esmalte foram removidos dos poços com pinças estéreis, lavados em solução salina, e tiveram o biofilme coletado com instrumentos plásticos estéreis de toda superfície de esmalte de cada disco. Os biofilmes foram dispostos em eppendorfs pré-pesados. Biofilmes foram serialmente diluídos ( $10^1$  –  $10^7$ ) e inoculados em duplicata nos meios de cultura: BHI (Brain Heart Infusion) pH 4,8; ágar mitis salivarius associado a 0,2 unidades de bacitracina/mL, ágar rogosa e ágar sangue. Depois as placas foram incubadas em atmosfera de anaerobiose por 96 horas. O número de unidades formadoras de colônia foi determinado por um pesquisador treinado, e os resultados expressos em UFC/mg de biofilme (peso úmido) – Apêndice D.

### **3.9 Intercorrências**

Na primeira rodada o crescimento microbiano foi mínimo e quase inexistente após os 10 dias de crescimento, sendo a mesma descartada. A revisão dos procedimentos laboratoriais foi realizada, e atribuiu-se o crescimento inapropriado dos biofilmes aos suportes que sustentavam os espécimes em cada poço da placa. Os suportes foram fabricados com material de fio de alpaca, liga metálica contendo cobre, níquel e zinco, relatados como inibidores do crescimento microbiano. Os mesmos foram substituídos por novos suportes fabricados com fio de aço inoxidável 0,5 mm (MORELLI®, Sorocaba, SP, Brasil).

Dessa forma, o experimento ocorreu em 3 rodadas subsequentes, com aumento do número de indivíduos por rodada, até totalizar a coleta de 20 indivíduos.

## **4 Artigo**

### **Influence of the inoculum source on the cariogenicity of in vitro microcosm biofilms<sup>1</sup>**

C. Signori<sup>a</sup>; T.T. Maske<sup>a</sup>, M.S. Cenci<sup>a</sup>, E.F. Oliveira<sup>a</sup>, F.H. van de Sande\*<sup>a,b</sup>.

<sup>a</sup>Graduate Program in Dentistry, Federal University of Pelotas, Pelotas, Brazil

<sup>b</sup>School of Dentistry, IMED Faculdade Meridional, Passo Fundo, Brazil

Short title: **Inoculum source and biofilm cariogenicity**

Keywords: Dental Plaque. Saliva. Microcosm. Dental caries. Demineralization.

\*Corresponding author:

F.H. van de Sande

Address: Rua Senador Pinheiro, 304, 99070-220, Passo Fundo, RS, Brazil. Phone/FAX: +55 54 30456100

E-mail: fvandesande@gmail.com

Conflict of Interests:

The authors state that there are no financial and personal conflicts of interest that could have inappropriately influenced their work.

---

<sup>1</sup> Artigo formatado segundo as normas do periódico Caries Research.

Nota: Figuras e Tabela estão didaticamente contidas ao longo do texto com finalidade de facilitar a leitura.

## Abstract

This study investigated the cariogenic potential of biofilms originating from different types of inoculum (saliva and dental plaque) from individuals with active caries and caries-free, in a microcosm biofilm model. Ten volunteers were selected from each caries condition for paired collecting of saliva and dental plaque. Biofilm microcosms were originated from the inoculum on enamel specimens in 24-well plates. Biofilms grown in defined medium enriched with mucin (DMM), under cariogenic challenge (DMM with 1% sucrose) 6h/day. After 10 days, the biofilms were collected for analysis of outcome variables: mineral loss (percentage of surface hardness change - % SHC) and microbiological composition of biofilms. Statistical analysis was performed using t-test, Linear Multivariate Analysis Model and Pearson's correlation coefficient. Comparative analysis between microbiological baseline data for different types of inoculum was statistically significant only for *Streptococcus mutans* for individuals with active caries, and not significantly different for caries-free. For different caries conditions, data was statistically significant for *S. mutans* and acid-tolerant microorganisms in dental plaque samples, and acid-tolerant in saliva. After 10 days of growth of biofilms, the values for total microorganisms, lactobacilli, *S. mutans*, acid-tolerant; and also to the surface hardness change, were not statistically significant, considering the type of inoculum and caries condition. Positive correlation was found for % SHC and CFUs counts of acid-tolerant bacteria ( $r=0.406$ ) and lactobacilli ( $r=0.379$ ). Under the limits of this study, the cariogenic potential of biofilms, formed under identical conditions *in vitro*, is similar, regardless of baseline differences between the source and type of inoculum.

## Introduction

The main feature of microcosm biofilm models is the ecological complexity, compared to consortium or single-species biofilms [Filoche et al., 2007]. These models simulate the oral environment, providing a version of *in vitro* natural plaque, under highly controlled conditions [Tang et al., 2003]. The modulation of composition and prevalence of microbial biofilm species related to dental caries within a complex plaque-like community, can be manipulated by exposure to sucrose and growth conditions [Filoche et al., 2007; Sissons et al., 2007]. Natural resources of the oral cavity, such as saliva and pooled dental plaque samples, have been used as the inoculum in a range of experimental models [Filoche et al., 2008; Rudney et al., 2012; Sissons et al., 2007; van de Sande et al., 2011].

Different types of oral inocula, even if arising from the same individual, are not completely similar, and will lead to distinct biofilms compositions [Rudney et al., 2012]. However, exposure to sucrose promotes changes in microbial composition of biofilms due to increased levels of specific bacteria related to dental caries [Filoche et al., 2007; Lee et al., 2013], and induction of the biofilm cariogenicity, independent of the inoculum source (individuals with different caries experience) [Azevedo et al., 2014]. This causes a decrease in mineral protective capacity of the plaque, which is directly proportional to the frequency of sucrose exposure [Pearce et al., 2002], and will promote enamel demineralization in *in vitro* models [van de Sande et al., 2011].

A limited number of studies reports the influence of the type of inoculum [Rudney et al., 2012], or source in cariogenicity of biofilms developed under controlled conditions [Azevedo et al., 2014; Azevedo et al., 2011]. Saliva inocula, coming from different caries conditions, lead to similar biofilm cariogenicity, under sucrose exposure [Azevedo et al., 2011], but this response may have been affected by the nature of biofilm (type of inoculum) used, saliva instead of dental plaque from tooth surface, which would be more representative of the oral microbiota [Nyvad et al., 2013], since it is known that the cariogenicity of dental plaque *in vivo*, undergoes variations according to factors such as oral hygiene, saliva, diet, tooth, and even between sites from the same donor [Pretty et al., 2005].

The maintenance of these differences *in vitro*, and the cariogenic potential of microcosms biofilms derived from the dental plaque or saliva from individuals with different caries experience, under controlled conditions, remains unclear. Thus, the aim of this study was to evaluate the cariogenicity of biofilms originated from different inoculum types (saliva

and dental plaque) collected from caries-free and caries active individuals. The null hypothesis under investigation was that biofilms would have the same cariogenic potential, under standardized conditions, despite type and source of the inoculum.

## **2. Subjects and Methods**

### **Experimental Design**

This was an in vitro study, with a completely randomized blind 2 x 2 factorial design, using a previously published biofilm model for caries-related studies (van de Sande et al., 2011). The variables of interest were the inoculum type at two levels (dental plaque and saliva) and inoculum source at two levels (caries-free and caries active individuals). Ten volunteers were selected from each caries experience condition for the collection of dental plaque and saliva. The experiment was run in triplicate, *viz.* for each condition 3 independent experimental units (enamel/biofilm) were evaluated. The means were obtained and used in the analysis. Outcome variables assessed were mineral loss (percentage of surface hardness change) and microbiological composition of the biofilm (CFU counts). Ethical approval was granted by the Ethics Committee, School of Medicine, Federal University of Pelotas, protocol No. 556.676/2014 (Pelotas, RS, Brazil).

### **Sample size**

Sample size was estimated based on data collected from a previous published study [Azevedo et al., 2011]. Assuming no interactions between inoculum source and type, independent comparisons between biofilms originating from caries-free and caries-active surfaces (individuals) at a rate of 1:1 were set to be able to reject the null hypothesis that the means of the groups are equal with probability of 80%. The Type I error probability associated with this test of this null hypothesis was 5%. For %SHC the standard deviation was 10%. We worked under the concept that meaningful differences on %SHC between groups should be of at least 30%. Therefore 3 subjects should be included in each group. For microbial analysis we performed the test for acid-tolerant bacteria counts. The standard deviation was 30 CFU/mg x  $10^5$  and difference between groups was 40 CFU/mg x  $10^5$ . Ten subjects should be included in each group. Thus, twenty volunteers were included in the study, 10 from each condition. The calculation was performed with PS Power and Sample Size Program Version 3.0.43 software [Dupont and Plummer, 1998].

## **Sample Characterization**

20 students, aged between 12 and 15 years, were selected from an ongoing project for dental care and oral health activities, held by the School of Dentistry at a local public school (Rachel Mello Municipal School, Pelotas, Brazil). The school is located in an urban area with water supply, and comprises a population of low socioeconomic level students. Eligibility criteria for the caries-active group (10 students) included the presence of active non-cavitated caries lesions in at least 3 free dental surfaces, located in premolars, canines and/or incisors. Carious lesions were diagnosed as active when the enamel surface had rough and chalky aspects [Thylstrup et al., 1994]. Whereas the caries-free group (10 students) should present only sound tooth surfaces (all teeth), and no previous history of caries experience. Clinical examination was performed under standardized conditions, with the help of probe, mirror and natural lighting by 2 well trained examiners. For inclusion the students should present good general health, and had not undergone antibiotic treatment within the last 3 months. The study was explained to the student's parent / legal guardian, for whom a written informed consent was given. To participate in the study, a copy of the consent should have been signed by the parent. After performing the collection procedures all students were referred for the School of Dentistry (Federal University of Pelotas, Brazil) to receive dental treatment.

## **Preparation of tooth specimens**

One hundred and twenty enamel/dentin specimens (5 mm of diameter and 2.5 mm thickness) were prepared from bovine teeth, by the use of cylindrical diamond-coated drill (trephine type) at a speed of 400 rpm, under water cooling, perpendicular to the buccal surface of the tooth. Then surfaces were flattened with sanding discs (particle size 600/1200/1500/2000) and polished with felt discs and diamond paste. The base (dentin part) and sides of the specimen were sealed with nail varnish, leaving only the enamel surface exposed. The specimens were autoclaved, at 121 °C, for 15 minutes at 15 pounds of pressure, and stored in a sterile solution until use.

## **Inoculum**

Approximately 8 mL of stimulated saliva (Parafilm "M", American National Can <sup>TM</sup>, Chicago, Ill., USA) were collected from each of the 20 donors in the morning, 2 hours after the last meal, and 24 hours after the last oral hygiene. Then, supragingival dental plaque from

the buccal surface was collected with hand excavator from sites with active caries lesions and sites of sound surfaces, according to the caries experience level of the individuals. The samples were deposited into coded sterile plastic tubes, transported in ice to the microbiology laboratory and processed within 3 h of sampling.

Saliva samples were divided into two parts. For use as inoculum 2mL of the saliva were diluted in RTF (reduced transport fluid), in a proportion of 2(saliva/mL):1(RTF/mL). The other part (6 mL) was clarified by centrifugation (10,000g for 5 minutes at 4°C) for later use in the formation of acquired pellicle [Koo et al.,2005] – where dental plaque would be used as inoculum. In the protocol for dental plaque as inoculum the matching plaque sample to clarified saliva of the same donor, was also diluted in RTF in the same way as was the saliva, in a 2(plaque/mg):1(RTF/mL) proportion, by weight on a precision scale and adding RTF. The plaque was then suspended by vortex agitation and dispersed in the solution by sonication.

### **Microbiological profile at baseline**

An aliquot of saliva and plaque suspension from each donor were vortexed for 2 seconds, serially diluted ( $10^1$ - $10^7$ ) in sterile saline solution and plated in duplicate on blood agar (total anaerobic microorganisms' counts), mitis salivarius agar with bacitracin (mutans streptococci),and brain heart infusion agar adjusted to pH 4.8 (acid-tolerant and acidogenic microorganisms' counts). Plates were incubated in anaerobic condition (5-10% CO<sub>2</sub>, <1% O<sub>2</sub>) at 37°C, for 96 hours. The number of colony forming units (CFUs) were counted and expressed as CFU / mg of biofilm (or mL of saliva).

### **Biofilm model**

The enamel specimens were individually disposed in sterile wells (24-well tissue culture plate; TPP - Techno Plastic Products, Trasadingen, SU). Inoculating procedure was slightly different according to each inoculum type, described as follows. Dental plaque as inoculum – 60 enamel specimens were precoated with 400µL of clarified saliva, incubated at 37°C. After 20 minutes [Macakova et al., 2010], saliva was gently aspirated, and specimens were covered with 260µL of plaque suspension. Saliva as inoculum – the other 60 specimens were inoculated with 260µL of the previously diluted saliva.

After 1 hour, in both cases, 1.8mL of DMM (chemically defined artificial saliva) [Wong and Sissons, 2001], was added as nutritional source. Biofilms were submitted to daily

cariogenic challenge with DMM supplemented with 1% sucrose for 6 hours, after what samples were carefully washed for 10 seconds in sterile saline and transferred to a new plate containing DMM without sucrose. As a routine control procedure of the experiment, pH measurements were recorded from the supernatant of each well, immediately after the enamel discs were transferred to a new plate containing new DMM. The supernatant pH of the pure DMM showed higher value (pH=7) compare to DMM supplemented with sucrose (pH value between 4 and 5). Plates were incubated at 37°C in anaerobic condition (5-10% CO<sub>2</sub>, <1% O<sub>2</sub>), for a period of 10 days.

### **Analysis of biofilm microbial composition**

On the 10th day of the experiment, enamel discs were removed from the wells, gently washed with sterile saline, and the biofilm was collected from the enamel surface of each disc with sterile plastic instruments, and disposed in pre-weighed sterile tubes. Biofilms were serially diluted ( $10^{-1} - 10^{-7}$ ) in sterile salina and inoculated in duplicate in the culture media: brain heart infusion with pH adjusted to 4.8, mitis salivarius agar with 0.2 units of bacitracin/mL, rogosa agar and blood agar. Plates were incubated in anaerobic condition for 96 h. The number of colony forming units (CFUs) were determined by a trained researcher, and the results were expressed CFU/mg of biofilm (wet weight).

### **Percentage of surface hardness change (%SHC)**

Hardness readings were obtained with a Knoop diamond (25g load for 5 s), in a microhardness tester (FM 700, Future-Tech Corp., Tóquio, Japan), from all enamel discs, before (SH) and after (SH2) the experiment, with three indentations spaced 50 µm from each other on the enamel surface. At each time, the average values for each specimen were obtained and the %SHC was calculated as: %SHC = 100 (SH2 – SH)/SH [Cury et al., 2000]. This procedure was performed by one blind and trained operator.

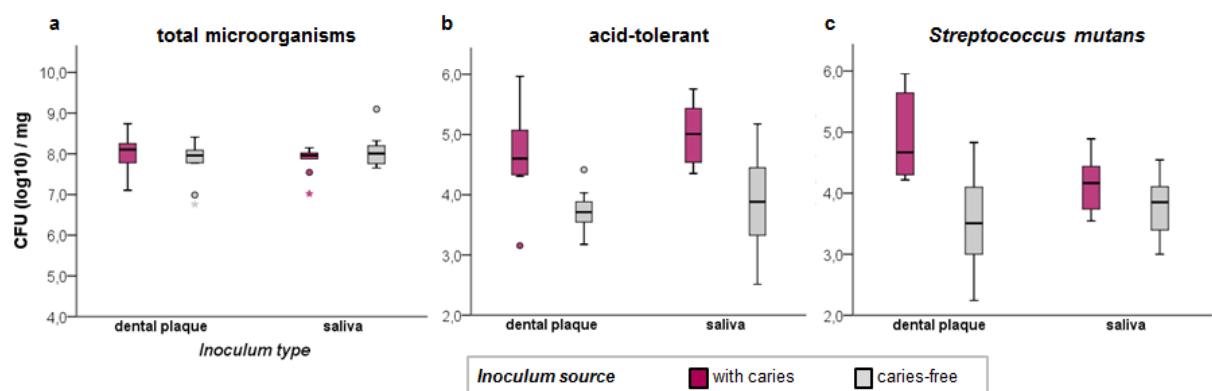
### **Statistical analysis**

Baseline microbiological data (CFU counts) were analysed with Paired-Samples T tests to verify if differences were statistically significant between dental plaque and saliva samples. Also, Independent-Samples T test was performed to analyse if CFU counts from caries-free and caries active individuals were significantly different. Independent statistical comparisons for all response variables were determined by Multivariate General Linear

Model analysis according to inoculum type (dental plaque and saliva) and inoculum source (caries-free and caries active individuals), and interactions (inoculum type and source). Correlation between response variables were verified with Pearson correlation coefficients. Data from microbial biofilm composition were transformed (log 10). For the statistical analysis the significance level was set at 5% and IBM SPSS Statistics for Windows Version 22.0 software was used (IBM Corp. Armonk, NY).

### 3. Results

Comparing the inoculum type, the analysis of the microbiological data at baseline did not show statistically significant differences within caries-free individuals. Within caries active individuals, the differences were statistically significant only for *Streptococcus mutans* counts ( $p = 0.010$ ), comparing saliva and dental plaque samples (Figure 1).

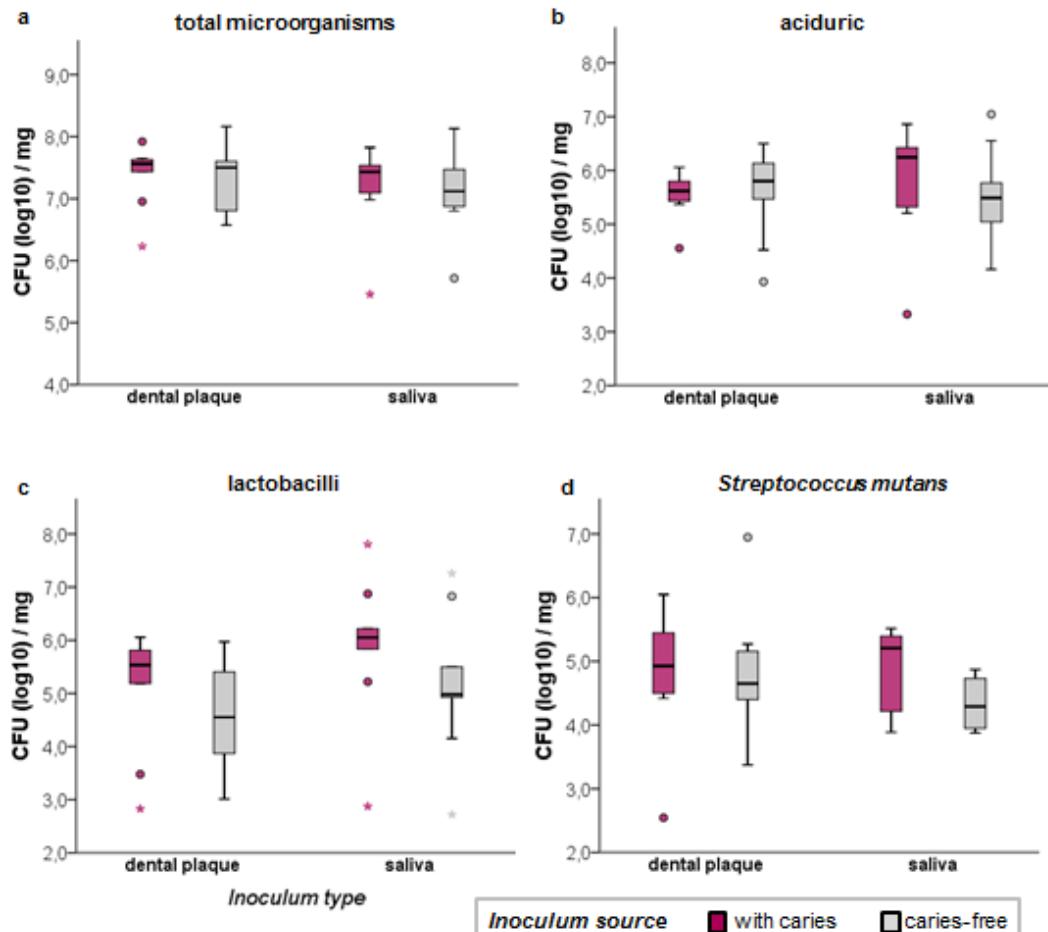


**Figure 1.** Baseline CFU counts according to type and source of the inoculum: (a) total microorganisms, (b) acid-tolerant, (c) *Streptococcus mutans*.  
Note. Saliva counts are expressed in CFU (log 10)/mL.

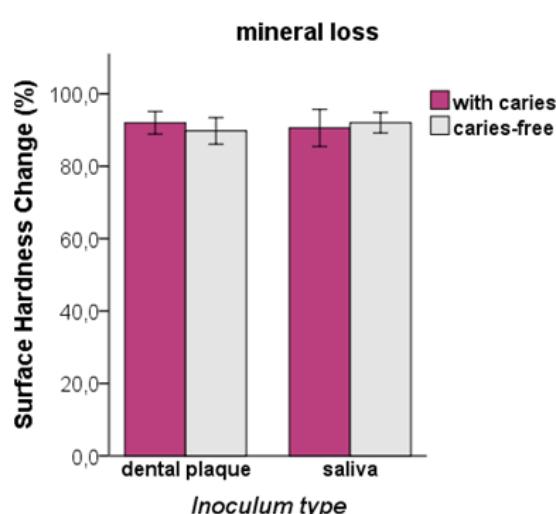
The comparative analysis of CFU counts between individuals with different caries status, showed statistically significant differences for *Streptococcus mutans* ( $p = 0.001$ ) and acid-tolerant microorganisms' counts ( $p = 0.002$ ) in dental plaque samples, and for acid-tolerant counts ( $p = 0.001$ ) in saliva. Higher levels of *S. mutans* were found in dental plaque collected from active caries lesions (Figure 1).

After the growth of biofilms under cariogenic challenges, the differences in CFUs mean values were not statistically significant for total microorganisms ( $p = 0.275$ ;  $p = 0.596$ ), lactobacilli ( $p = 0.084$ ;  $p = 0.100$ ), *Streptococcus mutans* ( $p = 0.399$ ;  $p = 0.267$ ) and acid-

tolerant microorganisms' counts ( $p = 0.699$ ;  $p = 0.525$ ), considering the inoculum type and caries status of the individuals, respectively (Figure 2).



**Figure 2.** Microcosm biofilm CFU counts according to the type and source of the inoculum. (a) total microorganisms, (b) aciduric, (c) lactobacilli, (d) *Streptococcus mutans*.



Regarding the percentage of surface hardness change (%SHC) differences in the mean values were not statistically significant for both variables under analysis, the inoculum type ( $p = 0.799$ ) and the caries status of the individuals ( $p = 0.820$ ).

**Figure 3.** Mean values and SD of the percentage of Surface Hardness Change (%SHC) for different types (dental plaque and saliva) and sources (with caries and caries-free) of inoculum.

Average values of %SHC were 92 and 90% when dental plaque was used as inoculum, and 90 and 92% for saliva as inoculum, from samples of caries active and caries-free individuals respectively (Figure 3). Pearson correlation coefficients are displayed in Table 1. Significant correlation was found for SHC% and CFU counts of acid-tolerant bacteria and lactobacilli. Likewise positive correlation also was found between acid-tolerant microorganisms and outcome variables: mineral loss and counting of lactobacilli, total microorganisms and *Streptococcus mutans*.

**Table 1. Pearson correlation coefficients among the response variables.**

	SHC%	lactobacilli	acid-tolerant	<i>Streptococcus mutans</i>	total microorganisms
<b>SHC%</b>	r .	0.379*	0.406**	0.179	0.280
	p	0.016	0.009	0.268	0.080
<b>Lactobacilli</b>	r 0.379*	.	0.568**	0.351*	0.581**
	p 0.016		0.000	0.027	0.000
<b>acid-tolerant</b>	r 0.406**	0.568**	.	0.406**	0.334*
	p 0.009	0.000		0.009	0.035
<b><i>Streptococcus mutans</i></b>	r 0.179	0.351*	0.406**	.	0.416**
	p 0.268	0.027	0.009		0.008
<b>total microorganisms</b>	r 0.280	0.581**	0.334*	0.416**	.
	p 0.080	0.000	0.035	0.008	

\*Correlation is significant at the 0.05 level (p; 2-tailed). \*\*Correlation is significant at the 0.01 level (p; 2-tailed).

#### 4. Discussion

This study examined the cariogenicity of biofilms originating from saliva and dental plaque because the inoculum type was shown to yield different microcosms [Rudney et al., 2012], which could influence the cariogenic potential of in vitro biofilms [Nyvad et al., 2013]. Also, the dental plaque samples were collected from specific sites, *viz.* the surface of active white spot caries lesions and from the correspondent locations in sound surfaces. The current methodology has been widely used in caries-related studies [Azevedo et al., 2011; Borges et al., 2014; Kuper et al., 2014; Maske et al., 2014; Peralta et al., 2013]. Therefore the retrieved

results contribute to the understanding of the influence of the inoculum in the cariogenicity of biofilms, grown under standardized conditions in a biofilm model.

Microbial composition of microcosm biofilms derived from saliva and dental plaque inoculants, showed similar levels of acid-tolerant bacteria, lactobacilli, *Streptococcus mutans* and total anaerobic microorganisms, after a period of 10 days under daily cariogenic challenges. Likewise, no substantial differences in microbial composition were found according to the caries status of the donors. However, analysing the baseline results, differences were seen according to the inoculum type and source. Dental plaque collected from active caries lesions (individuals with caries) showed higher levels of *Streptococcus mutans* and acid-tolerant bacteria when compared to sound surfaces (caries-free individuals), which is in agreement with a previous report evaluating microbiological levels from initial lesions and healthy tooth surfaces [Svensater et al., 2003].

Also, looking into the microbiological data between the inoculum types, some differences were found. In this sense, although differences were detected at baseline, distinctness of the inoculum source and type disappeared under standardized conditions *in vitro*. This could be attributed to the high cariogenic challenge of the model, favouring the growth of bacteria able to survive in an acidic environment, which is in accordance with the Ecological Plaque Hypothesis [Marsh, 2010]. However, if a shorter sucrose exposure and concentration were used, simulating a less cariogenic diet, it probably would have direct influence on the ecosystem ecological pressures, which could result in other findings. Yet, other results may be seen if differences in baseline levels of *S. mutans* and acid-tolerant bacteria were even more pronounced between the population samples, or if specific bacterial species were investigated by gene sequencing techniques [Tanner et al., 2011].

It is well known the implied limitation of the use of cultivable microorganism's methods for analysis of biofilms, which only allow the study of cultivable microorganisms. This limitation has given way to the development of microbiological molecular analysis, responsible for a more complete view of active microorganisms in the oral biofilm [Nyvad et al., 2013]. However, cultivable methods still provide important information for study of microorganism's several aspects [Yano et al., 2002].

*In vitro* biofilms grown under sucrose exposure were shown to maintain the microbial diversity found in saliva [Edlund et al., 2013], but a reduction in calcium levels in the biofilm with a dose-response effect to sucrose was demonstrated [Pearce et al., 2002]. Thus, under successive sucrose exposures at high concentrations, as adopted in the present study, the pH

falls beneath the critical threshold for enamel demineralization [Lee et al., 2013], reflecting biofilm acidogenic activity [van de Sande et al., 2011; Welin-Neilands and Svensater, 2007] and resulting in mineral loss [van de Sande et al., 2011]. Examining the current findings, regardless of the source and type of inoculum that initiated the biofilms, similar levels of enamel demineralization were found. Azevedo et al. [2014] investigated the correlation of several response variables in mother-child pairs with distinct caries experience levels. A significant correlation was found for acidogenicity (pH), acid-tolerant bacteria and lactobacilli counts when biofilms were formed under successive cariogenic challenges. Still, mineral loss values, as well as microbiological counts were similar among all groups when frequently exposed to sucrose [Azevedo et al., 2014]. In the present study, an increase in acid-tolerant bacteria levels was observed between baseline and the in vitro biofilm, and a positive correlation between enamel demineralization and acid-tolerant bacteria counts was found. This association is attributed to the increase in the number of acid-tolerant bacteria during the maturation of cariogenic biofilm on the tooth surface. These bacteria become dominant and are able to induce enamel demineralization, establishing a directly proportional relationship between aciduric and acidogenic bacteria and mineral loss [Kim et al, 2014; Marsh et al, 2010].

The null hypothesis of this study was therefore accepted. No differences in the cariogenic potential of biofilms were found irrespective of the inoculum type and source. Under standardized in vitro conditions, the composition of the biofilm community is probably associated at some degree with the characteristics of the “new” environment, where factors such as the nature of the colonisable surface, shear forces, nutrient media, oxygen availability and so on will modulate the bacterial shifts over time [Tang et al., 2003]. Even if the dental plaque is retrieved from specific surfaces, once it is used to inoculate similar surfaces and receives equal conditions, the pressures experienced at the original site are no longer present. Confectioning samples with distinct stagnation sites and selective surface cleaning may allow isolating the site-specific variable to determine the relative importance of site *versus* inoculum.

Our results also show that depending on the research purpose of a microcosm study, *viz.* to test the effect of an antibacterial material in a high cariogenic challenge environment [Borges et al., 2014; Peralta et al., 2013; Zhang et al., 2012], the choice of the type or source of inoculum is not a major factor that will influence the outcome of the study. In such cases a methodology for easier handling should be chosen. However, to research specific issues

related to tooth decay, where there is access to use of molecular biology methods, the choice of the type and source of inoculum may perhaps be an interesting alternative to clarify dynamics and interactions of microorganisms exposed to different conditions in microcosms biofilm models.

In conclusion, under the limits of the presented biofilm model, the cariogenic potential of biofilms is similar, regardless of baseline differences between the type and source of inoculum. Nonetheless, further studies should also look into the influence of inoculum source in the cariogenic response under continuous flow systems, because the flow rate and sucrose availability mimic more closely the natural situation.

### **Acknowledgements**

The authors thank the laboratory technicians Carmen Lúcia Machado Lopes e Lizângela Ferreira (Microbiological Laboratory - School of Dentistry, UFPel, Pelotas, RS, Brazil). This study was supports by grants from CNPq - National Council for Research and Development/Brazil (CNPq proc#486810/2012-7).

## References

- Azevedo MS, van de Sande FH, Maske TT, Signori C, Romano AR, Cenci MS: Correlation between the cariogenic response in biofilms generated from saliva of mother/child pairs. *Biofouling* 2014;30:903-909.
- Azevedo MS, van de Sande FH, Romano AR, Cenci MS: Microcosm biofilms originating from children with different caries experience have similar cariogenicity under successive sucrose challenges. *Caries Res* 2011;45:510-517.
- Borges FB, Kochhann DELEL, Machado FW, Boscato N, Van De Sande FH, Moraes RR, Cenci MS: Effect of cariogenic challenge on the stability of dentin bonds. *J Appl Oral Sci* 2014;22:68-72.
- Cury JA, Rebelo MA, Del Bel Cury AA, Derbyshire MT, Tabchoury CP: Biochemical composition and cariogenicity of dental plaque formed in the presence of sucrose or glucose and fructose. *Caries research* 2000;34:491-497.
- Dupont WD, Plummer WD, Jr.: Power and sample size calculations for studies involving linear regression. *Control Clin Trials* 1998;19:589-601.
- Edlund A, Yang Y, Hall AP, Guo L, Lux R, He X, Nelson KE, Nealson KH, Yooseph S, Shi W, McLean JS: An in vitro biofilm model system maintaining a highly reproducible species and metabolic diversity approaching that of the human oral microbiome. *Microbiome* 2013;1:25.
- Filoche SK, Soma D, van Bekkum M, Sissons CH: Plaques from different individuals yield different microbiota responses to oral-antiseptic treatment. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2008;54:27-36.
- Filoche SK, Soma KJ, Sissons CH: Caries-related plaque microcosm biofilms developed in microplates. *Oral Microbiol Immunol* 2007;22:73-79.
- Kim YS, Lee ES, Kwon HK, Kim BI: Monitoring the maturation process of a dental microcosm biofilm using the quantitative light-induced fluorescence-digital (qlf-d). *J Dent* 2014;42:691-696.
- Koo H, SCHOBEL B, SCOTT-ANNE K, WATSON G, BOWEN WH, CURY JA, ROSALEN PL, PARK YK: Apigenin and tt-farnesol with fluoride effects on *S. mutans* biofilms and dental caries. *J Dent Res* 2005;v.84:1016-1020.
- Kuper NK, Opdam NJ, Ruben JL, de Soet JJ, Cenci MS, Bronkhorst EM, Huysmans MC: Gap size and wall lesion development next to composite. *J Dent Res* 2014;93:108S-113S.
- Lee ES, Kang SM, Ko HY, Kwon HK, Kim BI: Association between the cariogenicity of a dental microcosm biofilm and its red fluorescence detected by quantitative light-induced fluorescence-digital (qlf-d). *J Dent* 2013;41:1264-1270.
- Macakova L, Yakubov GE, Plunkett MA, Stokes JR: Influence of ionic strength changes on the structure of pre-adsorbed salivary films. A response of a natural multi-component layer. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2010;77:31-39.
- Marsh PD: Microbiology of dental plaque biofilms and their role in oral health and caries. *Dent Clin North Am* 2010;54:441-454.
- Maske TT, Isolan CP, van de Sande FH, Peixoto AC, Faria ESAL, Cenci MS, Moraes RR: A biofilm cariogenic challenge model for dentin demineralization and dentin bonding analysis. *Clin Oral Investig* 2014.

- Nyvad B, Crielaard W, Mira A, Takahashi N, Beighton D: Dental caries from a molecular microbiological perspective. *Caries Res* 2013;47:89-102.
- Pearce EI, Sissons CH, Coleman M, Wang X, Anderson SA, Wong L: The effect of sucrose application frequency and basal nutrient conditions on the calcium and phosphate content of experimental dental plaque. *Caries Res* 2002;36:87-92.
- Peralta SL, Carvalho PH, van de Sande FH, Pereira CM, Piva E, Lund RG: Self-etching dental adhesive containing a natural essential oil: Anti-biofouling performance and mechanical properties. *Biofouling* 2013;29:345-355.
- Pretty IA, Edgar WM, Smith PW, Higham SM: Quantification of dental plaque in the research environment. *J Dent* 2005;33:193-207.
- Rudney JD, Chen R, Lenton P, Li J, Li Y, Jones RS, Reilly C, Fok AS, Aparicio C: A reproducible oral microcosm biofilm model for testing dental materials. *J Appl Microbiol* 2012;113:1540-1553.
- Sissons CH, Anderson SA, Wong L, Coleman MJ, White DC: Microbiota of plaque microcosm biofilms: Effect of three times daily sucrose pulses in different simulated oral environments. *Caries Res* 2007;41:413-422.
- Svensater G, Borgstrom M, Bowden GH, Edwardsson S: The acid-tolerant microbiota associated with plaque from initial caries and healthy tooth surfaces. *Caries Res* 2003;37:395-403.
- Tang G, Yip HK, Cutress TW, Samaranayake LP: Artificial mouth model systems and their contribution to caries research: A review. *J Dent* 2003;31:161-171.
- Tanner AC, Kent RL, Jr., Holgerson PL, Hughes CV, Loo CY, Kanasi E, Chalmers NI, Johansson I: Microbiota of severe early childhood caries before and after therapy. *J Dent Res* 2011;90:1298-1305.
- Thylstrup A, Bruun C, Holmen L: In vivo caries models – mechanisms for caries initiation and arrestment. *Adv Dent Res* 1994;8:144–157.
- van de Sande FH, Azevedo MS, Lund RG, Huysmans MC, Cenci MS: An in vitro biofilm model for enamel demineralization and antimicrobial dose-response studies. *Biofouling* 2011;27:1057-1063.
- Welin-Neilands J, Svensater G: Acid tolerance of biofilm cells of *streptococcus mutans*. *Appl Environ Microbiol* 2007;73:5633-5638.
- Wong L, Sissons C: A comparison of human dental plaque microcosm biofilms grown in an undefined medium and a chemically defined artificial saliva. *Arch Oral Biol* 2001;46:477-486.
- Yano A, Kaneko N, Ida H, Yamaguchi T, Hanada N: Real-time PCR for quantification of *Streptococcus mutans*. *FEMS Microbiol Lett* 2002; 217: 23–30.
- Zhang K, Melo MA, Cheng L, Weir MD, Bai Y, Xu HH: Effect of quaternary ammonium and silver nanoparticle-containing adhesives on dentin bond strength and dental plaque microcosm biofilms. *Dent Mater* 2012;28:842-852.

## **5 CONCLUSÃO**

Dentro das limitações do presente estudo, pode-se concluir que o potencial cariogênico dos biofilmes desenvolvidos em um modelo de biofilme de microcosmos, sob condições padronizadas (exposição à sacarose), é similar, independentemente do tipo e fonte do inóculo.

No entanto, futuros estudos devem ser conduzidos com o objetivo de avaliar a influência da fonte do inóculo na resposta cariogênica em sistemas de fluxo contínuo, os quais permitem o controle da taxa de fluxo e disponibilidade de sacarose, mimetizando assim, de forma mais próxima, o ambiente oral.

## REFERÊNCIAS

AAS, J. A.; GRIFFEN, A. L.; DARDIS, S. R.; LEE, A. M.; OLSEN, I.; DEWHIRST, F. E.; LEYS, E. J.; PASTER, B. J. Bacteria of dental caries in primary and permanent teeth in children and young adults. **Journal of Clinical Microbiology**, v.46, n.4, p.1407-17.

AAS, J. A.; PASTER, B. J.; STOKES, L. N.; OLSEN, I.; DEWHIRST, F. E. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, n.11, p.5721-5732, 2005.

AZEVEDO, M. S.; VAN DE SANDE, F. H.; MASKE, T. T.; SIGNORI, C.; ROMANO, A. R.; CENCI, M. S. Correlation between the cariogenic response in biofilms generated from saliva of mother/child pairs. **Biofouling**, v.30, n.8, p.903-909, 2014.

AZEVEDO, M. S.; VAN DE SANDE, F. H.; ROMANO, A. R.; CENCI, M. S. Microcosm biofilms originating from children with different caries experience have similar cariogenicity under successive sucrose challenges. **Caries research**, v.45, n.6, p.510-517, 2011.

BEIGHTON, D. The complex oral microflora of high-risk individuals and groups and its role in the caries process. **Community Dentistry and Oral Epidemiology**, v.33, n.4, p.248-255, 2005.

BEIGHTON, D.; GILBERT, S. C.; CLARK, D.; MANTZOURANI, M.; AL-HABOUBI, M.; ALI, F.; RANSOME, E.; HODSON, N.; FENLON, M.; ZOITOPOULOS, L.; GALLAGHER, J. Isolation and identification of bifidobacteriaceae from human saliva. **Applied and Environmental Microbiology**, v.74, n.20, p.6457-6460, 2008.

BORGES, F. B.; KOCHHANN, D. E. L. E. L.; MACHADO, F. W.; BOSCATO, N.; VAN DE SANDE, F. H.; MORAES, R. R.; CENCI, M. S. Effect of cariogenic challenge on the stability of dentin bonds. **Journal of Applied Oral Science : revista FOB**, v.22, n.1, p.68-72, 2014.

BOWEN, M. B.; PRUCHNO, C.; BELLONE, C. J. Characterization of a concanavalin A supernatant-derived idiotype-specific T helper cell factor. **Journal of Immunology**, v.136, n.4, p.1295-1302, 1986.

CENCI, M. S.; PEREIRA-CENCI, T.; CURY, J. A.; TEN CATE, J. M. Relationship between gap size and dentine secondary caries formation assessed in a microcosm biofilm model. **Caries Research**, v.43, n.2, p.97-102, 2009.

CURY, J. A.; REBELLO, M. A.; DEL BEL CURY, A. A. In situ relationship between sucrose exposure and the composition of dental plaque. **Caries Research**, v.31, n.5, p.356-360. 1997.

CURY, J. A.; REBELO, M. A.; DEL BEL CURY, A. A.; DERBYSHIRE, M. T.; TABCHOURY, C. P. Biochemical composition and cariogenicity of dental plaque formed in the presence of sucrose or glucose and fructose. **Caries Research**, v.34, n.6, p.491-497, 2000.

DUPONT, W. D.; PLUMMER, W. D. Power and Sample Size Calculations: A Review and Computer Program. **Controlled Clinical Trials**, v.11, p.116-28.1990.

EDLUND, A.; YANG, Y.; HALL, A. P.; GUO, L.; LUX, R.; HE, X.; NELSON, K. E.; NEALSON, K. H.; YOOSEPH, S.; SHI, W.; MCLEAN, J. S. An in vitro biofilm model system maintaining a highly reproducible species and metabolic diversity approaching that of the human oral microbiome. **Microbiome**, v.1, n.1, p.25, 2013.

FILOCHE, S. K.; COLEMAN, M. J.; ANGKER, L.; SISSONS, C. H. A fluorescence assay to determine the viable biomass of microcosm dental plaque biofilms. **Journal of Microbiological Methods**, v.69, n.3, p.489-496, 2007.

FILOCHE, S. K.; SOMA, D.; VAN BEKKUM, M.; SISSONS, C. H. Plaques from different individuals yield different microbiota responses to oral-antiseptic treatment. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.54, n.1, p.27-36, 2008.

FILOCHE, S. K.; SOMA, K. J.; SISSONS, C. H. Caries-related plaque microcosm biofilms developed in microplates. **Oral Microbiology and Immunology**, v.22, n.2, p.73-79, 2007.

FILOCHE, S.; WONG, L.; SISSONS, C. H. Oral Biofilms: Emerging Concepts in Microbial Ecology. **Journal of Dental Research**, v.89, n.1, p.8-18, 2010.

GIBBONS, R. J.; ETHERDEN, I. Albumin as a Blocking Agent in Studies of Streptococcal Adsorption to Experimental Salivary Pellicles. **Infection and Immunity**, v.50, n.2, p.592-594, 1995.

KIDD, E. The implications of the new paradigm of dental caries. **Journal of Dentistry**, v.39 Suppl 2, S3-8, 2011.

KOO, H.; SCHOBEL, B.; SCOTT-ANNE, K.; WATSON, G.; BOWEN, W. H.; CURY, J. A.; ROSALEN, P. L.; PARK, Y. K. Apigenin and tt-farnesol with fluoride effects on *S. mutans* biofilms and dental caries. **Journal of Dental Research**, v.84, n.11, p.1016-1020, 2005.

KUPER, N. K.; OPDAM, N. J.; RUBEN, J. L.; DE SOET, J. J.; CENCI, M. S.; BRONKHORST, E. M.; HUYSMANS, M. C. Gap Size and Wall Lesion Development Next to Composite. **Journal of Dental Research**, v.93, n.7 suppl, p.108S-113S, 2014.

LEDDER, R. G.; GILBERT, P.; PLUEN, A.; SREENIVASAN, P. K.; DE VIZIO, W.; MCBAIN, A. J. Individual microflora beget unique oral microcosms. **Journal of Applied Microbiology**, v.100, n.5, p.1123-31, 2006.

LEE, E. S.; KANG, S. M.; KO, H. Y.; KWON, H. K.; KIM, B. I. Association between the cariogenicity of a dental microcosm biofilm and its red fluorescence detected by Quantitative Light-induced Fluorescence-Digital (QLF-D). **Journal of Dentistry**, v.41, n.12, p.1264-1270, 2013.

MACAKOVA, L.; YAKUBOV, G. E.; PLUNKETT, M. A.; STOKES, J. R. Influence of ionic strength changes on the structure of pre-adsorbed salivary films. A response of a natural multi-component layer. **Colloids and surfaces. B, Biointerfaces**, v.77, n.1, p.31-39, 2010.

MAGER, D. L.; XIMENEZ-FYVIE, L. A.; HAFFAJEE, A. D.; SOCRANSKY, S. S. Distribution of selected bacterial species on intraoral surfaces. **Journal of Clinical Periodontology**, v.30, n.7, p.644-54, 2003.

MARSH, P. D. Microbiology of dental plaque biofilms and their role in oral health and caries. **Dental Clinics of North America**, v.54, n.3, p.441-454, 2010.

MASKE, T. T.; ISOLAN, C. P.; VAN DE SANDE, F. H.; PEIXOTO, A. C.; FARIA, E. S. A. L.; CENCI, M. S.; MORAES, R. R. A biofilm cariogenic challenge model for dentin demineralization and dentin bonding analysis. **Clinical Oral Investigations**, v.2014.

NYVAD, B.; CRIELAARD, W.; MIRA, A.; TAKAHASHI, N.; BEIGHTON, D. Dental caries from a molecular microbiological perspective. **Caries Research**, v.47, n.2, p.89-102, 2013.

PEARCE, E. I.; SISSONS, C. H.; COLEMAN, M.; WANG, X.; ANDERSON, S. A.; WONG, L. The effect of sucrose application frequency and basal nutrient conditions on the calcium and phosphate content of experimental dental plaque. **Caries Research**, v.36, n.2, p.87-92, 2002.

PERALTA, S. L.; CARVALHO, P. H.; VAN DE SANDE, F. H.; PEREIRA, C. M.; PIVA, E.; LUND, R. G. Self-etching dental adhesive containing a natural essential oil: anti-biofouling performance and mechanical properties. **Biofouling**, v.29, n.4, p.345-355, 2013.

PRETTY, I. A.; EDGAR, W. M.; SMITH, P. W.; HIGHAM, S. M. Quantification of dental plaque in the research environment. **Journal of Dentistry**, v.33, n.3, p.193-207, 2005.

PRISMA Flow Diagram. Disponível em:  
<http://www.prisma-statement.org/statement.htm> Acesso em: 13 ago. 2013.

RUDNEY, J. D.; CHEN, P.; LENTON, J.; LI, J.; LI, Y.; JONES, R. S.; REILLY, C.; FOK, A. S.; APARICIO, C. A reproducible oral microcosm biofilm model for testing dental materials. **Journal of Applied Microbiology**, v.113, n.6, p.1540-1553, 2012.

SELWITZ, R. H.; ISMAIL A. I.; PITTS N. B. Dental caries. **Lancet**, v.369,n.9555, p.51-59, 2007.

SISSONS, C. H. Artificial dental plaque biofilm model systems. **Advances in Dental Research**, v.11, n.1, p.110-126, 1997.

SISSONS, C. H.; ANDERSON, S. A.; WONG, L.; COLEMAN, M. J.; WHITE, D. C. Microbiota of plaque microcosm biofilms: effect of three times daily sucrose pulses in different simulated oral environments. **Caries Research**, v.41, n.5, p.413-422, 2007.

SOUSA, R. P.; ZANIN, I. C.; LIMA, J. P.; VASCONCELOS, S. M.; MELO, M. A.; BELTRAO, H. C.; RODRIGUES, L. K. In situ effects of restorative materials on dental biofilm and enamel demineralisation. **Journal of Dentistry**, v.37, n.1, p.44-51, 2009.

SVENSATER, G.; BORGSTROM, M.; BOWDEN, G. H.; EDWARDSSON, S. The acid-tolerant microbiota associated with plaque from initial caries and healthy tooth surfaces. **Caries Research**, v.37, n.6, p.395-403, 2003.

TAKAHASHI, N.; NYVAD, B. Caries Ecology Revisited: Microbial Dynamics and the Caries Process. **Caries Research**, v.42, n.6, p.409-418, 2008.

TANG, G.; YIP, H. K.; CUTRESS, T. W.; SAMARANAYAKE, L. P. Artificial mouth model systems and their contribution to caries research: a review. **Journal of Dentistry**, v.31, n.3, p.161-171, 2003.

TANNER, A. C.; KENT, R. L., JR.; HOLGERSON, P. L.; HUGHES, C. V.; LOO, C. Y.; KANASI, E.; CHALMERS, N. I.; JOHANSSON, I. Microbiota of severe early childhood caries before and after therapy. **Journal of Dental Research**, v.90, n.11, p.1298-1305, 2011.

THURNHEER, T.; GMUR, R.; SHAPIRO, S.; GUGGENHEIM, B. Mass transport of macromolecules within an in vitro model of supragingival plaque. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, n.3, p.1702-1709, 2003.

VAN DE SANDE, F. H.; AZEVEDO, M. S.; LUND, R. G.; HUYSMANS, M. C.; CENCI, M. S. An in vitro biofilm model for enamel demineralization and antimicrobial dose-response studies. **Biofouling**, v.27, n.9, p.1057-1063, 2011.

WELIN-NEILANDS, J.; SVENSATER, G. Acid tolerance of biofilm cells of *Streptococcus mutans*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.73, n.17, p.5633-5638, 2007.

WONG, L.; SISSONS, C. A comparison of human dental plaque microcosm biofilms grown in an undefined medium and a chemically defined artificial saliva. **Archives of Oral Biology**, v.46, n.6, p.477-486, 2001.

## **APÊNDICES**

## **APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**



**UNIVERIDADE FEDERAL DE PELOTAS  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM DENTÍSTICA**



### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)**

Título da pesquisa:

**“Potencial cariogênico do biofilme originado de inóculos de sítios dentais com e sem lesões ativas de cárie”**

Prezado(a) Senhor(a):

Seu (sua) filho(a) está sendo convidado (a) a participar de uma pesquisa chamada **“Potencial cariogênico do biofilme originado de inóculos de sítios dentais com e sem lesões ativas de cárie”**, que está sendo realizada na Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Pelotas.

Essa pesquisa irá ajudar nos estudos sobre a doença cárie através da simulação no laboratório do crescimento da placa dental.

A participação de seu(sua) filho(a) é muito importante e ela se dará da seguinte forma, seu(sua) filho(a) receberá primeiramente um exame clínico e após serão realizados procedimentos de coleta de saliva e placa dental de sua boca para análise em laboratório.

No dia da coleta seu (sua) filho(a) não poderá usar meios de higiene bucal pelo período de 24h anterior à coleta de material. Essa coleta será realizada uma única vez.

Com base no exame clínico, todo e qualquer tratamento necessário será oferecido e realizado pelos pesquisadores, mesmo que o seu(sua) filho venha a desistir de participar do estudo.

Gostaríamos de esclarecer que os procedimentos de coleta a serem realizados oferecem risco mínimo a saúde de seu(sua) filho(a), contornável com o reestabelecimento da higiene oral.

A participação nessa pesquisa é totalmente voluntária, podendo o paciente: recusar-se a participar, ou mesmo desistir a qualquer momento sem que isto acarrete qualquer prejuízo à sua pessoa.

As informações serão tratadas com o mais absoluto sigilo e confidencialidade, de modo a preservar a sua identidade. Os materiais coletados e dados serão utilizados nessa pesquisa, e ainda, parte dos mesmos será guardada, e usada em outras análises com futura publicação, mediante nova avaliação do Comitê de Ética.

Informamos que seu(sua) filho(a) não pagará nem será remunerado por sua participação. Garantimos, no entanto, que todas as despesas decorrentes da pesquisa serão resarcidas, quando devidas e decorrentes especificamente da participação na pesquisa.

Caso o(a) senhor(a) tenha dúvidas ou necessite de maiores esclarecimentos pode nos contatar (**Pesquisadores Responsáveis: Elenara Ferreira de Oliveira /Orientadora, Cel.: 9981 6138/E-mail.: f.elenara@gmail.com e Cácia Signori, Cel.: 8134 2804/E-mail:** caciasignori@gmail.com).

Este termo deverá ser preenchido em duas vias de igual teor, sendo uma delas, devidamente preenchida, assinada e entregue ao(a) senhor(a).

Pelotas, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2013.

Pesquisadora Responsável \_\_\_\_\_

RG:\_\_\_\_\_

Eu \_\_\_\_\_, RG \_\_\_\_\_, abaixo assinado(a), concordo de livre e espontânea vontade que meu (minha) filho(a) \_\_\_\_\_ nascido(a) em \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_\_ , participe do estudo “Potencial cariogênico do biofilme originado de inóculos de sítios dentais com e sem lesões ativas de cárie”, e esclareço que obtive todas informações necessárias.

---

Nome e assinatura ou impressão dactiloscópica  
(Responsável)

## **APÊNDICE B – Termo de autorização aos pais**

### **AUTORIZAÇÃO**

Nome do aluno: \_\_\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_  
Série: \_\_\_\_\_ Turma: \_\_\_\_\_ Sala: \_\_\_\_\_

Autorizo meu filho (a), ou menor pelo qual sou responsável legal, a receber exame odontológico, realizado pela Cirurgiã-Dentista Cácia Signori, aluna de pós-graduação da Faculdade de Odontologia, na EMEF \_\_\_\_\_.

Pelotas, \_\_\_\_ de \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

Autorização: ( ) SIM      NÃO ( )

Assinatura do responsável: \_\_\_\_\_.

Telefone para contato:\_\_\_\_\_

Obs.: Se houver alguma dúvida, falar com \_\_\_\_\_ (Diretor) ou  
\_\_\_\_\_ (Coordenador).

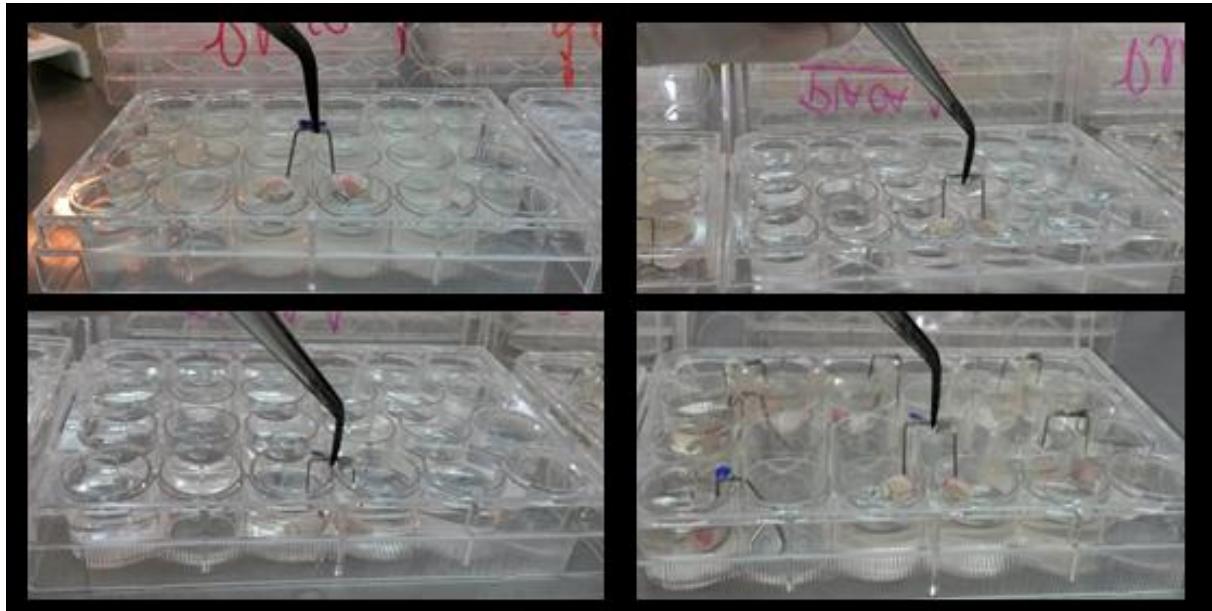
## **APÊNDICE C – Ficha de Triagem**

Escola: \_\_\_\_\_ Sala: \_\_\_\_\_ Professor: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_

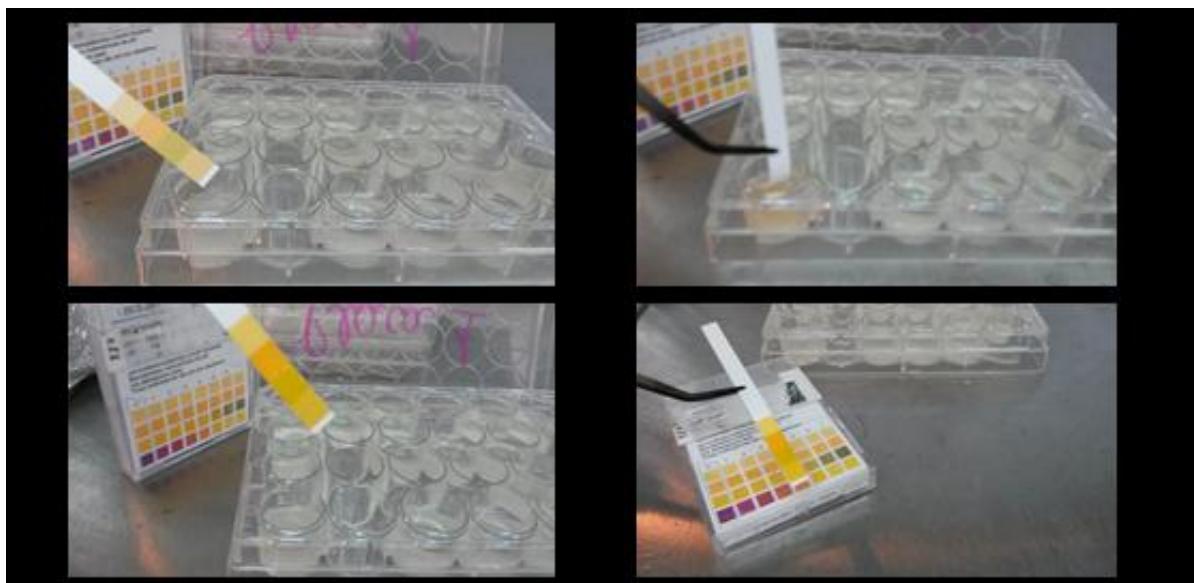
Baixo risco	Risco moderado						Alto risco		
A: ausência de cavidade de cárie, sem placa, sem gengivite e/ou sem mancha branca de cárie	<b>A1:</b> ausência de cavidade ou mancha branca de cárie, <u>com presença de placa</u>	<b>A2:</b> ausência de cavidade ou mancha branca de cárie, <u>com presença de gengivite</u>	<b>B:</b> história de dente restaurado, <u>sem placa/gengivite</u> e/ou sem mancha branca de cárie	<b>B1:</b> história de dente restaurado, <u>com placa/gengivite</u> e/ou sem mancha branca de cárie	<b>C:</b> uma ou mais de cárie inativa, <u>sem placa/gengivite</u> e/ou sem mancha branca de cárie	<b>C1:</b> uma ou mais cavidades de cárie inativa, <u>com placa/gengivite</u>	<b>D:</b> ausência de cavidade de cárie, com presença de mancha branca de cárie	<b>E:</b> uma ou mais cavidades de cárie ativa	<b>F:</b> presença de dor e/ou abscesso

Fonte: Unidade de Saúde Bucal Coletiva, UFPel.

## APÊNDICE D



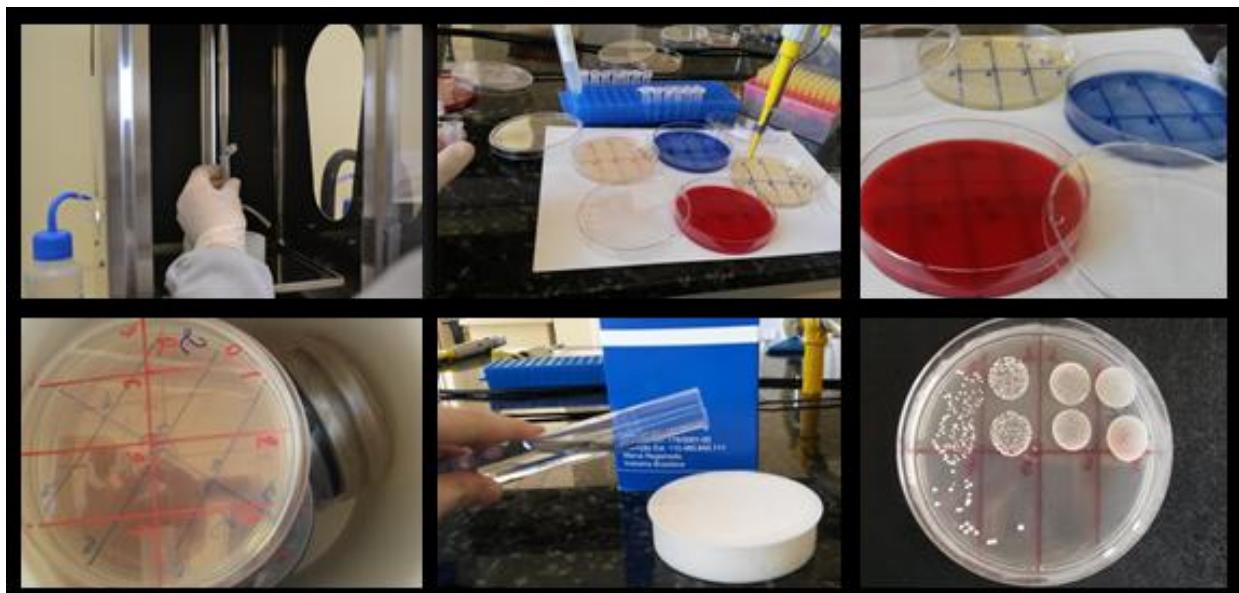
Troca dos meios: (1) Remoção dos espécimes da placa removida de atmosfera de anaerobiose, (2) Lavagem em solução salina estéril, (3) Movimento intermitente de lavagem, (4) Deposição dos espécimes em placa de 24 poços estéril contendo novo meio (DMM sem ou com sacarose).



Aferição do pH com fitas indicadoras de Ph.



Coleta dos biofilmes – (1) Remoção dos espécimes, (2) Lavagem em solução salina estéril, (3) Remoção do biofilme de toda superfície de esmalte com lâminas plásticas, (4) Deposição dos biofilmes em eppendorfs pré-pesados, (5) Nova pesagem e ajuste na proporção 1mg de biofilme/1mL de salina, (6) Vortexação.



(6) Sonicação, (7) Diluição e Plaqueamento em duplicata, (8) Incubação dos meios de cultura em atmosfera de anaerobiose, (9) Contagem das unidades formadoras de colônia (UFC).

## **ANEXOS**

## **ANEXO A - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa**

FACULDADE DE MEDICINA DA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
PELOTAS



### **PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

#### **DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** Potencial cariogênico do biofilme originado de inóculos de sítios dentais com e sem lesões ativas de cárie

**Pesquisador:** Elenara Ferreira de Oliveira

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 27197414.6.0000.5317

**Instituição Proponente:** Faculdade de Medicina

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### **DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 556.676

**Data da Relatoria:** 27/02/2014

#### **Apresentação do Projeto:**

Modelos de biofilmes de microcosmos in vitro originados a partir da saliva ou de amostras de placa dental têm sido bastante explorados com a finalidade de elucidar os processos relacionados ao estabelecimento e evolução da doença cárie dentária. Entretanto, é sugerido pela literatura que esses modelos não reproduzem os processos microbianos e metabólicos que ocorrem na cárie dentária à nível de cada sítio. Este estudo revisará de forma sistemática estudos in vitro que investigaram a influência do tipo de inóculo no potencial cariogênico e perfil microbiano do biofilme em modelos experimentais de biofilme. Os respectivos desfechos primários e secundários serão investigados: desmineralização, perfil microbiológico e variação de pH.

#### **Objetivo da Pesquisa:**

##### **Objetivo Primário:**

Avaliar o potencial cariogênico do biofilme originado de inóculos de sítios dentais com e sem lesões ativas de cárie, através de um modelo de microcosmos de biofilme.

##### **Objetivo Secundário:**

- a) Realizar uma revisão sistemática com o objetivo de avaliar estudos que tenham investigado a influência do inóculo no perfil microbiano e/ou potencial cariogênico do biofilme;
- b) comparar o potencial cariogênico do biofilme advindo de inóculos de origem salivar e da placa

FACULDADE DE MEDICINA DA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
PELOTAS



Continuação do Parecer: 556.676

dental de superfícies dentárias com lesões não cavitadas ativas de cárie e superfícies hígidas;  
c) analisar o perfil microbiológico resultante de biofilmes de diferentes inóculos submetidos ao desafio cariogênico.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

**Riscos:**

Os riscos aos sujeitos da amostra são mínimos, pois a participação do sujeito da pesquisa implica somente que os mesmos deverão abster-se de qualquer método de higiene oral por um período de 24 horas anterior a coleta das amostras, e de alimentação 2 horas previamente ao procedimento. Tais riscos são contornáveis através do reestabelecimento de uma adequada higiene oral.

**Benefícios:**

Benefícios futuros com o desenvolvimento de modelos de biofilmes em laboratório que permitam a simulação fiel de sítios específicos da microbiota oral e permitindo assim o desenvolvimento de "cáries in vitro", o teste de substâncias antibacterianas entre outras possibilidades em um modelo de biofilme adequado para esse propósito.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

A pesquisa é de relevância, uma vez que busca a reprodução in vitro das condições reais na cavidade bucal.

Para o presente estudo, biofilmes de microcosmos serão formados sobre discos de esmalte bovino. O estudo será in vitro, cego (análise estatística)e aleatorizado (distribuição dos espécimes de esmalte). O efeito da utilização de inóculos distintos de um mesmo indivíduo será investigado em relação ao perfil microbiológico e o potencial cariogênico dos biofilmes formados. Dez indivíduos serão selecionados para as avaliações comparativas pareadas (placa dentária de superfície com lesão de cárie e saliva). O grupo controle corresponderá à placa e saliva coletadas de dez indivíduos livres de cárie. Os fatores em estudo serão: o tipo de inóculo em três níveis (placa dentária de superfície com cárie, placa dentária de superfície hígida, saliva) e o tempo de formação dos biofilmes em cinco níveis (24h, 72h, 120h, 168h e 14 dias). As variáveis de desfecho avaliadas serão a perda mineral [percentual de perda de dureza de superfície (todos os tempos) e dureza interna (14 dias)] e composição microbiológica do biofilme (UFC).

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

OK

FACULDADE DE MEDICINA DA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
PELOTAS



Continuação do Parecer: 556.676

**Recomendações:**

OK

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

OK

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

PELOTAS, 13 de Março de 2014

---

Assinador por:  
Patricia Abrantes Duval  
(Coordenador)

Endereço: Rua Prof Araujo, 465 sala 301	CEP: 96.020-360
Bairro: Centro	
UF: RS	Município: PELOTAS
Telefone: (53)3284-4980	Fax: (53)3221-3554
	E-mail: cep.famed@gmail.com