MAYRA FIDELIS ZAMBONI QUITERO

Obtenção *in vitro* de mancha branca por desafio cariogênico misto

São Paulo

2016

MAYRA FIDELIS ZAMBONI QUITERO

Obtenção *in vitro* de mancha branca por desafio cariogênico misto

Versão Corrigida

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, para obter o título de Doutor pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Área de Concentração: Dentística

Orientadora: Prof^a. Dra. Adriana Bona Matos

São Paulo

2016

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo da Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Quitero, Mayra Fidelis Zamboni.

Obtenção in vitro de mancha branca por desafio cariogênico misto / Mayra Fidelis Zamboni Quitero; orientador Adriana Bona Matos -- São Paulo, 2016.

61 p. : fig., tab.; 30 cm.

Tese (Doutorado) -- Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de Concentração: Dentística. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão corrigida.

1. Microscopia de polarização. 2. Tomografia por coerência óptica. 3. Microbiologia. I. Matos, Adriana Bona. II. Título.

Quitero MFZ. Obtenção *in vitro* de mancha branca por desafio cariogênico misto. Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Odontologia.

Aprovado em: / /2016

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

À Deus, por ter iluminado meu caminho e me dado forças para atingir meus objetivos.

*Aos meus avós, **Lydia e Elço**, que junto aos anjos assistem a todos os meus passos. Tenho certeza de que estão muito orgulhosos dessa conquista!*

*Aos meus pais, **Sandra e Eduardo**, por acreditarem nos meus sonhos e não medirem esforços para que eu possa realizá-los. Vocês são meu porto seguro. Amo muito vocês!*

AGRADECIMENTOS

À minha querida orientadora, **Profa. Dra Adriana Bona Matos**, que me acolheu quando mais precisei, acreditou em mim e fez com que esta jornada fosse muito mais prazerosa. Obrigada pela confiança, ensinamentos, conselhos e amizade. Serei eternamente grata!

À **Profa. Dra. Maria Regina Lorenzetti Simionato** do Departamento de Microbiologia Oral do ICB/USP, por me ter recebido em seu laboratório e por toda ajuda a mim dispensada.

Ao **Prof. Anderson Zanardi de Freitas**, do Centro de Lasers e Aplicações do IPEN/USP, que me permitiu utilizar seu equipamento e cujos conhecimentos possibilitaram a execução deste trabalho.

Ao **Prof. Dr. Frederico Barbosa de Sousa** do Laboratório de Microscopia e Imagem Biológica (Lamib) do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba (CCS/UFPB), pela oportunidade de realização de estágio, em que tive grande aprendizado e fui muito bem recebida.

À **Profa. Dra. Luciana Kfourir Siriani**, que sempre com um sorriso no rosto me ajudou no Laboratório de Microbiologia. Poder contar com você me deixou mais segura e confiante. Muito obrigada, de coração!

À **Cynthia Azevedo**, minha querida amiga e parceira ao longo dessa jornada. Muito obrigada por toda a ajuda, companheirismo e amizade. Você fez toda a diferença!

À querida **Tatiane A. de Oliveira**, obrigada por dividir comigo as dificuldades e as muitas gargalhadas. Certamente tudo foi mais divertido ao seu lado!

Às amigas **Thayanne Ramos, Thaysa Ramos, Anely Lopes e Bruna Uglík**, pelos muitos momentos de descontração e alegria.

À **Livia Dante**, minha amiga que está longe, mas sempre em meu coração.

À minha amiga **Bárbara Ferreira**, que tanto me ajudou e aconselhou durante os momentos difíceis.

À **Flávia Ibuki**, pelos tantos momentos juntas ao longo destes 14 anos de amizade.

A **Beatriz Togoro** e **Livia Trevelin**, por toda a ajuda no meu projeto e pela ótima convivência na sala da Profa. Adriana.

Ao **Lucas Ramos de Pretto**, que com muita gentileza me ajudou a utilizar o equipamento no IPEN.

À **Elizabeth S. R. Somessari** e ao **Carlos Gaia da Silveira**, do Centro de Tecnologia das Radiações do IPEN/USP, pela esterilização das amostras.

À **Soninha**, técnica do Laboratório de Dentística, por todo o seu auxílio, sempre com carinho e boa vontade.

Aos professores do Departamento de Dentística, por contribuírem para minha formação e auxiliarem em diversos projetos.

A todos os colegas de Pós-Graduação, obrigada pelas dicas, companhia e experiências trocadas.

À minha família, que sempre torceu pelo meu sucesso.

Aos funcionários do Departamento de Dentística - **Davi, Selma** e **Aldo** – pela colaboração.

Aos funcionários da biblioteca da FOUSP pelas correções e formatação deste trabalho.

A todos aqueles que de forma direta ou indireta contribuíram para que este trabalho fosse realizado.

**"Lute com determinação, abrace
a vida com paixão, perca com
classe e vença com ousadia,
porque o mundo pertence a quem
se atreve e a vida é muito para
ser insignificante."**

Charles Chaplin

Quitero MFZ. Obtenção *in vitro* de mancha branca por desafio cariogênico misto [tese]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2016. Versão corrigida.

RESUMO

A proposta deste estudo *in vitro* foi otimizar o método microbiológico para a produção de lesão de mancha branca em esmalte que possa ser validada por ensaio não destrutivo (tomografia por coerência óptica – OCT) para possibilitar a utilização posterior dos espécimes em outros experimentos. Foram obtidos 168 fragmentos retangulares de esmalte bovino com janelas centrais de desmineralização de 3,0 x 3,0 mm. Os grupos experimentais foram compostos a partir de 3 fatores de variação: microrganismo (*S. mutans* UA 159, *S. sobrinus* 3347 e *S. mutans* + *S. sobrinus*), fonte de carboidrato (sacarose 1% e sacarose 1% + amido 1%) e tempo (1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 dias). Assim, formaram-se seis grupos experimentais: G1 (*S. mutans* + sacarose), G2 (*S. mutans* + sacarose + amido), G3 (*S. sobrinus* + sacarose), G4 (*S. sobrinus* + sacarose + amido), G5 (*S. mutans* + *S. sobrinus* + sacarose), G6 (*S. mutans* + *S. sobrinus* + sacarose + amido), testados em 7 tempos de desafio cariogênico. Terminada esta etapa, foram obtidas imagens em escala de cada espécime pelo OCT, e em seguida os espécimes foram processados e submetidos à análise através de microscópio de luz polarizada. Em cada um dos métodos, foram realizadas 5 mensurações de profundidade da região desmineralizada. O teste estatístico de Análise de Variância (ANOVA) ($p < 0.05$) detectou que os desafios cariogênicos testados foram capazes de desmineralizar o esmalte em profundidade, sendo influenciados pelo tipo de microrganismo, fonte de carboidrato e tempo ($p = 0,000$). O Teste de Correlação de Pearson apresentou uma correlação significativa ($p = 0,000$) entre as medidas de profundidade de desmineralização aferidas através dos métodos de luz polarizada e OCT. Logo, a tomografia por coerência óptica é um método não destrutivo válido para aferir a profundidade de desmineralização de lesões de mancha branca, que pode ser muito útil quando se objetiva obter substrato desmineralizado padronizado para estudos laboratoriais. Concluiu-se ainda que o desafio cariogênico realizado com microrganismo *S. mutans* UA 159, suplementado com sacarose como fonte de carboidrato por 6 dias, é capaz de produzir mancha branca de esmalte padronizada. Desta maneira, seria obtido um substrato modificado relevante para estudos laboratoriais.

Palavras-chave: Microscopia de polarização. Cárie em esmalte. Tomografia por coerência óptica. Microbiologia.

Quitero MFZ. A defined-multispecies microbial model for the development of enamel white spots *in vitro* [thesis]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2016. Versão corrigida.

ABSTRACT

The aim of this *in vitro* study was to optimize the microbiological method for the production of white spot lesions in enamel that can be validated by non-destructive test (optical coherence tomography - OCT) to enable the subsequent use of the specimens in other experiments. A hundred and sixty eight bovine enamel fragments with central windows of demineralization measuring 3,0 x 3,0 mm were obtained. The experimental groups were composed from three variation factors: the microorganism (*S. mutans* UA 159, *S. sobrinus* 3347 and *S. mutans* + *S. sobrinus*), carbohydrate source (1% sucrose and 1% sucrose + 1% starch) and time (1, 2, 3, 4, 5, 6 and 7 days). Thus, six experimental groups were formed: G1 (*S. mutans* + sucrose), G2 (*S. mutans* + starch + sucrose), G3 (*S. sobrinus* + sucrose), G4 (*S. sobrinus* + starch + sucrose), G5 (*S. mutans* + *S. sobrinus* + sucrose), G6 (*S. mutans* + *S. sobrinus* + sucrose + starch) tested in 7 periods of cariogenic challenge. After this step, images in scale were obtained from each specimen with OCT, and then the specimens were processed and analysed by polarized light microscopy. In each of the methods were performed 5 measurements of demineralization depth. The statistical test Analysis of Variance (ANOVA) ($p < 0.05$) detected that the cariogenic challenges tested were able to demineralize enamel in depth, regardless of the type of microorganism, carbohydrate source and time ($p = 0,000$). The Pearson's Correlation Test showed a significant correlation ($p = 0,000$) between the measurements of depth demineralization measured with polarized light microscopy and OCT. Therefore, the optical coherence tomography is a non-destructive method valid to measure the depth of demineralization of white spot lesions, which can be very useful when the objective is to obtain standard demineralized substrate for laboratory studies. It was also concluded that the cariogenic challenge performed with the microorganism *Streptococcus mutans* UA159, supplemented with sucrose as carbohydrate source for 6 days, is capable to produce standard white spot lesions in enamel. In this way, a modified substrate relevant for laboratory studies could be obtained.

Keywords: Polarization light microscopy. Enamel caries. Optical coherence tomography. Microbiology.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	15
3 PROPOSIÇÃO.....	24
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
5 RESULTADOS.....	33
6 DISCUSSÃO.....	45
7 CONCLUSÕES.....	50
REFERÊNCIAS.....	51
ANEXO.....	61

1 INTRODUÇÃO

A cariologia é uma área da Odontologia que está em constante mudança quanto à abordagem terapêutica das lesões de cárie. Apesar da terapia preventiva ter crescido bastante nos últimos anos, a cárie dental continua a ser uma das doenças crônicas mais prevalentes na população (1). Segundo levantamento epidemiológico da cárie dentária no Brasil realizado em 2003¹ por iniciativa do Ministério da Saúde, o índice CPO-D aos 12 anos foi de 6,8.

A mínima intervenção em lesões incipientes de esmalte é capaz de evitar sua progressão para a fase de cavitação, o que exigiria uma abordagem restauradora (2-4). A lesão de cárie inicial, que se manifesta clinicamente como mancha branca, resulta de um comprometimento incipiente em nível ultraestrutural, ainda capaz de se reestruturar cristalinamente. Morfologicamente, apresenta a porção externa aparentemente intacta, com desmineralização na subsuperfície (5). Esta lesão se inicia com uma pequena desmineralização superficial mas, com a continuidade deste processo, os ácidos atingem a camada subsuperficial, mantendo uma área pseudo intacta. Esta camada superficial mais mineralizada ocorre pela deposição de fluoretos e de minerais da própria estrutura dental (6). Com o aumento da porosidade do tecido, o esmalte torna-se menos translúcido, pois os poros formados na estrutura do esmalte são preenchidos por ar ou água, cujos índices de refração são diferentes da apatita, o que se observa clinicamente como alterações esbranquiçadas (7).

O uso de agentes tais como os infiltrantes resinosos é uma possibilidade para a abordagem terapêutica dessas lesões (8). Esses produtos, que possuem um componente resinoso a base de TEGDMA, apresentam geralmente um alto poder de penetração, tendo a capacidade de preencher os poros do esmalte inicialmente afetado, de forma a paralisar a progressão da lesão (9-11). Além disso, superfícies de esmalte infiltradas por resina podem inibir o crescimento bacteriano (12). Entretanto, por ser considerado um material novo, estudos devem ser executados para a avaliação da sua efetividade (13, 14).

¹ Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Projeto SB Brasil 2003: Condições de Saúde Bucal da população brasileira 2002 – 2003: resultados principais. Brasília: Ministério da Saúde, 2004. 63p.

Sabe-se que a situação ideal é a realização de pesquisas clínicas longitudinais de longa duração, mas estas demandam tempo até a sua conclusão e posterior aplicação prática dos resultados obtidos. Assim, estudos laboratoriais realizados utilizando-se substratos cariados produzidos artificialmente são uma importante alternativa para fornecer dados mais próximos e ágeis dos alcançados na clínica diária (15).

A obtenção de substrato natural com mancha branca dá margem a uma grande variabilidade de resultados. Dados controversos observados são atribuídos a ausência de padronização das lesões de cárie obtidas naturalmente, pois sabe-se das diferenças ultraestruturais nas diferentes zonas do tecido cariado (16, 17).

Autores (18) estudaram os principais métodos artificiais para obtenção de dentina cariada, como a técnica do gel acidificado, de ciclagem de pH e o método microbiológico. Verificaram que, apesar da simplicidade das duas primeiras técnicas, o método microbiológico é o que apresenta uma maior semelhança no padrão de degradação colágena quando comparado com lesões naturais. São também vantagens do sistema bacteriano a possibilidade de investigar a etiologia e a prevenção das lesões de cárie, o potencial cariogênico de diversas espécies bacterianas e a cariogenicidade das dietas (19).

Por ser considerado um substrato com alta relevância clínica, estudos nos quais lesões incipientes em esmalte são obtidas artificialmente e de forma padronizada podem contribuir significativamente na execução de testes *in vitro*. Assim, um protocolo de padronização de obtenção desse substrato laboratorialmente para sua utilização em futuros estudos seria de grande contribuição para a área da Dentística.

Para determinar a profundidade de desmineralização do esmalte dental vários estudos utilizam a técnica de Microscopia de Luz Polarizada (MLP) (20-22), a qual é destrutiva e com elevada dificuldade de execução. Ressalta-se, porém, que para possibilitar que este substrato desmineralizado seja utilizado em ensaios futuros, é necessário validá-lo por ensaio não destrutivo, tal como a tomografia por coerência óptica (OCT) (23).

Com a constante evolução no conhecimento da Microbiologia Oral, em específico na área da Cariologia, novos protocolos de indução de lesão de cárie em

esmalte tem sido pensados, com a finalidade de aproximar ainda mais das características obtidas *in vivo*, além de otimizar a obtenção desse substrato padronizado. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a efetividade de diferentes desafios cariogênicos na obtenção de lesões de mancha branca *in vitro* em esmalte.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A cárie dental é uma doença crônica que envolve fatores genéticos, comportamentais, culturais, sociais e ambientais na sua etiologia (24-27). Sua causa direta é uma complexa interação entre a microbiota bacteriana produtora de ácidos e os carboidratos provenientes da dieta (28) que irão agir ao longo do tempo sobre o dente.

Se o pH do biofilme permanecer baixo durante um período de tempo prolongado, como consequência da metabolização dos açúcares pelas bactérias, ocorre uma transição do estágio de equilíbrio dinâmico da microbiota do biofilme dental para uma fase caracterizada pela seleção de bactérias acidúricas. Os ácidos orgânicos produzidos por estas bactérias, tais como láctico, acético, fórmico e propiônico, rapidamente se difundem através dos poros do esmalte (29). Consequentemente, o equilíbrio fisiológico mineral entre o esmalte e o meio é rompido, induzindo à perda de cálcio e fosfato da superfície dental (30, 31). O primeiro sinal clínico de que um processo de cárie está presente no esmalte é chamado de lesão de mancha branca e, conforme esta lesão progride, pode ser detectada clinicamente através de radiografias.

As lesões iniciais se apresentam como lesões de subsuperfície e, microscopicamente, podem ser divididas em quatro zonas: a camada superficial mais mineralizada; a zona translúcida, com perda mineral em torno de 1%; a zona escura, na qual se encontra cerca de 5% de perda mineral; e o corpo da lesão, com grande quantidade de dissolução mineral, podendo-se chegar a uma perda de 50% ou mais (32). Esta camada superficial mais mineralizada existe porque durante os episódios de flutuação de pH, a saliva proporciona o tamponamento do meio e fornece os íons cálcio e fosfato que participam do processo de remineralização (33).

O biofilme dental é uma organização microbiológica formada por várias espécies bacterianas localizada na superfície dos dentes e envolta por uma camada de polissacarídeos extracelulares (34). É desenvolvido pelo crescimento em camadas de microcolônias de bactérias capazes de se aderir umas às outras,

formando uma comunidade em que as diferentes populações podem interagir (35).

Os microrganismos presentes na cavidade oral formam dois tipos de biofilme nas superfícies dentárias: a placa sub-gengival e a placa supra-gengival, as quais diferem significativamente entre si quanto à composição da microbiota bacteriana. A placa supragengival é composta por bactérias Gram-positivas, incluindo *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus salivarius*, *Lactobacillus*, dentre outros, enquanto na placa subgengival predominam bactérias Gram-negativas, tais como *Actinobacillus*, *Fusobacterium nucleatum* e *Porphyromonas gingivalis* (36-38). Enquanto a placa supragengival é responsável pelas lesões cariosas, o microbioma subgengival está associado a gengivite e doenças periodontais (39).

Marsh e Bradshaw (40) descrevem o processo de desenvolvimento do biofilme maduro da seguinte forma:

- 1- formação da película adquirida na superfície dental;
- 2- adesão de bactérias pioneiras à película adquirida;
- 3- formação de microcolônias embebidas em material extracelular como polissacarídeos extracelulares solúveis e insolúveis;
- 4- coadesão de colonizadores secundários aos colonizadores pioneiros;
- 5- crescimento e maturação do biofilme.

A matriz formada por polissacarídeos extracelulares influencia as propriedades químicas e físicas do biofilme, tornando-o mais ou menos virulento, promovendo adesão e coadesão de microrganismos, atuando como reservatório de energia, protegendo os microrganismos da influência de antimicrobianos, afetando a difusão de substâncias que perfluem o biofilme e ajudando a concentrar íons ou outros nutrientes fisiológicos no microambiente (41).

As propriedades cariogênicas dos microrganismos na cavidade bucal estão associadas a sua habilidade de formar biofilmes na superfície dental, tolerar mudanças no pH e produzir ácidos a partir do metabolismo de carboidratos (42). *Streptococcus mutans* é considerado o agente etiológico primário da cárie dental e possui atributos de virulência que permitem suas sobrevivência e seleção justamente nas situações ambientais críticas para a maioria das outras espécies (41).

Outro microrganismo envolvido neste processo é o *Streptococcus sobrinus*, sendo que alguns estudos epidemiológicos e *in vitro* sugerem que ele seja até mais acidogênico que o *S. mutans* (43-46). Estudos clínicos apontam que a colonização elevada por *S. sobrinus* foi associada à atividade de cárie agressiva em crianças (47, 48). Okada et al. (49), por sua vez, indicaram através de estudo longitudinal que crianças com presença de ambas as espécies bacterianas apresentavam uma incidência de cárie maior que aquelas positivas apenas para *S. mutans*. Já Saraithong et al. (50) verificaram em seu estudo uma correlação positiva entre a formação de cárie em crianças e os níveis de *S. sobrinus* presentes em amostras de placa dental, e apontam que tanto *S. mutans* quanto *S. sobrinus* apresentam cariogenicidade elevada.

Neste contexto, é sabido que uma dieta rica em sacarose apresenta um papel crucial na patogenicidade da cárie dental (51, 52). O principal fator responsável pela cariogenicidade da sacarose é o fato deste carboidrato servir de substrato para a síntese bacteriana da matriz de polímeros extracelulares (53), a qual além de permitir um crescimento microbiano contínuo, foi associada a um aumento na atividade de cárie (54). Além disso, os ácidos resultantes da metabolização da sacarose pelas bactérias presentes na placa dental mantém o pH baixo, causando a desmineralização do esmalte (29).

O amido também é uma importante fonte de carboidratos fermentáveis, a qual é consumida de maneira simultânea ou intercalada com a sacarose (55). Enquanto o amido é considerado não cariogênico ou pouco cariogênico quando utilizado como única fonte de carboidratos, a combinação entre amido e sacarose é considerada muito cariogênica (53). O potencial cariogênico desta combinação pode ser devido à alteração na composição e estrutura da matriz polissacarídica, bem como um aumento na acidogenicidade do biofilme dental formado por *S. mutans* (56, 57). Entretanto, alguns estudos questionam este aumento do potencial cariogênico. Thurnheer et al. (58) demonstraram que a associação da sacarose com amido não foi mais acidogênica que a utilização apenas de sacarose. Da mesma forma, Aires et al. (59) apontaram através de estudo *in situ* que a combinação de amido com sacarose não foi mais cariogênica à dentina que a sacarose como única fonte de carboidrato.

A complexidade do meio bucal e as questões éticas associadas a estudos *in vivo* levaram ao desenvolvimento de modelos laboratoriais para o desenvolvimento da doença cárie, que simulam o ambiente bucal *in vitro* através de métodos químicos ou microbiológicos (60).

No método químico são utilizados ácidos, geralmente acético ou láctico, para a desmineralização dos tecidos dentais (61) e soluções remineralizadoras contendo cálcio e fosfato (62). Já o método microbiológico emprega cepas de microrganismos de cariogenicidade previamente conhecida para que o produto ácido do metabolismo destes desmineralize a estrutura dental (62). O método microbiológico permite a comparação do potencial cariogênico de diferentes espécies bacterianas, além de possibilitar a investigação da etiologia, do modo de prevenção das lesões cariosas e da cariogenicidade das dietas.

Muitos estudos disponíveis na literatura empregam o método bacteriano de indução de cárie *in vitro* utilizando-se de apenas um tipo de microrganismo (monobiofilme). De acordo com Espejo (63), no estudo de Dummer et al. (64) foi utilizada uma técnica de banhos sequenciais para a desmineralização de esmalte humano utilizando-se uma cultura de *S. mutans* NCTC 10832 em meio enriquecido com sacarose. As trocas do meio de cultura foram feitas a cada 24 horas durante períodos entre 7 e 26 dias. Os espécimes foram seccionados e tiveram sua espessura reduzida a 80 µm para observação sob microscopia de luz polarizada. Concluiu-se que esta metodologia foi capaz de desenvolver lesões de cárie em esmalte com histologia similar à observada *in vivo*, com a presença de camada superficial, corpo da lesão, zona escura e zona translúcida.

Clarkson (65), por sua vez, desenvolveu *in vitro* lesões de cárie de esmalte e dentina utilizando *S. mutans* e meio de cultura enriquecido com dextrose e uma gelatina com cálcio, fosfato e flúor e as trocas foram realizadas a cada 48 horas. Em esmalte, foi possível desenvolver cárie subsuperficial com características histológicas similares às encontradas *in vivo*. Já em dentina, as lesões formadas foram similares à cárie radicular natural.

Já Gama-Teixeira et al. (66) modificaram a metodologia proposta por Dummer et al. (64) alterando o período de incubação e o meio de cultura utilizado. Seu objetivo foi avaliar *in vitro* o potencial dos materiais restauradores na inibição de cáries secundárias. O desafio cariogênico utilizou *S. mutans* ATCC 25175 em

meio TSB enriquecido com 5% de sacarose durante 30 dias. Na análise através de microscopia de luz polarizada foi observada a formação de cárie secundária ao redor de todos os materiais restauradores investigados.

Azevedo et al. (23) avaliaram o grau de desmineralização da dentina humana afetada por cárie produzida através do método microbiológico. Utilizou-se *S. mutans* ATCC 25175 em meio TSB enriquecido com 5% de sacarose durante 7, 14 e 21 dias. Os autores concluíram que o período de 7 dias de desafio é suficiente para se produzir dentina afetada por cárie, e o sistema de tomografia por coerência óptica (OCT) foi um método eficiente e não destrutivo para se verificar a profundidade de desmineralização do tecido cariado.

Entretanto, fez-se necessária a análise das áreas desmineralizadas através de outros métodos de diagnóstico de cárie mais usuais, para permitir a reprodutibilidade dos resultados obtidos em outros laboratórios de pesquisa que não dispõe desta tecnologia.

Por este motivo, outro estudo do mesmo grupo de pesquisa (67) se propôs a validar um protocolo para obtenção de dentina afetada por cárie, através do processo *in vitro* de desmineralização de dentina humana induzida por biofilme de *S. mutans* UA 159. A validação do protocolo foi realizada através de diferentes métodos diagnósticos: inspeção visual, radiografia digital, fluorescência a laser e OCT. Todos os métodos testados foram efetivos em diferenciar o substrato hígido do afetado por cárie produzido artificialmente, em todos os tempos de desmineralização testados (7, 14 e 21 dias), e verificou-se que dentina afetada por cárie pode ser obtida artificialmente com o método microbiológico realizado por 7 dias em dentes inclusos.

Porém, a utilização de apenas uma espécie bacteriana para o desenvolvimento de cárie *in vitro* apresenta a desvantagem de não levar em consideração as interações que podem acontecer entre os microrganismos durante a formação do biofilme (68). Deste modo, desafios cariogênicos contendo mais de uma espécie bacteriana são relevantes para se estudar a cárie em esmalte e dentina, e podem utilizar tanto biofilmes de multiespécies definidas quanto microsoma, sendo que este último é obtido *in vivo* a partir da microbiota natural oral (69, 70). O microsoma permite o desenvolvimento de lesões cariosas sob um meio microbiológico heterogêneo. Porém, apesar de ser um modelo *in vitro*

bastante realista, os efeitos das variações individuais que podem ocorrer na obtenção do inóculo quanto à composição do biofilme e de seu potencial cariogênico ainda estão em debate (71-73).

Neste contexto, apesar de ser mais simples e não apresentar uma ecologia microbiana tão complexa quanto o protocolo de microsoma, o biofilme de multiespécies definidas permite o desenvolvimento de lesões cariosas num ambiente microbiano com menor variabilidade (68). Esta metodologia foi empregada no trabalho de Arthur et al. (68), em que os microrganismos *Lactobacillus casei*, *Streptococcus mutans*, *S. salivarius* e *S. sanguinis* foram utilizados para a produção de cárie em esmalte variando as concentrações de sacarose (0.5 e 1,0%), flúor (0.4, 0.8 e 1.0 ppm F) e cálcio (1.0 e 2.0 mM de Ca). Os resultados sugeriram que a cultura mista foi capaz de mostrar níveis diferentes de inibição de cárie de acordo com as concentrações de flúor e de cálcio. A concentração de sacarose, por sua vez, influenciou o desenvolvimento de cárie apenas no meio com menor percentual de flúor.

Para o tratamento de uma lesão cariosa previamente à cavitação, busca-se seguir os preceitos da Odontologia Minimamente Invasiva (74). A intervenção mínima concentra-se nas opções menos invasivas possíveis a fim de minimizar a perda de tecido e o desconforto do paciente.

Para o tratamento das lesões incipientes de cárie, o primeiro passo é controlar os fatores etiológicos desta doença, tais como diminuir a quantidade de placa bacteriana e modificar a dieta (1). Entretanto, algumas lesões não são passíveis de remineralizar apenas com a remoção dos fatores etiológicos. Nestes casos, é necessário o uso de um agente que permita a remineralização, tal como o fluoreto (1, 75).

O pH crítico para a dissolução da hidroxiapatita é de 5,5 (76). Quando existe a ação do flúor, forma-se a fluorhidroxiapatita, cujo pH crítico para dissolução é 4,5. Neste caso, a hidroxiapatita da sub-superfície é dissolvida, enquanto a fluorhidroxiapatita forma uma camada superficial mais resistente que retarda a difusão dos agentes desmineralizantes através da estrutura dental (32, 77).

No caso de aplicações tópicas de flúor, o fluoreto em contato com a superfície do esmalte forma o fluoreto de cálcio (CaF_2), que atua como um reservatório dos íons Ca e F. No caso de queda do pH, esse composto se dissocia e

ocorre a liberação dos íons Ca e F, que se adsorvem à superfície dos cristais formando um composto semelhante à fluorapatita, porém sem carbonato em sua composição, que torna o esmalte mais resistente a futuros desafios ácidos (33, 78, 79).

A disposição de íons fluoreto de maneira contínua e em níveis baixos no meio bucal auxilia na prevenção de lesões cariosas e na remineralização do esmalte que sofreu a ação dos ácidos provenientes do metabolismo bacteriano (80, 81).

O flúor pode se apresentar sob a forma de vernizes, soluções, géis e mousses (82). Pelo fato de prolongarem o tempo de contato entre o agente fluoretado e o dente, os vernizes aumentam a incorporação de fluoreto na superfície dental (83). Além disso, por serem utilizados em quantidades menores que os demais agentes fluoretados, os vernizes são mais seguros em relação a toxicidade, pois há menor absorção no trato gastrointestinal (84).

Existem outras estratégias que também utilizam de mecanismo químico para a remineralização das lesões cariosas, tais como: goma arábica (85), produtos contendo CPP-ACP (86-88), xilitol (86, 88), a associação de fluoretos com zinco (75) e nanocristais de hidroxiapatita (88).

Atualmente, existe a proposta de uma estratégia baseada em agente mecânico para evitar a progressão de lesões iniciais em esmalte previamente à cavitação (10, 11). Neste caso, utiliza-se um agente resinoso capaz de infiltrar o tecido dentário com a finalidade de preencher os poros do esmalte afetado pela cárie e assim reduzir a passagem dos ácidos produzidos pelo metabolismo bacteriano, estacionando a lesão. A introdução de um componente resinoso a base de TEGDMA no agente infiltrante foi capaz de aumentar sua molhabilidade, permitindo a penetração até os poros mais internos (9-11). Além disso, ao preencher os poros do esmalte, o índice de refração daquela área volta a se assemelhar a do esmalte hígido, o que contribui esteticamente por mascarar as lesões de mancha branca (89, 90).

O uso de infiltrantes tem sido proposto, mas ainda não se apresenta como uma alternativa difundida entre os profissionais. A literatura demonstra que a utilização destes agentes foi favorável para se limitar a lesão de cárie em esmalte (9, 10).

Entretanto, Freitas (74) avaliou o efeito do infiltrante resinoso sobre lesões cariosas artificiais e a eficiência deste tratamento após novo desafio ácido por modelos experimentais *in vitro* e *in situ*. Verificou-se que o infiltrante foi capaz de reequilibrar parcialmente a dureza interna, porém sua resistência após o novo desafio ácido apresentou-se limitada. Portanto, estudos utilizando este material ainda são necessários.

Assim, acreditamos que para estudar infiltrantes de forma mais ágil, o uso de substrato modificado artificialmente é fundamental. Contudo, para que o substrato produzido possa ser utilizado em pesquisas futuras, o método para identificação da desmineralização em profundidade não deve ser destrutivo.

Para se determinar a profundidade de desmineralização do esmalte dental vários estudos utilizam a técnica de Microscopia de Luz Polarizada (MLP)(20-22). A luz polarizada é criada pela passagem de luz através de um filtro de polarização, causando a oscilação do campo elétrico num único plano. Existem dois filtros de polarização no microscópio de polarização - acima e abaixo da amostra (o polarizador e o analisador). A forma na qual os materiais interagem com a luz polarizada pode fornecer informações a respeito de sua estrutura e composição. Colocando-se um material isotrópico (apenas um índice de refração) na platina do microscópio nada será visto, porque a polarização da luz não foi dividida pelo objeto. Porém, se for colocado um material anisotrópico ou birrefringente (dois índices de refração) tal como o esmalte dental na platina, uma imagem luminosa aparecerá em fundo escuro (91). Já as lesões cariosas modificam a polarização gerando uma imagem com maior contraste em relação ao tecido hígido (92). Entretanto, trata-se de uma técnica destrutiva e com elevada dificuldade de execução, já que os espécimes devem ser cortados em fatias extremamente finas, o que eventualmente leva à destruição das lesões mais frágeis (93).

A Tomografia por Coerência Óptica (OCT – Optical Coherence Tomography), por sua vez, caracteriza-se por ser uma técnica não -invasiva e não -ionizante que fornece imagens seccionais de alta resolução de estruturas espalhadoras de luz, em tempo real. Baseada em princípios de interferometria de baixa coerência, é em muitos aspectos semelhante à técnica de ultrassom, mas utiliza luz ao invés de ondas acústicas (94, 95), e pode atingir uma resolução espacial até 10 vezes maior (96).

A profundidade da amostra avaliada pelo OCT varia de 1 a 3 mm para a maioria dos tecidos biológicos, pois devido à natureza destes tecidos, como coeficiente de espalhamento, coeficiente de absorção e suas dependências com o comprimento de onda, a quantidade de luz retroespalhada é insuficiente para ser detectada em profundidades maiores que as descritas (97).

Um método para avaliar quantitativamente a perda mineral de um dente não terá utilidade se não houver um completo conhecimento das propriedades ópticas do esmalte e da dentina, como refletividade, espalhamento e interação luz-tecido (62, 98). Devido a características estruturais diferentes, o esmalte e a dentina apresentam comportamento distinto frente a sua visualização no OCT. As imagens de esmalte geralmente têm informações mais ricas e uma maior profundidade de análise, enquanto as imagens em dentina geralmente têm um perfil de menor profundidade. Esta característica tem sido atribuída pelo maior coeficiente de dispersão da dentina. No entanto, apesar destas diferenças, o OCT tem capacidade de ser utilizado na pesquisa odontológica e no diagnóstico de cárie, uma vez que lesões cariosas apresentam maior contraste quando comparado ao tecido hígido (98).

Diversos estudos utilizam a técnica do OCT para analisar lesões artificiais de cáries em esmalte e dentina avaliando sua profundidade de desmineralização (23, 99-101). Os bons resultados obtidos através dessa técnica mostram sua aplicação promissora e sua futura utilização *in vivo* no monitoramento de lesões de cárie. Além disso, apresenta como vantagem o fato de não ser destrutiva, possibilitando a utilização do substrato cariado em outros estudos(23).

3 PROPOSIÇÃO

A proposta deste estudo foi otimizar o método microbiológico para a produção de lesão de mancha branca em esmalte que possa ser validada por ensaio não destrutivo (tomografia por coerência óptica – OCT), possibilitando a utilização posterior dos espécimes em outros experimentos.

3.1 Objetivos específicos

- Testar a participação do microrganismo e da fonte de carboidrato na formação das lesões de mancha branca no esmalte, ao longo do tempo;
- Validar o ensaio não destrutivo comparando a profundidade de desmineralização obtida através de OCT e microscopia de luz polarizada.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Aspectos Éticos

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo mediante o parecer de aprovação número 013/2015 (Anexo A).

4.2 Desenho experimental

O desenho experimental foi organizado conforme descrito no quadro 4.1.

Quadro 4.1 - Desenho experimental

Unidade experimental	168 fragmentos de esmalte dentário bovino
Fatores de variação	1- Microrganismos 3 níveis: <ul style="list-style-type: none"> • Bactéria 1 (<i>S. mutans</i>); • Bactéria 2 (<i>S. sobrinus</i>); e • Bactéria 1 + Bactéria 2 (Cultura mista).
	2- Fonte de carboidrato 2 níveis: <ul style="list-style-type: none"> • Sacarose • Sacarose + amido
	3- Tempo de desafio cariogênico 7 níveis: 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 dias
Variáveis de resposta	<ul style="list-style-type: none"> • Leituras através de OCT realizadas em cada um dos tempos de desafio cariogênico • Leituras através de microscopia de luz polarizada realizadas em cada um dos tempos de desafio cariogênico • Avaliação de diferenças na formação dos biofilmes entre as amostras • Aferição do pH do meio descartado dos grupos experimentais ao longo do tempo

4.3 Avaliação da biomassa

As cepas de *S. mutans* UA 159 e *S. sobrinus* ATCC 33478 foram cultivadas em Tryptic Soy Agar (TSA, Difco, Detroit, MI, USA) a 37°C por 24 h em câmara de CO₂. Colônias provenientes de uma placa de cultivo foram transferidas a 20 ml de TSB pré-aquecido e pré-reduzido na câmara de CO₂ até o crescimento final de DO₆₀₀=1,0 verificada em espectrofotômetro Biophotometer (Eppendorf do Brasil, São Paulo, SP, Brazil). As culturas foram então centrifugadas a 5000 *g* durante 5 minutos e ressuspensas em Biofilm Medium (Difco, Detroit, MI, USA) na DO₆₀₀=1,6 (cerca de 2x10¹⁰ ufc/ml).

Os biofilmes foram montados em placas de cultura celular de 48 poços contendo BM acrescido de 1% de sacarose e 1% de sacarose com 1% de amido. Para a avaliação dos monobiofilmes, alíquotas de 250 µl das suspensões padronizadas de *S. mutans* e *S. sobrinus* foram depositadas nos poços e acrescidas de 250 µl correspondentes aos meios contendo distintas fontes de carbono. Para a avaliação dos biofilmes mistos, a quantidade de inóculo padronizado de cada cepa depositado em cada poço foi de 125 µl, totalizando 500 µl. Os ensaios foram realizados em quintuplicata e desenvolvidos em câmara de CO₂ em 7 diferentes tempos (1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 dias).

Para a avaliação da biomassa, o meio de cultura foi removido e a coloração do biofilme foi realizada com 100 µl de safranina a 0,4% durante 15 min a temperatura ambiente. As placas foram então lavadas três vezes por imersão em água destilada. Em seguida, a descoloração do biofilme foi realizada com 200 µl de etanol a 95% por 15 min. Após esse período, três alíquotas de 50 µl da solução de etanol de cada poço foram transferidas para poços de placa de 96 poços e a absorbância a 490 nm (A490) foi verificada em leitor de placas (Microplate Reader Model 680, Biorad, Foster City, California, EUA). Desse modo, foram obtidas três leituras de cada poço, totalizando quinze leituras para cada experimento.

4.4 Obtenção dos dentes e preparo dos espécimes

Cem incisivos centrais bovinos foram submetidos a profilaxia com pedrapomes e água com o auxílio de uma escova de Robinson em baixa rotação, e observados em uma Lupa Estereoscópica com uma lente de aumento de 40 vezes com o objetivo de verificar a existência de defeitos, trincas e imperfeições no esmalte. As coroas foram seccionadas através de disco diamantado montado em peça de mão (Kavo Ind. e Com. Ltda., Joinville, Santa Catarina, Brazil) e das superfícies vestibulares foram obtidos 02 fragmentos retangulares de esmalte com dimensões aproximadas de 4,0 mm de comprimento e 6,0 mm de largura. O esmalte superficial dos fragmentos foi desgastado através de lixas de Al_3O_4 de granulação 800.

Em seguida, duas camadas de verniz ácido-resistente foram aplicadas na superfície de cada fragmento de esmalte, ficando exposta uma janela central 3,0 mm de comprimento x 3,0 mm de largura, para delimitação da área de desmineralização. Os 168 fragmentos dentários foram alocados aleatoriamente em 6 grupos experimentais (n=4), conforme tabela 4.1.

Tabela 4.1 – Divisão dos grupos experimentais

Grupo	Microrganismo	Fonte de carboidrato
G1	<i>S. mutans</i>	Sacarose 1%
G2	<i>S. mutans</i>	Sacarose 1% + amido 1%
G3	<i>S. sobrinus</i>	Sacarose 1%
G4	<i>S. sobrinus</i>	Sacarose 1% + amido 1%
G5	<i>S. mutans</i> + <i>S. sobrinus</i>	Sacarose 1%
G6	<i>S. mutans</i> + <i>S. sobrinus</i>	Sacarose 1% + amido 1%

4.5 Preparo e montagem dos espécimes para o desafio cariogênico

Os fragmentos foram presos com resina acrílica em fios de aço montando-se estruturas denominadas “árvores”. A finalidade desta estrutura é permitir que os espécimes fiquem fixados à tampa de um recipiente e submersos no mesmo meio de cultura numa altura similar, sem estarem em contato uns com os outros ou com a parede do recipiente. Além disso, esta disposição mantém os espécimes imóveis, preservando a placa dental formada em torno deles durante as trocas de meio de cultura (23).

Como foram testados 7 tempos de desafio cariogênico (1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 dias) em 6 grupos experimentais (G1, G2, G3, G4, G5 e G6) foram constituídas 42 “árvores” as quais foram fixadas às tampas dos tubos tipo falcon de 50ml utilizados durante o desafio cariogênico e imersas em 25 ml de água destilada. A amostra foi submetida à radiação Gama (dose de 25 Kgy), capaz de esterilizá-la sem prejudicar os tecidos dentais ou desidratá-los.

4.6 Fase microbiológica

4.6.1 Microrganismos e condições de cultivo

O desafio cariogênico foi realizado com *Streptococcus mutans* UA159, cepa com cariogenicidade previamente conhecida (42), e *Streptococcus sobrinus* ATCC 33478. Para o desafio cariogênico foram utilizados TSB e TSA.

4.6.2 Padronização dos inóculos bacterianos

Placas contendo TSA foram semeadas através da técnica de esgotamento utilizando uma alíquota dos estoques congelados de ambas as espécies, e foram incubadas por 16 horas em câmara de CO₂.

A partir das colônias desenvolvidas em meio sólido foram obtidas culturas puras de cada espécie em TSB. A densidade óptica dos caldos foi inicialmente ajustada em 0,3 a 600 nm (DO₆₀₀=0,3) e as culturas foram cultivadas em câmara CO₂ até atingir o valor de 0,8 de densidade óptica a 600 nm (DO₆₀₀=0,8).

Diluições decimais foram realizadas de 10⁻¹ a 10⁻⁸. Das três últimas diluições foram inoculados 25 µl em triplicata sobre placas contendo TSA. As placas foram incubadas a 37°C em câmara de CO₂ e o número de unidades formadoras de colônias (ufc) de *S. mutans* e *S. sobrinus* por mililitro foi determinado após 48 horas de incubação, de modo a conter cerca de 1 x 10¹⁰ ufc/ml.

4.6.3 Desafio cariogênico

Para o desafio cariogênico, 250 µl do caldo inóculo de *S. mutans* ou *S. sobrinus* foram transferidos para o tubo tipo falcon contendo 25 ml de TSB enriquecido conforme grupo experimental (Tabela 4.1). Nos grupos em que foi realizada cultura mista, foram transferidos 125 µl do caldo inóculo de *S. mutans* e 125 µl do inóculo de *S. sobrinus*. As árvores foram transferidas para os frascos contendo os meios de cultura semeados.

A cada 24 horas, as árvores foram transferidas para um novo meio de cultura acrescido de 250 µl do tubo anterior. O processo de indução de cárie foi realizado durante períodos de 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 dias.

Durante este período foram realizados testes para verificar a ausência de contaminação. Todos os dias o caldo foi semeado utilizando-se a técnica de

esgotamento em uma placa contendo TSA, que permaneceu incubada a 37°C por 48 horas. Além disso, o pH final foi aferido antes do meio ser descartado.

4.7 Análise através da Tomografia por Coerência Óptica (OCT)

Finalizado cada um dos períodos do desafio cariogênico, os espécimes foram removidos dos fios de aço ao qual estavam presos com auxílio de alicate de corte. A placa aderida à superfície foi removida cuidadosamente com gaze e os espécimes foram lavados com água deionizada. O verniz ácido-resistente que delimitava a área de desmineralização foi removido com acetona. Cada espécime foi armazenado individualmente em água destilada em temperatura de 4°C até o início dos métodos de análise.

Utilizou-se um sistema de OCT (OCP930SR, Thorlabs Inc., New Jersey, USA) disponível no laboratório de Tomografia Óptica do Centro de Lasers e Aplicações – IPEN-CNEN/SP) composto por um led superluminescente operando em 930 nm com resolução no ar, lateral e longitudinal de 6,0 µm. O sistema dispõe de uma ponta em fibra óptica capaz de alcançar os espécimes facilmente, sem a necessidade de contato entre eles. A luz conduzida pela fibra óptica é dividida em dois feixes, um enviado para o espelho de referência e o outro levado até o espécime, possibilitando a formação de 4 imagens por segundo em tempo real (2000 X 512 pixels; equivalente a largura X altura de 6000 X 1581 µm²).

Foi adquirida uma imagem da região central da janela de desmineralização de cada espécime, que abrangia tanto a área exposta ao desafio cariogênico bem como o substrato hígido. As imagens obtidas em escala nos diferentes tempos de desafio cariogênico (1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 dias) pelo OCT em cada um dos grupos foram analisadas comparativamente quanto à profundidade da desmineralização.

A profundidade de desmineralização foi medida através do software Image J (National Institute of Mental Health- Bethesda, MD, EUA), fornecendo valores em µm. Em cada imagem foram realizadas 5 mensurações da região desmineralizada. Os valores obtidos geraram um valor médio de profundidade de desmineralização

para cada espécime, sendo este o valor final a ser utilizado para posterior análise estatística.

4.8 Microscopia de Luz Polarizada

Cortes transversais nas regiões de mancha branca foram realizados utilizando-se disco diamantado dupla face (n°11-4224 série 15 HC), em baixa rotação, acoplado a uma máquina de corte de alta precisão (Isomet 1000, Buehler, Illinois, USA), sob refrigeração à água. As secções foram submetidas a desgaste com jig de lapidação e lixas de Al_2O_3 de granulação decrescente (de 320 a 1200) até uma espessura final de aproximadamente 100 μm . A amostra foi mantida em azida sódica para evitar a contaminação por fungos.

Os espécimes foram montados em lâminas embebidos em água e submetidos à análise através de microscópio de luz polarizada (Zeiss Axiophot imager. A1, Oberkochen, Germany), acoplado a uma câmera digital (Zeiss AxioCam HRc, Oberkochen, Germany). Foram realizadas 5 mensurações de profundidade da região desmineralizada. Os valores obtidos geraram um valor médio de profundidade de desmineralização para cada espécime, sendo este o valor final a ser utilizado para posterior análise estatística.

4.9 Análise dos resultados

Os resultados foram submetidos a testes de normalidade e homogeneidade para a escolha do teste estatístico adequado. Comparações múltiplas foram feitas para verificar possíveis diferenças entre os grupos, e o nível de significância utilizado foi de 5 %.

5 RESULTADOS

Para a análise dos resultados de profundidade de desmineralização foi utilizado um modelo de Análise de Variância (ANOVA), com 3 fatores fixos: microrganismo, com 3 níveis [*S. mutans* (UA), *S. sobrinus* (S) e cultura mista (UA+S)], fonte de carboidrato, com 2 níveis [sacarose (SA) e sacarose + amido (S+A)] e tempo de desafio cariogênico, com 7 níveis (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 dias). Comparações múltiplas foram realizadas com o teste de Tukey, utilizando o software estatístico Minitab, versão 16.1 ($p < 0,05$).

5.1 Avaliação da profundidade de desmineralização a partir de imagens de OCT

De acordo com a Análise de Variância (ANOVA), os fatores principais microrganismo ($p=0,000$), fonte de carboidrato ($p=0,000$) e tempo de desafio cariogênico ($p=0,000$), bem como as interações duplas fonte de carboidrato vs. tempo de desafio cariogênico ($p=0,043$) e microrganismo vs. tempo de desafio cariogênico ($p=0,001$) e a interação tripla microrganismo vs. fonte de carboidrato vs. tempo de desafio cariogênico ($p=0,000$) foram estatisticamente significantes. Apenas a interação dupla microrganismo vs. fonte de carboidrato ($p=0,160$) não apresentou diferença estatisticamente significativa.

As medidas resumo para os grupos experimentais (média e desvio padrão) estão apresentadas nas tabelas 5.1, 5.2 e 5.3.

Tabela 5.1 - Medidas resumo (média $\pm$ desvio padrão) para valores (em micrômetros) de profundidade de desmineralização para o microrganismo UA, obtidas em OCT

Microrganismos	Fonte de carboidrato	Tempo de desafio cariogênico						
		1	2	3	4	5	6	7
UA	SAC	73,8 $\pm$ 13,3 Aa	95,6 $\pm$ 5,0 ABab	114,9 $\pm$ 18,1 Bb	125,5 $\pm$ 7,7 Bb	146,0 $\pm$ 15,6 BCa	170,8 $\pm$ 13,4 Cab	182,7 $\pm$ 5,1 Ca
	SAC + A	103,4 $\pm$ 5,6 Aa	120,6 $\pm$ 18,8 ABa	131,0 $\pm$ 15 ABab	154,0 $\pm$ 13,3 Bab	155,7 $\pm$ 5,4 Ba	143,8 $\pm$ 35,0 Bb	196,5 $\pm$ 11,0 Ca

*Médias que não compartilham da mesma letra são estatisticamente diferentes. As letras maiúsculas representam significância na linha. As letras minúsculas representam significância na coluna.

Ao analisar a profundidade de desmineralização para o microrganismo UA, observa-se que a fonte de carboidrato sacarose induz desmineralização que aumenta de forma significativa a partir do terceiro dia, e ainda mais a partir do sexto dia. Para a associação de fontes de carboidrato sacarose + amido, por sua vez, a desmineralização atingiu seu ponto máximo apenas no sétimo dia.

Tabela 5.2 - Medidas resumo (média $\pm$ desvio padrão) para valores (em micrômetros) de profundidade de desmineralização para o microrganismo S, obtidas em OCT

Microrganismos	Fonte de carboidrato	Tempo de desafio cariogênico						
		1	2	3	4	5	6	7
S	SAC	90,2 $\pm$ 8,2 Aa	115,0 $\pm$ 15,6 ABa	156,6 $\pm$ 9,2 BCa	142,1 $\pm$ 15,8 CDab	164,6 $\pm$ 18,8 CDa	181,5 $\pm$ 7,5 CDab	186,2 $\pm$ 25,8 Da
	SAC + A	84,2 $\pm$ 3,4 Aa	130,7 $\pm$ 6,5 BCa	117,6 $\pm$ 5,9 ABb	167,0 $\pm$ 13 CDa	172,2 $\pm$ 12,2 Da	197,5 $\pm$ 14,5 Da	194,7 $\pm$ 11,8 Da

*Médias que não compartilham da mesma letra são estatisticamente diferentes. As letras maiúsculas representam significância na linha. As letras minúsculas representam significância na coluna.

Ao analisar a profundidade de desmineralização quando o microrganismo S é suplementado por sacarose, a desmineralização atinge seu ponto máximo aos 7 dias. Contudo, quando este microrganismo é suplementado pela associação sacarose + amido, a desmineralização atinge seu ponto máximo aos 5 dias.

Tabela 5.3 - Medidas resumo (média $\pm$ desvio padrão) para valores (em micrômetros) de profundidade de desmineralização para a associação de microrganismos UA + S, obtidas em OCT

Microrganismos	Fonte de carboidrato	Tempo de desafio cariogênico						
		1	2	3	4	5	6	7
UA + S	SAC	71,0 $\pm$ 14,9 Aa	81,4 $\pm$ 2,0 ABab	117,5 $\pm$ 7,3 BCb	124,6 $\pm$ 2,7 Cb	143,6 $\pm$ 18,0 CDa	153,0 $\pm$ 15,8 CDB	177,2 $\pm$ 11,3 Da
	SAC + A	85,6 $\pm$ 17,7 Aa	74,9 $\pm$ 2,1 Ab	128,9 $\pm$ 2,6 Bab	139,0 $\pm$ 10,1 BCab	159,8 $\pm$ 8,3 BCa	177,0 $\pm$ 12,8 Cab	173,3 $\pm$ 15,2 Ca

*Médias que não compartilham da mesma letra são estatisticamente diferentes. As letras maiúsculas representam significância na linha. As letras minúsculas representam significância na coluna.

Quando a associação de microrganismos UA+S é suplementada por sacarose observa-se que a desmineralização ocorre de forma mais lenta, atingindo seu ponto máximo aos 7 dias, enquanto para a associação com amido atinge o ponto máximo já aos 6 dias.

5.2. Avaliação da profundidade de desmineralização a partir de imagens de luz polarizada

De acordo com a Análise de Variância (ANOVA), os fatores principais tempo de desafio cariogênico ($p=0,000$), microrganismo ($p=0,000$) e as interações duplas

fonte de carboidrato vs. microrganismo ($p=0,003$), microrganismo vs. tempo de desafio cariogênico ($p=0,001$) e fonte de carboidrato vs. tempo de desafio cariogênico ($p=0,014$) foram estatisticamente significantes. Contudo, o fator principal fonte de carboidrato ($p=0,530$), bem como a interação tripla microrganismo vs. fonte de carboidrato vs. tempo de desafio cariogênico ($p=0,352$) não foram estatisticamente significantes.

As medidas resumo para os grupos experimentais (média e desvio padrão) estão apresentadas nas tabelas 5.4, 5.5 e 5.6.

Tabela 5.4 - Medidas resumo (média $\pm$ desvio padrão) para valores (em micrômetros) de profundidade de desmineralização para o microrganismo UA, obtidas em microscopia de luz polarizada

Microrganismos	Fonte de carboidrato	Tempo de desafio cariogênico						
		1	2	3	4	5	6	7
UA	SAC	85,7 $\pm$ 13,68 Aa	107,96 $\pm$ 14,26 ABab	116,62 $\pm$ 13,04 ABa	140,70 $\pm$ 17,34 Ba	137,36 $\pm$ 14,63 ABa	190,6 $\pm$ 20,0 Cab	205,48 $\pm$ 9,13 Ca
	SAC + A	109,92 $\pm$ 17,48 Aa	119,36 $\pm$ 15,74 ABb	124,16 $\pm$ 15,42 ABa	165,1 $\pm$ 24,6 BCa	167,06 $\pm$ 12,23 BCa	156,0 $\pm$ 23,2 ABCa	201,6 $\pm$ 22,9 Ca

*Médias que não compartilham da mesma letra são estatisticamente diferentes. As letras maiúsculas representam significância na linha. As letras minúsculas representam significância na coluna.

Ao analisar a profundidade de desmineralização para o microrganismo UA, observa-se que a fonte de carboidrato sacarose induz desmineralização que aumenta de forma significativa a partir do sexto dia. Já para a associação de fontes de carboidrato sacarose + amido, a desmineralização atinge seu ponto máximo no sétimo dia.

Tabela 5.5 - Medidas resumo (média $\pm$ desvio padrão) para valores (em micrômetros) de profundidade de desmineralização para o microrganismo S, obtidas em microscopia de luz polarizada

Microrganismos	Fonte de carboidrato	Tempo de desafio cariogênico						
		1	2	3	4	5	6	7
S	SAC	74,7 $\pm$ 30,6 Aa	94,42 $\pm$ 6,80 ABab	139,8 $\pm$ 27,5 Ba	166,00 $\pm$ 6,3 7 BCa	171,9 $\pm$ 23,0 BCa	196,3 $\pm$ 22,5 Cab	216,9 $\pm$ 35,0 Ca
	SAC + A	92,40 $\pm$ 6,5 Aa	126,71 $\pm$ 14,60 Ab	137,94 $\pm$ 13,25 ABa	164,51 $\pm$ 13,83 BCa	179,9 $\pm$ 32,6 BCa	211,5 $\pm$ 35,4 Cb	212,1 $\pm$ 23,7 Ca

*Médias que não compartilham da mesma letra são estatisticamente diferentes. As letras maiúsculas representam significância na linha. As letras minúsculas representam significância na coluna.

Analisando a profundidade de desmineralização quando o microrganismo S é suplementado por ambas as fontes de carboidrato testadas observa-se que a desmineralização atinge seu ponto máximo aos 6 dias.

Tabela 5.6 - Medidas resumo (média $\pm$ desvio padrão) para valores (em micrômetros) de profundidade de desmineralização para a associação de microrganismos UA + S, obtidas em microscopia de luz polarizada

Microrganismos	Fonte de carboidrato	Tempo de desafio cariogênico						
		1	2	3	4	5	6	7
UA + S	SAC	71,42 $\pm$ 6,5 1 Aa	79,22 $\pm$ 6,40 ABab	131,3 $\pm$ 20,1 BCa	139,28 $\pm$ 14,92 Ca	154,67 $\pm$ 16,06 Ca	206,0 $\pm$ 22,8 Dab	210,8 $\pm$ 24,4 Da
	SAC + A	77,72 $\pm$ 15,68 Aa	65,93 $\pm$ 6,32 Aa	117,86 $\pm$ 13,54 ABa	130,34 $\pm$ 10,91 Ba	157,14 $\pm$ 8,09 BCa	180,73 $\pm$ 15,09 Cab	176,99 $\pm$ 10,84 Ca

*Médias que não compartilham da mesma letra são estatisticamente diferentes. As letras maiúsculas representam significância na linha. As letras minúsculas representam significância na coluna.

Quando a associação de microrganismos UA+S é suplementada por ambas as fontes de carboidrato testadas observa-se que a desmineralização atinge seu ponto máximo aos 6 dias.

5.3 Correlação entre as profundidades de desmineralização aferidas pelos testes de OCT e de microscopia de luz polarizada

Gráfico 5.1 - Correlação entre as medidas de profundidade de desmineralização, em micrômetros, aferidas pelos métodos de microscopia de luz polarizada (MLP) e tomografia por coerência óptica (PROF)

O teste de Correlação de Pearson apresentou uma correlação significativa ($p=0,000$) entre as medidas de profundidade de desmineralização aferidas através dos métodos de luz polarizada e OCT.

5.4 Avaliação da biomassa

De acordo com a Análise de Variância (ANOVA), os fatores principais tempo de desafio cariogênico ($p=0,000$), microrganismo ($p=0,000$) e tempo ($p=0,000$), as interações duplas fonte de carboidrato vs. microrganismo ($p=0,000$), microrganismo vs. tempo de desafio cariogênico ($p=0,000$) e fonte de carboidrato vs. tempo de desafio cariogênico ($p=0,000$), e a interação tripla microrganismo vs. fonte de carboidrato vs. tempo de desafio cariogênico ($p=0,000$) foram estatisticamente significantes.

De uma maneira geral, observa-se que para a associação de fontes de carboidrato sacarose + amido, a formação de biofilme ocorre de forma mais lenta, atingindo seu ponto máximo no apenas no sétimo dia para todos os microrganismos testados. Além disso, a adição de amido diminuiu a quantidade de biomassa para todos os grupos experimentais.

As medidas resumo para os grupos experimentais (média e desvio padrão) estão apresentadas nas tabelas 5.7, 5.8 e 5.9, e a quantificação dos biofilmes para os seis grupos experimentais no decorrer dos tempo está apresentada no gráfico 5.2.

Tabela 5.7 - Quantificação da densidade óptica dos biofilmes (média $\pm$ desvio padrão) para o microrganismo UA

Microrganismos	Fonte de carboidrato	Tempo de desafio cariogênico						
		1	2	3	4	5	6	7
UA	SAC	0,363 $\pm$ 0,026 Ab	0,461 $\pm$ 0,034 ABb	0,403 $\pm$ 0,060 ABb	0,529 $\pm$ 0,069 Bb	0,467 $\pm$ 0,040 ABb	0,498 $\pm$ 0,650 Bb	0,505 $\pm$ 0,153 Bab
	SAC + A	0,118 $\pm$ 0,008 Aa	0,130 $\pm$ 0,011 Aa	0,152 $\pm$ 0,023 Aa	0,201 $\pm$ 0,027 Aa	0,096 $\pm$ 0,018 Aa	0,123 $\pm$ 0,011 Aa	0,396 $\pm$ 0,026 Ba

*Médias que não compartilham da mesma letra são estatisticamente diferentes. As letras maiúsculas representam significância na linha. As letras minúsculas representam significância na coluna.

Ao analisar a biomassa para o microrganismo UA, observa-se que a fonte de carboidrato sacarose induz formação de biofilme que aumenta de forma significativa a partir do quarto dia.

Tabela 5.8 - Quantificação da densidade óptica dos biofilmes (média $\pm$ desvio padrão) para o microrganismo S

Microrganismos	Fonte de carboidrato	Tempo de desafio cariogênico						
		1	2	3	4	5	6	7
S	SAC	0,337 $\pm$ 0,048 Ab	0,529 $\pm$ 0,074 BCb	0,471 $\pm$ 0,096 Bb	0,727 $\pm$ 0,107 Dc	0,585 $\pm$ 0,052 Cbc	0,620 $\pm$ 0,076 CDb	0,575 $\pm$ 0,332 Cb
	SAC + A	0,097 $\pm$ 0,015 Aa	0,127 $\pm$ 0,015 Aa	0,125 $\pm$ 0,013 Aa	0,149 $\pm$ 0,012 Aa	0,139 $\pm$ 0,023 Aa	0,147 $\pm$ 0,026 Aa	0,341 $\pm$ 0,053 Ba

*Médias que não compartilham da mesma letra são estatisticamente diferentes. As letras maiúsculas representam significância na linha. As letras minúsculas representam significância na coluna.

Ao analisar a biomassa para o microrganismo S, observa-se que a fonte de carboidrato sacarose induz formação de biofilme de maneira errática ao longo do período de análise.

Tabela 5.9 – Quantificação da densidade óptica dos biofilmes (média $\pm$ desvio padrão) para a associação de microrganismos UA + S

Microrganismos	Fonte de carboidrato	Tempo de desafio cariogênico						
		1	2	3	4	5	6	7
UA + S	SAC	0,414 $\pm$ 0,058 Ab	0,514 $\pm$ 0,025 ABb	0,624 $\pm$ 0,101 Bc	0,844 $\pm$ 0,150 Cc	0,601 $\pm$ 0,054 Bc	0,558 $\pm$ 0,071 Bb	0,777 $\pm$ 0,349 Cc
	SAC + A	0,111 $\pm$ 0,010 Aa	0,128 $\pm$ 0,010 Aa	0,109 $\pm$ 0,016 Aa	0,140 $\pm$ 0,017 Aa	0,101 $\pm$ 0,010 Aa	0,125 $\pm$ 0,015 Aa	0,309 $\pm$ 0,031 Ba

*Médias que não compartilham da mesma letra são estatisticamente diferentes. As letras maiúsculas representam significância na linha. As letras minúsculas representam significância na coluna.

Para a associação de microrganismos U+S, observa-se que a fonte de carboidrato sacarose induz formação de biofilme de maneira errática ao longo do período de análise.

Gráfico 5.2 - Quantificação da densidade óptica dos biofilmes para os seis grupos experimentais no decorrer do tempo

5.4 Aferição do pH

O pH final do meio de cultura, aferido antes deste ser descartado, variou entre 3.93 e 4.95 para todos os grupos experimentais testados.

5.5 Avaliação qualitativa dos diferentes métodos

As imagens obtidas por OCT e MLP estão detalhadas nas pranchas 1 e 2. Para fins ilustrativos, optamos por escolher apenas as imagens obtidas após 6 dias de desafio cariogênico para cada um dos grupos experimentais. Como as imagens eram muito semelhantes entre si, consideramos que sua repetição e descrição não agregaria novos conhecimentos ou significado aos resultados obtidos. Desta forma, uma legenda auto-explicativa descreve detalhadamente as imagens.

Figura 5.1 – Imagens representativas da profundidade de desmineralização medida por MLP (A, B e C) e OCT (a, b e c), em micrômetros, de cada um dos grupos experimentais. Na sequência, indicaremos a média $\pm$ desvio padrão da profundidade de desmineralização para cada um dos grupos representados. MLP - A: grupo 1 - $190,6 \pm 20$; B: grupo 2 - $156 \pm 23,2$; C: grupo 3 - $196,3 \pm 22,5$. OCT - a: grupo 1 - $170,8 \pm 13,4$; b: grupo 2 - $143,8 \pm 35$; c: grupo 3 - $181,5 \pm 7,5$

Figura 5.2 – Imagens representativas da profundidade de desmineralização medida por MLP (D, E e F) e OCT (d, e e f), em micrômetros, de cada um dos grupos experimentais. Na sequência, indicaremos a média $\pm$ desvio padrão da profundidade de desmineralização para cada um dos grupos representados. MLP - D: grupo 4 - $1211,5 \pm 35,4$; E: grupo 5 - $206 \pm 22,8$; F: grupo 6 - $180,73 \pm 15,09$. OCT - d: grupo 4 - $197,5 \pm 14,5$; e: grupo 5 - $153 \pm 15,8$; f: grupo 6 - $177 \pm 12,8$

6 DISCUSSÃO

Neste trabalho objetivou-se produzir artificialmente, pelo método microbiológico modificado, lesões de mancha branca em esmalte para serem utilizadas em estudos laboratoriais. É fundamental que o método de detecção seja capaz de aferir a profundidade de desmineralização do substrato afetado por cárie de maneira não destrutiva, uma vez que o tecido obtido será utilizado em estudos futuros. Além disso, torna-se possível a padronização da profundidade do tecido desmineralizado, reduzindo a variabilidade dos espécimes utilizados nas pesquisas.

Tradicionalmente, a MLP é a técnica utilizada para determinar a profundidade de desmineralização do esmalte dental (20-22), seja ela realizada por qualquer método. Contudo, esta é uma técnica destrutiva, o que inviabiliza a utilização em novos estudos do substrato padronizado obtido. Autores (21, 23, 93) tem apresentado o OCT como uma técnica não destrutiva capaz de detectar e quantificar a profundidade de desmineralização de substrato dental. Desta forma, a comparação entre estas técnicas torna-se fundamental, pois caso a não invasiva seja confirmada eficiente para este fim, será ampliada a possibilidade de produzir substratos padronizados, que podem ser muito úteis em pesquisas na área de Dentística.

No presente estudo, as imagens geradas por OCT mostram claramente o processo de desmineralização em todos os grupos experimentais testados, e os diferentes protocolos de produção de lesão de mancha branca atingiram uma profundidade de desmineralização máxima entre 173,3 μm e 196,5 μm , ao final de 7 dias de desafio cariogênico. Já com a MLP, os valores de profundidade de desmineralização ficaram entre 176,99 μm e 219,9 μm . Ainda que os valores numéricos pareçam diferentes, a análise estatística verificou existência de correlação significativa entre as medidas de profundidade de desmineralização aferidas pelos dois métodos testados.

Portanto, podemos afirmar que o OCT é um método capaz de validar, sem perda de precisão nos resultados, a profundidade de desmineralização de lesões de mancha branca em esmalte obtidas artificialmente, possibilitando a utilização dos espécimes em experimentos subsequentes. Estes resultados estão de acordo

com Espigares et al. (102), que apontaram o OCT como uma tecnologia válida para a detecção de lesões de mancha branca em esmalte.

A literatura demonstra ainda que esta técnica pode manter a sua precisão de leitura em lesões de até 1,5 mm de profundidade (103). Desta maneira, conclui-se que este método pode ser utilizado inclusive para determinar a profundidade de desmineralização de lesões mais profundas do que as obtidas neste trabalho.

Para a obtenção de substrato padronizado é essencial a procura por um método microbiológico que seja capaz de desmineralizar tecidos dentários de forma eficiente e rápida. A vantagem de utilizar o método microbiológico expressa-se na obtenção de um tecido mais próximo da realidade, entretanto existe a possibilidade de contaminação ao longo da realização do experimento. Daí a importância do método ser rápido. Entende-se por eficiente, neste trabalho, a obtenção de uma profundidade de desmineralização máxima detectável. Assim, em todos os grupos experimentais, independente do microrganismo e da fonte de carboidrato, a desmineralização não passou da faixa entre 196,5 e 219,9 µm. Para o que se destina este substrato modificado é uma profundidade excelente. Ressalta-se que o fator que modifica esta profundidade, de maneira geral, é o tempo. Portanto, o melhor resultado é o que atinge a profundidade indicada em menor tempo. Algumas pequenas diferenças entre os desafios cariogênicos testados serão apontadas na sequência.

Neste estudo foram testadas diferentes propostas de desafio cariogênico, utilizando os microrganismos *S. mutans*, *S. sobrinus* e a proposta adicional de cultura mista (*S. mutans* + *S. sobrinus*). Oda et al. (104) e Saraithong et al. (50) destacam a importância desta associação no aumento da atividade de cárie, observando maior incidência na presença de consumo de refrigerantes contendo aproximadamente 10% de sacarose. Aires et al. (59) também detectam correlação entre atividade de cárie e concentração de sacarose.

Desta forma, a fonte de carboidrato utilizada para suplementar o meio de cultura se mostra como um elemento crucial a ser considerado em desafios *in vitro*. Neste trabalho foram escolhidos a sacarose e a associação de sacarose com amido solúvel. Autores (53, 105, 106) consideram esta associação de fontes de carboidrato altamente cariogênica, sendo capaz de formar grande quantidade de biofilme através da elevada produção de polissacarídeos extracelulares,

responsáveis por incrementar a adesão de microrganismos, assim como sua acidogenicidade. Contudo, há controvérsia na literatura a respeito deste tema, nos motivando a investigar mais sobre o assunto.

Para detectar se a desmineralização era produzida pelas culturas bacterianas utilizadas, em todos os grupos experimentais testados o pH final do meio a ser descartado foi medido, e obteve-se como média 4,48. Sendo assim, em todos os grupos observou-se pH menor que 5,5, que é considerado o pH crítico para a dissolução do esmalte (76). Portanto, podemos afirmar que todos os microrganismos suplementados pelos meios de cultura testados foram os responsáveis por produzir a desmineralização do esmalte no decorrer do tempo.

É conhecido na literatura (107) que estreptococos, colonizadores orais representados pelos *S. mutans* e *S. sobrinus*, são considerados os principais agentes etiológicos da cárie dental (108). Estudos clínicos consideram que o *S. sobrinus* possui um papel aditivo ao do *S. mutans*, potencializando sua ação em situações de cárie severa (43-46, 50, 104). É necessário entender que a formação das lesões de cárie somente começa quando há alta contagem de bactérias em um hospedeiro susceptível, com a aderência dos microrganismos à superfície dental. Por esta razão, as pesquisas que investigam vacinas contra cáries dirigem seus esforços na questão da aderência bacteriana (109).

Para o *S. mutans*, os elementos envolvidos na aderência inicial e específica à película adquirida são os antígenos celulares de superfície, a região ligadora de glucanos da enzima glucosiltransferase e as proteínas ligadoras de glucano (Gbps) (108). O antígeno celular de superfície do *S. sobrinus* apresenta diferenças estruturais e menor potencial adesivo em relação ao *S. mutans* (110). Talvez por este motivo, o *S. sobrinus* apresente uma adesão inicial à película adquirida menor e de forma pouco específica, mas uma vez aderido ele pode, na presença de sacarose, se acumular através de uma grande produção de glucanos (107, 111). Qualquer glucosiltransferase, em especial aquelas secretadas por *S. mutans*, presente na película adquirida promove a adesão inicial do *S. sobrinus*, motivo pelo qual este é raramente encontrado na ausência do *S. mutans* (111, 112). Pulsos frequentes de sacarose permitem que o *S. sobrinus* se acumule nas faces livres através da produção do *S. mutans*, contribuindo para o aumento da atividade de

cárie em superfícies lisas geralmente observada em indivíduos *S. sobrinus* positivos (108).

A virulência destes estreptococos está diretamente relacionada a propriedades que permitem sua colonização e crescimento em superfícies dentais em ambiente ácido (108). Estas propriedades incluem a produção e a regulação de proteínas responsáveis pela adesão, de glicosiltransferases e de polissacarídeos extracelulares (glucanos), os quais permitem que as bactérias adiram firmemente à superfície dental na forma de um biofilme (108). Os glucanos são exopolímeros de glicose sintetizados por enzimas glicosiltransferases (Gtfs) a partir de carboidratos que, em combinação com as proteínas ligadoras de glucano (Gbps), promovem a aderência e acúmulo de estreptococos cariogênicos na superfície dental (53).

O *S. mutans* expressa três glicosiltransferases (Gtfs B, C e D) que produzem glucanos solúveis e insolúveis (41, 113), sintetizados diretamente a partir da sacarose, mas não a partir do amido não digerido (114, 115). Entretanto, o amido pode ser digerido a partir de enzimas salivares denominadas α -amilases em maltose, maltodextrinas, dentre outros oligossacarídeos, alguns dos quais serão utilizados durante a síntese de glucanos (114, 115). Além disso, a maltose e as maltodextrinas provenientes do amido podem ser metabolizadas em ácidos por *S. mutans* (116).

Neste trabalho, ambos os métodos de detecção verificaram que para o microrganismo *S. mutans* (UA 159) em meio suplementado com sacarose, a profundidade de desmineralização do esmalte aumentou de forma significativa a partir do sexto dia. Já para associação entre sacarose e amido, a desmineralização atingiu seu ponto máximo apenas no sétimo dia, confirmados pelos resultados de biomassa. Nestes, observou-se um aumento significativo da quantidade de biomassa do sexto para o sétimo dia. Supõe-se que a degradação do amido, assim como a sua utilização metabólica pelos microrganismos estudados, necessite de maior tempo, visto que tanto os ensaios de desmineralização como os de biomassa parecem ser mais efetivos somente a partir do sexto dia.

No caso do microrganismo *S. sobrinus*, considerando a forte correlação entre os métodos de leitura, propomos utilizar como fonte de carboidrato a associação sacarose + amido, pois a obtenção do seu ponto máximo de

desmineralização ocorre já aos 5 dias. Isso pode ser explicado, pois o amido potencializa a formação de polissacarídeos extracelulares essenciais para a formação e manutenção de biofilme cariogênico de *S. sobrinus* (105, 106). Contudo, no ensaio com este microrganismo observa-se uma lentidão tanto na formação da cultura inicial para produzir o inóculo bacteriano, quanto para o crescimento de biofilme, dificultando desta forma um protocolo que deveria ser de rápida e fácil execução.

Arthur et al. (68) destacam a importância de trabalhar com biofilmes de multiespécies definidas, pois estes levam em consideração as interações que podem ocorrer entre os diferentes microrganismos. Neste trabalho, ao utilizar a cultura mista (*S. mutans* + *S. sobrinus*) suplementada por sacarose e pela associação sacarose + amido, a desmineralização atingiu seu ponto máximo em torno de 6 dias, semelhante aos resultados obtidos com um ensaio de fácil execução em que o *S. mutans* foi suplementado somente com sacarose. A complexidade experimental instalada na utilização da metodologia multiespécie não se justifica frente aos resultados obtidos.

A adição de amido promoveu uma menor e mais lenta formação de biofilme para todos os microrganismos testados. No modelo utilizado, a espessura do biofilme, entretanto, não está relacionada à profundidade de desmineralização, sendo necessários novos ensaios para estabelecer protocolos correspondentes.

Assim, visto que nosso objetivo foi otimizar a obtenção de lesões padronizadas de mancha branca em esmalte, julgamos que o desafio cariogênico que utiliza *S. mutans* suplementado por sacarose como fonte de carboidrato foi o mais eficiente.

7 CONCLUSÕES

1. Os desafios cariogênicos testados são capazes de desmineralizar o esmalte em profundidade, sendo influenciados pelo tipo de microrganismo, fonte de carboidrato e tempo.

2. Este estudo propõe que o desafio cariogênico realizado com microrganismo *S. mutans* UA 159, suplementado com sacarose como fonte de carboidrato por 6 dias, é capaz de produzir mancha branca de esmalte padronizada. Desta maneira, seria obtido um substrato modificado relevante para estudos laboratoriais.

3. Tanto o OCT quanto a microscopia de luz polarizada são métodos capazes de aferir a profundidade de desmineralização. Ressalta-se contudo que o OCT, por ser um método não destrutivo e que não requer nenhum tipo de preparo da amostra, apresenta-se como uma excelente alternativa quando se objetiva obter substratos desmineralizados padronizados para estudos laboratoriais.

4. A formação de biomassa é menor e mais lenta quando há a suplementação de amido à sacarose como fonte de carboidrato para todos os grupos experimentais.

REFERÊNCIAS²

1. Kidd E. The implications of the new paradigm of dental caries. *J Dent.* 2011;39 Suppl 2:S3-8.
2. Featherstone JD. Dental caries: a dynamic disease process. *Aust Dent J.* 2008;53(3):286-91.
3. Mount GJ, Ngo H. Minimal intervention: early lesions. *Quintessence Int.* 2000;31(8):535-46.
4. Mount GJ, Ngo H. Minimal intervention: a new concept for operative dentistry. *Quintessence Int.* 2000;31(8):527-33.
5. Mount GJ. Classification for minimal intervention. *Quintessence Int.* 2000;31(6):375-6.
6. Theuns HM, van Dijk JW, Driessens FC, Groeneveld A. Effect of the pH of buffer solutions on artificial carious lesion formation in human tooth enamel. *Caries Res.* 1984;18(1):7-11.
7. Thylstrup A, Fejerskov O. *Cariologia Clínica.* 2 ed. São Paulo: Editora Santos; 1995.
8. Paris S, Schwendicke F, Seddig S, Muller WD, Dorfer C, Meyer-Lueckel H. Micro-hardness and mineral loss of enamel lesions after infiltration with various resins: influence of infiltrant composition and application frequency in vitro. *J Dent.* 2013;41(6):543-8.
9. Paris S, Hopfenmuller W, Meyer-Lueckel H. Resin infiltration of caries lesions: an efficacy randomized trial. *J Dent Res.* 2010;89(8):823-6.
10. Meyer-Lueckel H, Chatzidakis A, Naumann M, Dorfer CE, Paris S. Influence of application time on penetration of an infiltrant into natural enamel caries. *J Dent.* 2011;39(7):465-9.
11. Paris S, Bitter K, Naumann M, Dorfer CE, Meyer-Lueckel H. Resin infiltration of proximal caries lesions differing in ICDAS codes. *Eur J Oral Sci.* 2011;119(2):182-6.
12. Tawakoli PN, Attin T, Mohn D. Oral biofilm and caries-infiltrant interactions on enamel. *J Dent.* 2016;48:40-5.

² De acordo com o estilo Vancouver.

13. Askar H, Lausch J, Dorfer CE, Meyer-Lueckel H, Paris S. Penetration of micro-filled infiltrant resins into artificial caries lesions. *J Dent.* 2015;43(7):832-8.
14. Araujo TG, Sfalcin RA, de Araujo GS, Alonso RC, Puppin-Rontani RM. Bond Strength of Experimental Low-viscosity Resin Materials to Early Enamel Caries Lesions: Effect of Diluent/Solvent Addition. *J Adhes Dent.* 2015;17(2):117-23.
15. Magalhaes AC, Moron BM, Comar LP, Wiegand A, Buchalla W, Buzalaf MA. Comparison of cross-sectional hardness and transverse microradiography of artificial carious enamel lesions induced by different demineralising solutions and gels. *Caries Res.* 2009;43(6):474-83.
16. Pugach MK, Strother J, Darling CL, Fried D, Gansky SA, Marshall SJ, et al. Dentin caries zones: mineral, structure, and properties. *J Dent Res.* 2009;88(1):71-6.
17. Zanchi CH, Lund RG, Perrone LR, Ribeiro GA, del Pino FA, Pinto MB, et al. Microtensile bond strength of two-step etch-and-rinse adhesive systems on sound and artificial caries-affected dentin. *Am J Dent.* 2010;23(3):152-6.
18. Marquezan M, Correa FN, Sanabe ME, Rodrigues Filho LE, Hebling J, Guedes-Pinto AC, et al. Artificial methods of dentine caries induction: A hardness and morphological comparative study. *Arch Oral Biol.* 2009;54(12):1111-7.
19. Fontana M, Dunipace AJ, Gregory RL, Noblitt TW, Li Y, Park KK, et al. An in vitro microbial model for studying secondary caries formation. *Caries Res.* 1996;30(2):112-8.
20. Le MH, Darling CL, Fried D. Automated analysis of lesion depth and integrated reflectivity in PS-OCT scans of tooth demineralization. *Lasers Surg Med.* 2010;42(1):62-8.
21. Lee C, Darling CL, Fried D. Polarization-sensitive optical coherence tomographic imaging of artificial demineralization on exposed surfaces of tooth roots. *Dent Mater.* 2009;25(6):721-8.
22. Douglas SM, Fried D, Darling CL. Imaging Natural Occlusal Caries Lesions with Optical Coherence Tomography. *Proc SPIE Int Soc Opt Eng.* 2010;7549:75490n.
23. Azevedo CS, Trung LC, Simionato MR, Freitas AZ, Matos AB. Evaluation of caries-affected dentin with optical coherence tomography. *Braz Oral Res.* 2011;25(5):407-13.
24. Hallett KB, O'Rourke PK. Social and behavioural determinants of early childhood caries. *Aust Dent J.* 2003;48(1):27-33.

25. Corby PM, Lyons-Weiler J, Bretz WA, Hart TC, Aas JA, Boumenna T, et al. Microbial risk indicators of early childhood caries. *J Clin Microbiol.* 2005;43(11):5753-9.
26. Peres MA, de Oliveira Latorre Mdo R, Sheiham A, Peres KG, Barros FC, Hernandez PG, et al. Social and biological early life influences on severity of dental caries in children aged 6 years. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2005;33(1):53-63.
27. Gussy MG, Waters EG, Walsh O, Kilpatrick NM. Early childhood caries: current evidence for aetiology and prevention. *J Paediatr Child Health.* 2006;42(1-2):37-43.
28. Selwitz RH, Ismail AI, Pitts NB. Dental caries. *Lancet.* 2007;369(9555):51-9.
29. Featherstone JD. The science and practice of caries prevention. *J Am Dent Assoc.* 2000;131(7):887-99.
30. Marsh PD. Are dental diseases examples of ecological catastrophes? *Microbiology.* 2003;149(Pt 2):279-94.
31. Takahashi N, Nyvad B. Caries ecology revisited: microbial dynamics and the caries process. *Caries Res.* 2008;42(6):409-18.
32. Robinson C. Fluoride and the caries lesion: interactions and mechanism of action. *Eur Arch Paediatr Dent.* 2009;10(3):136-40.
33. Buzalaf MA, Pessan JP, Honorio HM, ten Cate JM. Mechanisms of action of fluoride for caries control. *Monogr Oral Sci.* 2011;22:97-114.
34. Struzycka I. The oral microbiome in dental caries. *Pol J Microbiol.* 2014;63(2):127-35.
35. Dufour D, Levesque CM. Bacterial behaviors associated with the quorum-sensing peptide pheromone ('alarmone') in streptococci. *Future Microbiol.* 2013;8(5):593-605.
36. He XS, Shi WY. Oral microbiology: past, present and future. *Int J Oral Sci.* 2009;1(2):47-58.
37. Hojo K, Nagaoka S, Ohshima T, Maeda N. Bacterial interactions in dental biofilm development. *J Dent Res.* 2009;88(11):982-90.
38. Marsh PD. Contemporary perspective on plaque control. *Br Dent J.* 2012;212(12):601-6.

39. Abusleme L, Dupuy AK, Dutzan N, Silva N, Burleson JA, Strausbaugh LD, et al. The subgingival microbiome in health and periodontitis and its relationship with community biomass and inflammation. *Isme j.* 2013;7(5):1016-25.
40. Marsh PD, Bradshaw DJ. Dental plaque as a biofilm. *J Ind Microbiol.* 1995;15(3):169-75.
41. Siriani LK. Influência do gene *cnm* de *Streptococcus mutans* na formação de biofilme e na interação do microrganismo às células endoteliais [tese]. Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2012.
42. Durso SC, Vieira LM, Cruz JN, Azevedo CS, Rodrigues PH, Simionato MR. Sucrose substitutes affect the cariogenic potential of *Streptococcus mutans* biofilms. *Caries Res.* 2014;48(3):214-22.
43. de Soet JJ, Toors FA, de Graaff J. Acidogenesis by oral streptococci at different pH values. *Caries Res.* 1989;23(1):14-7.
44. de Soet JJ, van Loveren C, Lammens AJ, Pavicic MJ, Homburg CH, ten Cate JM, et al. Differences in cariogenicity between fresh isolates of *Streptococcus sobrinus* and *Streptococcus mutans*. *Caries Res.* 1991;25(2):116-22.
45. Okada M, Taniguchi Y, Hayashi F, Doi T, Suzuki J, Sugai M, et al. Late Established *Mutans Streptococci* in Children over 3 Years Old. *Int J Dent.* 2010;2010:732468.
46. Okada M, Kawamura M, Oda Y, Yasuda R, Kojima T, Kurihara H. Caries prevalence associated with *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in Japanese schoolchildren. *Int J Paediatr Dent.* 2012;22(5):342-8.
47. Kishi M, Abe A, Kishi K, Ohara-Nemoto Y, Kimura S, Yonemitsu M. Relationship of quantitative salivary levels of *Streptococcus mutans* and *S. sobrinus* in mothers to caries status and colonization of *mutans streptococci* in plaque in their 2.5-year-old children. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2009;37(3):241-9.
48. Nurelhuda NM, Al-Haroni M, Trovik TA, Bakken V. Caries experience and quantification of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in saliva of Sudanese schoolchildren. *Caries Res.* 2010;44(4):402-7.
49. Okada M, Soda Y, Hayashi F, Doi T, Suzuki J, Miura K, et al. Longitudinal study of dental caries incidence associated with *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in pre-school children. *J Med Microbiol.* 2005;54(Pt 7):661-5.
50. Saraithong P, Pattanaporn K, Chen Z, Khongkhunthian S, Laohapensang P, Chhun N, et al. *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* colonization and caries experience in 3- and 5-year-old Thai children. *Clin Oral Investig.* 2015;19(8):1955-64.

51. Moynihan P, Petersen PE. Diet, nutrition and the prevention of dental diseases. *Public Health Nutr.* 2004;7(1a):201-26.
52. Hara AT, Zero DT. The caries environment: saliva, pellicle, diet, and hard tissue ultrastructure. *Dent Clin North Am.* 2010;54(3):455-67.
53. Bowen WH. Do we need to be concerned about dental caries in the coming millennium? *Crit Rev Oral Biol Med.* 2002;13(2):126-31.
54. Mattos-Graner RO, Smith DJ, King WF, Mayer MP. Water-insoluble glucan synthesis by mutans streptococcal strains correlates with caries incidence in 12- to 30-month-old children. *J Dent Res.* 2000;79(6):1371-7.
55. Lingstrom P, van Houte J, Kashket S. Food starches and dental caries. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2000;11(3):366-80.
56. Kopec LK, Vacca-Smith AM, Bowen WH. Structural aspects of glucans formed in solution and on the surface of hydroxyapatite. *Glycobiology.* 1997;7(7):929-34.
57. Duarte S, Klein MI, Aires CP, Cury JA, Bowen WH, Koo H. Influences of starch and sucrose on *Streptococcus mutans* biofilms. *Oral Microbiol Immunol.* 23. Denmark 2008. p. 206-12.
58. Thurnheer T, Giertsen E, Gmur R, Guggenheim B. Cariogenicity of soluble starch in oral in vitro biofilm and experimental rat caries studies: a comparison. *J Appl Microbiol.* 2008;105(3):829-36.
59. Aires CP, Del Bel Cury AA, Tenuta LM, Klein MI, Koo H, Duarte S, et al. Effect of starch and sucrose on dental biofilm formation and on root dentine demineralization. *Caries Res.* 42. Switzerland: 2008 S. Karger AG, Basel.; 2008. p. 380-6.
60. Tang G, Yip HK, Cutress TW, Samaranayake LP. Artificial mouth model systems and their contribution to caries research: a review. *J Dent.* 2003;31(3):161-71.
61. Featherstone JD, Rodgers BE. Effect of acetic, lactic and other organic acids on the formation of artificial carious lesions. *Caries Res.* 1981;15(5):377-85.
62. Featherstone JD. Modeling the caries-inhibitory effects of dental materials. *Dent Mater.* 1996;12(3):194-7.
63. Espejo LC. Influência de diferentes sistemas adesivos dentários resinosos aplicados em dentina humana frente a um desafio cariogênico bacteriano, in vitro [dissertação]. Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo; 2008.

64. Dummer PM, Edmunds DH, Green RM. Demineralisation of human enamel by *Streptococcus mutans* NCTC 10832 using a sequential batch culture technique. *Caries Res.* 1982;16(2):193-6.
65. Clarkson BH, Wefel JS, Miller I. A model for producing caries-like lesions in enamel and dentin using oral bacteria in vitro. *J Dent Res.* 1984;63(10):1186-9.
66. Gama-Teixeira A, Simionato MR, Elian SN, Sobral MA, Luz MA. *Streptococcus mutans*-induced secondary caries adjacent to glass ionomer cement, composite resin and amalgam restorations in vitro. *Braz Oral Res.* 2007;21(4):368-74.
67. de Azevedo CS, Garbui BU, Martins e Silva C, Simionato Lorenzetti MR, de Freitas AZ, Matos AB. Obtaining artificially caries-affected dentin for in vitro studies. *J Contemp Dent Pract.* 2014;15(1):12-9.
68. Arthur RA, Waeiss RA, Hara AT, Lippert F, Eckert GJ, Zero DT. A defined-multispecies microbial model for studying enamel caries development. *Caries Res.* 47. Switzerland: Basel.; 2013. p. 318-24.
69. Shu M, Wong L, Miller JH, Sissons CH. Development of multi-species consortia biofilms of oral bacteria as an enamel and root caries model system. *Arch Oral Biol.* 45. England2000. p. 27-40.
70. Giacaman RA, Munoz MJ, Ccahuana-Vasquez RA, Munoz-Sandoval C, Cury JA. Effect of fluoridated milk on enamel and root dentin demineralization evaluated by a biofilm caries model. *Caries Res.* 46. Switzerland: Basel.; 2012. p. 460-6.
71. Filoche SK, Soma KJ, Sissons CH. Caries-related plaque microcosm biofilms developed in microplates. *Oral Microbiol Immunol.* 2007;22(2):73-9.
72. 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.* 45. Switzerland: Basel.; 2011. p. 510-7.
73. Zaura E, Buijs MJ, Hoogenkamp MA, Ciric L, Papetti A, Signoretto C, et al. The effects of fractions from shiitake mushroom on composition and cariogenicity of dental plaque microcosms in an in vitro caries model. *J Biomed Biotechnol.* 2011;2011:135034.
74. Freitas MCCdA. Efeito de um infiltrante resinoso no tratamento de lesões de mancha branca: análise in vitro e in situ [tese]. Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo.; 2015.

75. Lynch RJ, Churchley D, Butler A, Kearns S, Thomas GV, Badrock TC, et al. Effects of zinc and fluoride on the remineralisation of artificial carious lesions under simulated plaque fluid conditions. *Caries Res.* 2011;45(3):313-22.
76. Ribeiro CC, Tabchoury CP, Del Bel Cury AA, Tenuta LM, Rosalen PL, Cury JA. Effect of starch on the cariogenic potential of sucrose. *Br J Nutr.* 2005;94(1):44-50.
77. ten Cate JM, Featherstone JD. Mechanistic aspects of the interactions between fluoride and dental enamel. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1991;2(3):283-96.
78. ten Cate JM. Review on fluoride, with special emphasis on calcium fluoride mechanisms in caries prevention. *Eur J Oral Sci.* 1997;105(5 Pt 2):461-5.
79. Marinho VC, Higgins JP, Logan S, Sheiham A. Systematic review of controlled trials on the effectiveness of fluoride gels for the prevention of dental caries in children. *J Dent Educ.* 2003;67(4):448-58.
80. Pessan JP, Al-Ibrahim NS, Buzalaf MA, Toumba KJ. Slow-release fluoride devices: a literature review. *J Appl Oral Sci.* 2008;16(4):238-46.
81. Suyama E, Tamura T, Ozawa T, Suzuki A, Iijima Y, Saito T. Remineralization and acid resistance of enamel lesions after chewing gum containing fluoride extracted from green tea. *Aust Dent J.* 2011;56(4):394-400.
82. Lee YE, Baek HJ, Choi YH, Jeong SH, Park YD, Song KB. Comparison of remineralization effect of three topical fluoride regimens on enamel initial carious lesions. *J Dent.* 2010;38(2):166-71.
83. Clark DC. A review on fluoride varnishes: an alternative topical fluoride treatment. *Community Dent Oral Epidemiol.* 1982;10(3):117-23.
84. Olympio KP, Cardoso VE, Bijella MF, Pessan JP, Delbem AC, Buzalaf MA. Urinary fluoride output in children following the use of a dual-fluoride varnish formulation. *J Appl Oral Sci.* 2009;17(3):179-83.
85. Onishi T, Umemura S, Yanagawa M, Matsumura M, Sasaki Y, Ogasawara T, et al. Remineralization effects of gum arabic on caries-like enamel lesions. *Arch Oral Biol.* 2008;53(3):257-60.
86. Kugel G, Arsenault P, Papas A. Treatment modalities for caries management, including a new resin infiltration system. *Compend Contin Educ Dent.* 2009;30 Spec No 3:1-10; quiz 1-2.
87. Bergstrand F, Twetman S. A review on prevention and treatment of post-orthodontic white spot lesions - evidence-based methods and emerging technologies. *Open Dent J.* 2011;5:158-62.

88. Rao A, Malhotra N. The role of remineralizing agents in dentistry: a review. *Compend Contin Educ Dent*. 2011;32(6):26-33; quiz 4, 6.
89. Kim S, Kim EY, Jeong TS, Kim JW. The evaluation of resin infiltration for masking labial enamel white spot lesions. *Int J Paediatr Dent*. 2011;21(4):241-8.
90. Rocha Gomes Torres C, Borges AB, Torres LM, Gomes IS, de Oliveira RS. Effect of caries infiltration technique and fluoride therapy on the colour masking of white spot lesions. *J Dent*. 2011;39(3):202-7.
91. Feynman RP, Leighton RB, Sands M. *Lições de Física de Feynman: a edição definitiva*. Porto Alegre 2008.
92. Kang H, Darling CL, Fried D. Nondestructive Monitoring of the Repair of Natural Occlusal Lesions using Cross - Polarization Optical Coherence Tomography. *Proc Soc Photo Opt Instrum Eng*. 2012;8208.
93. Can AM, Darling CL, Ho C, Fried D. Non-destructive assessment of inhibition of demineralization in dental enamel irradiated by a $\lambda=9.3$ -microm CO₂ laser at ablative irradiation intensities with PS-OCT. *Lasers Surg Med*. 2008;40(5):342-9.
94. Otis LL, Colston BW, Jr., Everett MJ, Nathel H. Dental optical coherence tomography: a comparison of two in vitro systems. *Dentomaxillofac Radiol*. 2000;29(2):85-9.
95. Otis LL, Everett MJ, Sathyam US, Colston BW, Jr. Optical coherence tomography: a new imaging technology for dentistry. *J Am Dent Assoc*. 2000;131(4):511-4.
96. Fujimoto JG, Brezinski ME, Tearney GJ, Boppart SA, Bouma B, Hee MR, et al. Optical biopsy and imaging using optical coherence tomography. *Nat Med*. 1995;1(9):970-2.
97. Freitas AZ, Amaral MM, Raelle MP. Optical Coherence Tomography: Development and Applications In: DUARTE, F.J. *Laser Pulse Phenomena and Applications*. Rijeka: InTech, 2010, p. 409-432.
98. Chen Y, Otis L, Piao D, Zhu Q. Characterization of dentin, enamel, and carious lesions by a polarization-sensitive optical coherence tomography system. *Appl Opt*. 2005;44(11):2041-8.
99. Jones RS, Darling CL, Featherstone JD, Fried D. Remineralization of in vitro dental caries assessed with polarization-sensitive optical coherence tomography. *J Biomed Opt*. 2006;11(1):014016.
100. Manesh SK, Darling CL, Fried D. Nondestructive assessment of dentin demineralization using polarization-sensitive optical coherence tomography

- after exposure to fluoride and laser irradiation. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2009;90(2):802-12.
101. Manesh SK, Darling CL, Fried D. Polarization-sensitive optical coherence tomography for the nondestructive assessment of the remineralization of dentin. *J Biomed Opt.* 2009;14(4):044002.
 102. Espigares J, Sadr A, Hamba H, Shimada Y, Otsuki M, Tagami J, et al. Assessment of natural enamel lesions with optical coherence tomography in comparison with microfocus x-ray computed tomography. *J Med Imaging (Bellingham).* 2015;2(1):014001.
 103. Baumgartner A, Dichtl S, Hitzenberger CK, Sattmann H, Robl B, Moritz A, et al. Polarization-sensitive optical coherence tomography of dental structures. *Caries Res.* 2000;34(1):59-69.
 104. Oda Y, Hayashi F, Okada M. Longitudinal study of dental caries incidence associated with *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in patients with intellectual disabilities. *BMC Oral Health.* 2015;15:102.
 105. Koo H, Falsetta ML, Klein MI. The exopolysaccharide matrix: a virulence determinant of cariogenic biofilm. *J Dent Res.* 92. United States 2013. p. 1065-73.
 106. Klein MI, DeBaz L, Agidi S, Lee H, Xie G, Lin AH, et al. Dynamics of *Streptococcus mutans* transcriptome in response to starch and sucrose during biofilm development. *PLoS One.* 2010;5(10):e13478.
 107. Loesche WJ. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol Rev.* 1986;50(4):353-80.
 108. Conrads G, de Soet JJ, Song L, Henne K, Sztajer H, Wagner-Dobler I, et al. Comparing the cariogenic species *Streptococcus sobrinus* and *S. mutans* on whole genome level. *J Oral Microbiol.* 2014;6:26189.
 109. Zhang P, Jespersgaard C, Lamberty-Mallory L, Katz J, Huang Y, Hajishengallis G, et al. Enhanced immunogenicity of a genetic chimeric protein consisting of two virulence antigens of *Streptococcus mutans* and protection against infection. *Infect Immun.* 2002;70(12):6779-87.
 110. Demuth DR, Davis CA, Corner AM, Lamont RJ, Leboy PS, Malamud D. Cloning and expression of a *Streptococcus sanguis* surface antigen that interacts with a human salivary agglutinin. *Infect Immun.* 1988;56(9):2484-90.
 111. Gibbons RJ, Cohen L, Hay DI. Strains of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* attach to different pellicle receptors. *Infect Immun.* 1986;52(2):555-61.

112. Rolla G, Ciardi JE, Schultz SA. Adsorption of glucosyltransferase to saliva coated hydroxyapatite. Possible mechanism for sucrose dependent bacterial colonization of teeth. *Scand J Dent Res*. 1983;91(2):112-7.
113. Bowen WH, Koo H. Biology of *Streptococcus mutans*-derived glucosyltransferases: role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms. *Caries Res*. 2011;45(1):69-86.
114. Fu DT, Robyt JF. Maltodextrin acceptor reactions of *Streptococcus mutans* 6715 glucosyltransferases. *Carbohydr Res*. 1991;217:201-11.
115. Vacca Smith AM, Bowen WH. In situ studies of pellicle formation on hydroxyapatite discs. *Arch Oral Biol*. 2000;45(4):277-91.
116. Clarkson BH, Krell D, Wefel JS, Crall J, Feagin FF. In vitro caries-like lesion production by *Streptococcus mutans* and *Actinomyces viscosus* using sucrose and starch. *J Dent Res*. 1987;66(3):795-8.

ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)

Fundado em 1900
"Em constante busca da excelência"

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
Comissão de Ética no Uso de Animais
Tel. (11) 3091 7842
ceuafo@usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo CEUA/FOUSP N° 013/2015 referente ao projeto intitulado: **"Obtenção in vitro de mancha branca em dentes bovinos por desafio cariogênico misto"** sob a responsabilidade de execução dos autores **Profa. Dra. Adriana Bona Matos** e da aluna **Mayra Zamboni Quitero Siciliano**, foi analisado na presente data e considerado isento de análise da CEUA por utilizar material de origem animal da espécie gado Nelore (*Bos Taurus*) proveniente de Figorífico.

São Paulo, 08 de junho de 2015.

Prof. Dr. Victor Elias Arana-Chavez
Presidente da CEUA/FOUSP

Av. Prof. Lineu Prestes, 2227 – São Paulo, SP – Cep 05508-000
www.fo.usp.br