

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

CAROLINE GOMES DE ANDRADE

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CARIOGÊNICO DE BIOFILMES CONTENDO  
*CANDIDA ALBICANS* EM RELAÇÃO À DENTINA RADICULAR:  
ESTUDO *IN VITRO*

Porto Alegre – Rio Grande do Sul  
2017

**Caroline Gomes de Andrade**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CARIOGÊNICO DE BIOFILMES CONTENDO  
*CANDIDA ALBICANS* EM RELAÇÃO À DENTINA RADICULAR:  
ESTUDO *IN VITRO***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Nível Mestrado, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como pré-requisito para a obtenção do título de Mestre em Clínica Odontológica – Cariologia e Dentística.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Alex Arthur

**PORTO ALEGRE  
2017**

CIP - Catalogação na Publicação

de Andrade, Caroline Gomes  
Avaliação do potencial cariogênico de biofilmes  
contendo *Candida albicans* em relação à dentina  
radicular: Estudo in vitro. / Caroline Gomes de  
Andrade. -- 2018.  
51 f.  
Orientador: Rodrigo Alex Arthur.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Faculdade de Odontologia,  
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Porto  
Alegre, BR-RS, 2018.

1. Dentina. 2. *Candida albicans*. 3. *Streptococcus  
mutans*. 4. Biofilme. 5. Colágeno. I. Arthur, Rodrigo  
Alex, orient. II. Título.

*À minha família, especialmente a meu pai e  
minha mãe, verdadeiros guerreiros que nunca  
mediram esforços para me apoiar em todas as  
batalhas, que colocam meus objetivos como os  
deles próprios e me encorajam a alcançá-los, que  
me incentivam e me inspiram a sempre dar o  
melhor de mim em tudo o que faço, exemplos de  
vida, humildade e honestidade.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus acima de tudo, por me conceder a vida e me guiar pelo caminho do bem. Sem Ele, nada seria.

Ao meu orientador, Professor Rodrigo, pela imensa paciência, pelo apoio, por todo o conhecimento transmitido e por ser um exemplo de integridade e profissionalismo. Muito obrigada por me incentivar a ir em busca de novos conhecimentos e novos desafios!

Ao Professor Marcelo Lamers, por ter me orientado pela histologia e guiado nossas análises histológicas com muito empenho e disponibilidade, encontrando tempo para orientação mesmo com todas as funções que exerce na Universidade.

À Professora Thaís Negrini, por ter ensinado, incentivado e aprimorado a técnica laboratorial, e também por ter sido um poço de ternura e carinho durante esse tempo, sempre disponível para o que quer que fosse.

A todos os professores do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Bucal, por todos os ensinamentos transmitidos e por todas as lições passadas. Tenho uma profunda admiração pelo vosso trabalho e sempre os lembrarei com muito carinho.

À Luisa Mercado, técnica do Labim, que me ajudou muito no laboratório, sempre muito paciente em suas explicações e exercendo seu trabalho de organizar tudo com maestria. Obrigada por ter se tornado essa grande amiga que és hoje, meu ombro amigo para as horas boas e as nem tão boas assim.

À Luiza Lenzi, bolsista de iniciação científica do laboratório, que deixou de aproveitar feriados e finais de semana para me ajudar com a pesquisa e que lixou muito os dedos me ajudando a preparar as amostras, sempre muito pontual e divertida, exigente consigo mesma para que tudo corresse bem.

À Flávia, Emily e Juli, funcionárias da Unidade de Patologia Experimental do Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas, por todo o auxílio e suporte técnico durante o processamento das amostras para análise histológica.

Aos meus colegas, Andréa Catelan, Andréa Recchi, Carolina Schwertner, Gustavo Eidt, Rafael Azambuja e Natacha Amin; a T1. Obrigada pela amizade de cada um de vocês, torço para que suas carreiras sejam brilhantes e que continuemos unidos como somos, vocês foram os responsáveis pelos meus maiores risos até hoje.

À toda minha família: meus pais Arnaldo e Margarete, meus irmãos Juliano e Cristiano, minhas cunhadas Micheli e Jaqueline, minha doce sobrinha Alice, meus avós, minha tia, madrinha e mãe Delba, e todos os demais. Vocês são o meu porto seguro, o meu lar. Eu sinto

um amor incondicional por cada um, e agradeço a Deus por tê-los em minha vida. Obrigada por me ensinarem a alçar voos, e me garantirem que sempre estarão prontos para me segurar se eu cair. Tudo o que sou, devo a vocês.

Ao Eduardo, meu melhor amigo e parceiro na vida. Você teve a tarefa mais árdua de todas, ouvir todos os meus problemas, as minhas dúvidas, os meus momentos de tristeza, de saudade da família. Obrigada por sempre me confortar e ter um abraço e uma palavra de carinho disponíveis para mim, amo você!

À Capes, pelo auxílio financeiro à pesquisa.

Enfim, a todos aqueles que não foram citados, mas participaram direta ou indiretamente na realização desse trabalho. A jornada não foi fácil, mas cada um me ajudou a vencer etapas e chegar aqui hoje, esse trabalho é de todos nós!

## RESUMO

Após a exposição da raiz do dente na cavidade bucal, causada por recessão gengival, há uma mudança na microflora existente na região. Micro-organismos se depositam nessa região e formam um biofilme, que se exposto a carboidratos fermentáveis pode levar a uma queda de pH do meio, selecionando micro-organismos ácido-tolerantes e causando uma dissolução dos tecidos minerais e ativação de mecanismos de degradação da matriz orgânica da dentina. A presença de *Candida albicans* em lesões radiculares vem sendo relatada na literatura de forma controversa, alguns estudos sugerem que a cariogenicidade do biofilme aumenta na presença desse fungo, embora outros sugerem que o fungo levaria a uma neutralização do pH do biofilme por meio de secreção de metabólitos e consumo de ácido lático liberado na matriz do biofilme como resultado da metabolização de carboidratos. Frente ao exposto, o objetivo desse estudo foi avaliar o potencial cariogênico de biofilmes contendo *Candida albicans* em relação à dentina radicular. Discos de dentina radicular foram obtidos de raízes de dentes bovinos e tiveram sua microdureza de superfície inicial determinada. Foi realizado então um experimento *in vitro* nos quais os blocos de dentina foram aleatorizados em 3 grupos para cultivo de biofilme como se segue: Grupo 1 – biofilme monoespécie de *S. mutans* (SM); Grupo 2 – biofilme monoespécie de *C. albicans* (CA); e Grupo 3 – biofilme dualespécies de *S. mutans* + *C. albicans* (MIX). Os biofilmes foram cultivados na superfície dos blocos de dentina durante 24, 48 e 72 horas. O pH do meio de cultura dos biofilmes foi aferido a cada 24 horas. Biofilmes foram coletados da superfície de seis blocos de dentina após cada um dos tempos acima descritos e a contagem de células viáveis foi determinada. Além disso, após cada período de formação de biofilme, os mesmos blocos de dentina tiveram sua microdureza de superfície medida novamente para determinação da porcentagem de perda de dureza de superfície (%PDS) e duas amostras de cada grupo/tempo foram submetidas a coloração histológica PicroSirius Red para determinação da porcentagem de colágeno estruturado na matriz orgânica da dentina desmineralizada. Os experimentos foram realizados em triplicata e os dados foram analisados por ANOVA de duas vias seguido de teste de Bonferroni ao nível de significância de 5%. Em relação aos resultados, independentemente da composição microbiana do biofilme, houve maior %PDS em biofilmes formados durante 48 e 72h em comparação aos biofilmes formados por 24 horas. Em relação à composição microbiana do biofilme, observou-se que a %PDS no biofilme de SM foi estatisticamente maior que na presença do biofilme MIX, que por sua vez foi maior que aquela encontrada na presença de biofilme CA. Os resultados mostraram ainda que os valores de pH do meio de cultivo dos biofilmes MIX foram estatisticamente maiores do

que os valores encontrados na presença de biofilme SM nos tempos de 48 e 72 horas ( $p < 0,05$ ). Em relação à análise orgânica da dentina, os resultados sugerem que há uma maior tendência para manutenção de colágeno estruturado em biofilmes contendo CA do que em relação aos biofilmes de SM e de MIX. Nossos resultados sugerem que embora a *C. albicans* apresente potencial cariogênico para dentina radicular, o biofilme contendo *C. albicans* associada ao *S. mutans* parece apresentar um menor potencial cariogênico quando comparado aos biofilmes cultivados na ausência deste fungo.

Palavras chave: cárie radicular, dentina, colágeno, biofilme, *Streptococcus mutans*, *Candida albicans*

## ABSTRACT

After root exposure on the oral cavity, caused by gingival recession, a shift in the site microflora occurs. Deposits of microorganisms turn in to a biofilm in the root surface, which if exposed frequently to fermentable carbohydrates may lead to a pH drop on the biofilm matrix, selecting acid tolerant microorganisms causing solubilization of the mineralized tissues and the activation of dentin organic matrix degrading system. *Candida albicans* presence in root caries has been debated on the literature, some studies suggest that the cariogenicity of the biofilm increases on the fungus presence, although some others have said that the fungus would lead to a biofilm pH neutralization by releasing some metabolites and lactic acid consumption, the acid released on the biofilm matrix as a product of the carbohydrates metabolization. Therefore, the aim of this present study was to evaluate the cariogenic potential of biofilms containing *C. albicans* in relation to root dentin. Dentin root slabs were obtained from root of bovine teeth and its surface microhardness was accessed. An *in vitro* trial was performed, by randomizing the slabs in 3 groups: Group 1 – mono-species *S. mutans* biofilm (SM), Group 2 – mono-species *C. albicans* biofilm (CA) and Group 3 - dual-species *S. mutans* and *C. albicans* biofilm (MIX). The biofilms were grown at the dentin slab surface in 24, 48 and 72. The pH of the culture medium was checked every 24 hours. Biofilms were collected from the surface of six dentin slabs after each time as described above and the CFU/mL counts were determined. Additionally, after each time of biofilm growth, the surface microhardness of the samples was measured again to calculate the surface hardness loss percentage (%SHL) and, also, two samples of each group/time were sent to histological stain by PicroSirius Red to determine the percentage of structured collagen on the organic demineralized dentin. Each trial was performed three times and the data was analysed by Two-Way ANOVA, followed by Bonferroni test, with a significance level of 5%. As related to the results, irrespective from the microbial composition of the biofilm, a higher %SHL was observed in biofilms growth in 48 and 72 hours when compared to the biofilms growth in 24 hours. Regarding the microbial composition of the biofilm, it was observed that the %SHL at the SM biofilm was statistically higher than in the presence of the MIX biofilm, which was also higher than the one found at the CA biofilm. The results also show that the pH values of the culture medium in MIX biofilms were statistically higher than those found in the presence of SM biofilms at 48 and 72 hours ( $p < 0,05$ ). Related to the organic analysis of the dentin, the results suggest that there is a higher tendency to structured collagen maintenance in CA biofilms when compared to the SM and MIX biofilms. Our results suggest that, although *C. albicans* has a cariogenic potential related to root dentin, the biofilm

containing *C.albicans* associated to *S. mutans* seems to present a lower cariogenic potential when compared to biofilms growth without this fungus.

Key words: root caries, dentin, collagen, biofilm, *Streptococcus mutans*, *Candida albicans*.

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 - Contagem de micro-organismos ( $\text{Log}_{10}\text{UFC/mL}$ ), de acordo com tempo de formação e composição dos biofilmes (média  $\pm$  dp) [Intervalo de confiança de Wald 95%].

Tabela 2 - Desenvolvimento de cárie (%PDS) e pH de acordo com tempo de formação e composição dos biofilmes (média  $\pm$  dp) [Intervalo de confiança de Wald 95%].

Tabela 3 - Porcentagem de colágeno remanescente estruturado nos terços superficial e médio nas amostras de dentina de acordo com tempo de formação e composição dos biofilmes (média\*) [Intervalo de confiança de Wald 95%].

Tabela 4 - Porcentagem de colágeno remanescente estruturado no terço profundo nas amostras de dentina de acordo com tempo de formação e composição dos biofilmes (média) [Intervalo de confiança de Wald 95%].

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Imagens obtidas sob luz polarizada de cortes histológicos evidenciando as marcações do corante SiriusRed em bloco de dentina após 24 horas de formação de biofilme.

**Figura 2.** *Threshold* ajustado pelo ImageJ evidenciando as marcações de colágeno estruturado em bloco de dentina após 24 horas de formação de biofilme.

**Figura 3.** Imagens obtidas sob luz polarizada de cortes histológicos evidenciando as marcações do corante SiriusRed em bloco de dentina após 48 horas de formação de biofilme.

**Figura 4.** *Threshold* ajustado pelo ImageJ evidenciando as marcações de colágeno estruturado em bloco de dentina após 48 horas de formação de biofilme.

**Figura 5.** Imagens obtidas sob luz polarizada de cortes histológicos evidenciando as marcações do corante SiriusRed em bloco de dentina após 72 horas de formação de biofilme.

**Figura 6.** *Threshold* ajustado pelo ImageJ evidenciando as marcações de colágeno estruturado em bloco de dentina após 72 horas de formação de biofilme.

## LISTA DE ABREVIATURAS

BHI: Brain Heart infusion

°C: Graus Celsius

CA: *Candida albicans*

GtfB: Glicosiltransferase B

MIX: Biofilme dualespécies de *Candida albicans* e *Streptococcus mutans*.

MMPs: Metaloproteinases da matriz dentária

SM: *Streptococcus mutans*

TSB: Tryptic Soy Broth

UFC: Unidades formadoras de colônia

%PDS: Porcentagem de perda de dureza de superfície

## SUMÁRIO

1. ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVA .....	14
1.1. <i>Cárie radicular e fatores associados</i> .....	14
1.2. <i>Papel dos biofilmes microbianos no desenvolvimento da cárie radicular</i> .....	17
1.3. <i>Papel do componente orgânico da dentina no desenvolvimento e paralização da lesão de cárie</i> .....	22
2. OBJETIVOS.....	24
2.1. <i>Objetivos específicos</i> .....	25
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	25
3.1. <i>Delineamento experimental</i> .....	25
3.2. <i>Obtenção dos blocos de dentina radicular</i> .....	26
3.3. <i>Cultivo dos biofilmes in vitro</i> .....	27
3.4. <i>Análises pós-formação de biofilme</i> .....	28
3.4.1. <i>Determinação da contagem de células viáveis nos biofilmes</i> .....	28
3.4.2. <i>Determinação da porcentagem de perda dureza de superfície (%PDS)</i> .....	29
3.4.3. <i>Determinação da porcentagem de colágeno remanescente na matriz orgânica da dentina</i> 29	
3.5. <i>Análise estatística</i> .....	31
4. RESULTADOS.....	31
5. DISCUSSÃO.....	43
6. CONCLUSÃO .....	46
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	47

## 1. ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVA

### 1.1. Cárie radicular e fatores associados

A cárie dentária é uma doença multifatorial onde várias características ambientais e comportamentais interagem entre si, tendo fatores que atuam na superfície dentária e que atuam no indivíduo/população. Fatores como pH, biofilme dental, composição e frequência da dieta, espécies microbianas presentes no biofilme, fluxo salivar e composição salivar, capacidade tampão e taxa de metabolismo de açúcar atuam diretamente sobre as superfícies dentárias e são modificadores do processo de doença cárie. Já classe social, educação, renda, conhecimento sobre o processo saúde-doença, comportamento e atitudes em relação a saúde bucal são fatores relacionados ao indivíduo/população e que também podem influenciar na atividade da doença (Fejerskov e Nyvad, 2003).

Considerando todos esses fatores, ainda existem diferenças no que se refere a progressão de cárie em diferentes substratos dentais. Comparando esmalte e dentina, temos uma grande diferença quanto à composição orgânica e inorgânica de cada substrato. Enquanto o esmalte é considerado o tecido mais duro do corpo humano, com alto conteúdo mineral – cerca de 90%, a dentina tem uma maior participação de conteúdo orgânico em sua composição, em torno de 18%. Mesmo a dentina tendo 70% de minerais em sua composição, esse mineral difere daquele que compõe o esmalte, mesmo os dois sendo chamados genericamente de hidroxiapatita. Os cristais presentes na dentina são menores em tamanho do que os do esmalte e também sofrem menos trocas iônicas que o esmalte, que geralmente incorpora fluoreto, diminuindo a solubilidade desses cristais. Ao contrário, os tecidos dentinários, tanto na coroa como na superfície radicular, tem maior conteúdo de magnésio e carbonato, o que torna o mineral mais solúvel (Hoppenbrouwers *et al.*, 1986; Goldberg *et al.*, 2011).

Quanto ao pH crítico para desmineralização dos substratos, foi estimado que um pH inferior a 5,5 seria necessário para permitir dissolução dos minerais presentes no esmalte dental, enquanto que para desmineralização de dentina esse valor deveria ser inferior a 6,5 (Dawes, 2003). Porém, quando o fluoreto está presente na cavidade bucal de forma constante, e devido ao fato de possibilitar formação de minerais do tipo fluorapatita na superfície dental, os valores de pH crítico são reduzidos em 1 unidade, de forma que no intervalo de pH entre 4,5 e 5,5 para esmalte, e entre 6,5 e 5,5 para dentina, há perda de hidroxiapatita e redeposição de fluorapatita na superfície dental, reduzindo dessa forma a perda mineral líquida frente aos episódios cariogênicos. Diante disso, o mineral da dentina seria muito mais solúvel e dissolveria em

situações em que o esmalte não seria afetado (Hoppenbrouwers *et al.*, 1986). Porém, contrariando Hoppenbrouwers, um estudo recente sugere que embora a solubilidade do mineral radicular seja maior do que a hidroxiapatita do esmalte, o seu pH crítico é mais baixo do que o estabelecido na literatura, variando de 5,66 a 5,08 (Shellis, 2010). Ainda assim, muitos carboidratos que são considerados seguros para esmalte, tem poder de dissolver dentina, como é o caso da lactose e do amido, que sozinhos não teriam capacidade para dissolver esmalte, mas tem se mostrado prejudiciais para a dentina, por causar uma queda de pH abaixo do pH crítico (Botelho *et al.*, 2016).

Um estudo recente comparou a dissolução mineral e a degradação proteica entre blocos de esmalte coronário e dentina radicular em um modelo de biofilme *in vitro* que foram constantemente expostos a glicose e o pH na interface dente/biofilme foi avaliado a cada 30 minutos, durante 120 minutos no total. Não foi encontrada atividade proteolítica em nenhuma das interfaces, porém o pH da interface dentina radicular/biofilme foi significativamente mais alto nos tempos de 30, 60 e 90 minutos quando comparado a interface esmalte coronário/biofilme. Porém, maiores quantidades de cálcio foram dissolvidas de dentina radicular do que de esmalte coronário, mesmo tendo havido uma produção similar de lactato (Mayanagi *et al.*, 2017), o que se justifica pelos diferentes valores de pH crítico necessários para dissolução desses minerais.

Diferentemente da dentina coronária, a dentina radicular é recoberta por uma camada de cimento, um tecido que pertence ao periodonto de suporte, ancorando os ligamentos periodontais. Recobrendo a raiz, temos dois tipos de cimento, o cimento acelular, que recobre os terços cervical e médio da dentina radicular, e o cimento celular, que contém fibras intrínsecas e recobre a porção apical radicular e regiões de furca (Bosshardt e Selvig, 1997). Quando esse tecido que é menos mineralizado e mais poroso é exposto à cavidade oral, ele pode servir como um nicho para penetração de micro-organismos ou ser removido por completo devido à escovação vigorosa ou tratamentos periodontais (Schupbach *et al.*, 1989).

A penetração inicial de micro-organismos ocorre seguindo múltiplas fissuras perpendiculares a superfície do cimento. Eventualmente, fissuras se fundem formando micro cavidades preenchidas com micro-organismos. Em um processo subsequente, bactérias podem invadir os túbulos dentinários (Schupbach *et al.*, 1989). Por isso, especificamente a cárie radicular, esta somente irá ocorrer a partir do momento em que houver recessão gengival e/ou perda de inserção e exposição da raiz na cavidade bucal. devido à exposição da região onde o sistema de fibras de Sharpey estava inserido, que é convertida em canais que podem facilitar a

penetração de micro-organismos juntamente com trincas e fissuras da superfície do cimento (Bosshardt e Selvig, 1997).

Atualmente, está havendo um aumento da prevalência das lesões de cárie radiculares. Isso se deve ao fato de que a população está envelhecendo com mais saúde e mantendo mais dentes em boca, e, com o tempo, tendo recessões gengivais, deixando as raízes expostas na cavidade bucal. Uma revisão sistemática realizada com o objetivo de identificar os fatores de risco associados a incidência de cárie radicular em modelos preditivos publicados na literatura, estimou que a prevalência das lesões dentre os estudos analisados variou de 12 a 77% (Ritter *et al.*, 2010).

Alguns estudos epidemiológicos têm sugerido que a presença de biofilme, proximidade do dente com próteses dentárias, presença de recessão gengival, hipossalivação, presença de cárie coronária, maior idade e maior renda mensal, pessoas brancas, uso de escova elétrica e experiência de cárie coronária são indicadores/fatores de risco ou preditores para cárie radicular (Tan e Lo, 2014; Hayes *et al.*, 2016; Ritter *et al.*, 2016).

Clinicamente tem sido observado que as lesões de cárie em dentina radicular são diferentes em relação a lesão de cárie em esmalte em termos de forma da lesão. Enquanto em esmalte a lesão cariiosa se desenvolve em profundidade, na superfície radicular ela ocorre lateralmente. Geralmente observa-se uma lesão extensa, mas rasa. Uma possível explicação para a extensão lateral da lesão se relaciona com a presença de fluido crevicular gengival, espessura de depósitos bacterianos e exposição ao fluxo salivar e estrutura do tecido dental. Biofilmes mais delgados podem ter fácil acesso ao sistema de tamponamento da saliva, o que pode contribuir para a redução da acidez do biofilme. O fluido gengival crevicular também pode agir como um agente modulador na cárie radicular devido ao seu pH neutro para levemente alcalino. Além disso, a acessibilidade ao fluxo salivar permite um processo de remineralização e previne a desmineralização em profundidade (Takahashi e Nyvad, 2016).

A microbiota associada com cárie radicular também difere quando comparada à associada com cárie em esmalte. Alguns micro-organismos diversos tem sido encontrados, tais como *Bifidobactéria*, *Rothia*, *Veillonella*, enterococos, bastonetes Gram-negativos anaeróbios e *Candida albicans* (Shen *et al.*, 2005). Estes micro-organismos não parecem ser tão dependentes de carboidratos refinados presentes na dieta como aqueles das cáries coronárias (Ellen *et al.*, 1985). Isso pode acontecer devido as diferenças na estrutura e composição desses tecidos, assim como condições micro ambientais. Por exemplo, lesões em dentina fornecem uma maior gama de nutrientes, advindos não somente da dieta, mas também do fluido crevicular

gingival e da matriz orgânica da dentina, que levam ao aumento da diversidade das populações microbianas associadas (Simon-Soro *et al.*, 2014; Rocas *et al.*, 2016).

### *1.2. Papel dos biofilmes microbianos no desenvolvimento da cárie radicular*

O biofilme dental é uma complexa comunidade multiespécies, composta por micro-organismos que vivem em simbiose. Quando o biofilme está em homeostase, temos os micro-organismos interagindo entre si e com seus produtos para manter o ambiente estável. Nessa condição, temos a presença de patógenos em pequena quantidade, sem condições necessárias para sua proliferação (Marsh, 2003; Takahashi e Nyvad, 2008).

Os estudos pioneiros nessa área relataram formação de lesão de cárie mesmo sem a presença dos patógenos/bactérias cariogênicas até então conhecidos ou ainda ausência de lesão de cárie mesmo na presença desses patógenos, originando a “Teoria da Placa Inespecífica”. Porém, com o avanço das pesquisas, começou a se pensar que apenas algumas espécies seriam responsáveis pelo desenvolvimento da lesão cariosa, e que poderiam ser transmitidos de uma pessoa para a outra, considerando a cárie como uma doença infectocontagiosa, a “Teoria da Placa Específica” (Huxley, 1973; Kohler *et al.*, 1981; Kohler *et al.*, 1983; Loesche, 1986). Então, em 1994, Marsh sugeriu a “Teoria da Placa Ecológica”, que une as duas teorias prévias, sugerindo que o biofilme se forma naturalmente nos dentes e é benéfico para o hospedeiro, ajudando a prevenir a colonização por espécies exógenas. A composição bacteriana do biofilme continua relativamente estável apesar da exposição regular a pequenas perturbações do ambiente. Essa estabilidade (homeostase microbiana) é causada em parte por um balanço dinâmico de ambas interações microbianas sinérgicas e antagônicas. Porém, a homeostase pode ser rompida, levando a mudanças no balanço da microflora, predispondo assim os sítios à doença (Marsh, 1994). Nesse biofilme que se forma, uma estabilidade dinâmica existe quando a produção de ácidos por algumas bactérias é neutralizado por processos metabólicos de outras espécies do biofilme, balanceando o processo des-remineralização (Takahashi e Nyvad, 2008).

Na presença frequente de carboidratos fermentáveis fornecidos pela dieta e consequente produção de ácidos pelas bactérias do biofilme dental, há uma adaptação e seleção microbiana favorecendo micro-organismos acidúricos ou ácido-tolerantes. Ocorre então o rompimento da homeostase microbiana do biofilme, e a proliferação de micro-organismos cariogênicos resulta no desequilíbrio do balanço dos processos de des-remineralização. Dessa forma, há o predomínio de eventos de desmineralização com perda mineral do dente. Uma vez que é estabelecido um ambiente acidúrico, os micro-organismos acidogênicos aumentam,

promovendo o desenvolvimento da lesão (Takahashi e Nyvad, 2008). Dentre os micro-organismos acidúricos e acidogênicos mais relacionados à cárie dental, os *Streptococcus mutans* constituem um dos grupos mais estudados.

Estudos genômicos e proteômicos permitiram aos pesquisadores um rápido progresso na identificação de genes, proteínas e vias metabólicas associados com a tolerância ao stress do *S. mutans*. Lemos e Burne, 2008, catalogaram os principais mecanismos de tolerância, que são: a bomba de prótons – que extrai prótons das células e em certas condições, gera a ATP para crescimento e persistência; a alcalinização do citoplasma; alteração do envelope celular; proteção, reparo ou degradação de proteínas e alteração de vias catabólicas (Lemos e Burne, 2008).

Várias estratégias de sobrevivência foram estabelecidas pelas comunidades encontradas na superfície dental. Elas são capazes de explorar os recursos disponíveis, incluindo vias glicolíticas e mecanismos fisiológicos permitindo aos micro-organismos armazenar compostos metabólicos como reservatórios energéticos (Takahashi e Nyvad, 2016).

Como reservatórios energéticos, estes micro-organismos podem converter compostos obtidos pela degradação de carboidratos da dieta em reservas intracelulares, chamadas de polissacarídeos intracelulares. Além disso, esses micro-organismos secretam polissacarídeos de reserva energética na matriz extracelular do biofilme dental após o metabolismo desses carboidratos da dieta. Porém, há um tipo de polissacarídeo extracelular que não funciona como reserva, pois não pode ser metabolizado depois de produzido, mas que causa um grande efeito na cariogenicidade do biofilme, o mutano – produzido pela enzima glicosiltransferase B do *S. mutans* que atua especificamente utilizando a sacarose como substrato. Esse polissacarídeo insolúvel é capaz de aumentar a cariogenicidade do biofilme pela modificação da matriz extracelular do mesmo, a qual se torna mais pegajosa, volumosa e porosa. Um biofilme mais poroso é mais cariogênico pois permite mais facilmente a difusão dos substratos fermentáveis para as camadas mais internas do biofilme. O caminho para a diluição dos ácidos ali produzidos pela saliva também se torna mais longo (Zero *et al.*, 1986).

Estudos clínicos têm sugerido que indivíduos carie ativos apresentam maiores contagens de *S. mutans* na saliva e biofilme (Kohler *et al.*, 1981; Choi *et al.*, 2009; Saraithong *et al.*, 2015), e que esses micro-organismos representam um terço da microbiota total de lesões cavitadas em dentina, sugerindo uma importante participação desses micro-organismos no desenvolvimento da lesão de cárie (Shen *et al.*, 2002).

Especificamente em relação a cárie radicular, o que se sabe é que há também uma alteração na homeostasia microbiana na medida em que há a recessão gengival causada por doença periodontal. Inicialmente, os micro-organismos não dispõem de muito oxigênio e carboidratos, tornando o ambiente inabitável para algumas espécies. Quando essa região é exposta a cavidade bucal, esse microambiente muda e a microbiota tem de se adaptar as novas condições sobre cemento/dentina. Quando uma grande quantidade de açúcar está disponível, ocorre a desmineralização dos tecidos duros radiculares, devido as trocas minerais entre os fluidos orais e a superfície dental (Tjaderhane *et al.*, 2015).

Porém, existem alguns mecanismos capazes de agir como tampões nesses biofilmes, como a saliva e o fluido crevicular, que ajudam a manter o pH próximo a neutralidade e secretam componentes de defesa do hospedeiro, modulando o crescimento e a atividade destes biofilmes em desenvolvimento (Do *et al.*, 2017).

Algumas espécies específicas incluindo *Streptococcus mutans*, *Lactobacilos spp.*, *Actinomyces*, *Atopobium*, *Olsenella*, *Pseudoramibacter*, *Propionobacterium* e *Selemonas* podem ser considerados agentes etiológicos da cárie radicular (Preza *et al.*, 2008). Porém, há estudos que também têm mostrado que *Candida albicans* está presente em sítios cariados.

A coagregação entre dois micro-organismos é definida como um reconhecimento entre moléculas da superfície, de forma que uma mistura de células é formada. Essas interações têm um papel importante na aderência bacteriana e colonização dos tecidos do hospedeiro (Kolenbrander, 1988). Um estudo realizado na China analisou 30 amostras de dentina radicular cariada, e *Candida albicans* esteve presente em 19 das amostras, em um total de 76,19% de fungos isolados, porém, a presença de *C. albicans* não influenciou na severidade da lesão (Shen *et al.*, 2002). Alguns anos após a realização desse estudo, 22 micro-organismos isolados destas lesões foram testados *in vitro* para verificar os perfis de coagregação desta microflora e entre os 210 pares avaliados, somente 29 demonstraram reação positiva de coagregação, sendo que o isolado de *C. albicans* não teve coagregação significativa com nenhum dos outros 21 micro-organismos estudados (Shen *et al.*, 2005).

Um estudo *in vitro* desenvolveu um método para estudar o potencial cariogênico de diferentes espécies de *Candida* sobre blocos de dentina. No total, 6 espécies (*Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, *Candida inconspicua* e *Candida norvegensis*) foram analisadas e observou-se que ao fim desses 15 dias, foi constatado que *Candida albicans* havia tido um padrão mais agressivo de desmineralização, indicando que

quando presente junto a um micro-organismo cariogênico, o fungo pode ter um papel ativo na progressão da cárie (Szabo *et al.*, 2014).

Já um estudo transversal analisou as contagens de *C. albicans* na saliva de crianças com cárie severa da infância e crianças livres de cárie. Nesse estudo foi encontrada uma prevalência de 100% e uma maior contagem de *C. albicans* na saliva de crianças com cárie severa da infância (Thomas *et al.*, 2016).

Outro estudo determinou a presença de *S. mutans* e *C. albicans* em biofilme supra gengival e em dentina cariada de 56 crianças de 1-5 anos divididas em 3 grupos: livres de cárie, cárie ativas e com cárie severa da infância. *S. mutans* e *C. albicans* foram mais encontrados nas amostras de crianças com cárie severa da infância, independente da amostra, seja biofilme ou dentina cariada. A frequência de *C. albicans* em amostras de cárie severa da infância foi maior quando comparada com os demais grupos, tendo uma associação significativa da presença desse micro-organismo com cárie severa da infância (De Carvalho *et al.*, 2006).

A correlação entre a presença de *Candida* em 100 crianças com idades entre 6 – 12 anos foi analisada, dividindo-as em dois grupos, livres de cárie e cárie positivos. Foram coletadas amostras das superfícies bucais das crianças com swabs estéreis e também com bochecho de 10 ml de tampão fosfato. Após a análise, foi identificado que as crianças no grupo cárie positivo tiveram uma maior frequência de presença de *Candida* quando comparadas com o grupo de crianças livres de cárie, e o risco relativo calculado foi de 67,37 e o intervalo de confiança variou de 14-323, relacionando um maior risco de cárie com presença de *Candida* (Raja *et al.*, 2010).

Mediante a coleta de amostras de biofilme de 41 crianças de 3 – 6 anos, 21 com cárie severa da infância e 20 livres de cárie, um estudo avaliou a presença de *C. albicans*. Os resultados demonstraram que *C. albicans* esteve presente em 57,1% das amostras de crianças com cárie severa da infância, sugerindo que esse micro-organismo é um importante componente do biofilme associado com cárie severa da infância (Yang *et al.*, 2012).

Outro estudo clínico coletou amostras de saliva, biofilme e dentina cariada – quando havia, de 26 crianças cárie ativas e 24 crianças livres de cárie, onde *C. albicans* foi encontrada em baixas frequência e quantidade em saliva e biofilme tanto de crianças cárie ativas quanto de crianças livres de cárie. Em dentina cariada, *C. albicans* foi encontrada em apenas 4 das 26 amostras, enquanto que *S. mutans* foi encontrado em 21 das 26 amostras, o que não resultou em uma interação significativa estatisticamente entre os dois micro-organismos (Al-Ahmad *et al.*, 2016).

Estudos têm investigado a relação que existe entre *C. albicans* e *S. mutans* quando esses micro-organismos são cultivados simultaneamente nos biofilmes. Recentemente, foi observada uma interação sinérgica entre *C. albicans* e *S. mutans* mediada pela influência das glicosiltransferases derivadas das bactérias. Foi determinado que as glicosiltransferases do *S. mutans* (particularmente GtfB) se ligam a superfície das células de *C. albicans* mesmo quando elas estão na forma de hifas, convertendo-as em produtoras de polissacarídeos extracelulares insolúveis quando há sacarose disponível. Essa interação resulta em um aumento enorme na quantidade de polissacarídeos extracelulares na matriz do biofilme, e sinergicamente melhora a expressão de virulência in vivo, como foi determinado neste trabalho específico, usando um modelo de cárie dental em roedores (Falsetta *et al.*, 2014).

Em um estudo que usou microscopia de força atômica para melhor entender a força e a dinâmica da ligação entre GtfB e *C. albicans*, foi demonstrado que as enzimas se ligam com bastante força à superfície celular e tem uma baixa taxa de dissociação, sugerindo uma ligação altamente estável. A ligação entre a enzima e a superfície celular de *C. albicans* foi 2,5 vezes maior e a estabilidade da ligação aproximadamente 20 vezes maior quando comparada a adesão da enzima com *S. mutans*. Essa adesão forte e estável da GtfB com *C. albicans* explica em parte porque essa exoenzima modula efetivamente essa interação tão virulenta (Hwang *et al.*, 2015).

Além de promover adesão, *C. albicans* também é capaz de usar o ácido láctico produzido pelo *S. mutans* para seu próprio metabolismo. Isso reduz a tensão do oxigênio para níveis preferidos pelo *S. mutans* e, além disso, a *C. albicans* também tem o potencial de induzir fatores estimulantes de crescimento para *S. mutans* (Metwalli *et al.*, 2013). A *C. albicans* também apresenta um mecanismo de virulência próprio, a capacidade de mudar sua forma de levedura para hifa, conforme o ambiente em que está inserida (Sudbery, 2011).

Um estudo *in vitro* realizado com a intenção de avaliar os efeitos da terapia fotodinâmica em biofilmes de *C. albicans* sozinha e associada com *S. mutans* e *Enterococcus faecalis* teve como resultados que o *S. mutans* favoreceu o crescimento de *C. albicans* em biofilmes crescidos na presença de sacarose, sem ter efeito do tratamento fotodinâmico. Foi concluído que o crescimento e a sensibilidade da *C. albicans* ao tratamento é altamente influenciado pela combinação bacteriana, e que a presença de sacarose influencia diretamente na sensibilidade do biofilme ao tratamento, pois é o substrato para a construção da matriz extracelular (Tome *et al.*, 2017).

Porém, contrariando o descrito acima, alguns estudos sugerem que a presença de *C. albicans* em um biofilme de *S. mutans* parece diminuir o potencial cariogênico do biofilme em

termos de acidez e desmineralização, enquanto a produção de ácido láctico e o crescimento de espécies acidogênicas não é inibido. Então, foi hipotetizado que *C. albicans* metabolicamente leva a alcalinização no biofilme consumindo ácido láctico, que por sua vez, diminui a desmineralização da hidroxiapatita (Willems *et al.*, 2016).

*C. albicans* tem a habilidade de mudar as condições ambientais no nicho que está inserida, aumentando o pH e permitindo que o ambiente se torne mais favorável a muitas outras espécies bacterianas. Além disso, há a produção de metabólitos secundários, como o farnesol, um composto que age como antimicrobiano contra alguns tipos bacterianos (Krom *et al.*, 2014).

O farnesol é um agente antimicrobiano, que foi testado em associação com fluoreto para diminuir alguns fatores de virulência do *S. mutans*, como a síntese de polissacarídeos extracelulares e a habilidade de tolerar estresses exógenos. Tanto em um modelo *in vitro*, como em um modelo em ratos, a aplicação tópica durante 60 segundos, duas vezes ao dia, reduziu drasticamente o desenvolvimento de lesões cáries, quando comparado aos grupos somente com fluoreto ou somente com veículo, sem alterar as contagens de *S. mutans* nem a população total do biofilme (Falsetta *et al.*, 2012).

Considerando os estudos disponíveis, (Pereira *et al.*, 2017) propôs que ainda não é possível classificar a *Candida* como um micro-organismo cariogênico, mas é possível afirmar que tem uma função secundária, agindo em sinergismo com patógenos como residentes do biofilme. No entanto, as evidências ainda são inconclusivas e mais estudos são necessários para confirmar essa afirmação.

### *1.3. Papel do componente orgânico da dentina no desenvolvimento e paralização da lesão de cárie.*

Além da perda de minerais provocada pelos ácidos bacterianos, a lesão em dentina também progride devido a degradação da matriz orgânica por enzimas que são capazes de degradar o colágeno (Takahashi e Nyvad, 2016).

Essas enzimas são genericamente denominadas de colagenases e podem ser secretadas pelos micro-organismos durante o avanço da lesão. Porém, algumas proteinases intrínsecas do tecido dentinários, também denominadas de metaloproteinases, estão naturalmente presentes na dentina em sua forma inativa. Todas as vezes que essas enzimas são expostas ao baixo pH, elas são ativadas e dão início à degradação do colágeno dentinário (Ricard-Blum, 2011).

As metaloproteinases da matriz dentária, geralmente representadas pela sigla MMPs são uma família de enzimas zinco e cálcio dependentes, que são importantes em vários processos

fisiológicos, e são capazes de degradar quase que qualquer componente da matriz extracelular. Essa família representa 23 enzimas, que são divididas em 6 grupos, baseado no substrato que degradam. Porém, a maioria das MMPs podem degradar vários substratos com diferentes especificidades (Tjaderhane *et al.*, 2015).

Em um trabalho que usou Western Blotting para identificar as MMPs presentes em lesões de cárie em dentina, MMP-2, MMP-8 e MMP-9 foram identificadas nas amostras. Ao mesmo tempo, quando amostras de saliva foram armazenadas em pH baixo seguido de neutralização, houve um aumento de quatro vezes na atividade proteolítica. Assim, foi demonstrado que após ativação dessas enzimas pelos ácidos bacterianos, elas têm um papel crucial na destruição da dentina por cárie (Tjaderhane *et al.*, 1998).

Outro estudo avaliou a presença de MMPs por imunofluorescência e por coloração Tricrômica de Masson em fatias de pré-molares cariados extraídos. Os resultados mostraram que a expressão de MMP-2 estimulada pela cárie, teve diferentes níveis em dentina hígida, dentina afetada e dentina infectada. A maior expressão de MMP-2 na região de dentina afetada quando comparada à dentina hígida sugere uma degradação mais rápida da camada híbrida quando esse tecido afetado é utilizado como substrato para uma restauração adesiva (Toledano *et al.*, 2010).

*C. albicans* também mostrou estar associada à degradação de colágeno tipo I na dentina cariada em crianças HIV, devido à liberação de enzimas proteolíticas na matriz extracelular. Esse resultado pode estar associado a um fator de virulência de muitos fungos, que pode ser modulado pela imunossupressão (Portela *et al.*, 2012).

Porém, um estudo mostrou que em cáries dentinárias, parece haver uma resposta do complexo dentino-pulpar, estimulando a síntese de colágeno tipo I, fosforinas e sialoproteínas, provavelmente para formar uma base para formação de dentina reparadora ou reacionária (Lee *et al.*, 2006).

A manutenção das fibras colágenas é de fundamental importância quando se pensa em remineralização do tecido dentinário cariado. A remineralização intrafibrilar é seguida pela extrafibrilar, até englobar toda a rede de colágeno. Por isso, a matriz orgânica da dentina funciona como um arcabouço para os minerais, levando a uma remineralização com recuperação das propriedades mecânicas (Kinney *et al.*, 2003). Na medida em que o colágeno é degradado pela ação das collagenases microbianas e também pelas MMPs devido à acidificação da dentina, o processo de remineralização pode ser comprometido.

Diversas técnicas estão disponíveis para análise do colágeno dentinário, dentre elas a técnica de coloração PicroSirius Red. Essa técnica consiste em um corante que se liga a várias

moléculas, incluindo o colágeno, estimulando sua birrefringência, que pode ser verificada sob luz polarizada, mostrando o conjunto colágeno/sirius red com cores brilhantes, contrastando com o resto da amostra (Rittie, 2017).

Objetivando analisar o colágeno peritubular em dentina cariada, um estudo foi realizado com a técnica de PicroSirius Red associada com HE em amostras de dentina cariada de 10 pacientes. A média de túbulos dentinários na dentina infectada foi de 213 e na dentina afetada foi de 120. A área média dos túbulos na dentina infectada foi 1175 e na dentina afetada 1420. A porcentagem de colágeno intratubular organizado na dentina infectada foi 12,71% e na afetada foi 32,37%. Os autores concluem que o uso do Sirius Red para o cálculo da porcentagem de colágeno organizado na matriz, associado à quantificação e caracterização dos túbulos dentinários é um método seguro e reprodutível para morfometria em cáries em dentina (Pinheiro *et al.*, 2008).

Frente ao exposto, sabemos que quando há recessão gengival, a superfície radicular é recoberta por biofilmes microbianos. Na presença de carboidratos fermentáveis, esses micro-organismos liberam ácidos decorrentes da metabolização, que diminuem o pH do biofilme, e que, se constante, leva a uma seleção de micro-organismos ácido-tolerantes a acidogênicos. As interações entre esses ácidos liberados na matriz do biofilme e os tecidos dentinários, levam à dissolução do mineral presente no tecido, formando uma lesão de cárie. Existem estudos que mostram que tanto *S. mutans* como *C. albicans* estão presentes em pacientes cárie ativos ou que possuam cárie radicular. Ainda, parece que quando esses micro-organismos estão associados, o potencial cariogênico do biofilme é aumentado. Porém, existem evidências que sugerem que essa associação nem sempre pode levar a um maior potencial cariogênico.

Dessa forma, é necessário que o papel da *C. albicans* na cariogenicidade de biofilmes de *S. mutans* seja esclarecida de forma a possibilitar um melhor entendimento sobre a participação desses micro-organismos no desenvolvimento de cárie.

## **2. OBJETIVOS**

O objetivo desse estudo foi avaliar o potencial cariogênico de biofilmes contendo *C. albicans* em relação à dentina radicular.

### 2.1. Objetivos específicos:

- Comparar a porcentagem de perda de dureza de superfície (%PDS) em dentina radicular bovina induzida por biofilmes monoespécie de *S. mutans*, *C. albicans* ou dualespécies de *S. mutans* e *C. albicans*, formados *in vitro*, em 24, 48 e 72 horas;
- Comparar as contagens de unidades formadoras de colônia por mL (UFC/mL) de biofilmes monoespécie de *S. mutans*, *C. albicans* ou dualespécies de *S. mutans* e *C. albicans* em 24, 48 e 72 horas;
- Comparar a queda de pH no meio de cultura de biofilmes monoespécie de *S. mutans* e *C. albicans* e dualespécies de *S. mutans* e *C. albicans* em 24, 48 e 72 horas;
- Descrever comparativamente a porcentagem de colágeno remanescente na matriz dentinária após cultivo de biofilmes monoespécie de *S. mutans* e *C. albicans* e dualespécie de *S. mutans* e *C. albicans* formados durante 24, 48 e 72 horas.

A hipótese de trabalho é que a presença de *C. albicans* em um biofilme de *S. mutans* altera o potencial cariogênico e o padrão de organização da matriz orgânica da dentina em relação aos biofilmes monoespécie diminuindo o seu potencial cariogênico.

A hipótese nula é de que a associação entre *S. mutans* e *C. albicans* em biofilmes *in vitro* não altera o potencial cariogênico nem o padrão de organização da matriz orgânica da dentina em relação aos biofilmes monoespécies.

## 3. MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1. Delineamento experimental

Biofilmes *in vitro* formados por *S. mutans*, *C. albicans* ou associação entre *S. mutans* + *C. albicans* foram cultivados na superfície de blocos de dentina radicular de dentes bovinos por 24, 48 e 72 horas. Ao final desse período foi determinada a contagem de micro-organismos viáveis em cada condição. Em seguida, foi determinada a porcentagem de perda de minerais de superfície nos blocos de dentina em cada condição analisada. Amostras de dentina pós-formação de biofilme foram também avaliadas por meio de coloração histológica para análise da organização de fibras de colágeno remanescentes na dentina após indução de lesão de cárie pelos diferentes grupos microbianos. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

### 3.2. Obtenção dos blocos de dentina radicular

Os blocos de dentina foram obtidos a partir da superfície radicular da face vestibular e lingual de dentes bovinos. Previamente ao preparo, os dentes foram submetidos à remoção de restos teciduais e armazenados durante 30 dias em uma solução de formol a 2% e pH 7,0. Posteriormente, esses dentes foram fixados pela raiz em uma morsa de bancada acoplada a uma furadeira de bancada (Schulz, FB13) contendo uma broca diamantada do tipo serra-copo com 8 mm de diâmetro (Black Jack, J722) de forma que de cada dente foram obtidos 2 blocos de dentina radicular, todos com 8 mm de diâmetro. Os discos foram então colados com auxílio de cera à uma superfície acrílica de forma que a parede pulpar dos blocos ficasse voltada para cima. Os discos então foram lixados em máquina politriz (AROTEC APL-4) com o auxílio de lixas d'água de granulação 600 e 1200 para permitir a planificação dessas superfícies, marcando essa superfície após o processo de planificação com grafite a fim de não ser confundida com a superfície vestibular. Em seguida, os blocos foram colados de forma que a superfície vestibular da dentina radicular ficasse para cima e então também foram lixadas e planificadas com lixas d'água de granulação 600 e 1200 em máquina politriz, passando para a etapa de polimento da superfície vestibular com auxílio de feltro para polimento e pasta diamantada para acabamento de resina composta, de forma que foram obtidos blocos com espessura de 1,8 mm em média. A cada troca de lixa, os blocos foram imersos em água e passaram por limpeza com ponta de sonicador (VIBRACELL, Sonic Materials INC50T) para remover possíveis grânulos que tenham se desprendido da lixa e que poderiam causar riscos na superfície do bloco. Os blocos que continham trincas ou rachaduras foram descartados. Os demais blocos foram armazenados em recipientes fechados com 100% de umidade, conservados em geladeira a 4°C (Arthur *et al.*, 2015).

Após o preparo dos blocos, os mesmos foram levados a um microdurômetro (Shimadzu, HMV 2) para determinação de sua dureza superficial inicial. Uma endentação de referência foi feita no centro de cada bloco, utilizando uma carga de 100 N durante 5 segundos, para que a segunda medição, após a formação dos biofilmes, fosse facilitada. O endentador foi então posicionado 100 µm abaixo dessa endentação de referência onde outras 5 endentações foram realizadas distantes 100 µm uma da outra, com uma carga de 10 N durante 5 segundos. A média de dureza das 5 endentações foi calculada para cada bloco de dentina e os blocos que obtiveram valores de dureza de superfície igual à média geral com variação de 20% acima ou abaixo da média foram incluídos no estudo (Média =  $39,69 \pm 7,64$ ). Foram excluídos blocos que apresentaram rachaduras ou fendas detectadas após o polimento. Uma película de

aproximadamente 1 mm de largura de verniz de unha foi aplicada em uma das bordas laterais dos blocos selecionados, de forma que uma parte da superfície da dentina ficou recoberta e não foi exposta às condições experimentais. O software Excel foi utilizado para randomização dos blocos em relação às diferentes condições experimentais. Todos os blocos foram numerados e distribuídos aleatoriamente entre os grupos experimentais de forma que a média de dureza inicial foi semelhante entre todos os grupos (Média =  $39,70 \pm 0,77$ ). Então, os discos foram fixados em tampas de placas de 24 poços e foram esterilizados por peróxido de hidrogênio (Arthur *et al.*, 2015).

### 3.3. Cultivo dos biofilmes *in vitro*

Cepas de *S. mutans* (UA 159) e *C. albicans* (ATCC 90027), que estavam sendo conservadas congeladas, tiveram 50 µL transferidos para placas contendo Brain Heart Infusion Agar (BHI) (Kasvi, LOT 072116509) pela técnica do esgotamento e foram incubadas a 37°C durante 24 horas (*C. albicans*) e 48 horas (*S. mutans*) em estufa de cultura. Após esse período, as unidades formadoras de colônia (UFC) foram transferidas das placas de BHI para tubos Falcon contendo 10 mL de meio Tryptic Soy Broth (TSB) (LOT 610053) contendo 0,5% de sacarose, que foram incubadas em estufa (FANEM 002CB) a 37°C durante 24 horas. Passado esse tempo, os tubos foram agitados com auxílio de um agitador orbital (KLINE CT 150) e 2 mL de cada tubo foi transferido para dois novos tubos contendo 10 mL de meio fresco e incubados por mais 24 horas em estufa a 37°C. No dia seguinte, as suspensões tiveram sua densidade óptica ajustadas com o auxílio de um espectrofotômetro (SPECTRONIC 21D, MILTON ROY), calibrado em 550 nm. Para *S. mutans* a absorbância foi ajustada em 0,5 (equivalente a  $10^9$  UFC/mL) e para *C. albicans* a absorbância foi ajustada em 0,6 (equivalente a  $10^7$  UFC/mL). Após o ajuste, alíquotas do mesmo volume de cada suspensão foram combinadas para formar uma suspensão dual-espécies (Contagem média CA em MIX:  $3,00E+07$  UFC/mL; Contagem média de SM em MIX:  $1,40E+08$  UFC/mL) (correspondendo a  $8,14 \text{ Log}_{10}(\text{UFC/mL de SM})$  e  $7,47 \text{ Log}_{10}(\text{UFC/mL de CA})$ ).

Em seguida, três placas de 24 poços foram preenchidas com 1,8 mL de meio TSB suplementado com 0,12% de sacarose e 0,12% de glicose, sendo uma placa para cada composição de biofilme. Cerca de 400 µL de inóculo foram adicionados em cada poço de acordo com os seguintes grupos: Grupo 1 – biofilme monoespécie de *S. mutans* (SM); Grupo 2 – biofilme monoespécie de *C. albicans* (CA) e Grupo 3 – Biofilme dual-espécies formado por

*S. mutans* e *C. albicans* (MIX). As tampas com os blocos de dentina previamente randomizados e esterilizados foram colocadas então sobre as placas e levadas à estufa e incubadas a 37°C durante 8 horas. Após esse período, o meio de cultura foi substituído por meio estéril a fim de não ocorrer uma desmineralização muito intensa nas primeiras horas do experimento. No decorrer do experimento, as placas foram incubadas durante 72 horas totais e o meio de cultura foi trocado a cada 24 horas e o pH do meio foi aferido após cada período de incubação com o auxílio de um pHmetro (DIGIMED) previamente calibrado com padrões de pH 4 e 7 (Arthur et al, 2015).

Foram realizados 3 experimentos distintos. Em cada um deles, 6 replicatas foram utilizadas em cada condição experimental (composição de biofilme e tempo). Além disso, 2 blocos de dentina de cada composição microbiana e de cada tempo de formação de biofilme foram coletados dos experimentos 1 e 2 para posterior determinação da porcentagem de colágeno estruturado na matriz orgânica da dentina.

Após a coleta, os blocos foram limpos para evitar permanência de biofilme na superfície e acomodados sobre algodão umedecido em microtubos identificados e então estocados em geladeira até a determinação da microdureza superficial após formação de biofilme.

### *3.4. Análises pós-formação de biofilme*

#### **3.4.1. Determinação da contagem de células viáveis nos biofilmes**

A cada 24 horas foi realizada a coleta dos blocos correspondentes (6 blocos para cada composição microbiana) com o auxílio de uma lâmina de bisturi e uma pinça estéril, e os mesmos foram imersos em 1 mL de solução salina estéril contida em um microtubo, com 4 pérolas de vidro adicionadas a cada um, e os microtubos foram agitados em um agitador de tubos durante 1 minuto para que houvesse a dispersão do biofilme da superfície do bloco. Depois dessa etapa, foi feita uma diluição seriada, transferindo 100 µL do conteúdo do primeiro microtubo para um segundo microtubo contendo 900 µL de solução salina estéril. Esse processo se seguiu até se chegar a uma diluição de 10<sup>-6</sup>. Após a diluição, 25 µL de cada diluição foram transferidos para uma placa contendo BHI Ágar, que foi incubada em microaerofilia durante 24 horas, quando se tratava do grupo MIX, ou durante 48 horas, quando se tratava do grupo SM. As placas do grupo CA não apresentavam necessidade de microaerofilia, então somente foram incubadas durante 24 horas. Todas as placas ficaram em estufa com temperatura controlada a

37°C. Após esse período, foi realizada a contagem das unidades formadoras de colônia (UFC) de cada placa com o auxílio de um microscópio estereoscópico (OLYMPUS, sz2). Os resultados obtidos foram transformados em UFC/mL seguindo o cálculo:

$$\text{UFC/mL} = \frac{(\text{contagem} * 1000)}{25} * \text{diluição}$$

Em seguida, os resultados obtidos foram transformados em logaritmo de 10, para melhor exposição dos dados.

### **3.4.2. Determinação da porcentagem de perda dureza de superfície (%PDS)**

Após o término dos experimentos, foi medida a microdureza superficial final dos blocos de dentina (n=6/tempo/grupo). Foram realizadas cinco endentações localizadas 100 µm à direita e 100 µm abaixo da endentação de referência, quando foi possível identificá-la. Quando não foi possível, as endentações foram feitas no centro do bloco. A carga e o tempo usados foram os mesmos usados para determinar a microdureza superficial inicial.

A partir do valor médio das 5 endentações, foi calculada uma média de dureza pós-experimento. A porcentagem de perda de dureza superficial foi calculada pela seguinte fórmula:

$$\%PDS = \frac{(DI - DP) \times 100}{DI}$$

PDS = Perda de dureza superficial

DI = Dureza inicial

DP = Dureza pós-experimento

### **3.4.3. Determinação da porcentagem de colágeno remanescente na matriz orgânica da dentina**

Os blocos de dentina foram fixados durante 48 horas em solução de formol tamponado a 10% a fim de evitar a autólise das células presentes nas amostras e aumentar a capacidade de coloração da amostra. Depois disso, os blocos foram descalcificados com ácido nítrico a 10%

durante 10 dias, com trocas diárias do ácido. Os blocos foram testados quanto à descalcificação com o auxílio de uma agulha, e quando essa ultrapassou o bloco sem resistência, foi dado prosseguimento ao processamento. Os blocos então foram acondicionados em cassetes histológicos identificados e desidratados em concentrações crescentes de álcool e levados para clareamento em xilol, a fim de promover uma melhor penetração de parafina na peça. Em seguida, as amostras foram imersas em parafina a 60°C e levadas em estufa na mesma temperatura. Após esse processo, foi feita a inclusão propriamente dita, derramando parafina líquida sobre o bloco acondicionado em recipiente específico.

Com o cassete histológico pronto, as amostras seguiram para o corte, onde com o auxílio de um micrótomo foram obtidas fatias de aproximadamente 3 µm, que foram colocadas sobre a superfície de lâminas de vidro silanizadas, para evitar desprendimento da amostra. As lâminas foram levadas à estufa em 80°C durante 30 minutos para evaporação da parafina, e então desparafinizadas com xilol e reidratadas em concentrações decrescentes de álcool.

As lâminas seguiram então para o processo da coloração, sendo primeiramente recobertas pelo corante Sirius Red durante um tempo de 30 minutos. Após esse período, as lâminas foram lavadas com água destilada, e, então, o corante Fast Green foi aplicado durante 4 minutos e novamente as lâminas foram lavadas com água destilada. Após a coloração, as amostras foram novamente desidratadas em álcool e clarificadas no xilol, e em seguida, lamínulas de vidro foram montadas acima das amostras para proteção. Nesta técnica de coloração histológica, podemos observar que, em luz polarizada, as fibras colágenas se apresentam em vermelho/alaranjado devido à ligação ao corante Sirius Red, e que as demais proteínas não-colágenas se mostram como um fundo verde, devido a ligação com o corante Fast Green (Lopez-De Leon e Rojkind, 1985).

De posse das lâminas coradas, os cortes histológicos foram fotografados com o auxílio de um microscópio ótico em aumento de 5x em luz polarizada conectado a um computador com o software IS Capture de captura de imagens. Após fotografadas, as imagens foram remontadas no software Power Point e seguiram para análise pelo software de análise de imagens ImageJ.

No ImageJ, a imagem polarizada foi aberta, transformada em 8 bit, para manter somente as informações de marcação, e depois foi ajustada a seleção das marcações correspondentes com a ferramenta *threshold*. A seleção foi ajustada usando como referência a imagem polarizada, para se conseguir o maior nível de fidelidade das marcações do colágeno. Depois do *threshold* ajustado, a imagem foi dividida em três terços iguais: superficial, médio e interno. Cada terço teve sua área total medida pela ferramenta desenho à mão livre, que selecionou toda

a imagem correspondente ao corte histológico. Em cada terço foi aplicada a ferramenta *analyze particles*, que foi ajustada para marcar células com tamanho de pixel<sup>2</sup> de 0-infinito e circularidade de 0,0 a 5,0 pixels. Um banco de dados foi gerado para cada imagem, mostrando quantas marcações houve na imagem e a área de cada marcação. De posse desses dados, a área de todas as marcações foi somada.

Com os dados de área total da imagem e de área total de marcação, foi calculada então uma porcentagem de colágeno estruturado remanescente de cada terço de cada corte. Depois de analisar todos os cortes, foi feita uma média geral de cada terço em relação à grupo/tempo.

### 3.5. Análise estatística

As variáveis estudadas (%PDS, contagem de micro-organismos viáveis, pH, porcentagem de colágeno estruturado remanescente) foram comparadas entre os diferentes tipos de biofilme e tempos pré-estabelecidos. Inicialmente, foi realizado o teste de Shapiro-Wilk para testar a normalidade das variâncias. Quando presentes, os outliers foram excluídos da análise (outliers foram encontrados para as variáveis de pH e contagem de SM no tempo de 72 horas, e também para a variável porcentagem de colágeno estruturado no terço superficial, médio e profundo para o biofilme de CA no tempo 72 horas e no terço superficial no biofilme SM no tempo 72 horas). Com um padrão de distribuição normal, usou-se a Análise de Variância de duas vias (ANOVA-2way) para comparar os efeitos principais (tipo de biofilme ou tempo de formação do biofilme) e o efeito da interação entre esses dois fatores. Quando significativo foi usado o teste de comparação múltipla de Bonferroni. O nível de significância adotado foi de 5%. Para a análise do colágeno, a porcentagem de colágeno estruturado nos terços superficial e médio foi transformada em logaritmo de base 10 ( $\text{Log}_{10}$ ) para cumprir o requisito de homogeneidade das variâncias do teste estatístico, e por isso foi calculada a média geométrica. As análises foram realizadas no software SPSS (versão 23, IBM Statistics).

## 4. RESULTADOS

Dentre as comparações realizadas, houve efeito isolado do tipo de biofilme nas contagens de CA ( $p=0,002$ ). Para %PDS houve efeito isolado de tipo de biofilme e de tempo

de formação de biofilme ( $p < 0,001$ ). Para a variável pH houve interação entre os fatores tipo de biofilme e tempo de formação dos biofilmes ( $p < 0,001$ ) (Tabelas 1 e 2).

Em relação às contagens de micro-organismos viáveis nos biofilmes, não foi observada diferença estatística nas contagens de SM entre biofilme monoespécies e biofilme dualespécies para os tempos de formação analisados. Já para CA, as contagens foram estatisticamente maiores no biofilme monoespécies quando comparado ao biofilme dualespécies (Tabela 1).

Em relação ao desenvolvimento da lesão de cárie, observou-se que, independentemente do tipo de biofilme, houve maior %PDS em biofilmes formados durante 48 e 72h em comparação aos biofilmes formados por 24 horas. Em relação ao tipo de biofilme, observou-se que a %PDS no biofilme monoespécies de SM foi estatisticamente maior que na presença de biofilme dualespécies, que por sua vez foi maior que aquela encontrada na presença de biofilme monoespécie de CA (Tabela 2).

Considerando o potencial acidogênico dos biofilmes em função da composição microbiana, após 24 horas de crescimento os biofilmes monoespécies de CA apresentaram pH estatisticamente maior que os demais biofilmes que não foram diferentes entre si. Após 48 e 72 horas de formação de biofilme, os valores de pH foram estatisticamente diferentes entre os tipos de biofilmes, sendo que os biofilmes de CA apresentaram os maiores valores, enquanto que os biofilmes de SM apresentaram os menores valores de pH. Em relação ao potencial acidogênico dos biofilmes em função do tempo de formação, não houve alteração nos valores de pH dos biofilmes monoespécies de SM e de CA. Porém, observou-se que no biofilme dualespécies, o pH após 72 horas foi estatisticamente maior quando comparado aos biofilmes formados por 24 e 48 horas, cujos valores de pH não foram estatisticamente diferentes entre si (Tabela 2).

**Tabela 1.** Contagem de micro-organismos ( $\text{Log}_{10}\text{UFC/mL}$ ), de acordo com tempo de formação e composição dos biofilmes (média  $\pm$  dp) [Intervalo de confiança de Wald 95%]:

Variáveis	Tempo	Biofilmes			Total
		SM	CA	MIX	
Contagem SM ( $\text{Log}_{10}$ UFC/mL)	24h	6,85 $\pm$ 0,45 [6,35; 7,35]	-	6,75 $\pm$ 0,63 [6,75; 7,25]	6,80 $\pm$ 0,54 [6,44; 6,15]
	48h	7,18 $\pm$ 0,69 [6,65; 7,71]	-	6,96 $\pm$ 1,28 [6,45; 7,46]	7,06 $\pm$ 1,03 [6,70; 7,43]
	72h	6,62 $\pm$ 1,07 <sup>‡</sup> [6,09; 7,16]	-	6,39 $\pm$ 1,73 [5,89; 6,89]	6,50 $\pm$ 1,04 [6,14; 6,82]
	<b>Total</b>	6,88 $\pm$ 0,78 [6,58; 7,19]	-	6,70 $\pm$ 1,29 [6,41; 6,99]	
	$\rho_{\text{biofilme}}$				0,381
	$\rho_{\text{Tempo}}$				0,104
	$\rho_{\text{Interação}}$				0,957
Contagem CA ( $\text{Log}_{10}$ UFC/mL)	24h	-	4,93 $\pm$ 0,62 [4,55; 5,30]	4,54 $\pm$ 0,54 [4,17; 4,92]	4,73 $\pm$ 0,61 [4,47; 5,00]
	48h	-	5,25 $\pm$ 0,66 [4,87; 5,62]	4,82 $\pm$ 1,00 [4,45; 5,20]	5,04 $\pm$ 0,86 [4,77; 5,30]
	72h	-	5,46 $\pm$ 0,62 [5,08; 5,20]	4,82 $\pm$ 1,72 [4,44; 5,19]	5,14 $\pm$ 0,98 [4,87; 5,40]
	<b>Total</b>	-	5,21 $\mathbf{a}$ $\pm$ 0,66 [4,87; 5,40]	4,73 $\mathbf{b}$ $\pm$ 0,94 [4,51; 4,95]	
	$\rho_{\text{biofilme}}$				<b>0,002</b>
	$\rho_{\text{Tempo}}$				0,090
	$\rho_{\text{Interação}}$				0,760

Médias seguidas por letras minúsculas distintas diferem estatisticamente entre si na comparação entre os diferentes tipos de biofilmes pelo teste de Bonferroni ( $p < 0,05$ ). Médias seguidas por letras maiúsculas distintas diferem estatisticamente entre si na comparação entre os diferentes tempos de formação de biofilme pelo teste de Bonferroni ( $p < 0,05$ ).

SM: biofilme monoespécies de *S. mutans*

CA: biofilme monoespécies de *C. albicans*

Mix: biofilme dualespécies de SM + CA.

<sup>‡</sup>: outliers excluídos: 0,00 e 0,00.

**Tabela 2.** Desenvolvimento de cárie (%PDS) e pH de acordo com tempo de formação e composição dos biofilmes (média ± dp) [Intervalo de confiança de Wald 95%]:

Variáveis	Tempo	Biofilmes			Total
		SM	CA	MIX	
%PDS	24h	-76,19 ± 9,49 [-80,09; -72,30]	-34,21 ± 9,2 [-38,10; -30,31]	-72,25 ± 6,48 [-76,15; -68,36]	-60,88A ± 20,84 [-63,13; -58,64]
	48h	-82,91 ± 4,38 [-76,15; -68,36]	-44,45 ± 9,91 [-76,15; -68,36]	-77,94 ± 7,63 [-81,83; -74,05]	-68,44B ± 18,80 [-70,68; -66,19]
	72h	-83,51 ± 4,77 [-81,83; -74,05]	-39,37 ± 13,31 [-43,26; -35,47]	-78,91 ± 6,16 [-82,80; -75,02]	-67,26B ± 21,82 [-69,51; -65,01]
	<b>Total</b>	<b>-80,87a ± 7,32</b> [-83,12; -78,62]	<b>-39,34b ± 11,53</b> [-41,59; -37,09]	<b>-76,37c ± 7,29</b> [-78,62; -74,12]	
	$p_{\text{biofilme}}$			<b>&lt;0,001</b>	
	$p_{\text{Tempo}}$			<b>&lt;0,001</b>	
	$p_{\text{Interação}}$			0,534	
pH	24h	4,60Aa ± 0,09 [4,43; 4,77]	6,94Ab ± 0,11 [6,76; 7,10]	4,78Aa ± 0,14 [4,61; 4,94]	5,44 ± 1,08 [5,34; 5,53]
	48h	4,46Aa ± 0,06 [4,29; 4,62]	6,92Ab ± 0,17 [6,75; 7,08]	4,91Ac ± 0,26 [4,75; 5,08]	5,43 ± 1,09 [5,33; 5,52]
	72h	4,67Aa ± 0,46 <sup>‡</sup> [4,49; 4,84]	6,85Ab ± 0,30 [6,68; 7,02]	5,70Bc ± 0,86 [5,53; 5,86]	5,78 ± 1,06 [5,64; 5,84]
	<b>Total</b>	<b>4,57 ± 0,27</b> [4,47; 4,67]	<b>6,90 ± 0,21</b> [6,80; 6,99]	<b>5,13 ± 0,66</b> [5,03; 5,22]	
	$p_{\text{biofilme}}$			<b>&lt;0,001</b>	
	$p_{\text{Tempo}}$			<b>&lt;0,001</b>	
	$p_{\text{Interação}}$			<b>&lt;0,001</b>	

Médias seguidas por letras minúsculas distintas diferem estatisticamente entre si na comparação entre os diferentes tipos de biofilmes pelo teste de Bonferroni ( $p < 0,05$ ). Médias seguidas por letras maiúsculas distintas diferem estatisticamente entre si na comparação entre os diferentes tempos de formação de biofilme pelo teste de Bonferroni ( $p < 0,05$ ).

SM: biofilme monoespécies de *S. mutans*

CA: biofilme monoespécies de *C. albicans*

Mix: biofilme dualespécies de SM + CA.

%PDS: porcentagem de perda de dureza de superfície.

‡: outliers excluídos: 6,82 e 6,95.

Em relação aos dados da estrutura do colágeno remanescente, os blocos de dentina expostos aos biofilmes de CA apresentaram uma maior porcentagem de colágeno estruturado remanescente que aquelas encontradas nos blocos de dentina expostos aos biofilmes de SM nos terços superficial, médio e profundo para todos os tempos de formação de biofilme ( $p < 0,05$ ) (Tabelas 3 e 4). Quando CA esteve presente em associação com SM nos biofilmes (MIX), a porcentagem de colágeno estruturado remanescente no terço superficial e médio da dentina foi estatisticamente maior quando comparado aos blocos expostos aos biofilmes de SM para todos os tempos de formação de biofilme ( $p < 0,05$ ) e semelhante aos blocos expostos aos biofilmes de CA em todos os terços analisados (Tabelas 3 e 4 e Figuras 1, 2, 3, 4, 5 e 6).

**Tabela 3.** Porcentagem de colágeno remanescente estruturado nos terços superficial e médio nas amostras de dentina de acordo com tempo de formação e composição dos biofilmes (média\*) [Intervalo de confiança de Wald 95%]:

Variáveis	Tempo	Biofilmes			Total
		SM	CA	MIX	
Terço superficial	24h	0,722 [0,43; 1,19]	2,33 [1,40; 3,87]	1,06 [0,64; 1,76]	1,21 [0,90; 1,62]
	48h	0,71 [0,43; 1,15]	1,94 [1,14; 3,30]	1,66 [1,00; 2,76]	1,32 [0,98; 1,76]
	72h	0,77 <sup>¥</sup> [0,44; 1,34]	1,24 <sup>§</sup> [0,73; 2,11]	1,24 [0,73; 2,12]	1,06 [0,77; 1,44]
	<b>Total</b>	<b>0,73a</b> [0,54; 0,98]	<b>1,78b</b> [1,31; 2,40]	<b>1,30b</b> [0,96; 1,75]	
	P <sub>biofilme</sub>				<b>&lt;0,001</b>
	P <sub>tempo</sub>				0,596
	P <sub>interação</sub>				0,465
Terço médio	24h	3,78 [2,88; 4,98]	5,99 [4,56; 7,88]	5,21 [3,96; 6,85]	4,91 [4,19; 5,75]
	48h	3,45 [2,65; 4,49]	7,40 [5,55; 9,86]	5,97 [4,54; 7,85]	5,34 [4,56; 6,22]
	72h	4,97 [3,73; 6,63]	5,62 <sup>§</sup> [4,22; 7,50]	6,46 [4,85; 8,62]	5,65 [4,79; 6,67]
	<b>Total</b>	<b>4,02a</b> [3,43; 4,71]	<b>6,29b</b> [5,35; 7,41]	<b>5,86b</b> [4,99; 6,88]	
	P <sub>biofilme</sub>				<b>&lt;0,001</b>
	P <sub>tempo</sub>				0,465
	P <sub>interação</sub>				0,264

Médias seguidas por letras minúsculas distintas diferem estatisticamente entre si na comparação entre os diferentes tipos de biofilmes pelo teste de Bonferroni ( $p < 0,05$ ).

\*Média geométrica

SM: biofilme monoespécies de *S. mutans*

CA: biofilme monoespécies de *C. albicans*

Mix: biofilme dualespécies de SM + CA.

<sup>¥</sup> outliers excluídos: 0,082; <sup>§</sup> outliers excluídos: 8,50; <sup>§</sup> outliers excluídos 23,49.

**Tabela 4.** Porcentagem de colágeno remanescente estruturado no terço profundo nas amostras de dentina de acordo com tempo de formação e composição dos biofilmes (média) [Intervalo de confiança de Wald 95%]:

Variáveis	Tempo	Biofilmes			Total
		SM	CA	MIX	
Terço profundo	24h	5,36 [3,23; 7,48]	9,28 [7,16; 11,40]	8,00 [5,88; 10,12]	7,55 [6,32; 8,77]
	48h	6,84 [4,81; 8,87]	9,07 [6,85; 11,30]	7,10 [4,98; 9,22]	7,67 [6,44; 8,90]
	72h	7,51 [5,28; 9,73]	8,62 <sup>δ</sup> [6,39; 10,84]	9,10 [6,87; 11,32]	8,41 [7,12; 9,69]
	<b>Total</b>	<b>6,57a</b> [5,34; 7,80]	<b>8,99b</b> [7,73; 10,26]	<b>8,07ab</b> [6,82; 9,31]	
	$P_{\text{biofilme}}$				<b>0,026</b>
	$P_{\text{tempo}}$				0,588
	$P_{\text{interação}}$				0,583

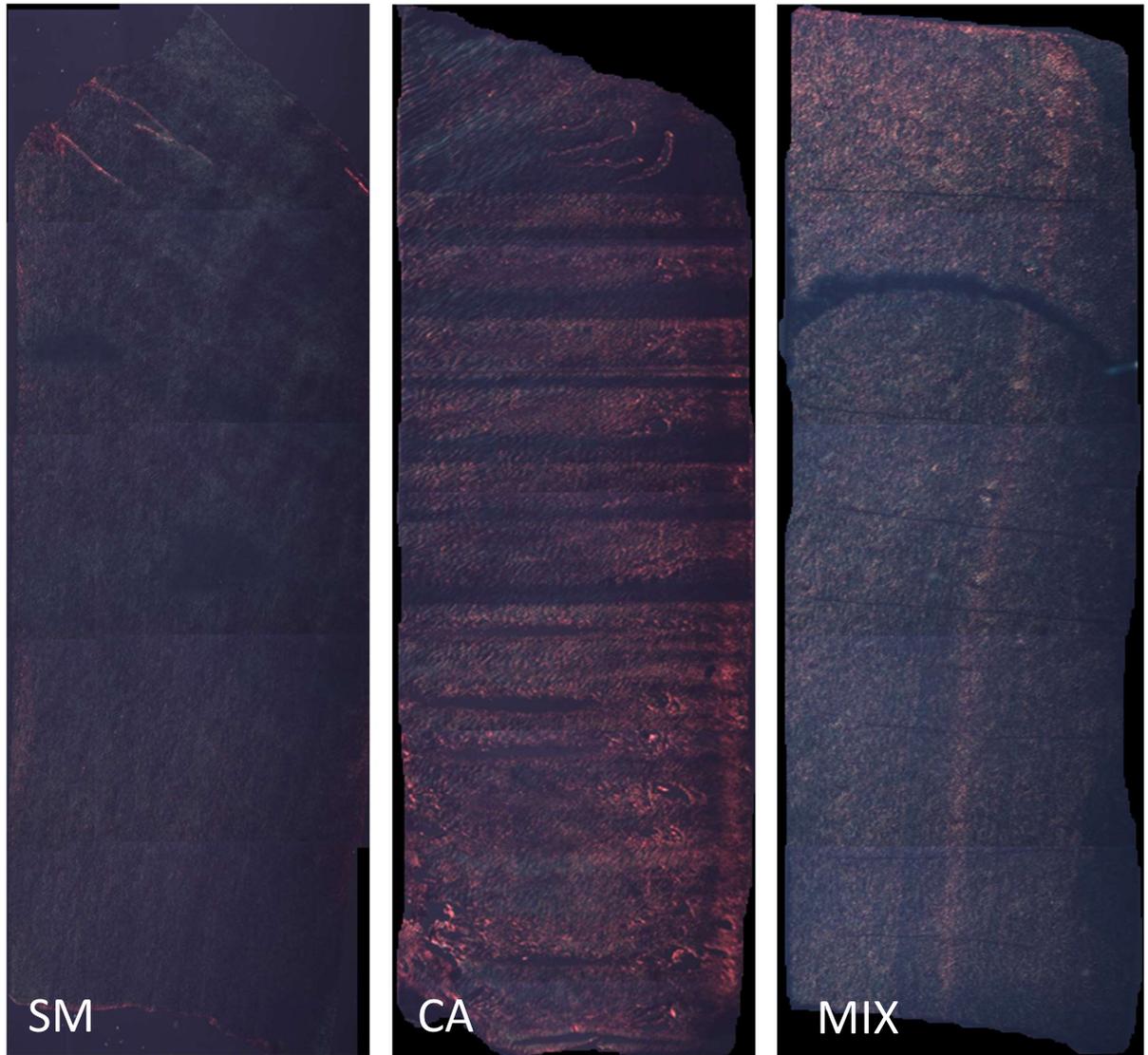
Médias seguidas por letras minúsculas distintas diferem estatisticamente entre si na comparação entre os diferentes tipos de biofilmes pelo teste de Bonferroni ( $p < 0,05$ ).

SM: biofilme monoespécies de *S. mutans*

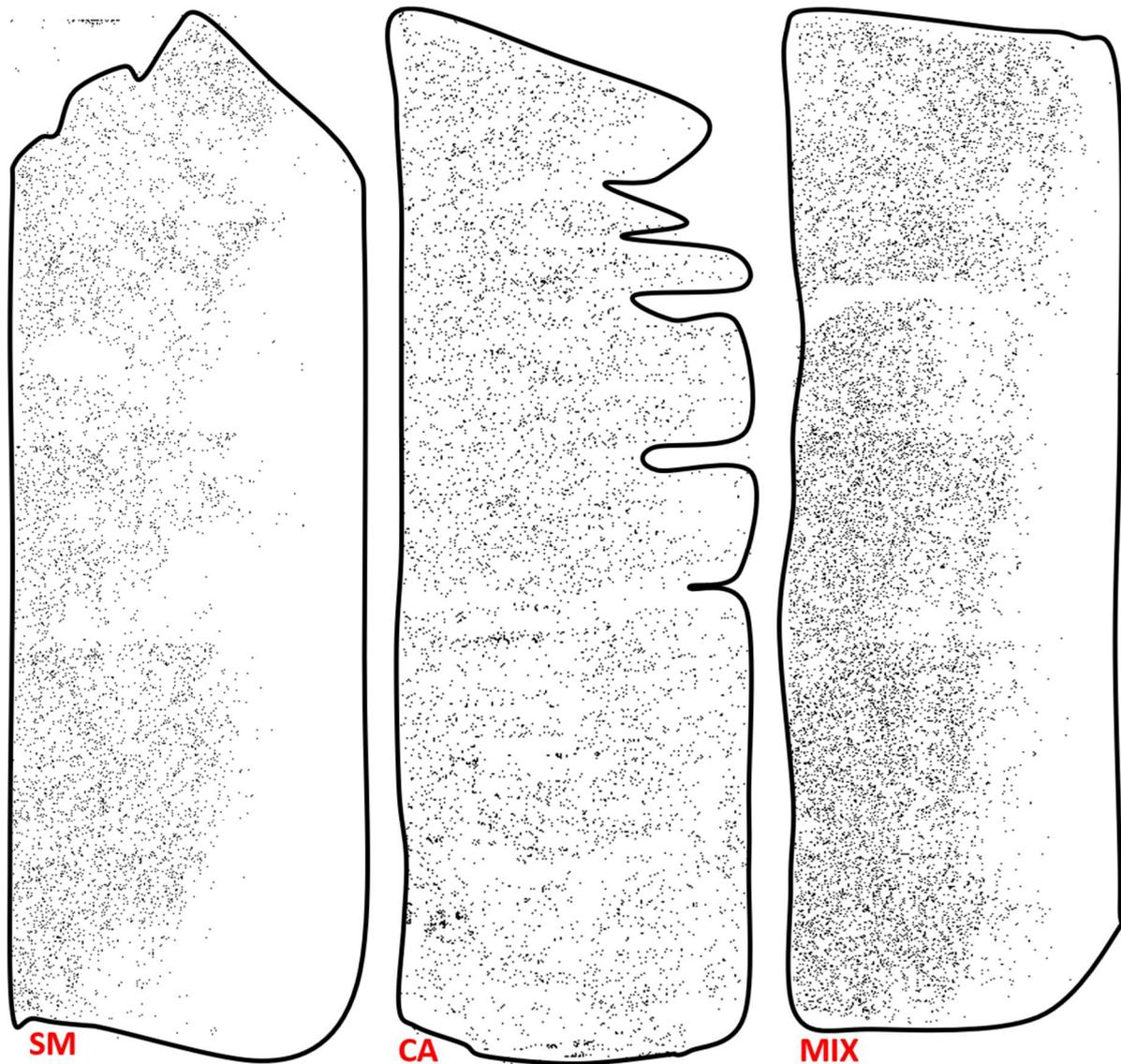
CA: biofilme monoespécies de *C. albicans*

Mix: biofilme dualespécies de SM + CA.

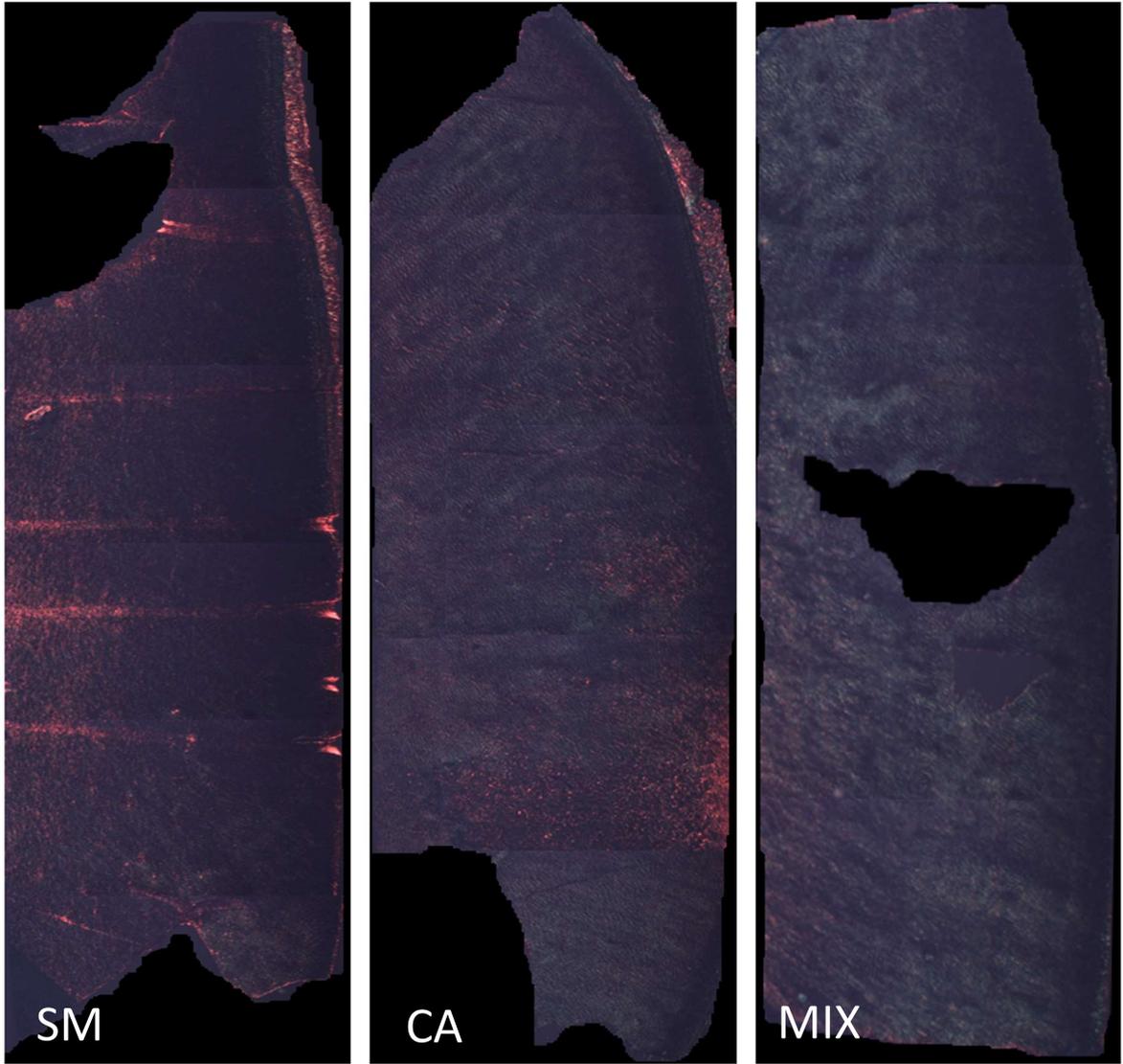
<sup>δ</sup>outliers excluídos: 22,08.



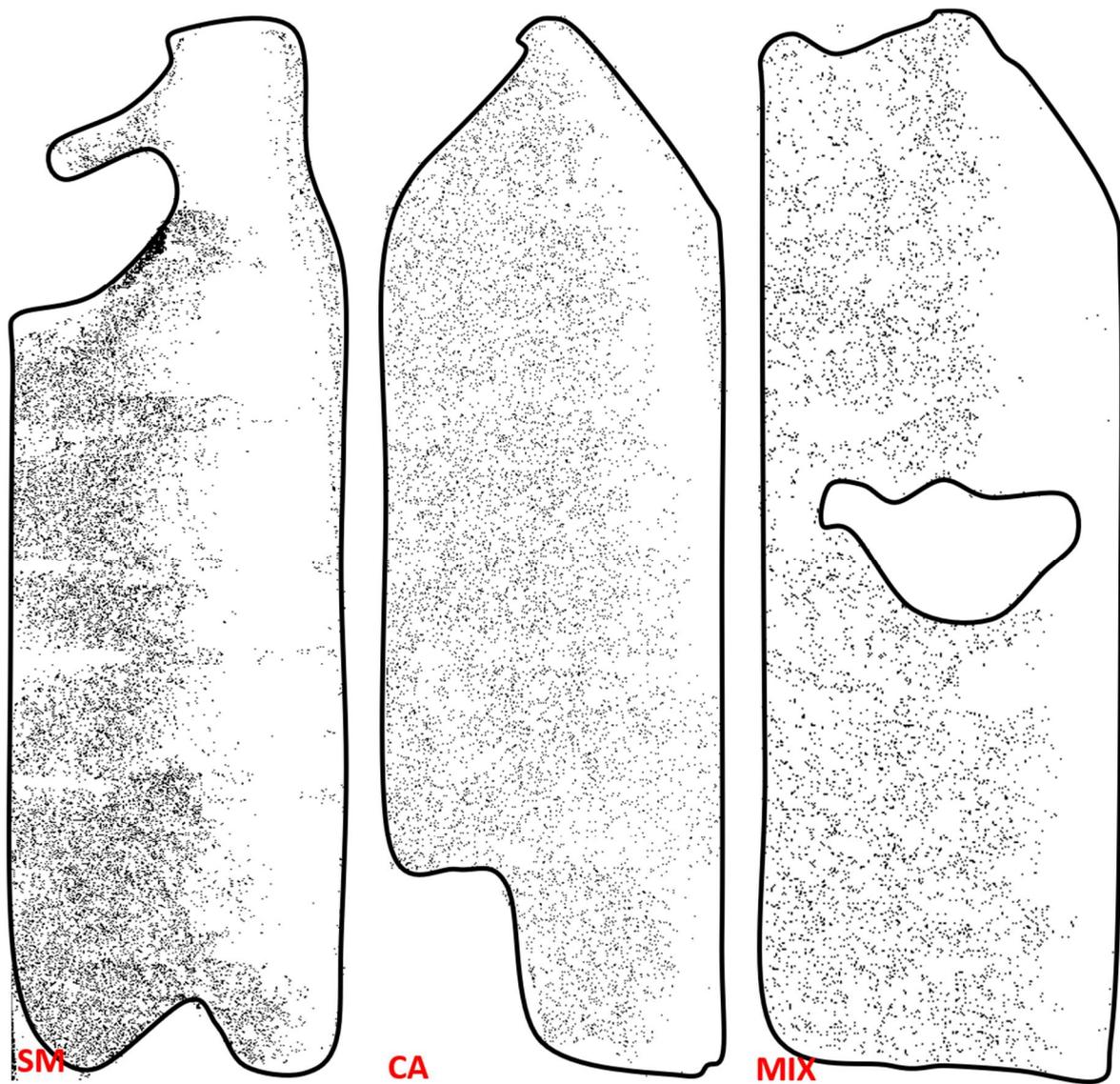
**Figura 1.** Imagens obtidas sob luz polarizada de cortes histológicos evidenciando as marcações do corante SiriusRed em bloco de dentina após 24 horas de formação de biofilme.



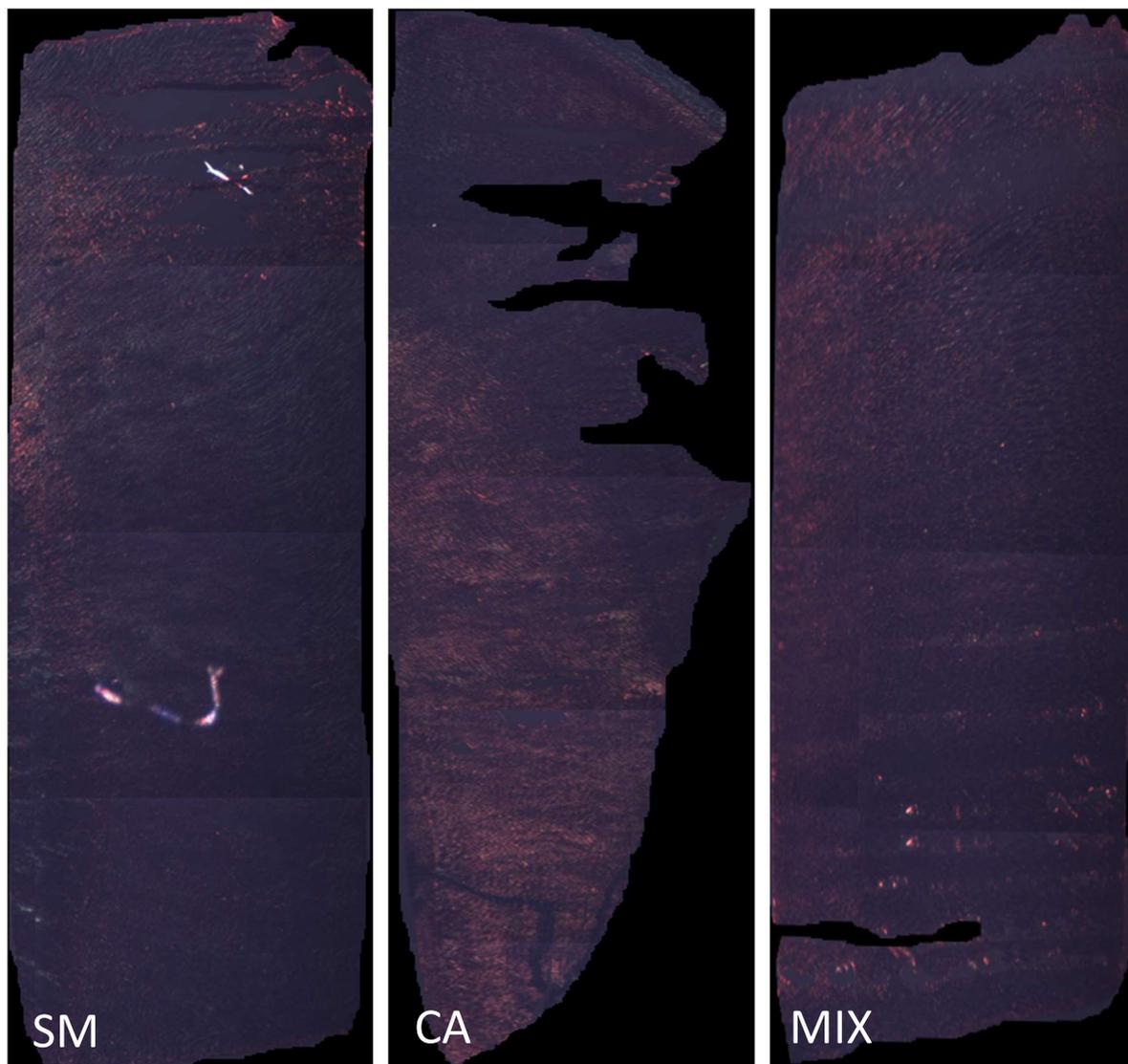
**Figura 2.** *Threshold* ajustado pelo ImageJ evidenciando as marcações de colágeno estruturado em bloco de dentina após 24 horas de formação de biofilme.



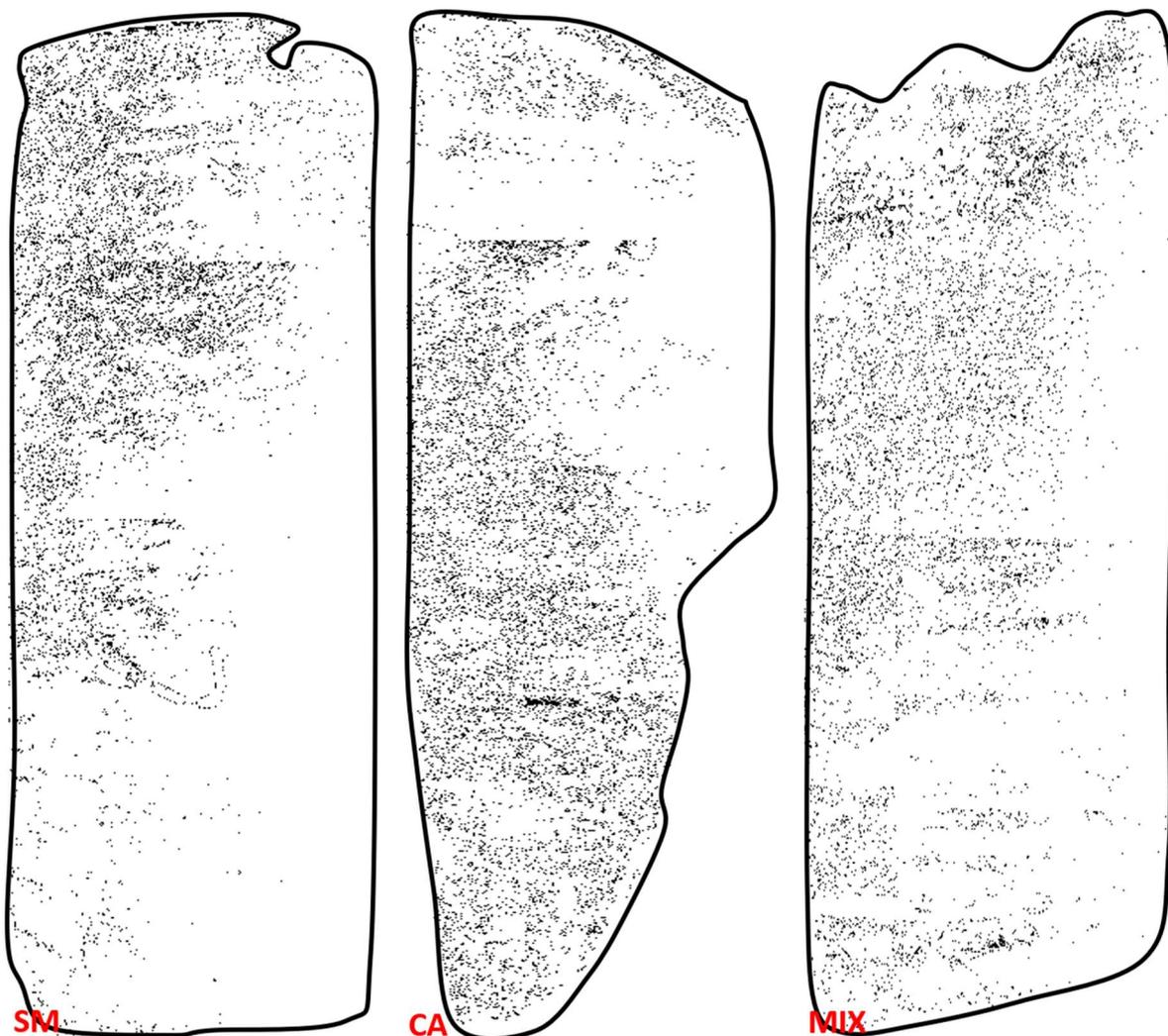
**Figura 3.** Imagens obtidas sob luz polarizada de cortes histológicos evidenciando as marcações do corante SiriusRed em bloco de dentina após 48 horas de formação de biofilme.



**Figura 4.** *Threshold* ajustado pelo ImageJ evidenciando as marcações de colágeno estruturado em bloco de dentina após 48 horas de formação de biofilme.



**Figura 5.** Imagens obtidas sob luz polarizada de cortes histológicos evidenciando as marcações do corante SiriusRed em bloco de dentina após 72 horas de formação de biofilme.



**Figura 6.** *Threshold* ajustado pelo ImageJ evidenciando as marcações de colágeno estruturado em bloco de dentina após 72 horas de formação de biofilme.

## 5. DISCUSSÃO

Quando analisados os resultados de cárie obtidos em biofilme monoespécie de SM, nota-se que houve uma queda de pH sempre maior do que nos demais biofilmes, que os valores permaneceram baixos em todos os períodos avaliados e que mesmo assim os valores de contagem de UFC/mL não apresentaram uma diminuição significativa com o passar do tempo. Isso significa que esse micro-organismo é acidogênico, capaz de converter carboidratos em ácidos que promovem a desmineralização dental, e, também, que é capaz de sobreviver em ambiente ácido, ou seja, é um micro-organismo ácido-tolerante (Hamada e Slade, 1980). Isso explica também os resultados de porcentagem de perda de dureza de superfície (%PDS), que

sempre foram maiores no grupo SM em relação aos demais biofilmes em todos os tempos analisados (Tabela 2). A cariogenicidade do *S. mutans* já é bem descrita na literatura, e se deve principalmente ao fato desse micro-organismo produzir polissacarídeo extracelular insolúvel na presença de sacarose, o que torna o biofilme mais espesso, poroso e aumenta a aderência aos tecidos dentais, facilitando a passagem de nutrientes para os micro-organismos nas camadas mais profundas do biofilme e o protegendo de agentes externos que poderiam levar à uma neutralização do pH e paralização do processo de dissolução mineral (Zero *et al.*, 1986; Klein *et al.*, 2015).

Já quando se analisa os resultados obtidos com o biofilme monoespécie de CA, observa-se que o pH do meio de cultura foi sempre maior em todos os tempos analisados, e sempre foi maior do que o pH dos demais biofilmes (Tabela 2). Esse fato contribuiu para que o desenvolvimento de cárie nos blocos de dentina radicular fosse menor em relação aos demais grupos analisados. Porém, apesar do potencial cariogênico da CA ser reduzido quando comparado aos demais grupos, é importante trazer à discussão que, quando o substrato se trata de dentina radicular, esse micro-organismo é altamente cariogênico, uma vez que cerca de 40% de perda de minerais foi observada na presença desse micro-organismo, aproximadamente metade da perda de minerais induzida pelo grupo de biofilme monoespécie de SM. Na literatura, o potencial cariogênico de *C. albicans* em relação à dentina radicular tem sido bastante descrito (Kaminishi *et al.*, 1986; Shen *et al.*, 2002; Metwalli *et al.*, 2013; Koo e Bowen, 2014; Szabo *et al.*, 2014; Thomas *et al.*, 2016). Um estudo que coletou biofilme de superfícies radiculares hígidas e cariadas, analisou o meta-transcriptoma da *C. albicans* presente nesses biofilmes e constatou que em saúde, houve expressão diferencial de genes relacionados a formação de biofilme; e em doença, genes relacionados a atividade metabólica, transporte de açúcares, tolerância ao estresse, invasão e regulação de pH; confirmando que a *C. albicans* é um micro-organismo importante no desenvolvimento de cárie radicular (Ev, 2016). Outro ponto que vale ser discutido, é que mesmo que os valores de pH tenham sido superiores ao pH crítico para desmineralização da dentina radicular (superiores a 6,5), houve desenvolvimento de lesão. Uma possível explicação para esse fenômeno é que o pH do meio de cultura oferece uma medida indireta do metabolismo do biofilme e não demonstra uma medida real do que acontece na interface biofilme e superfície dental. É possível que no biofilme de CA, apesar dos resultados sugerirem que houve pouca produção de ácidos, que o pH na interface tenha sido mais reduzido, levando assim, à dissolução mineral. Também é possível que os minerais da dentina possam ter sido perdidos para possibilitar estabelecimento

de equilíbrio químico com o meio de cultura, uma vez que já foi relatado que a dentina perde minerais até mesmo quando exposta à uma solução tampão supersaturada em hidroxiapatita (Hoppenbrouwers *et al.*, 1986).

Quando consideramos o potencial acidogênico do grupo MIX, observamos que houve redução neste potencial após 72 horas de formação de biofilme. Essa redução na perda de minerais deve-se ao fato do pH atingido após 72 horas de formação de biofilme ainda ser inferior ao pH crítico para desmineralização da dentina radicular, levando ao desenvolvimento de cárie (Dawes, 2003) (Tabela 2). Porém, parece haver uma tendência ao aumento do pH no biofilme MIX com o passar do tempo (Tabela 2). Nós hipotetizamos, então, que em biofilmes mais maduros o aumento nos valores de pH irá contribuir positivamente para a redução do potencial cariogênico deste biofilme. Como os biofilmes foram cultivados apenas por 72 horas, é possível que essa diferença no potencial cariogênico entre MIX e SM se acentue com o passar do tempo. Além disso, foi observada uma diferença estatisticamente significativa nas contagens de CA no biofilme de MIX quando comparado ao biofilme monoespécie de CA. Julgamos que essa diferença é clinicamente irrelevante uma vez que representa redução em menos de 1 Log nas contagens entre os dois grupos (Tabela 1).

Nossa hipótese é de que a CA altera o potencial cariogênico de biofilmes de SM, e isso se confirma com os resultados apresentados. Na presença de um biofilme dualespécie formado com CA+SM, houve menor desmineralização quando comparado ao biofilme monoespécie formado com SM. Isso pode estar relacionado ao metabolismo do biofilme, uma vez que o pH é aumentado com o passar do tempo, provavelmente devido ao metabolismo da CA, que, quando exposta à um ambiente ácido, leva a alcalinização do biofilme consumindo ácido láctico (Willems *et al.*, 2016) e pela produção de metabólitos secundários, como o farnesol (Krom *et al.*, 2014), diminuindo assim, a desmineralização da hidroxiapatita.

Quando consideramos a análise do colágeno estruturado, o padrão estrutural do colágeno remanescente nos blocos de dentina submetidos ao biofilme de CA é mais organizado quando comparado aos biofilmes de SM. Em acréscimo, o biofilme MIX permite que o colágeno remanescente nos blocos de dentina esteja mais estruturado quando comparado aos biofilmes de SM (Tabelas 3 e 4). Existem evidências de que a estrutura do colágeno remanescente afeta diretamente o processo de remineralização das lesões cariosas em dentina. Como mencionado previamente, a manutenção das fibras colágenas tem um papel extremamente importante na remineralização da dentina cariada, as quais funcionam como um arcabouço para os minerais, que levam a uma remineralização intrafibrilar, seguida pela

extrafibrilar, englobando toda a rede de colágeno e recuperando as propriedades mecânicas da dentina (Kinney *et al.*, 2003). Pode-se dizer que quanto maior a degradação do colágeno pelas colagenases microbianas e pelas MMPs, mais comprometido fica o processo de remineralização. É possível que a diferença na organização do colágeno encontrada no presente trabalho possa afetar de alguma forma a capacidade de remineralização dessas lesões sugerindo um possível efeito da *C. albicans* nesse processo.

## 6. CONCLUSÃO

Nossos resultados sugerem que embora a *C. albicans* apresente potencial cariogênico para dentina radicular, o biofilme contendo *C. albicans* associada ao *S. mutans* parece apresentar um menor potencial cariogênico e acidogênico e maior possibilidade de manutenção da matriz orgânica quando comparado aos biofilmes cultivados na ausência deste fungo.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-AHMAD, A. et al. Prevalence of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* in caries-free and caries-active children in relation to the oral microbiota-a clinical study. **Clin Oral Investig**, v. 20, n. 8, p. 1963-1971, Nov 2016. ISSN 1432-6981. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s00784-015-1696-9> >.

ARTHUR, R. A. et al. Effect of over-the-counter fluoridated products regimens on root caries inhibition. **Arch Oral Biol**, v. 60, n. 10, p. 1588-94, Oct 2015. ISSN 0003-9969. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.archoralbio.2015.07.018> >.

BOSSHARDT, D. D.; SELVIG, K. A. Dental cementum: the dynamic tissue covering of the root. **Periodontol 2000**, v. 13, p. 41-75, Feb 1997. ISSN 0906-6713 (Print)0906-6713. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

BOTELHO, J. N. et al. Enamel and dentine demineralization by a combination of starch and sucrose in a biofilm - caries model. **Braz Oral Res**, v. 30, n. 1, May 20 2016. ISSN 1806-8324. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1590/1807-3107BOR-2016.vol30.0052> >.

CHOI, E. J.; LEE, S. H.; KIM, Y. J. Quantitative real-time polymerase chain reaction for *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in dental plaque samples and its association with early childhood caries. **Int J Paediatr Dent**, v. 19, n. 2, p. 141-7, Mar 2009. ISSN 0960-7439. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-263X.2008.00942.x> >.

DAWES, C. What is the critical pH and why does a tooth dissolve in acid? **J Can Dent Assoc**, v. 69, n. 11, p. 722-4, Dec 2003. ISSN 0709-8936. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

DE CARVALHO, F. G. et al. Presence of mutans streptococci and *Candida* spp. in dental plaque/dentine of carious teeth and early childhood caries. **Arch Oral Biol**, v. 51, n. 11, p. 1024-8, Nov 2006. ISSN 0003-9969 (Print)0003-9969. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.archoralbio.2006.06.001> >.

DO, T. et al. Root Surface Biofilms and Caries. **Monogr Oral Sci**, v. 26, p. 26-34, 2017. ISSN 0077-0892 (Print)0077-0892. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1159/000479304> >.

ELLEN, R. P.; BANTING, D. W.; FILLERY, E. D. *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus* detection in the assessment of dental root surface caries risk. **J Dent Res**, v. 64, n. 10, p. 1245-9, Oct 1985. ISSN 0022-0345 (Print)0022-0345. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1177/00220345850640101301> >.

FALSETTA, M. L. et al. Symbiotic relationship between *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* synergizes virulence of plaque biofilms in vivo. **Infect Immun**, v. 82, n. 5, p. 1968-81, May 2014. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1128/iai.00087-14> >.

\_\_\_\_\_. Novel antibiofilm chemotherapy targets exopolysaccharide synthesis and stress tolerance in *Streptococcus mutans* to modulate virulence expression in vivo. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 56, n. 12, p. 6201-11, Dec 2012. ISSN 0066-4804. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1128/aac.01381-12> >.

FEJERSKOV, O.; NYVAD, B. Is dental caries an infectious disease? Diagnostic and treatment consequences for the practitioner. In: SCHOU, L. (Ed.). **Nordic Dentistry 2003 Yearbook**. Copenhagen: Quintessence Publishing, 2003. p.141-52.

GOLDBERG, M. et al. Dentin: structure, composition and mineralization. **Front Biosci (Elite Ed)**, v. 3, p. 711-35, Jan 01 2011. ISSN 1945-0494. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

HAMADA, S.; SLADE, H. D. Biology, immunology, and cariogenicity of Streptococcus mutans. **Microbiol Rev**, v. 44, n. 2, p. 331-84, Jun 1980. ISSN 0146-0749 (Print)0146-0749. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

HAYES, M. et al. Risk indicators associated with root caries in independently living older adults. **J Dent**, v. 51, p. 8-14, Aug 2016. ISSN 0300-5712. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.jdent.2016.05.006> >.

HOPPENBROUWERS, P. M.; DRIESSENS, F. C.; BORGGREVEN, J. M. The vulnerability of unexposed human dental roots to demineralization. **J Dent Res**, v. 65, n. 7, p. 955-8, Jul 1986. ISSN 0022-0345 (Print)0022-0345. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1177/00220345860650071101> >.

HUXLEY, H. G. The effect of inoculating strains of Streptococcus mutans and Streptococcus sanguis upon caries incidence and bacterial content of plaque in rats. **Arch Oral Biol**, v. 18, n. 10, p. 1215-26, Oct 1973. ISSN 0003-9969 (Print)0003-9969. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

HWANG, G. et al. Binding Force Dynamics of Streptococcus mutans-glucosyltransferase B to Candida albicans. **J Dent Res**, v. 94, n. 9, p. 1310-7, Sep 2015. ISSN 0022-0345. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1177/0022034515592859> >.

KAMINISHI, H. et al. Isolation and characteristics of collagenolytic enzyme produced by Candida albicans. **Infect Immun**, v. 53, n. 2, p. 312-6, Aug 1986. ISSN 0019-9567 (Print)0019-9567. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

KINNEY, J. H. et al. The importance of intrafibrillar mineralization of collagen on the mechanical properties of dentin. **J Dent Res**, v. 82, n. 12, p. 957-61, Dec 2003. ISSN 0022-0345 (Print)0022-0345. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1177/154405910308201204> >.

KLEIN, M. I. et al. Streptococcus mutans-derived extracellular matrix in cariogenic oral biofilms. **Front Cell Infect Microbiol**, v. 5, p. 10, 2015. ISSN 2235-2988. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3389/fcimb.2015.00010> >.

KOHLER, B.; BRATTHALL, D.; KRASSE, B. Preventive measures in mothers influence the establishment of the bacterium Streptococcus mutans in their infants. **Arch Oral Biol**, v. 28, n. 3, p. 225-31, 1983. ISSN 0003-9969 (Print)0003-9969. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

KOHLER, B.; PETTERSSON, B. M.; BRATTHALL, D. Streptococcus mutans in plaque and saliva and the development of caries. **Scand J Dent Res**, v. 89, n. 1, p. 19-25, Feb 1981. ISSN 0029-845X (Print)0029-845x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

KOLENBRANDER, P. E. Intergeneric coaggregation among human oral bacteria and ecology of dental plaque. **Annu Rev Microbiol**, v. 42, p. 627-56, 1988. ISSN 0066-4227 (Print)0066-4227. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.mi.42.100188.003211> >.

KOO, H.; BOWEN, W. H. Candida albicans and Streptococcus mutans: a potential synergistic alliance to cause virulent tooth decay in children. **Future Microbiol**, v. 9, n. 12, p. 1295-7, 2014. ISSN 1746-0913. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.2217/fmb.14.92> >.

KROM, B. P.; KIDWAI, S.; TEN CATE, J. M. Candida and other fungal species: forgotten players of healthy oral microbiota. **J Dent Res**, v. 93, n. 5, p. 445-51, May 2014. ISSN 0022-0345. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1177/0022034514521814> >.

LEE, Y. L. et al. Dentin-pulp complex responses to carious lesions. **Caries Res**, v. 40, n. 3, p. 256-64, 2006. ISSN 0008-6568 (Print)0008-6568. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1159/000092235> >.

LEMOS, J. A.; BURNE, R. A. A model of efficiency: stress tolerance by Streptococcus mutans. **Microbiology**, v. 154, n. Pt 11, p. 3247-55, Nov 2008. ISSN 1350-0872. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18957579> >.

LOESCHE, W. J. Role of Streptococcus mutans in human dental decay. **Microbiol Rev**, v. 50, n. 4, p. 353-80, Dec 1986. ISSN 0146-0749 (Print)0146-0749. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

LOPEZ-DE LEON, A.; ROJKIND, M. A simple micromethod for collagen and total protein determination in formalin-fixed paraffin-embedded sections. **J Histochem Cytochem**, v. 33, n. 8, p. 737-43, Aug 1985. ISSN 0022-1554 (Print)0022-1554. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1177/33.8.2410480> >.

MARSH, P. D. Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. **Adv Dent Res**, v. 8, n. 2, p. 263-71, Jul 1994. ISSN 0895-9374 (Print)0895-9374. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1177/08959374940080022001> >.

\_\_\_\_\_. Are dental diseases examples of ecological catastrophes? **Microbiology**, v. 149, n. Pt 2, p. 279-94, Feb 2003. ISSN 1350-0872 (Print)1350-0872. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.26082-0> >.

MAYANAGI, G. et al. pH Response and Tooth Surface Solubility at the Tooth/Bacteria Interface. **Caries Res**, v. 51, n. 2, p. 160-166, 2017. ISSN 0008-6568. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1159/000454781> >.

METWALLI, K. H. et al. Streptococcus mutans, Candida albicans, and the human mouth: a sticky situation. **PLoS Pathog**, v. 9, n. 10, p. e1003616, 2013. ISSN 1553-7366. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1003616> >.

PEREIRA, D. et al. Is the oral fungal pathogen Candida albicans a cariogen? **Oral Dis**, May 17 2017. ISSN 1354-523x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/odi.12691> >.

PINHEIRO, S. L. et al. Study of a morphometric model for histological evaluation of the collagen in dentin carious lesions. **J Clin Pediatr Dent**, v. 33, n. 2, p. 123-6, Winter 2008. ISSN 1053-4628 (Print)1053-4628. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

PORTELA, M. B. et al. Differential collagenolytic activity of Candida albicans isolated from oral mucosa and dentinal carious lesions of HIV-infected children. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol**, v. 113, n. 3, p. 378-83, Mar 2012. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.oooo.2011.09.006> >.

PREZA, D. et al. Bacterial profiles of root caries in elderly patients. **J Clin Microbiol**, v. 46, n. 6, p. 2015-21, Jun 2008. ISSN 0095-1137. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1128/jcm.02411-07> >.

RAJA, M.; HANNAN, A.; ALI, K. Association of oral candidal carriage with dental caries in children. **Caries Res**, v. 44, n. 3, p. 272-6, 2010. ISSN 0008-6568. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1159/000314675> >.

RICARD-BLUM, S. The collagen family. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 3, n. 1, p. a004978, Jan 01 2011. ISSN 1943-0264. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a004978> >.

RITTER, A. V. et al. A Predictive Model for Root Caries Incidence. **Caries Res**, v. 50, n. 3, p. 271-8, 2016. ISSN 0008-6568. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1159/000445445> >.

RITTER, A. V.; SHUGARS, D. A.; BADER, J. D. Root caries risk indicators: a systematic review of risk models. **Community Dent Oral Epidemiol**, v. 38, n. 5, p. 383-97, Oct 2010. ISSN 0301-5661. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0528.2010.00551.x> >.

RITTIE, L. Method for Picosirius Red-Polarization Detection of Collagen Fibers in Tissue Sections. **Methods Mol Biol**, v. 1627, p. 395-407, 2017. ISSN 1064-3745. Disponível em: < [http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4939-7113-8\\_26](http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4939-7113-8_26) >.

ROCAS, I. N. et al. Microbiome of Deep Dentinal Caries Lesions in Teeth with Symptomatic Irreversible Pulpitis. **PLoS One**, v. 11, n. 5, p. e0154653, 2016. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0154653> >.

SARAIHONG, P. et al. Streptococcus mutans and Streptococcus sobrinus colonization and caries experience in 3- and 5-year-old Thai children. **Clin Oral Investig**, v. 19, n. 8, p. 1955-64, Nov 2015. ISSN 1432-6981. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s00784-015-1437-0> >.

SCHUPBACH, P.; GUGGENHEIM, B.; LUTZ, F. Human root caries: histopathology of initial lesions in cementum and dentin. **J Oral Pathol Med**, v. 18, n. 3, p. 146-56, Mar 1989. ISSN 0904-2512 (Print)0904-2512. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

SHELLIS, R. P. Formation of caries-like lesions in vitro on the root surfaces of human teeth in solutions simulating plaque fluid. **Caries Res**, v. 44, n. 4, p. 380-9, 2010. ISSN 0008-6568. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1159/000318224> >.

SHEN, S.; SAMARANAYAKE, L. P.; YIP, H. K. Coaggregation profiles of the microflora from root surface caries lesions. **Arch Oral Biol**, v. 50, n. 1, p. 23-32, Jan 2005. ISSN 0003-9969 (Print)0003-9969. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.archoralbio.2004.07.002> >.

SHEN, S. et al. Bacterial and yeast flora of root surface caries in elderly, ethnic Chinese. **Oral Dis**, v. 8, n. 4, p. 207-17, Jul 2002. ISSN 1354-523X (Print)1354-523x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

SIMON-SORO, A.; GUILLEN-NAVARRO, M.; MIRA, A. Metatranscriptomics reveals overall active bacterial composition in caries lesions. **J Oral Microbiol**, v. 6, p. 25443, 2014. ISSN 2000-2297 (Print)2000-2297. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3402/jom.v6.25443> >.

SUDBERY, P. E. Growth of Candida albicans hyphae. **Nat Rev Microbiol**, v. 9, n. 10, p. 737-48, Aug 16 2011. ISSN 1740-1526. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2636> >.

SZABO, B. et al. Studies on the possible aetiological role of different *Candida* species in pathogenesis of dentine caries by monitoring the calcium release from tooth particles. **Acta Microbiol Immunol Hung**, v. 61, n. 1, p. 11-7, Mar 2014. ISSN 1217-8950 (Print)1217-8950. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1556/AMicr.61.2014.1.2> >.

TAKAHASHI, N.; NYVAD, B. Caries ecology revisited: microbial dynamics and the caries process. **Caries Res**, v. 42, n. 6, p. 409-18, 2008. ISSN 0008-6568. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1159/000159604> >.

\_\_\_\_\_. Ecological Hypothesis of Dentin and Root Caries. **Caries Res**, v. 50, n. 4, p. 422-31, 2016. ISSN 0008-6568. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1159/000447309> >.

TAN, H. P.; LO, E. C. Risk indicators for root caries in institutionalized elders. **Community Dent Oral Epidemiol**, v. 42, n. 5, p. 435-40, Oct 2014. ISSN 0301-5661. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/cdoe.12104> >.

THOMAS, A. et al. Association of Oral *Candida albicans* with Severe Early Childhood Caries - A Pilot Study. **J Clin Diagn Res**, v. 10, n. 8, p. Zc109-12, Aug 2016. ISSN 2249-782X (Print)0973-709x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.7860/jcdr/2016/19387.8357> >.

TJADERHANE, L. et al. Matrix metalloproteinases and other matrix proteinases in relation to cariology: the era of 'dentin degradomics'. **Caries Res**, v. 49, n. 3, p. 193-208, 2015. ISSN 0008-6568. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1159/000363582> >.

\_\_\_\_\_. The activation and function of host matrix metalloproteinases in dentin matrix breakdown in caries lesions. **J Dent Res**, v. 77, n. 8, p. 1622-9, Aug 1998. ISSN 0022-0345 (Print)0022-0345. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1177/00220345980770081001> >.

TOLEDANO, M. et al. Differential expression of matrix metalloproteinase-2 in human coronal and radicular sound and carious dentine. **J Dent**, v. 38, n. 8, p. 635-40, Aug 2010. ISSN 0300-5712. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.jdent.2010.05.001> >.

TOME, F. M. et al. Influence of sucrose on growth and sensitivity of *Candida albicans* alone and in combination with *Enterococcus faecalis* and *Streptococcus mutans* to photodynamic therapy. **Lasers Med Sci**, v. 32, n. 6, p. 1237-1243, Aug 2017. ISSN 0268-8921. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s10103-017-2201-2> >.

WILLEMS, H. M. et al. *Candida albicans* in oral biofilms could prevent caries. **Pathog Dis**, v. 74, n. 5, Jul 2016. ISSN 2049-632x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1093/femspd/ftw039> >.

YANG, X. Q. et al. Genotypic distribution of *Candida albicans* in dental biofilm of Chinese children associated with severe early childhood caries. **Arch Oral Biol**, v. 57, n. 8, p. 1048-53, Aug 2012. ISSN 0003-9969. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.archoralbio.2012.05.012> >.

ZERO, D. T.; VAN HOUTE, J.; RUSSO, J. The intra-oral effect on enamel demineralization of extracellular matrix material synthesized from sucrose by *Streptococcus mutans*. **J Dent Res**, v. 65, n. 6, p. 918-23, Jun 1986. ISSN 0022-0345 (Print)0022-0345. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1177/00220345860650061201> >.