

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



Dissertação

**Estabelecimento e validação de um modelo de biofilme complexo em um
dispositivo multifuncional simulador de cavidade bucal**

Tamires Timm Maske

Pelotas, 2015

Tamires Timm Maske

**Estabelecimento e validação de um modelo de biofilme complexo em um
dispositivo multifuncional simulador de cavidade bucal**

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

Orientador: Maximiliano Sérgio Cenci

Co-Orientadores: Françoise Hélène van de Sande Leite
Rodrigo Alex Arthur

Pelotas, 2015

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

M394e Maske, Tamires Timm

Estabelecimento e validação de um modelo de biofilme complexo em um dispositivo multifuncional simulador de cavidade bucal / Tamires Timm Maske ; Maximiliano Sérgio Cenco, orientador ; Françoise Hélène van de Sande Leite, Rodrigo Alex Arthur, coorientadores. — Pelotas, 2015.

122 f. : il.

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

1. Modelos de biofilme. 2. Microcosmos. 3. Cárie dentária. 4. Biofilmes. I. Cenco, Maximiliano Sérgio, orient. II. Leite, Françoise Hélène van de Sande, coorient. III. Arthur, Rodrigo Alex, coorient. IV. Título.

Black : D2

Elaborada por Fabiano Domingues Malheiro CRB: 10/1955

Tamires Timm Maske

Estabelecimento e validação de um modelo de biofilme complexo em um dispositivo multifuncional simulador de cavidade bucal

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

Data da defesa: 25/02/2015

Banca examinadora:

Prof. Dr. Maximiliano Sérgio Cenci (Orientador)
Doutor em Odontologia (área de concentração Cariologia) pela Universidade Estadual de Campinas

Prof. Dr. Rafael Guerra Lund
Doutor em Odontologia (área de concentração Dentística) pela Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dra. Daniela Prócida Raggio
Doutora em Ciências Odontológicas (área de concentração Odontopediatria) pela Universidade de São Paulo

Prof. Dr. Rafael Ratto de Moraes (Suplente)
Doutor em Odontologia (área de concentração Materiais Dentários) pela Universidade Estadual de Campinas

**Dedico este trabalho às minhas
duas mães: Lúcia e vó Ilma; e em
memória ao meu querido pai.**

Agradecimentos

Ao meu orientador **Prof. Dr. Maximiliano Sérgio Cenci**, para quem agradeço de forma especial. Max, obrigada por sempre me incentivar a seguir esse caminho acadêmico. Sua paciência, dedicação e capacidade de repassar o seu conhecimento são espelhos pra mim. Agradeço também sua grande contribuição e dedicação para construção dessa dissertação.

A minha co-orientadora **Prof. Dra. Françoise Hélène van de Sande**, da qual me orgulho de poder ter trabalhado ao longo de vários anos. Fran, você é um exemplo de pesquisadora, sempre crítica, objetiva e criteriosa! Aprendi muito com o seu jeito de trabalhar e lidar com as coisas; agradeço por ter herdado esse teu “modo científico” de ser.

Ao meu co-orientador **Prof. Dr. Rodrigo Alex Arthur**, por ter me possibilitado o aprendizado de novas metodologias de trabalho, e pela possibilidade de compartilhar conhecimentos e experiências sobre o desenvolvimento de modelos de biofilme. Obrigada pela sua contribuição nessa dissertação.

Ao **Prof. Dr. Rafael Ratto de Moraes**, pelo seu auxílio nas questões referentes ao processo de importação das bombas de infusão utilizadas nessa dissertação e pela oportunidade de trabalhos paralelos durante a execução dessa dissertação. Tua orientação foi também especial e enriquecedora em termos de aprendizado.

A **Profa. Dra. Tatiana Pereira Cenci**, pela contribuição na elaboração dessa dissertação. Suas dicas e experiências contribuíram muito para o desenvolvimento desse trabalho. Agradeço também sua disponibilidade em prontamente responder as minhas inquietações e me dar oportunidades de trabalhos paralelos à de minha dissertação.

As Professoras **Dra. Elenara Ferreira de Oliveira e Dra. Dione Dias Torriani** (*in memoriam*), pelo grande incentivo à seguir na carreira acadêmica.

Ao **Prof. Dr. Flávio Fernando Demarco**, pelas oportunidades de vivências em trabalhos de cunho epidemiológico e poder ter uma outra visão de mundo.

A empresa Daxta Pelotas, na pessoa de **Werner Einhardt** pelo incentivo pesquisa e pelo desenvolvimento do Software utilizado no trabalho.

Ao Laboratório de Microbiologia, em especial ao **Prof. Dr. Rafael Guerra Lund** e as laboratoristas **Carmen Lúcia Machado Lopes** e **Lizângela Ferreira**.

Ao laboratório CDC-Bio e as pessoas que lá me acolheram. Em especial a minha colega e amiga **Cristina Pereira Isolan**, que sempre me acompanhou nas longas horas de “dureza”. Cristina, és uma pessoa ímpar nessa vida, sempre alegre e com capacidade de espalhar essa alegria. Obrigada pela amizade!

Aos funcionários da manutenção e da esterilização da Faculdade de Odontologia de Pelotas-UFPeL pelo auxílio na execução do projeto. **Gilberto Vilela**, obrigada pela sua disposição em sempre me ajudar e fazer parte do desenvolvimento dessa idéia.

Ao Programa de Pós-graduação, em especial ao secretário, amigo e colega **Celaniro Junior** que sempre esteve disposto a auxiliar no que estivesse ao seu alcance.

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Tecnológico (Cnpq)** pela concessão da bolsa de mestrado e pelo financiamento de parte do projeto.

A minha amiga e colega **Cácia Signori**, que dividiu comigo horas de convívio no laboratório. Foram alguns meses, dias, noites e finais de semana na “rotina microbiana”, mas tempos de aprendizado e amizade. Obrigada!

A minha amiga, orientada de estágio e de iniciação científica **Katielle Valente Brauner**, por todo seu auxílio e dedicação durante esse anos de mestrado. A minha também orientada de estágio e amiga **Leina Nakanishi** pela sua dedicação na execução dessa dissertação. Obrigada meninas pelas horas de agradável convívio na nossa mal cheirosa sala anexa-703!

Em especial agradeço **a minha família** e ao meu namorado **Bruno Bittencourt Araújo** pela paciência nesses dois anos de mestrado. Vocês fazem parte dessa etapa e sem vocês nada teria sentido.

Aos meus amigos e colegas de Pós-graduação, em especial a **Quéren Ferreira da Rosa**, **Alexandra Rubin Cocco**, **Gabriela Romanini Basso**, **Carine Meireis**, e **José Augusto Sedrez** que sempre dividiram anseios e alegrias nessa caminhada.

“Só fizemos melhor aquilo que repetidamente insistimos em melhorar. A busca da excelência não deve ser um objetivo, e sim, um hábito.”

Aristóteles

Notas preliminares

A presente dissertação foi redigida segundo o Manual de Normas para Dissertações, Teses e Trabalhos Científicos da Universidade Federal de Pelotas de 2013, adotando o Nível de Descrição 4 – estrutura em Artigos, descrita no Apêndice D do referido manual. Disponível no endereço eletrônico: <http://sisbi.ufpel.edu.br/?p=manual>. Acesso em: 30 de Dezembro de 2014.

Resumo

MASKE, Tamires Timm. **Estabelecimento e validação de um modelo de biofilme complexo em um dispositivo multifuncional simulador de cavidade bucal.**

2015. 122f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2015.

O biofilme está diretamente relacionado a etiologia da doença cárie. Metodologias que permitem investigar as interações presentes no conjunto formado pelo tecido dental e biofilme cariogênico são essenciais para o avanço em pesquisa pré-clínica. O objetivo desse trabalho foi *i)* realizar uma revisão sistemática sobre modelos de biofilme para cárie dental avaliando seus aspectos metodológicos, risco de viés, reprodutibilidade e validação dose-resposta à anticariogênicos ou antimicrobianos; *ii)* desenvolver um modelo complexo de biofilme de microcosmos, em um simulador multifuncional de cavidade oral (MOCS). Pubmed, Isi Web of Science e Scopus foram consultadas para inclusão de artigos em inglês de 1990 até 2015. Foram selecionados 381 artigos e 59 artigos foram incluídos para a revisão. Conclui-se que diversos são os modelos de biofilme disponíveis para pesquisa relacionada a cárie dentária, no entanto, a maioria deles carecem de experimentos de validação como dose-resposta e reprodutibilidade para cada protocolo proposto. Para o estudo *in vitro*, os biofilmes foram formados sobre discos de esmalte, tendo como inóculo saliva humana. Realizou-se 3 experimentos independentes em que os biofilmes foram crescidos por até 21 dias. O 1º e o 2º experimento relacionaram-se ao desenvolvimento do modelo [adequação do protocolos experimentais (PE) 1 e 2] e o 3º para validação dose-resposta à clorexidina (CLX) e avaliação da reprodutibilidade do modelo. Para PE1 utilizou-se regime intermitente de 10% sacarose (1,2 mL/min, 5 min, 5x/dia) em associação a fluxo contínuo de saliva artificial (DMM, 0,04 mL/min), e os biofilmes foram crescidos por até 14 dias. Para o PE2 utilizou-se DMM em fluxo contínuo (0,06 mL/min) e 5% sacarose (0,25 mL/min, 6 min, 3X/dia) e houve crescimento por até 21 dias. Nos tempos experimentais de 4, 7, 14 ou 21 dias, amostras microbiológicas e minerais foram coletadas (n=10) e as variáveis de resposta estudadas foram: porcentagem de perda de dureza superficial, perda de dureza integrada e contagem de unidades formadoras de colônias microbianas (UFC). Para o experimento 3, utilizou-se o PE2 e os biofilmes foram crescidos por 7 dias em associação a aplicação de 5ml de Clorexidina em diferentes concentrações: 0,012%, 0,03%, 0,06%, 0,12% (n=10) e solução salina como controle (2x/dia a cada 12 h, a partir de 24 h do inóculo). Para esse experimento as variáveis de resposta foram obtidas por porcentagem de perda mineral de superfície e por composição microbiológica do biofilme. Dados do controle foram comparados aos dados do PE2 para avaliação da reprodutibilidade. Ambos PE 1 e 2 desencadearam perda mineral em esmalte e aumento dos micro-organismos acidúricos e lactobacilos em 7 dias de experimento ($p < 0,05$). Existiu dose-resposta à perda mineral e a microorganismos totais e mutans, assim como correlação positiva e significativa entre os valores minerais e microbiológicos. Por permitir o crescimento de um biofilme cariogênico e por desencadear desmineralização do esmalte e dose-resposta a CLX, a MOCS

parece ser um recurso laboratorial válido para pesquisas pré-clínicas relacionadas a cárie dentária.

Palavras-chave: modelos de biofilme; biofilmes; cárie dental; microcosmo

Abstract

MASKE, Tamires Timm. **Establishment and validation of a complex biofilm model in a multifunctional oral cavity simulator**. 2015. 121f. Dissertation (Master Degree Dentistry) – Programa de Pós Graduação em Odontologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2015.

Biofilm is directly related to dental caries etiology. Methodologies that allow investigating interactions between dental tissues and cariogenic biofilms are essential to pre-clinical research advancement. This study aimed to i) systematically review the literature on dental caries biofilm models and evaluate methodological parameters, bias risk, reproductibility and dose-response to anticariogenic or antimicrobial potential ii) develop and establish a complex biofilm model in a multifunctional oral cavity simulator (MOCS). Pubmed, Isi Web of Science and Scopus were searched to potential complete papers from 1990 to 2015. 381 papers were selected to systematic review and 59 papers were included in the sistematic review. It was concluded that despite bias risk found, several *in vitro* biofilm models are available for caries-related research. However most of complex and simplified models lacked of validation experiments such as dose-response trials and reproducibility for each established and proposed protocol. For the *in vitro* study, biofilms were formed on enamel bovine discs and human saliva was used as inoculum. Three independent experiments were carried out and biofilms were growth up to 21 days. Experiments 1 and 2 were related to the biofilm model establishment [experimental protocols (EP)] and the third evaluated dose-response to chlorehidine (CHX) and the model reproductibility. EP1 used 10% sucrose in an intermittent pulse (1.2 mL/min, 5 min, 5 x/day) and continuous flow of artificial saliva (DMM, 0.04 mL/min). The biofilms were growth up to 14 days. EP2 used 5% sucrose (0.25 mL/min, 6 min, 3x/day) and DMM in continuos flow (0.06 mL/min) and the biofilm were formed up to 21 days. In the experimental times (4, 7, 14 or 21 days) microbiological and tooth samples were collected (n=10) and the outcomes were evaluated as percentage of superficial hardness change (%SHC), integrated hardness loss and colony forming units (CFU) counts. For the third experiment, the EP2 was used and biofilms were grown up to 7 days in association with CHX 0.012%, 0.03%, 0.06%, 0.12%, or saline solution as control. The treatment was applied twice a day. The outcomes were %SHC and CFU counts. Control data were compared to EP2 data (7 days) to evaluate the reproductibility of the model. Both EP1 and 2 showed that enamel demineralization and cariogenic microorganisms increase at 7 and 14 days compared to the initial experimental time ($p<0.05$). The model showed dose-respose to CHX regarding the mineral loss, total microorganisms and mutans streptococci counts. Also, a positive and significant correlation between hardness loss and microbiological values was observed. The proposed model demonstrated ability for cariogenic biofilm development, enamel demineralization and dose-response to CHX. Therefore, the MOCS seems to be a useful laboratory device to pre-clinical research related to dental caries.

Key-words: biofilm; dental caries; biofilm model; microcosms

Sumário

1 Introdução e revisão de literatura	12
2 Projeto de pesquisa	15
3 Relatório do trabalho de campo	39
4 Artigo 1	57
5 Artigo 2	82
6 Considerações finais	102
Referências	103
Apêndices	114
Anexos	118

1 Introdução e revisão de literatura

A cárie dentária tem sido descrita como uma doença crônica, de progressão lenta, raramente auto-limitante (TAKAHASHI e NIVAD, 2008), de caráter multifatorial e determinada pela presença de biofilme cariogênico (MARSH; PERCIVAL, 2006).

A placa dentária forma-se sobre o substrato dentário via uma sequência específica e coordenada de eventos, resultando em uma comunidade microbiana estruturalmente e funcionalmente organizada (MARSH, 2004). Uma vez que ocorre a formação da placa dentária, as espécies microbianas componentes permanecem em homeostase microbiana, mantendo relações internas de sinergismo e/ou antagonismo (MARSH, 2006).

De acordo com o entendimento ecológico do desenvolvimento da placa dentária ou biofilme dentário, em um estado convencional de dieta do indivíduo hospedeiro as espécies microbianas relacionadas à cárie dentária apresentam-se em menor quantidade e convivem em equilíbrio com as demais espécies do ambiente oral (MARSH, 2005; MARSH; PERCIVAL, 2006). A presença de alterações ambientais, fisiológicas ou pressões ecológicas no ambiente bucal, no entanto, é capaz de romper a homeostase microbiana formada, e selecionar e estimular a proliferação de microorganismos específicos que levam ao desenvolvimento da placa cariogênica e consequentemente a desmineralização do substrato dentário (MARSH, 2005; MARSH; PERCIVAL, 2006).

A complexidade microbiana encontrada no ambiente oral, associada às dificuldades éticas da experimentação clínica *in vivo*, tem levado ao desenvolvimento de modelos laboratoriais que sejam capazes de reproduzir aquelas condições clínicas *in vitro* (SISSONS, 1997; TANG, 2003; MCBAIN, 2009). Modelos microbianos simplificados ou mais complexos têm sido utilizados para reproduzir lesões artificiais de cárie. Destacam-se os modelos de microplacas (VAN DE SANDE et al., 2011; ARTHUR et al., 2013; EDLUND et al. 2013), o *Constant Depth Film fermenter* (CDFF) (ZAURA et al., 2011), os modelos em câmeras e células de fluxo (LEE et al., 2010; LYNCH et al., 2006) e as bocas artificiais com diferentes configurações (SISSONS et al., 1991; MEI et al., 2013; SCHWENDICKE et al., 2014).

Dentro desse contexto, biofilmes artificiais têm sido cultivados a partir de uma espécie –monocultura-, (DENG; TEN CATE, 2004;); mais de uma espécie - consórcio- (SHU et al., 2000; THUMHEER et al., 2008; LEE et al., 2010; ARTHUR et al., 2013) ou por complexos microbianos (microcosmos) provenientes da placa dental (RUDNEY et al., 2012) ou a partir de inóculo de saliva (VAN DE SANDE et al., 2011; AZEVEDO et al., 2011; ZAURA et al., 2011). Microcosmos são capazes de manter a complexidade do inóculo original e as relações entre os ecossistemas *in vitro*, e portanto quando se deseja uma maior aproximação ao comportamento natural, com manutenção da heterogeneidade microbiana durante a formação dos biofilmes, os experimentos originados de microcosmos tornam-se mais fiéis.

Além da diversidade da origem microbiana, biofilmes artificiais podem ser formados em sistemas de cultura onde as exposições ao meio nutritivo são disponibilizados de forma contínua ou intermitente, caracterizados como modelos estáticos, semi-dinâmicos ou dinâmicos. Os ecossistemas naturais, provavelmente, funcionam de uma maneira análoga a cultura semi-contínua ou contínua, na qual os substratos são fornecidos por fluxo de fluido de forma constante ou descontinuamente. A vantagem do sistema de cultura contínua é a possibilidade de mimetização de processos fisiológicos como o maior controle das taxas de crescimento microbiano devido aos gradientes de força de cisalhamento impostos pelo fluxo (MCBAIN, 2009; COYNE et al., 2010), além de permitir a limpeza dos ácidos produzidos pelo biofilme (HUMPHREY et al., 2001).

Até hoje, não existem modelos laboratoriais ideais ou únicos; e a seleção ou desenvolvimento de um modelo vem se refletindo na preferência do investigador e em outras questões a serem definidas. Ao encontro disso, os dispositivos desenvolvidos para a manutenção de biofilmes *in vitro* devem ser considerados em termos do grau de controle que eles fornecem a vários aspectos da fisiologia oral (MCBAIN, 2009). Variáveis físicas e fisiológicas devem ser incorporadas para modular o desenvolvimento microbiano e permitir o melhor realismo com que eles replicam as condições *in vivo*, inclusive respondendo a intervenções preventivas utilizadas na prática clínica (SISSONS, 1997).

Assim, o desenvolvimento de modelos de biofilme que simulem a cavidade oral e que tenham capacidade de mimetizar os eventos mediados pelo biofilme dental que ocorrem em condições clínicas orais, como lesões de cárie, torna-se extremamente interessante no contexto odontológico laboratorial. Modelos

simulando condições do ambiente oral como temperatura, variações de pH, fluxo salivar contínuo, disponibilidade intermitente de sacarose e a formação de biofilme semelhante ao oral tornam-se relevantes para estudos de etiologia da cárie dentária, substâncias anti-cariogênicas, bem como para uma gama de aplicações e utilizações que os modelos *in vitro* permitem desencadear. A facilidade e a rapidez com a qual ensaios pré-clínicos poderiam ser realizados com esses métodos também os fazem relevantes.

2 Projeto de pesquisa

2.1 Introdução

A cárie dentária tem sido considerada uma das mais prevalentes doenças encontradas em humanos (SELWITZ; ISMAIL; PITTS, 2007). Fatores genéticos, comportamentais, culturais, sociais e ambientais têm sido relatados como fatores envolvidos na etiologia da cárie dentária (PERES et al., 2005; GUSSY et al., 2006). A presença de placa cariogênica tem sido considerada como causa direta para o desenvolvimento de lesões de cárie e resulta de um elevado nível de microorganismos patogênicos. Segundo a hipótese da placa ecológica, em um estado de baixa frequência de ingestão de carboidratos, espécies associadas a doença cárie estão em menor quantidade e convivem em equilíbrio com as demais espécies do ambiente oral (MARSH, 2005; MARSH; PERCIVAL, 2006). A presença de alterações ou pressões ecológicas no ambiente bucal, no entanto, é capaz de selecionar e favorecer a proliferação de microorganismos patogênicos; desencadeando o estado de doença e a consequente presença da cárie. (PARISOTTO et al., 2010).

A complexidade do ambiente oral e os problemas éticos relacionados aos estudos em humanos das doenças orais *in vivo*, tem levado ao desenvolvimento de modelos laboratoriais que simulem o ambiente bucal *in vitro* (TANG, 2003; MCBAIN, 2009). Os primeiros modelos desenvolvidos *in vitro*, pretendiam reproduzir as condições da microbiota oral de forma simplificada. Porém, ao longo do tempo, percebeu-se que alguns princípios como controle de temperatura, condição atmosférica, pH, meio nutritivo e controle da contaminação necessitavam ser respeitados para evitar o fracasso nos modelos que vinham sendo desenvolvidos (TANG et al., 2003).

Os biofilmes dentais definem-se como comunidades microbianas intimamente associadas entre si e protegidas por uma matriz polimérica extracelular de origem salivar e bacteriana (BOWDEN; LI, 1997; MARSH, 2005). A seleção e sucessão microbianas (teoria ecológica da placa) ocorrem conforme a disponibilidade de

nutrientes e substrato, e a tolerância ao meio – o pH e a concentração de oxigênio (BRADSHAW; MCKEE; MARSH, 1989; MARSH; BRADSHAW, 1997; RUBY; BARBEAU, 2002). O biofilme se desenvolve seletivamente como uma unidade estruturada para o aproveitamento energético, onde nutrientes, enzimas, oxigênio e produtos metabólicos permeiam os espaços entre os agregados microbianos (DAVEY; O'TOOLE G, 2000).

Considerando os princípios básicos citados acima, inúmeras metodologias foram sendo desenvolvidas para construção de modelos de biofilmes (SISSONS, 1997; GUGGENHEIN et al., 2001; DENG; TEN CATE, 2004; FILOCHE; SOMA; SISSONS, 2007). Até hoje, não existem modelos ideais ou únicos; a seleção ou desenvolvimento de um modelo vem se refletindo na preferência do investigador e em outras questões a serem definidas. Sistemas desenvolvidos para a manutenção de biofilmes em laboratório podem ser considerados em termos do grau de controle que eles fornecem a vários aspectos da fisiologia, do realismo com que eles se replicam as condições *in situ* e a facilidade com que podem ser estabelecidos, mantidos e replicados (MCBAIN, 2009).

Ao longo do tempo, vários experimentos mais ou menos complexos em seu desenvolvimento, como o *Constant Depth Film fermenter* (CDFF) (ZAURA et al., 2011; DENG; TEM CATE, 2004), *Multiplaque Artificial Mouth* (MAM) (SISSONS et al., 2007), e biofilmes formados em microplacas (FILOCHE; SOMA; SISSONS, 2007; VAN DE SANDE et al., 2011) têm sido realizados e vêm diferindo em relação à origem e a diversidade das espécies microbiológicas envolvidas no processo. As metodologias desenvolvidas obtêm a formação de biofilmes a partir de uma única espécie de microorganismo (SORVARI; SPETS-HAPPONEN, 1994; DENG; TEN CATE, 2004), mais de uma espécie - consórcio- (SHU et al., 2000; GUGGENHEIN et al., 2004; THUMHEER et al., 2008; LEE et al., 2010, ARTHUR et al., 2013) ou de microcosmos (biofilmes complexos) provenientes da placa dental (FILOCHE; SOMA, SISSONS, 2007) ou a partir de inóculo de saliva (VAN DE SANDE et al., 2011; AZEVEDO et al., 2011; ZAURA et al., 2011).

A seleção de uma ou mais espécies normalmente pressupõem a investigação de fatores individuais (onde a manipulação de uma única variável pode ser monitorada) ou coletivos (fenômenos ecológicos de interação e sucessão) das espécies envolvidas, respectivamente (WIMPENNY, 1997). Todavia, quando se deseja maior aproximação ao comportamento natural, com manutenção da

heterogeneidade microbiana durante a formação dos biofilmes, os experimentos originados de microcosmos são mais fiéis, mantendo a complexidade do inóculo original e as relações entre os ecossistemas *in vitro* (FILOCHE et al., 2008; MCBAIN, 2009).

Os biofilmes podem ser formados em sistemas de cultura onde as exposições ao meio nutritivo podem ser disponibilizadas de forma contínua ou intermitente, caracterizando modelos estáticos (*batch*), semi-dinâmicos (*semi-continuous* ou *fed-batch*) ou dinâmicos (*continuous*). A presença de culturas de microrganismos em modelos estáticos, com nutrientes finitos dentro de recipientes fechados e com taxa de crescimento rápido são relativamente raros na natureza. A maioria dos ecossistemas naturais, provavelmente, funciona de uma maneira análoga a cultura semi-contínua ou contínua, através da qual o fluxo de fluido serve para fornecer substratos constantemente ou descontinuamente. Enquanto modelos de cultura estática tem a vantagem de ser simples, os sistemas de cultura contínua permitem um melhor controle das taxas de crescimento e outras variáveis (MCBAIN, 2009).

Dentro desse contexto, modelos de biofilme em câmara de fluxo, podem simular o fluxo salivar variável e as diferentes tensões de cisalhamento que poderiam afetar a adesão bacteriana (ROSENTRITT et al., 2007). Além disso, podem mimetizar o fluxo nutricional no ambiente oral, caracterizando uma alta ou baixa disponibilidade de nutrientes e sacarose para o meio, possibilitando a alteração de pH e permitindo a seleção e sucessão microbiana que ocorre em biofilmes *in vivo* (BRADSHAW; MCKEE; MARSH 1989). Esses dispositivos geralmente não são tão complexos e permitem montagem caseiras (COENYE; NELIS, 2010).

Algumas metodologias vêm utilizando esses dispositivos para estudos relacionados ao desenvolvimento de lesões de cárie e estudos da ação anti-cárie de algumas substâncias (SEEMAN et al., 2005; XIE; LI; ZHOU, 2008; LEE et al., 2010). O uso de consórcio ou de monoespécies de bactérias é frequente para esses tipos de dispositivos, no entanto, a utilização de microcosmos de origem oral não tem sido relatada.

A partir do exposto, o desenvolvimento de um modelo de biofilme de microcosmo, em câmara de fluxo, que tenha capacidade de mimetizar os eventos mediados pelo biofilme dental que ocorre em condições clínicas, como lesões de cárie, seria extremamente interessante no contexto odontológico laboratorial.

Uma câmara de fluxo, simulando condições do ambiente oral como temperatura, variações de pH, fluxo salivar contínuo, disponibilidade intermitente de sacarose e a utilização de microcosmo para colonização do substrato dentário far-se-ia extremamente relevante para estudos de substâncias anti-cariogênicas, bem como para uma gama de aplicações e utilizações que modelos *in vitro* desse tipo permitem desencadear. Diante disso, o desenvolvimento de modelos de biofilme de microcosmos em câmara de fluxo, poderia servir não só para estudos de des e remineralização de substratos dentários, mas também para verificar os efeitos decorrentes da patogenicidade do biofilme sobre materiais restauradores e também na integridade adesiva. A facilidade e a rapidez com a qual ensaios pré-clínicos poderiam ser realizados com esse método também o fazem relevante.

2.2 Proposição

2.2.1 Objetivo Geral

Desenvolver um modelo de biofilme de microcosmos em fluxo contínuo para o estudo de aspectos relacionados ao desenvolvimento de lesões de cárie dental.

2.2.2 Objetivos específicos

- 1) Revisar sistematicamente a literatura relevante sobre modelos de biofilme *in vitro* que se relacionem as questões clínicas da cárie dentária como o desenvolvimento de biofilme cariogênico e lesão de cárie.
- 2) Desenvolver um modelo de biofilme de microcosmos *in vitro* em câmara de fluxo contínuo com capacidade de formar lesões de cárie artificiais.
- 3) Validar o modelo de biofilme com avaliação de dose-resposta a Clorexidina.
- 4) Testar a reprodutibilidade do modelo de biofilme.

2.3 Hipóteses

O modelo de biofilme desenvolvido terá capacidade de reproduzir as perdas minerais decorrentes do desafio cariogênico proporcionado, oferecerá uma relação de dose-resposta ao tratamento com Clorexidina e será reprodutível.

2.4 Materiais e métodos

2.4.1 Revisão sistemática de literatura- Modelos de biofilme *in vitro* para estudos de cárie dentária

2.4.1.1 Antecedentes e Justificativas

É comum encontrar na literatura inúmeros modelos que tentam mimetizar o ambiente oral; inclusive, vários são os modelos *in vitro* relacionados ao desenvolvimento da cárie dental. No entanto, pouco se sabe sobre seus dados de validação dose-resposta a agentes anticariogênicos ou antimicrobianos ou sobre a reprodutibilidade desses modelos. Dessa forma, uma revisão sobre os modelos de biofilmes *in vitro* relacionados à cárie dentária é relevante pois permitirá o conhecimento dos modelos que permitam reprodução, que tenham capacidade de mimetizar condições clínicas em laboratório, e que possam ser usados para estudos dose-resposta.

2.4.1.2 Objetivo

Revisar sistematicamente a literatura sobre modelos de biofilme laboratoriais para o estudo da cárie dentária; caracterizar e discutir os parâmetros metodológicos empregados para o desenvolvimento de biofilme e lesões artificiais de cárie através desses modelos. Além disso, visa revisar a reprodutibilidade, a validação dose-resposta a substâncias anticariogênicas e o risco de viés de cada estudo incluído para revisão.

2.4.1.3 Desenho Experimental

Esta revisão será do tipo sistemática e serão selecionados estudos *in vitro* sobre modelos de biofilme. O desfecho primário será a reprodução de lesões artificiais de cárie ou biofilme cariogênico; os desfechos secundários serão a validação dose-resposta a agentes antimicrobianos ou anticariogênicos. A estratégia de busca dos estudos a serem revisados envolverá busca nas principais bases de dados (PubMed, LILACs, ISI web, Scielo) e nas bibliografia dos estudos selecionados. Os dados coletados serão dispostos em forma de tabelas e figuras,

com o objetivo de facilitar o entendimento e possibilitar a comparação dos métodos de avaliação utilizados na literatura revisada.

As estratégias de busca utilizadas foram:

(((((("caries") OR *caries- like lesion*) OR *artificial caries*) OR *demineralization*)) AND (((*biofilm*) OR *dental plaque*) OR *microcosms*) OR *biofim models*)) AND (((((((((((((flow cell) OR *biochemical reactors*) OR *chemostat system*) OR *cdff*) OR *constant depth film fermenter*) OR *artificial mouth*) OR *multiplaque artificial mouth*) OR *multi-well plates*) OR *microplate*) OR *perfused biofilm fermentor*) OR *high throughput active attachment model*) OR *bioreactor*)) OR *24-well plates*).

Utilizando a estratégia acima, foi realizada uma busca em março de 2013, com limite de data (janeiro de 1990- março de 2013) e selecionado para o idioma inglês, que resultou em: Pubmed = 86; LILACs = 51; Scielo = 0; ISI Web of Knowledge= 281; totalizando 418 artigos. Para inclusão dos artigos da revisão foram adotadas as seguintes etapas:

Etapa 1: Remoção de artigos duplicados nas bases de dados pesquisadas

Etapa 2. Revisão dos títulos e resumos aplicando critérios de inclusão e exclusão por dois autores (TTM e FHS)

Critérios primários:

- Ser modelo microbiológico para induzir lesão de cárie ou biofilme cariogênico *in vitro*
- Permitir oscilações de pH (uso de sacarose ou outro carboidrato para simular desafio cariogênico)

Critérios secundários:

Ter validação por substâncias anticariogênicas e/ou antimicrobianas; ou pela produção de biofilme cariogênico; ou pela produção da lesão de cárie e/ou possuir reprodutibilidade em outro experimento

Etapa 3: Revisão dos resumos de forma independente por 2 autores (TTM e FHS) de acordo com os critérios de inclusão dos estudos descritas na Etapa 2. Inclusão de estudos baseada em consenso pelos autores.

Etapa 4: Artigos revisados por um autor (TTM), inclusão dos estudos originais que entraram nos critérios do Passo 1. Discussão com um segundo autor (FHS) e

decisão baseada em consenso, ou pela opinião de um terceiro autor (MSC), quando necessário.

Etapa 5: Adição de estudos presentes nas referências dos estudos selecionados na etapa 4.

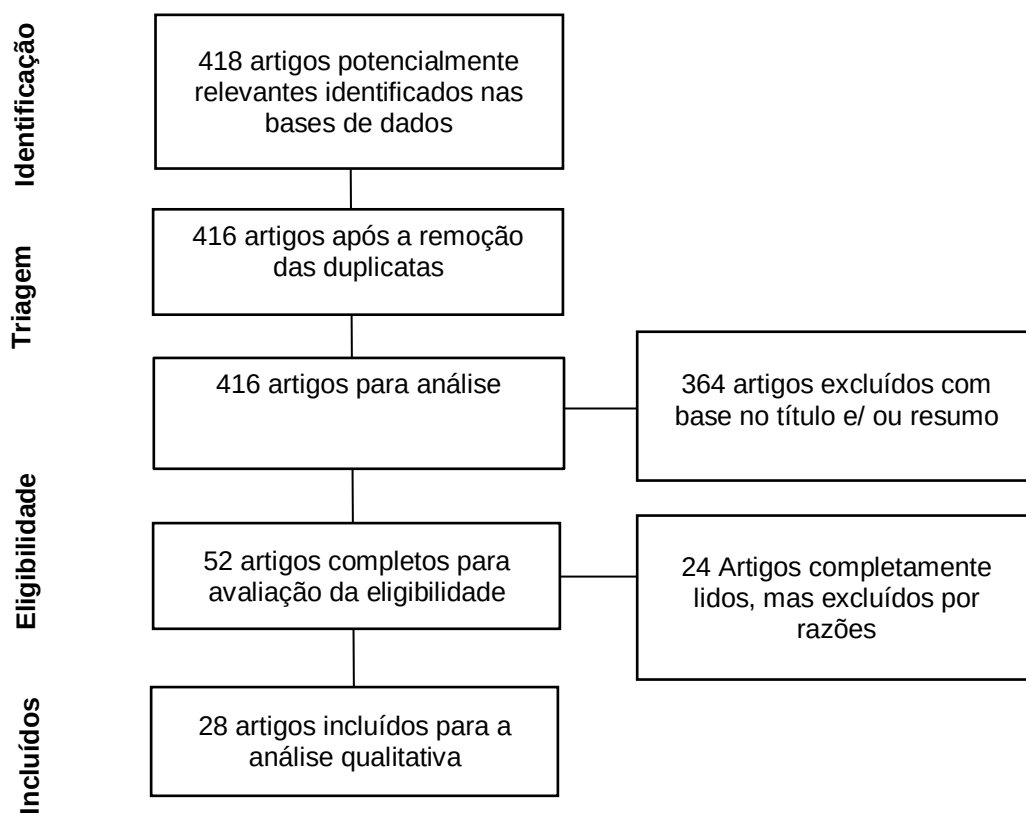


Figura 1- Fluxograma preliminar dos estudos selecionados

Tabela 1 - Dados preliminares extraídos dos artigos selecionados pelos critérios de inclusão.

Autor e Ano	Tipo modelo	Tipo de biofilme	Descrição modelo					Validação do modelo			Reprodutibilidade	Oscilações ph
			Tipo espécim e	Dias	Fatores controlados	Variáveis de resposta	Meio de cultura	Produz lesão cárie	Produz biofilme cariogênico	Dose-resposta		
1) ZAURA et al; 2011	CDFE modificado	Microscosmos	Dentina Bovina	8	Temperatura e anaerobiose	Perda mineral integrada e profundidade de lesão (TMR), Mudanças microbiana (qPCR), pH, acidogenicidade da palca e proteína na placa.	Meio enriquecido e definido de mucina (DMM)	Sim	Sim	CLX: Profundidade de lesão (ΔL), perda mineral integrada (ΔS), massa proteica, acidogenicidade. SF4: ΔL , ΔS e acidogenicidade SF5: ΔI e acidogenicidade.	Sim	Sacarose 10% por 5 minutos a cada 2 horas, por 8 horas.
2) LEE et al; 2010	Câmara de Fluxo	Consórcio de <i>Streptococcus mutans</i> e <i>Lactobacillus casei</i>	Dente humano	10	Temperatura Anaerobiose e pH.	ΔL , ΔS e crescimento bacteriano (UFC)	Bacto™ Todd Hewitt Broth	Sim	Sim	CLX: ΔL e ΔS Nanoemulsão de Cloreto de cetilpiridínio: ΔL , ΔS e crescimento bacteriano	Sim	Exposições de 6 min de sacarose 10% - 3x/dia
3) XIE; LI; ZHOU 2008	Célula de Fluxo	Consórcio de <i>Streptococcus sanguis</i> , <i>Streptococcus mutans</i> , <i>Actinomyces naeslundii</i> e <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Hidroxi-apatita esmalte bovino, discos de vidro	5	Temperatura Anaerobiose e pH	Superfície de área coberta por biofilme (SCB), densidade da integridade ótica (DIO), UFC, profundidade de lesão de cárie e pH	Mucina gástrica de porco III, peptona, protease, tripticasa peptona, extrato de levedura glucose KCl e cisteína-HCl	Sim	Sim	Fluor: ΔL , UFC, pH, DIO, SCB <i>Galla Chinensis</i> : pH, SCB, DIO, ΔL , UFC	sim	Exposições de 10 ml sacarose (25 mmol/l) a cada 12h.

4) HODGSON et al, 2001	Célula de Fluxo	Consórcio de <i>Streptococcus gordonii</i> , <i>Streptococcus salivarius</i> , <i>Streptococcus mutans</i> , <i>Actinomyces naeslundii</i> , <i>Veillonella parvula</i> e <i>Fusobacterium nucleatum</i> .	Esmalte bovino e Hidroxi-apatita	7- 14	Temperatura, pH e anaerobiose		Mucina gástrica de porco III, peptona, proteose, tripticase peptona, extrato de levedura glucose KCl, cisteína-HCl	Sim	Sim	Não	Sim- Xie com modificações	Exposições de sacarose 10 mmol/l ou 50mmol/l.
5) FILOCHE et al; 2008	Microplacas	Microcosmos	-	1	Temperatura pH anaerobiose	pH Checker-board DNA-DNA Hybridization (CKB)	DMM	Não	Sim	CLX: CKB, pH Listerine®: CKB, pH	Sim	Exposição contínua a 0.15% ou 0.5%
6) DENG; TEN CATE 2003	CDF	<i>Streptococcus mutans</i>	Dentina bovina	5-20	Temperatura e anaerobiose	pH, UFC, ΔL e ΔS	BHI com 25mM de Tampão PIPES e 1.5mM CaCl ₂ .	Sim	Sim	Não	Sim	Sacarose 2% por 30min: 4x ou 8x/ dia
7) FILOCHE; SOMA; SISSONS 2007	Microplacas	Microcosmos	-	3-10	Temperatura 35°C e anaerobiose	pH e CKB	DMM e Meio basal de mucina (BMM)	Não	Sim	Não	Sim	Sacarose 0.15% ou 0.5%
8) AZEVEDO et al; 2011	Microplacas	Microcosmos	Esmalte bovino	5	Temperatura e anaerobiose	pH, UFC, porcentagem de perda mineral	DMM	Sim	Sim	-	Sim	Sacarose 1%
9) VAN DE SANDE et al; 2011	Microplacas	Microcosmos	Esmalte bovino	5	Temperatura e anaerobiose	pH, UFC, % perda mineral;	DMM	Sim	Sim	CLX- pH e % perda mineral	Sim	1% sacarose- 6h diárias
10) SISSONS et al; 2007	Multiplacas em Boca artificial (MAM)	Microcosmos	-	19	Temperatura (35°C) e 5% CO ₂ in N ₂ (60ml/min)	pH, CKB	DMM, BMM e DMM com ureia	Não	Sim	-	Sim	Exposições de 6 minutos de sacarose 5% a cada 8 horas.
11) YIP et al; 2007	Multiplacas em Boca artificial	Consórcio de <i>Streptococcus mutans</i> , <i>Streptococcus sobrinus</i> , <i>Actinomyces naeslundii</i> e <i>Lactobacillus rhamnosus</i> .	Dente humano (raiz e esmalte) restaurado com CIV, CIVMR e com resina composta. (todos envelhecidos)	21	37°C de temperatura em 100% umidade	UFC, Infravermelho Transformado de Fourier (FTIR) e Digitalização de espectroscopia de energia dispersiva de elétrons (SEM-EDS)	BMM (0.2 ml/min)	Não	Sim	Sim- CIV % mineral da raiz dentária- não esmalte	Sim	Exposições de 6 minutos de sacarose 5% a cada 8 horas.

12) FONTANA et al; 2000	CDF	<i>Streptococcus mutans</i> TH16 e <i>Streptococcus mutans</i> A32-2	Esmalte ântero-inferior de incisivo humano	4	pH, viabilidade de mutans (através de MSB), Contaminação bacteriana (TSA), temperatura e anaerobiose	UFC, Profundidade de lesão e área da lesão.	MW (Mineral Wash)- Meio modificado a partir de Stookey e Stahlman.	Sim	Sim	Sim- tendência para anticorpos em diminuir a aderência dos <i>streptococcus mutans</i> .	Sim	Trypticase Soy Broth sem Dextrose (TSB) com 5% de sacarose TSB com 1% de sacarose
13) SHU et al; 2000	Multiplacas em boca artificial (MAM)	<i>Streptococcus mutans</i> , <i>Streptococcus sobrinus</i> , <i>Actinomyces naeslundii</i> e <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Esmalte bovino e dentina humana	7-22	35°C, Gás de umidificação (5% CO2 em N2).	Microdureza, Microrradiografia (ΔS e ΔL) UFC, pH	BMM	Sim	Sim	Sim- Flúor	Sim	2 experimentos: 1.5ml de 5% p/v sacarose ou glucose suplementadas por 6 minutos a cada 6 / 8 horas
14) SISSONS et al; 1998	Multiplacas em boca artificial (MAM)	Microcosmos	-	1- 48 dias	35°C, gás de umidificação.	pH de repouso, biomassa do biofilme (peso úmido)	BMM BMM + uréia BMM+ arginina e cloridrato de amônio	Não	Sim	Não	Sim	1.5 ml de 5% sacarose, 6 minutos de cada 8 em 8 horas.
15) BRADSHAW et al; 1994	*										Sim	
16) SORVARI; SPETS-HAPPONEN; LUOMA 1994	Boca artificial	<i>Streptococcus mutans</i>	Esmalte bovino	10	Temperatura 37°C	Microdureza interna	Solução de Fusayama, sem uréia.	Sim	Sim	Sim- tendência para CLX associado ao Flúor	Sim	Sim- sacarose 3%
17) PEARCE et al., 1992	★											
18) YUE et al; 1992	★											
19) FONTANA et al., 1996	★											
20) THURNHEER et al., 2008	Microplacas	<i>Actinomyces naeslundii</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Fusobacterium nucleatum</i> , <i>streptococcus sobrinus</i> e <i>Veillonella dispar</i>	Esmalte bovino	64.5 horas	Temperatura (37°C) anaerobiose.	UFC, Determinação da atividade da amilase, desmineralização (quantidade de luz induzida pela fluorescência	Modificado Fluido Universal (mFUM)- tampão fraco e com tampão forte	Sim	Sim	Não	Sim	Sacarose e Glucose (0.075%- 0.5%) e Amido (0.3%- 1%).

21) SEEMANN et al., 2005	Câmara de fluxo	<i>Streptococcus mutans</i>	Pré-molares humanos	21 dias	Temperatura, anaerobiose	UFC, desmineralização (Autofluorescência da desmineralização)	Trypicase soy broth (TSB)	Sim	Sim	Sim- selantes	Sim	5 minutos de 10% sacarose a cada hora
22) HASHIZUME et al., 2002	★											
23) GUGGENHEIN et al., 2004	Microplacas	<i>Streptococcus oralis</i> , <i>Streptococcus sobrinus</i> , <i>Actinomyces naeslundii</i> , <i>Veillonella dispar</i> , <i>Fusobacterium nucleatum</i> e <i>Candida albicans</i>	<i>Discos de esmalte bovino e hidroxapatita</i>	15 min até 64.5h oras	Temperatura (37°C) e anaerobiose	Específicos anticorpos em conjunto com confocal laser scanner microscópio (CLSM) e UFC. Quantitativa luz de Fluorescência (QLF)	Modificado Fluido Universal (mFUM)- tampão fraco e com tampão forte	Sim	Sim	Sim –CLX 0.12%	Sim	Glucose e sacarose (0.5 – 5%)
24) FILOCHE; SISSONS, 2004	Multiplacas artificial mouth (MAM)	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> on coculture with <i>Actinomyces naeslundii</i> , <i>Actinomyces gerencseriae</i> , <i>Streptococcus mutans</i> e <i>Veillonella parvula</i>	-	19	Temperatura 35°C e anaerobiose	UFC, peso úmido	DMM	Não	Sim	Não	Sim	Sacarose 5%, por 6 min a cada 8h.
25) SISSONS; WONG; CUTRESS, 1995	★											
26) VICKERMAN; JONES, 1995	★											
27) LI; BOWDEN, 1994	★											
28) SIMONSSON T; RUNDEGREN J; EDWARDSSON, 1991	★											

* Foi enviado email ao autor correspondente solicitando o artigo. Se não houver resposta em 30 dias, será reenviado o email, e se dentro de um novo prazo de 30 dias, não houver resposta, outros autores do mesmo estudo serão contatados. Caso não haja resposta; o artigo será excluído da revisão.

2.4.2 Estabelecimento de um modelo de biofilme de microcosmos em fluxo contínuo

2.4.2.1 Antecedentes e Justificativas

A formação de biofilmes originados de microcosmos são mais fiéis ao comportamento natural, como a heterogeneidade microbiana, e conseguem manter complexidade e as relações do ecossistema do inóculo original (MCBAIN, 2009), e sabendo que através de dispositivos chamados câmaras de fluxo é possível simular o fluxo salivar variável, as tensões de cisalhamento e a disponibilidade de nutriente, e ainda estimular a sucessão ecológica da placa. Portanto, a construção de um modelo de biofilme de microcosmo em câmara de fluxo contínuo seria extremamente interessante pois mimetizaria o ambiente bucal de forma bastante satisfatória.

Com a construção desse modelo de biofilme, as interações que modulam a patogenicidade do biofilme serão recriadas nesse modelo, conferindo maior realidade ao modelo proposto do que os obtidos de uma ou mais espécies selecionadas (SISSONS; WONG; SHU, 1998; TEN CATE, 2006). Além disso, o desenvolvimento de biofilmes originados de microcosmos permitirá o estudo dos ecossistemas envolvidos pela possibilidade de observação frente às condições impostas, sem as limitações e dificuldades inerentes a modelos de estudo *in situ* e *in vivo*. Embora, alguns modelos de câmara de fluxo venham sendo usados para pesquisas na Cariologia, o desenvolvimento desses modelos utilizando microcosmos como inóculo e sua validação ainda são relativamente inexplorados.

2.4.2.2 Objetivo

Essa etapa do estudo objetiva conduzir experimentos para testar o desenvolvimento de um modelo de biofilme de microcosmo em câmara de fluxo contínuo.

2.4.2.3 Aspectos éticos

O projeto será encaminhado ao Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Pelotas (FM-UFPe/ RS). Os voluntários assinarão um termo de consentimento livre e esclarecido, a fim de autorizar sua participação no estudo (Apêndice A).

2.4.2.4 Cálculo da amostra

A estimativa de número amostral (n) foi realizada utilizando os dados minerais (percentual de perda de dureza de superfície, %PDS) obtidos num modelo de biofilme de microcosmos (VAN DE SANDE et al., 2011). O cálculo amostral foi realizado no programa Sigmastat® (Versão 3.01, Systat Software Inc.), para Teste-T e ANOVA (análise de variância) considerando os seguintes parâmetros: poder do estudo de 80%, erro tipo alfa de 5%, valores da diferença entre as médias dos grupos de interesse e respectivos desvios-padrão na avaliação de %PDS. Com base nos dados reportados obteve-se, um n de 6 espécimes para avaliação de microdureza entre os dias experimentais (teste-t) a serem testados, e um n de 8 espécimes para avaliação entre as diferentes concentrações de CLX (ANOVA).

2.4.2.5 Delineamento experimental

Será realizado um estudo *in vitro*, completamente aleatorizado, no qual serão formados biofilmes em câmaras de fluxo sobre discos de esmalte, tendo como inóculo saliva (microcosmos) de um voluntário adulto e saudável. Os biofilmes serão crescidos independentemente por até 14 dias sobre discos de esmalte presentes nas câmaras de fluxo. Serão realizados 3 experimentos independentes: o primeiro para desenvolvimento do modelo (experimento 1), o segundo para validação dose-resposta à CLX (experimento 2), e o terceiro para testar a reprodutibilidade do modelo (experimento 3), cujos delineamentos estão descritos a seguir:

O experimento 1 será realizado em duplicata a partir de inóculos independentes. Em cada câmara, as mesmas condições serão realizadas para formação de biofilmes e o fator em estudo será o tempo de formação dos biofilmes (3, 6, 10 e 14 dias). Para avaliação comparativa entre os períodos experimentais, as câmaras serão abertas e duas amostras de esmalte serão removidas de cada uma. Ao final dos dois experimentos, haverá um n amostral de 16 espécimes para cada tempo experimental.

No experimento 2 o fator em estudo será as diferentes concentrações de CLX (0.012, 0.03, 0.06, e 0.12%). Serão realizados 2 experimentos independentes para cada condição de CLX por 6 dias de tempo experimental. Solução salina será utilizada como controle experimental também em 2 experimentos independentes.

Em cada experimento, serão coletadas 2 amostras de esmalte por câmara, totalizando 8 amostras para cada concentração de CLX.

Para o experimento 3, uma concentração de CLX será selecionada e os biofilmes serão crescidos por até 6 dias (n=8) para avaliação da reprodutibilidade do modelo proposto. Em todos os experimentos, as variáveis de resposta serão obtidas por: determinação das alterações em esmalte por microdureza de superfície e longitudinal e por composição microbiológica do biofilme.

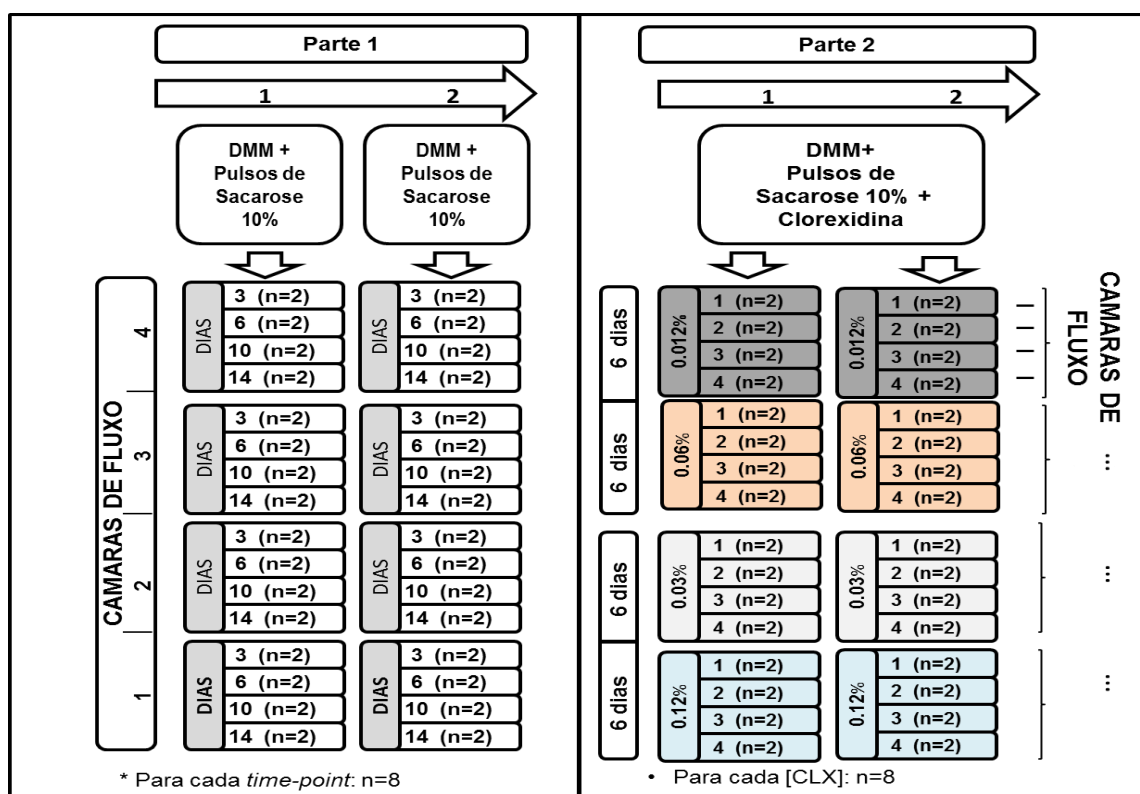


Figura 2 - Fluxograma dos experimentos 1 e 2. Parte 1- Desenvolvimento modelo: Dois experimentos independentes, em cada time-point, serão coletados 2 espécimes de cada de fluxo independente. Para cada tempo experimental serão coletados 8 amostras. Parte 2- Validação do modelo: Para cada concentração de CLX, serão feitos 2 experimentos de 6 dias cada, totalizando uma amostra de 8 espécimes por concentração da substância. Como controle utilizar-se-a solução salina, sob mesmo protocolo.

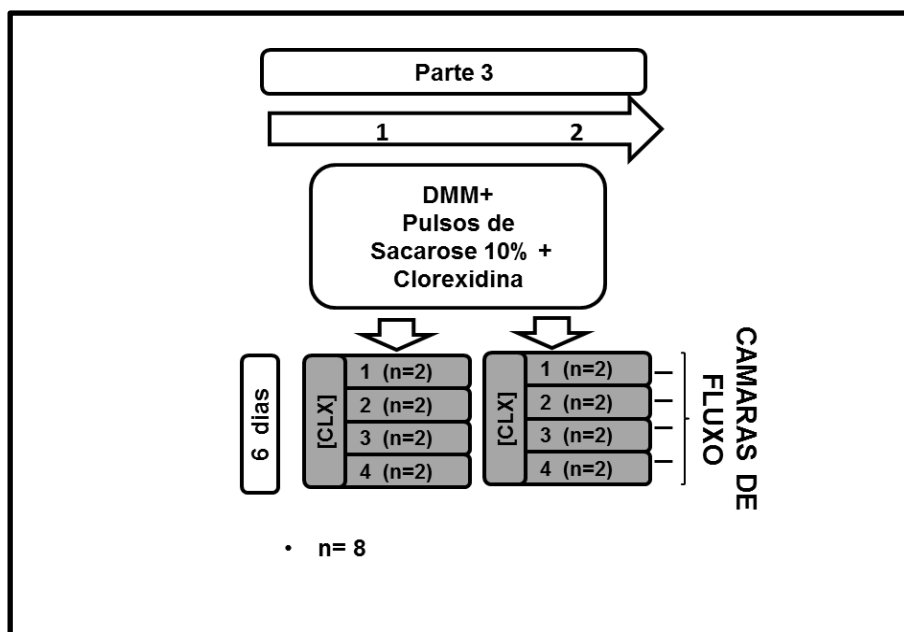


Figura 3 - Fluxograma do experimento 3 – Reprodutibilidade. O experimento será realizado em duplicata. Após 6 dias, serão coletados 2 espécimes de cada de câmara de fluxo independente.

2.4.2.6 Configuração e características do modelo

O aparato a ser desenvolvido será constituído essencialmente de quatro câmaras retangulares constituídas em metal aço-inox e com tampas de vidro. O vedamento do aparato se dará através de articulações (com parafusos) de metais localizadas na interface vidro/ metal. O mesmo dispositivo de vedamento por parafusos permitirá a abertura e fechamento da câmara para a coleta das amostras em cada tempo experimental. Cada caixa (10cm x 4cm x 2cm) apresentará suportes (aço-inox- 6cm x 1,5cm x 1,5cm) em seu interior para disposição dos espécimes experimentais ($n=8$). Orifícios de entrada e saída de fluxo se localizarão nas laterais das câmaras. As câmaras de fluxo serão armazenadas em estufa a 37°C.

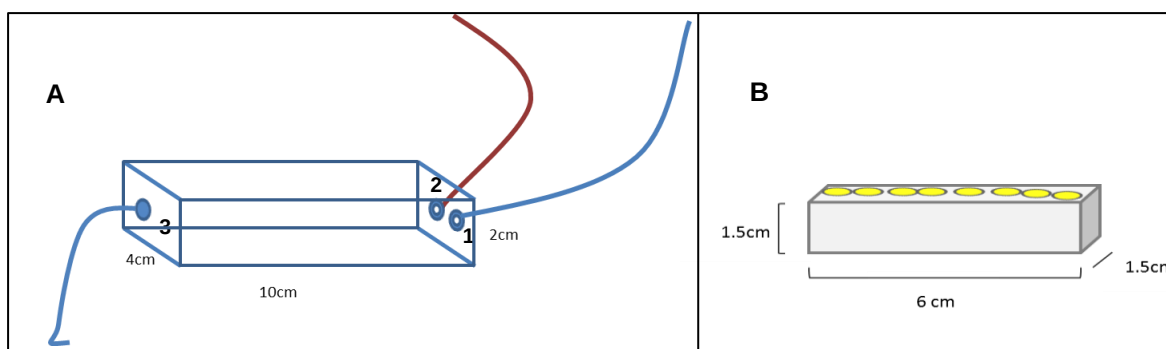


Figura 4 – Representação esquemática da câmara de fluxo e suporte para os espécimes. A- Câmara de fluxo: 1) Entrada para fluxo de meio de cultura DMM. 2) Entrada para fluxo de sacarose. 3) Saída para os fluxos. B- Suporte para os espécimes.

2.4.2.6.1 Alimentação / Fluxo do sistema

2.4.2.6.1.1 Fluxo contínuo

O sistema será alimentado através de mangueiras de fluxo (dispositivos hospitalares para soro fisiológico) com meio de cultura enriquecido e definido de mucina- análogo a saliva (DMM) utilizando-se a velocidade média de 0.5ml/min. O bombeamento em fluxo contínuo será obtido através de 1 bomba peristáltica de 4 canais (um canal para cada câmara).

2.4.2.6.1.2 Fluxo intermitente

O fluxo intermitente refere-se aos fluxos espaçados de sacarose, simulando a dieta cariogênica. As aplicações da solução de sacarose 10% (p/v) ocorrerão após 2 horas da inoculação da saliva (microcosmos) e após 1 hora do início do fluxo de DMM. A cada 2h, a sacarose será injetada no sistema em fluxo de 1.2ml/min, totalizando 5 minutos de aplicação. O período noturno, ou seja, de remineralização ocorrerá com fluxo contínuo de DMM puro por um período de 10h seguidas (ZAURA et al; 2011). O bombeamento em fluxo contínuo será obtido através de 1 bomba peristáltica de 4 canais (um canal para cada câmara).

2.4.2.6.1.3 Fluxo de tratamentos

Os tratamentos serão realizados 2x ao dia, começando logo após o último pulso de sacarose; o segundo fluxo começará 20 minutos antes do final do período de remineralização. Cada tratamento consistirá na aplicação de 1ml de solução de

Clorexidina (0.012% ou 0.03% ou 0.06% ou 0.12%) juntamente com o fluxo de DMM através de uma seringa em uma abertura própria na mangueira de fluxo.



Figura 5 – Esquema de fluxos de sacarose e clorexidina adaptado de Zaura (2011). Números em vermelho representam os horários nos quais ocorrerá infusão de sacarose 10% (5 minutos); setas amarelas representam períodos em que ocorrerá a injeção de Clorexidina 0.12%.

2.4.2.6.1.4 Fluxo de Gás de anaerobiose

A condição de anaerobiose em cada câmara será simulada através de uso de gás de anaerobiose contendo 10% CO₂, 10% H₂ e 80% de N₂ injetado diretamente nos recipientes do meio de cultura. O fluxo médio de gás injetado será de 50 mL/min $\pm$ 0.5 mL/min.

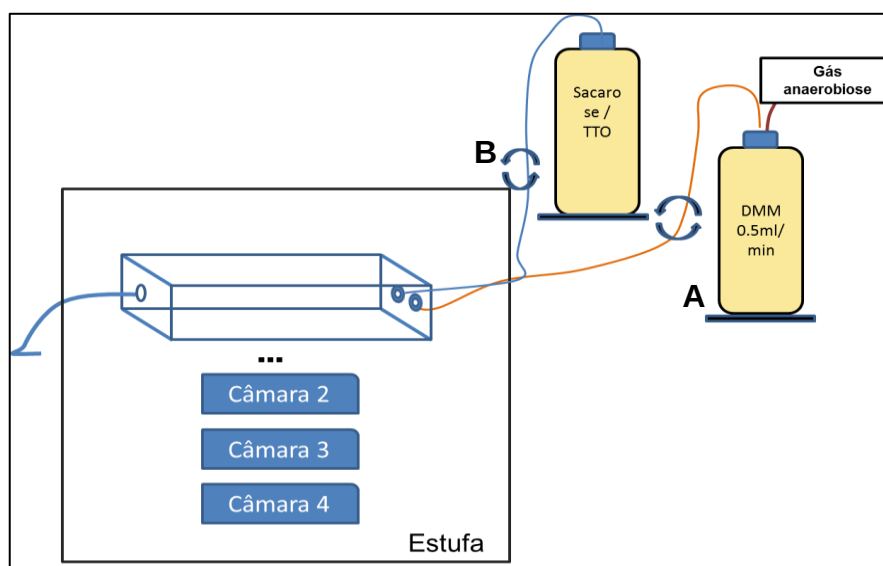


Figura 6 - Desenho esquemático das câmaras de fluxos localizadas na estufa. A) Bomba peristáltica emitindo fluxo de 0.5 mL/min de DMM. B) Bomba peristáltica emitindo fluxo de solução de sacarose 10%.

2.4.2.7 Obtenção e preparo das amostras de tecido dentário

Após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa, amostras de esmalte serão obtidas de incisivos bovinos irrompidos e livres de falhas provenientes de um frigorífico local. Os dentes serão limpos e armazenados em água destilada (-20°C). Para obtenção de discos de esmalte de 5mm de diâmetro e 2,5mm de espessura, o terço médio vestibular será seccionado em furadeira industrial com broca de núcleo de diamante (tipo trefina) em velocidade de 400 RPM. Para finalização será realizada planificação da superfície com discos de lixa (granulometria 600, 1200, e 1500) e polimento com feltro e pasta diamantada em politriz. Todos os procedimentos durante a confecção dos discos serão realizados sob refrigeração por água. Será realizada avaliação de microdureza inicial (descrita adiante, na análise de perda mineral). A base (dentina) e as laterais do disco serão isoladas com esmalte para unhas, deixando apenas a superfície do esmalte exposta. Por fim, as amostras serão esterilizadas por radiação gama e armazenadas em solução estéril a -20°C até utilização.

2.4.2.8 Confecção de saliva artificial – meio caldo

A obtenção do meio DMM (meio definido enriquecido com mucina) será realizada conforme protocolo descrito anteriormente por Wong & Sissons (2001), o qual contém mucina gástrica de suíno (2,5g/l), uréia (1.0mmol/l), sais (em mmol/l: de CaCl_2 , 1,0; MgCl_2 , 0,2; KH_2PO_4 , 3,5; K_2HPO_4 , 1,5; NaCl , 10,0; KCl , 15,0; NH_4Cl , 2,0), mistura de 21 aminoácidos livres, 17 vitaminas e fatores de crescimento. O meio contém aminoácidos para o equivalente em proteína/ peptídeo (em mmol/l) em concentrações baseadas nas da saliva humana: alanina (1,95), arginina (1,30), asparagina (1,73), ácido aspártico (1,52), cisteína (0,05), ácido glutâmico (5,41 mmol/l), glutamina (3,03), glicina (1,95), histidina (1,08), isoleucina (2,38), leucina (3,68), serina (3,46), treonina (1,08), triptofano (0,43), tirosina (2,17), valina (2,38), e caseína (5,0g/l).

2.4.2.9 Coleta e processamento da saliva

Será realizada uma única coleta de 20mL de saliva estimulada por filme de parafina (Parafilm "M"®, American National CanTM, Chicago, IL, EUA) de 1 doador saudável e que suspenderá a higiene oral por 24h e a alimentação por 2h

previamente à coleta de saliva. A saliva será depositada em um coletor graduado estéril, transportada em gelo ao Laboratório de Microbiologia (FO-UFPeI). Então, a saliva será filtrada através de lã de vidro estéril, armazenada em um recipiente estéril e homogeneizada em vortex (FILOCHE; SOMA; SISSONS, 2007). Duas alíquotas da saliva coletada do voluntário serão separadas, uma para quantificação microbiana (dados expressos em UFC/ mL), e a outra será centrifugada (5.000g, a 4°C por 5min); o sobrenadante será eliminado e o precipitado será congelado para futuras análises microbianas. Após a coleta da saliva o doador será instruído e orientado a realizar higiene oral através da associação de escova dental-dentífrico e fio dental (fornecido gratuitamente pelo pesquisador) para anular os possíveis riscos decorrentes da suspensão da higiene oral prévia a coleta. O paciente apresentando atividade de cárie receberá o tratamento necessário baseado em seu exame clínico bucal completo. Todos os tratamentos necessários serão realizados na clínica odontológica da Pós-graduação da Faculdade de Odontologia de Pelotas (UFPEL) e não haverá custo algum para o doador.

2.4.2.10 Crescimento microbiano e formação de biofilme

Após esterilização de cada câmara de fluxo, a saliva preparada será inoculada sobre os discos de esmalte também estéreis, em cada câmara de fluxo, em um volume de 400 µL por espécime. Após 1 hora, o meio DMM previamente preparado será infundido na velocidade de 0.5 mL/min para cada câmara.

Experimento 1- Fluxo contínuo de DMM e pulsos intermitentes de sacarose 10%

Após 1 hora da inoculação da saliva, o DMM será infundido na velocidade de 0.5ml/min para cada câmara. Após 1 hora do início do fluxo de DMM, se iniciará a injeção de sacarose. A cada 2h, a sacarose será injetada no sistema em fluxo de 1.2ml/min, totalizando 5 minutos de aplicação. Quando cessará o fluxo intermitente de sacarose, o DMM retornará em seu fluxo normal. O crescimento microbiano acontecerá por 14 dias.

Experimento 2 (DMM, pulsos intermitentes de sacarose 10% e diferentes concentrações de CLX) e Experimento 3 (DMM, pulsos intermitentes de sacarose 10% e uma concentração de CLX)

De semelhante forma ao experimento 1, ocorrerá a infusão de meio e de sacarose, no entanto, haverá aplicação de 1 ml de Clorexidina juntamente ao fluxo de DMM, 2X ao dia. O crescimento microbiano acontecerá por até 6 dias.

2.4.2.11 Análise dos Perfis Microbianos/ Crescimento da Placa

Para cada período de 3, 6, 10 e 14 dias, as câmaras de fluxo serão abertas e dois discos de esmalte serão removidos dos dispositivos acoplados em seu interior. Os demais discos permanecerão na mesma condição até seu período de coleta.

As células não aderidas ao biofilme serão removidas gentilmente por lavagem com solução salina estéril (2mL) (THURNHEER et al., 2003). Então, os discos serão colocados em tubos contendo 1mL RTF (meio de transporte reduzido), e sonicados (Sonicador Vibra Cell - Sonics and Materials, Danbury,CT, USA) com potência de 40W, amplitude de 5%, usando 6 pulsos de 10s cada (BOWEN; PRUCHNO; BELLONE, 1986) para obtenção do biofilme em suspensão homogênea.

Será realizada diluição seriada das suspensões de biofilme para contagem de microrganismos totais, estreptococos do grupo mutans, lactobacilos (TENUTA et al., 2006), cândida e acidúricos totais. As suspensões serão diluídas em RTF em séries até $1:10^7$ e imediatamente inoculadas em duplicata nos seguintes meios de cultura: Ágar sangue para microrganismos totais; Ágar mitis salivarius com 0,2 unidades de bacitracina/mL (MSB), para quantificação de estreptococos do grupo mutans (GOLD; JORDAN; VAN HOUTE, 1973); Ágar Rogosa SL para lactobacilos; CHROMagar Cândida para quantificação e diferenciação presuntiva de espécimes de cândida; e BHI com pH ajustado a 4,7 para quantificação de microrganismos totais acidúricos. As placas serão incubadas em condição de anaerobiose (80% N₂, 10% CO₂ e 10% H₂), a 37°C por 96h, com exceção das placas de CHROMagar Cândida que permanecerão a 37°C por 48h em estufa bacteriológica. As unidades formadoras de colônia serão contadas e os resultados expressos em UFC/mg de espécime de biofilme (peso úmido) e em porcentagem de estreptococos do grupo mutans, de lactobacilos, cândida e microrganismos acidúricos totais em relação aos microrganismos totais cultiváveis. Após remoção da alíquota da suspensão microbiana inicial (original) para quantificação, o espécime será removido da

suspensão, e esta será centrifugada. O sobrenadante será desprezado e o precipitado será armazenado a -80°C para análises futuras.

2.4.2.12 Análise da perda mineral nos discos de esmalte

Será realizada uma avaliação de microdureza superficial média inicial para obter valores de referência e buscar uma padronização das amostras de esmalte. Após cada fase de crescimento dos biofilmes, nas diferentes condições impostas ao meio, a microdureza de superfície do esmalte dos discos será mensurada novamente, e uma média para cada espécime será calculada. Estas análises serão realizadas de acordo com Cury et al. (2000) e a perda (em relação à microdureza inicial) da microdureza da superfície será calculada percentualmente (%PDS). Após a avaliação das superfícies, os discos serão seccionados no centro, longitudinalmente, para determinar a microdureza de secção transversal (MST) (CURY; REBELLO; DEL BEL CURY, 1997). Esta determinação será realizada de acordo com Cury et al. (2000), mas as indentações serão realizadas em 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180 e 200 μm da superfície externa do esmalte. Os valores de MST serão utilizados para o cálculo da área integrada de desmineralização (ΔS) para cada tratamento (SOUZA et al., 2009). As análises serão realizadas com um microdurômetro Future-Tech FM acoplado a um endentador Knoop. As indentações serão realizadas com cargas de 50- ou 25-grama por 5s, para %PDS e MST, respectivamente.

2.4.2.13 Tratamento estatístico

De posse dos resultados experimentais deste projeto, o método estatístico será escolhido com base na aderência ao modelo de distribuição normal e igualdade de variância. Para todos os testes será considerado o valor $p < 0,05$ como estatisticamente significativo.

2.5 Orçamento

O orçamento do projeto de pesquisa está descrito na tabela abaixo:

Tabela 2- Orçamento do projeto.

MATERIAIS ODONTOLÓGICOS DE CONSUMO	QUANTIDADE	VALOR UNITÁRIO	VALOR TOTAL (R\$)
Touca franzida c/ 100 (Fava)	2	8,10	16,20
Máscara c/ 50 (Best Fabril)	3	6,50	19,50
Luvas de procedimento c/ 100 (Supermax)	5	13,50	67,50
Cera utilidade (Epoxiglass)	1	9,00	9,00
Rolo papel grau cirúrgico 10cmX100m (Medstéril Investmar)	1	62,80	62,80
MATERIAL DE PAPELARIA			
Caixa de papel 500 fls. 95g/ m ² / tam. A4 para impressão em jato de tinta	1	15,00	15,00
Cartucho de tinta para impressora Deskjet 820	2	30,00	60,00
MATERIAIS DE CONSUMO LABORATORIAL			
Placa de petri descartável 90 x 15mm c/ 10, J. Prolab	100	1,99	199,00
Anaerobac c/ 10, Probac	10	105,60	1.056,00
Pipetas graduadas descartáveis	10	26,94	269,40
Ponteira cor amarela 20 a 200µl pct. c/ 1000, Axygen T200Y	10	26,94	269,40
Ponteira cor natural 20 a 300µl pct. c/ 1000, Axygen T350-C	10	29,05	290,50
Ponteira cor azul 100 a 1000µl pct. c/ 1000, Axygen T1000-B	10	29,05	290,50
Rack c/ 96 ponteiros 0,5 a 10µl, Axygen	1	6,26	6,26
Rack c/ 96 ponteiros 20 a 200µl, Axygen	1	6,26	6,26
Rack c/ 96 ponteiros 20 a 300µl, Axygen	1	7,08	7,08
Rack c/ 96 ponteiros 100 a 1000µl, Axygen	1	7,08	7,08
Filtro Millex GV 0,22µm 25mm c/ 25	4	221,10	884,4
Equipo para soro, estéril	50	1,18	59,30
REAGENTES E MEIOS DE CULTURA			

Agar Mitis Salivarius c/ 500g, Acumedia	3	204,50	613,50
Agar tryptic soy c/ 500g, Acumedia	1	112,58	112,58
Agar base sangue columbia c/ 500g, Acumedia	1	139,10	139,10
Rogosa SL Agar c/ 500g, Difco cód. 0480-17	1	1228,80	1228,80
Caldo cérebro e coração (BHI) c/ 500g, Acumedia	1	100,93	100,93
Agar cérebro e coração c/ 500g, Acumedia	1	155,05	155,05
Chromagar cândida c/ 500g, Difco	1	887,90	887,90
Agar sabouraud dextrose 4% c/ 500g, Acumedia	1	69,50	69,50
Caldo tryptic soy c/ 500g, Acumedia	1	91,95	91,95
Reagentes para confecção de DMM – saliva artificial	-	-	4.610,00
MATERIAL PERMANENTE			
10% Dióxido de Carbono, 10% Hidrogênio, em balanço Nitrogênio. Cilindro B-50 de aço, sob pressão de 150 Bar, com volume de 7,6 m³.	1	1.185,60	1.185,60
Cabeçote R 4 com 4 canais, para fluxos entre 0,05 e 30 ml/min, por canal, operação contra pressões de até 72 psi. 10 roletes para fluxo livre de pulsos.	2	3.327,00	6.654,00
Câmaras de fluxo	4	40,00	160,00
OUTRAS DESPESAS (CUSTEIO E DIVULGAÇÃO)			
Congressos (SBPQO, ORCA)	-	-	3.500,00
Passagens	-	-	3.000,00
TOTAL DE CUSTOS - CONSUMO	-	-	11335,09
TOTAL DE CUSTOS – PERMANENTE	-	-	8499,60
TOTAL – OUTROS	-	-	6500,00
TOTAL	-	-	25.834,69

2.6 Cronograma

O cronograma previsto para a execução desse projeto está descrito no quadro abaixo (Figura 7).

ATIVIDADES	PERÍODO																							
	2013											2014											2015	
	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	J	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	J	F
Pesquisa bibliográfica	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X								
Submissão ao CEP								X																
Qualificação					X																			
Aquisição dos materiais						X	X	X	X							X	X	X	X					
Preparo dos dentes						X	X	X						X	X									
Experimento 1																			X	X				
Análise do biofilme							X													X				
Experimento 2							X													X				
Análise do biofilme							X													X				
Experimento 3							X	X													X	X		
Análise do biofilme								X														X		
Avaliação dos espécimes								X	X	X	X	X									X	X		
Descrição dos resultados								X	X	X	X	X									X	X		
Análise estatística												X	X									X	X	
Redação dos artigos													X	X	X	X	X						X	
Redação da dissertação																		X	X				X	
Defesa da dissertação																								X

Figura 7 - Quadro referente ao cronograma do projeto de pesquisa

3 Relatório do Trabalho de Campo

Neste capítulo estão relatadas as complementações e as mudanças metodológicas realizadas no decorrer do desenvolvimento da pesquisa. Os demais aspectos metodológicos podem ser consultados no projeto original (capítulo anterior). O relatório também apresenta dados que não foram utilizados na elaboração do artigo, mas que fizeram parte da utilização preliminar do modelo e auxiliarão o seu entendimento.

3.1 Revisão sistemática

3.1.1 Estratégia de busca e critérios de inclusão

A estratégia de busca foi realizada para o Pubmed e adaptada para as bases Isi Web of Science e Scopus. Ao invés de termos livres como demonstrado no projeto, optou-se por executar uma estratégia de busca mais robusta utilizando além termos livres, termos dispostos nessa base de dados como “*Mesh*” e “*entry terms*”. A estratégia de busca está disposta no Artigo 1 (Tabela 1 do Apêndice), e foi realizada filtrando por idioma inglês e pelo período de 1990 a janeiro de 2015. A seleção pela data foi executada pelo fato de já existirem revisões sobre o assunto que relatavam artigos anteriores aos anos 90. Assim, além da busca nas bases de dados selecionadas, realizou-se a busca manual das referências dessas revisões narrativas (SISSONS, 1997; TANG, 2003; MCBAIN, 2009), dos artigos selecionados para análise qualitativa e de revistas científicas sobre o tema.

De diferente forma ao projeto inicial, os artigos foram selecionados segundo critérios divididos em duas partes. Para parte I, os estudos deveriam: i) usar um modelo de biofilme *in vitro*, ii) modelo reportado deveria permitir o desenvolvimento de biofilme cariogênico ou cárie dentária artificial e iii) modelo reportado deveria permitir flutuação de pH. Para parte II, estudos deveriam ter os critérios i, ii, iii e ter testado o efeito de substâncias antimicrobianas ou anticariogênicas. Essa modificação foi necessária, pois muitos modelos não possuíam esse efeito resposta, mas tornavam-se necessários para descrição de alguns parâmetros metodológicos

do modelos. Assim, para parte I, foram extraídos dados metodológicos do modelo de biofilme reportado, tais como: fonte do inóculo; substrato para o crescimento do biofilme; duração do experimento; meio de cultura utilizado e taxa de seu fluxo; fonte de carboidrato; e frequência de exposição. E na para Parte II, os dados coletados foram relacionados à métodos de avaliação; substâncias antimicrobianas ou anticariogênicas usadas, dose-resposta e reprodutibilidade do modelo e a significância dos efeitos dentro das variáveis de resposta.

3.1.2 Resultados da busca e avaliação do risco de viés

A busca dos artigos resultou em um novo diagrama de fluxo, descrito na Figura 1, do Artigo 1.

Os artigos selecionados para a Parte II foram analisados em relação ao risco de viés através de adaptações nos critérios utilizados por SARKIS- ONOFRE (2014). Optou-se pela escolha dos artigos da parte II, uma vez que nela estaria incluso os modelos de desenvolvimento de cárie e biofilme cariogênico que já foram usados para avaliar produtos anticariogênicos ou antimicrobianos, sendo portanto, mais fidedignos à resposta intra-oral. Tendo como base a premissa de que os modelos de biofilmes confiáveis seriam aqueles com validação dose-resposta à alguma substância anticariogênica ou antimicrobiana e possuisse reprodutibilidade, a avaliação de risco desses artigos tornaria a evidência de escolha para um melhor e mais confiável modelo.

3.2 Estabelecimento de um modelo de biofilme de microcosmos em fluxo contínuo

O projeto inicial de desenvolvimento do modelo de biofilme de fluxo contínuo foi estruturalmente modificado. Ao invés de um modelo de câmara de fluxo, composto por quatro câmaras individuais de pequeno tamanho, optou-se por desenvolver um dispositivo que pudesse permitir uma maior quantidade de amostras por experimento, e que da mesma forma que anteriormente planejado, representasse os aspectos da cavidade bucal como fluxo contínuo, presença de dieta intermitente, temperatura e atmosfera adequada. Além disso, foi adicionada a característica de possibilidade de desenvolvimento de 10 conjuntos de biofilmes

independentes, o que é desejável para garantir a independência entre unidades amostrais. Assim, desenvolveu-se o dispositivo denominado “Simulador multifuncional de Cavidade Oral” (MOCS).

3.2.1 Configuração e características do Simulador

O simulador é constituído por um sistema de câmara fechada acoplada a uma estufa de aquecimento ($37\pm 2^{\circ}\text{C}$) (Figura 8A). No interior dessa câmara, encontram-se 10 unidades individuais e independentes para acomodação de amostras experimentais (Figura 9C). Cada unidade apresenta um dispositivo removível o qual permite a inserção de até cinco amostras e apresentam recessões que direcionam o fluxo sobre as amostras (Figura 10). A câmara e seus componentes são constituídos de aço inox. (Representação tridimensional Apêndice B). O sistema ainda possui janelas de observação em vidro temperado localizadas na porção superior e frontal da câmara (Figura 9 A,B). Essas janelas servem para visualização dos processos no interior da câmara e de forma concomitante para posicionamento e retirada das amostras quando necessário.

O dispositivo permite simular o ambiente controlado de oxigênio através de tubulação com suplementação de gás de anaerobiose ($10\% \text{CO}_2$, $10\% \text{H}_2$ e $80\% \text{N}_2$) (Figura 8B e 11B).

Sobre cada unidade de acomodação de amostras, localizam-se três *inlets* para passagem de saliva artificial, solução de sacarose e do inóculo bacteriano. Tubulações de silicone partem de reservatórios específicos (solução de sacarose e saliva artificial), passam pelo sistema de infusão composto por duas bombas peristálticas de 10 canais (FC 100, ChaoChuing, China- Figura 8D) e chegam aos respectivos inlets (Figura 10A). Um computador foi acoplado as bombas peristálticas e um software desenvolvido para o sistema (Daxta, Pelotas, RS) foi usado para o controle dos fluxos diários de saliva e sacarose. Os fluxos provenientes dos reservatórios percorrem as unidades de acomodação e são direcionados a um reservatório de resíduos localizado na parte inferior do sistema (Figura 9D).

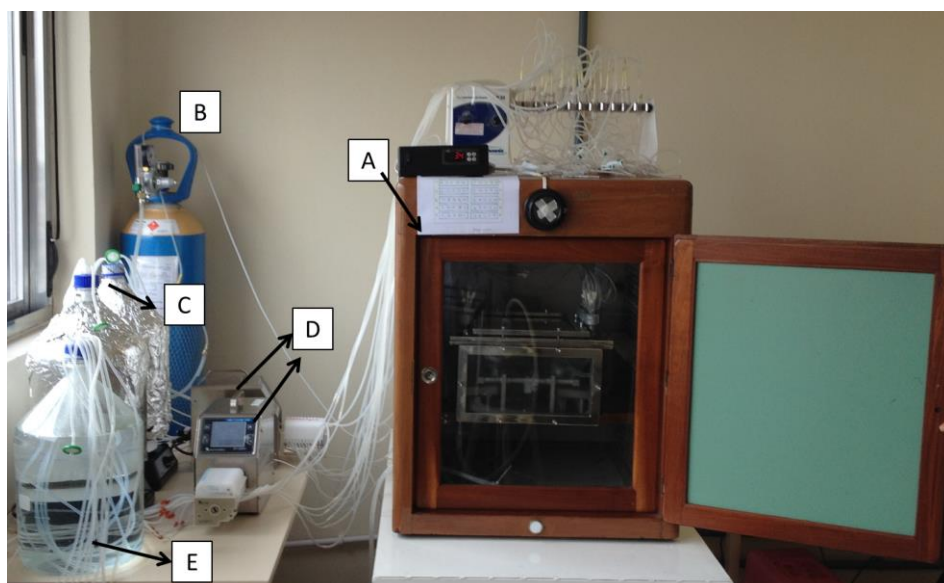


Figura 8 - Simulador multifuncional de cavidade oral (MOCS). A) Estufa de aquecimento com a câmara em seu interior; B) Gás de anaerobiose C) Reservatórios de meio de cultura; D) Bombas peristálticas E) Reservatório de sacarose



Figura 9 – Câmara fechada acoplada a estufa de aquecimento. A e B) Janelas em vidro temperado (aberturas); C) Inclinação das unidades individuais; D) Mangueira de silicone para eliminação de resíduos.

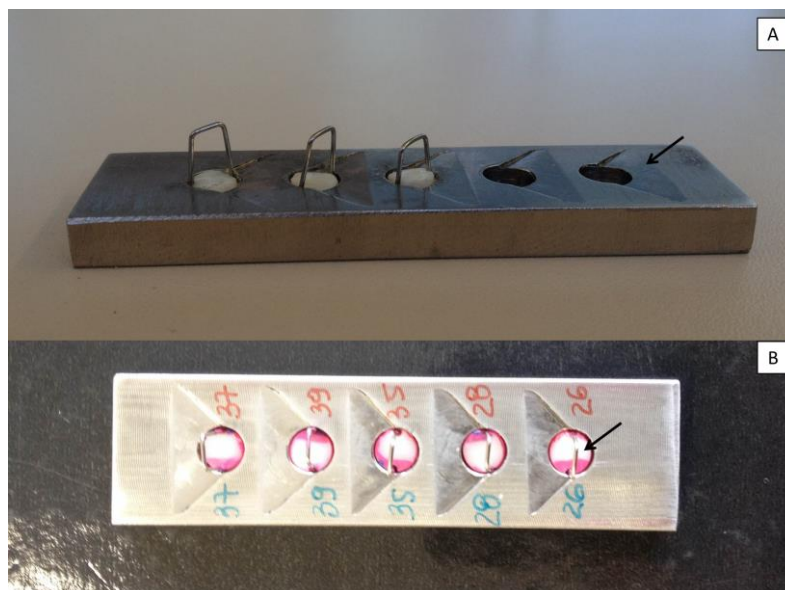


Figura 10 - Dispositivos para acomodação das amostras. A) Dispositivo removível vista lateral: Acomodações para inserção de amostras e presença de recessões que direcionam o fluxo sobre as amostras. B) Vista superior com as amostras em posição.

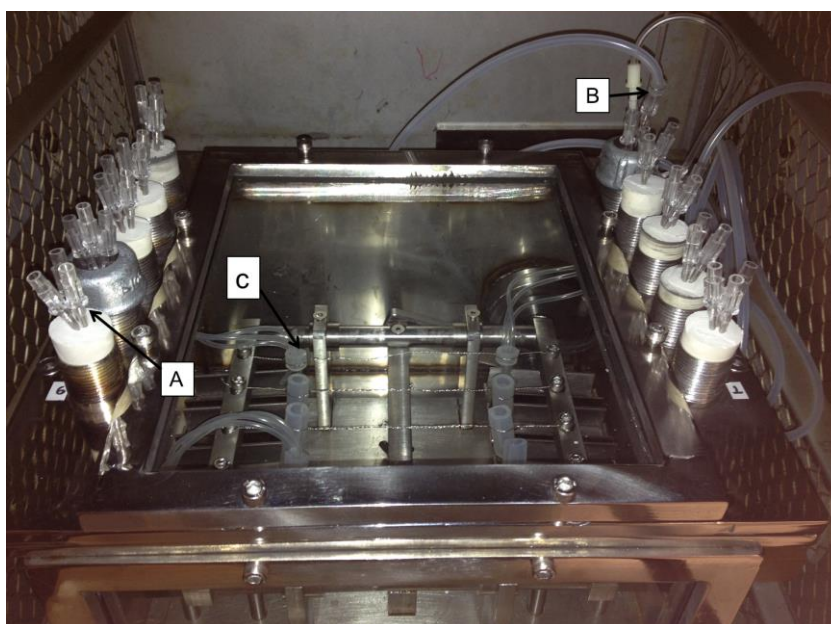


Figura 11 - Câmara e seus inlets. A) Inlets independentes para fluxos; B) Entrada para o gás de anaerobiose C) Adaptações para direcionamento dos fluxos sobre as unidades individuais contendo as amostras.

3.2.2 Delineamento experimental para o modelo de biofilme complexo (MOCS)

A modificação na configuração do modelo inicialmente planejado desencadeou mudanças no delineamento dos experimentos. Não houve a necessidade de realização de várias rodadas de experimentos com os mesmos parâmetros para adequação da quantidade amostral, tendo em vista que o simulador permite a inserção de até 50 amostras simultâneas (5 amostras para cada uma das dez unidades acopladoras) e que o dispositivo permite a mesma condição para todas amostras em cada unidade acopladora independente conforme a figura abaixo.

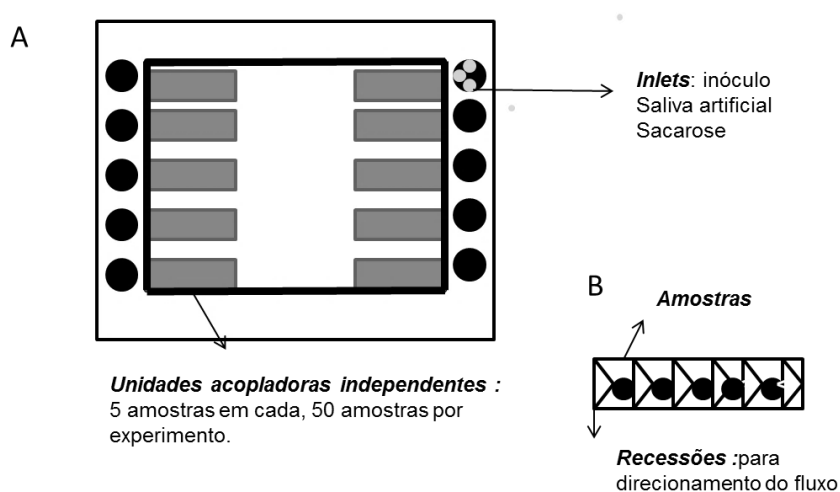


Figura 12 - Desenho esquemático do Simulador multifuncional de cavidade oral (MOCS).

Assim, realizou-se um estudo *in vitro*, completamente aleatorizado, no qual foram formados biofilmes em câmara de fluxo contínuo sobre discos de esmalte, tendo como inóculo saliva (microcosmos) de um voluntário adulto e saudável. Foram realizados 3 experimentos independentes, em que os biofilmes foram crescidos independentemente por até 21 dias. O primeiro e o segundo experimento relacionaram-se ao desenvolvimento do modelo (adequação do protocolos experimentais 1 e 2) e o terceiro para validação dose-resposta à clorexidina (CLX) e para testar a reprodutibilidade do modelo, cujos delineamentos estão descritos a seguir e na figura 13.

Os biofilmes foram originados a partir de saliva humana e crescidos independentemente sobre amostras de esmalte bovinos sob dois protocolos experimentais (PE) independentes por até 14 (PE1) e 21 dias (PE2). Para PE1

utilizou-se regime intermitente de 10% sacarose (1,2 ml/min, 5 min, 5x/dia) em associação a fluxo contínuo de saliva artificial (DMM, 0,04 ml/min). Para o PE2 utilizou-se DMM em fluxo contínuo (0,06 ml/min) e 5% sacarose (0,25ml/min, 6 min, 3X/dia). Nos tempos experimentais de 4, 7, 14 ou 21 dias, amostras microbiológicas e minerais foram coletadas (n=10) e as variáveis de resposta foram avaliadas através de porcentagem de perda de dureza superficial (%PDS), perda mineral integrada (ΔS), profundidade de lesão e contagem de unidades formadoras de colônia microbianas (UFC/mg peso úmido do biofilme).

Para o experimento 3 (Validação e reprodutibilidade), utilizou-se o PE2 e os biofilmes foram crescidos por 7 dias em associação a aplicação de 5ml de Clorexidina em diferentes concentrações: 0,12%; 0,06%; 0,03% e 0,012% (n=10 por concentração) e mesma quantidade de solução salina como controle (2x/dia a cada 12h, a partir de 24h do inóculo). Para esse experimento as variáveis de resposta foram obtidas por %PDS e por composição microbiológica do biofilme.

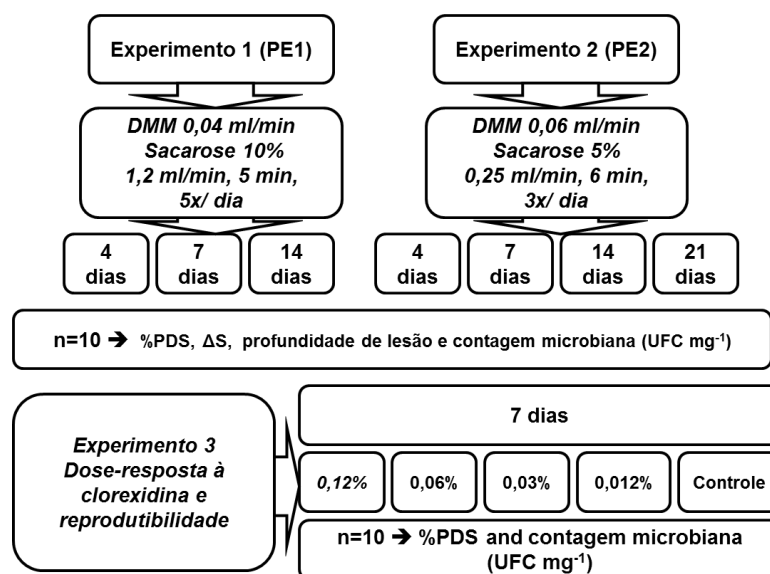


Figura 13 - Delineamento experimental para MOCS. Experimento 1, 2 com seus respectivos protocolos e tempos experimentais. Representação do Experimento 3, tempo experimental, doses de clorexidina para resposta mineral e antimicrobiana.

3.2.3 Confeções dos espécimes

As amostras tiveram uma configuração diferente da planajeda. Após a planificação da superfície e avaliação da microdureza inicial das amostras de esmalte, em cada disco de esmalte foram confeccionadas canaletas utilizando ponta diamantada (#4138) sob refrigeração para o corte. As canaletas foram feitas nas

laterais e na base de dentina do disco com aproximadamente 1mm de profundidade. Sobre as canaletas foi posicionado um dispositivo metálico pré-moldado em fio ortodôntico e as laterais e a base (dentina) do disco foram isoladas com esmalte para unhas, deixando apenas a superfície do esmalte exposta (Figura 14). Isso permitiu a facilidade de coleta das amostras no interior da câmara.

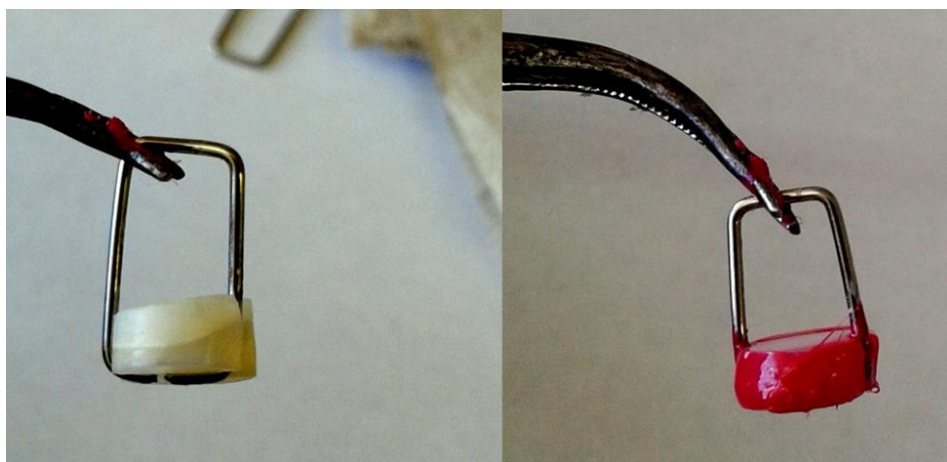


Figura 14 - Amostras de esmalte bovino com a presença de canaletas laterais e dispositivo metálico. Lado direito representa as amostras já recobertas por esmalte de unhas (base e lateral) com exceção da superfície.

3.2.4 Esterilização das amostras

Diferente da esterilização proposta, as amostras de esmalte foram codificadas e inseridas nos dispositivos removíveis para então serem posicionados no interior das unidades acopladoras. As amostras foram esterilizadas ao mesmo tempo que o sistema foi esterilizado. Para tanto, todo o sistema da câmara foi protegido com barreiras para contaminação-papel alumínio duplo (Figura 15), parcialmente vedado na porção da janela superior e autoclavado a 121°C, por 15 minutos. Logo após o processo de esterilização, o sistema foi vedado através dos parafusos localizados na janela de vidro.

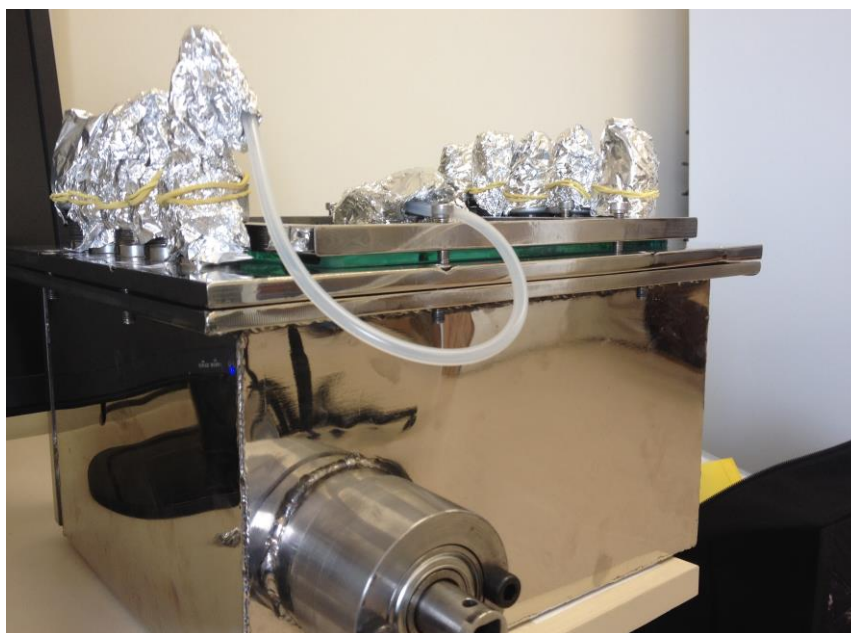


Figura 15 - MOCS com barreiras para não contaminação após esterilização.

3.2.5 Coleta da saliva, inóculo e formação de biofilme

Após aprovação do Comitê de Ética em pesquisa (Anexo A), foi realizada a coleta de 20 ml de saliva estimulada por filme de parafina (Parafilm .M"®, American National CanTM, Chicago, IL, EUA) de um doador saudável (50 anos) que suspendeu a higiene oral por 24h e a alimentação por 2h previas à coleta de saliva. O termo de consentimento livre e esclarecido foi lido e assinado pelo doador (Apêndice A). A saliva foi depositada em um tubo de 50 mL estéril e homogeneizada em vortex. Doze mL de saliva foram adicionadas em 240 mL de DMM previamente preparado, em proporção semelhante ao proposto por CENCI (2009). O restante da saliva foi submetido a quantificação microbiológica (dados expressos em UFC/mL-baseline).

A mistura de saliva e DMM foi agitada e 21 mL dessa solução foram adicionados através de cada *inlet* específico localizado sobre as unidades acopladoras (Figura 16).

O inóculo permaneceu sobre os discos de esmalte por 1 hora, para formação de película adquirida e após esse período, DMM foi perfundido em velocidade média de 0,04 ou 0,06 mL/min conforme protocolo e experimento. O desafio cariogênico foi simulado por fluxo intermitente de 5 ou 6 min de sacarose (5 ou 10%), por 5 ou 3x ao dia em velocidade de fluxo de 1,2 ou 0,25 mL/min. Os biofilmes foram formados independentemente sobre os discos de esmalte bovino,

em condições de anaerobiose dadas através fluxo médio de gás de 250 mL/min aplicados durante 30 minutos, 3x ao dia (SISSONS, 1991).

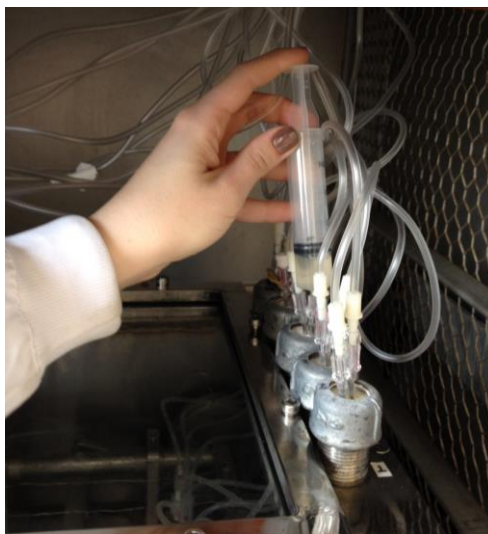


Figura 16 - Processo de inoculação individual. O *inlet* destinado para inóculo não possui tubulações externas, somente internas. O *inlet* é aberto e ocorre a inserção da seringa com o inóculo sob chama próxima.

3.2.6 Coleta do biofilme

Para ambos experimentos a janela superior da câmara foi assepticamente aberta (Figura 17) e os espécimes foram coletados. Para os PE1 e PE2 a câmara foi aberta nos dias 4, 7, 14 ou 21 dias. Os discos de esmaltes foram removidos com pinça estéril, sem perturbar o biofilme formado na superfície do disco e colocados em superfícies individuais estéreis. A coleta do biofilme foi realizada através de microbrush estéril e o biofilme recolhido de cada amostra foi colocado em microtubos estéreis pré-pesados.

O peso úmido de cada amostra foi determinado através de nova pesagem em balança de precisão. Em seguida foram adicionados 1ml de solução salina estéril (NaCl 0,9%) em cada microtubo e esses foram sonificados (Sonicador de Ponteira/Desruptor de Células Ultrassônico DES500, Unique, Brasil) com potência de 20W, amplitude de 5%, usando 3 pulsos de 10 segundos cada para obtenção do biofilme em suspensão homogênea. Essa suspensão microbiana possuía em torno de 5 a 10 mg de biofilme úmido. Tal conduta foi usada para possibilitar análises futuras relacionadas a quantificação de polissacarídeos intra e extracelulares, bem como, a produção de ácido láctico (CAHUANA-VASQUEZ et al., 2010).

As suspensões foram diluídas em solução salina em séries de até $1:10^7$ e imediatamente inoculadas em duplicata nos seguintes meios de cultura: Ágar sangue para microrganismos totais; Ágar mitis salivarius com 0,2 unidades de bacitracina/mL (MSB), para quantificação de estreptococos do grupo mutans; Ágar Rogosa SL para lactobacilos e BHI com pH ajustado a 4,8 para quantificação de microrganismos acidúricos totais. As placas foram incubadas em condição de anaerobiose (80% N₂, 10% CO₂ e 10% H₂), a 37°C por 96h. As contagens foram feitas por unidades formadoras de colônia e os resultados expressos em UFC/mg de espécime de biofilme (peso úmido).

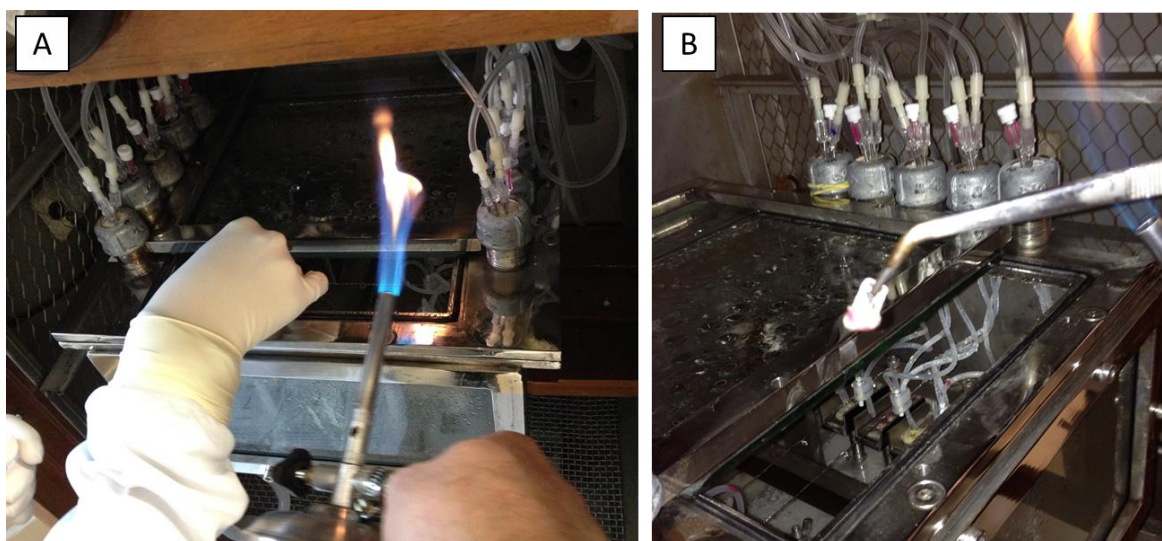


Figura 17 - Coleta das amostras. A) Remoção aséptica dos espécimes. Abertura da câmara através da janela superior. B) Remoção da amostra através de pinça estéril.

3.2.6 Comentários e resultados: Experimento 1- (PE1)

Inicialmente este experimento foi delineado para ser o protocolo padrão de utilização do modelo de biofilme no simulador e pretender-se-ia avaliar a resposta microbiológica e mineral nos tempos experimentais de 4, 7, 14 e 21 dias.

Ele foi baseado em literatura prévia, utilizando-se os parâmetros de fluxo de meio DMM de Sissons et al. (1991), que utilizava-se de fluxo contínuo a uma velocidade 0,04 mL/min. O fluxo de sacarose (dieta cariogênica) foi baseada nos estudos de Zaura (2011), onde se utilizou solução de sacarose 10% em cinco aplicações diárias na velocidade de 1,2 mL/min durante 5 minutos de 2 em 2 horas.

Diferente do projeto original optou-se pelo menor fluxo de DMM em decorrência do volume diário necessário a manutenção dos biofilmes nesse novo modelo. Para a configuração atual do modelo, seriam necessários aproximadamente oito litros de meio cultura ao dia (0.5 mL/min) e isto tornou-se inviável às atividades diárias do laboratório de microbiologia. Para tanto, optou-se a utilização a semelhança do modelo proposto por Sissons et al. (1991).

Diferente do esperado, o protocolo proposto apresentou uma acentuada porcentagem perda mineral superficial. Foram encontrados perdas minerais maiores de 80% para os primeiros 4 dias de experimento (Tabela 3). As análises minerais foram feitas sempre um dia após a coleta das amostras e isso permitiu o acompanhamento da perda mineral em cada tempo experimental. Assim optou-se por encerrar o experimento 1 com apenas 14 dias de andamento, uma vez que algumas amostras (n=2) desse tempo experimental começaram a apresentar perda da estrutura superficial do esmalte. Todas as amostras eram analisadas em lupa microscópica (500X) para análise de superfície antes da nova mensuração em microdurômetro. Aquelas que apresentassem comprometimento da superfície não seriam incluídas para análise mineral.

O crescimento microbiano decorrente desse protocolo experimental, está demonstrado na figura 18. A microbiota comportou-se de forma esperada pela teoria ecológica da placa, onde sempre que se exerce pressões ecológicas, por exemplo a presença de dieta rica em sacarose, há a seleção e a presença de maior quantidade de micro-organismos acidúricos e lactobacilos. Aos 14 dias, esses microorganismos mantiveram-se constantes em comparação aos 7 dias. Os dados minerais estão de acordo com os microbiológicos, mantendo-se também constantes após a primeira semana de experimento, sem progressão da perda mineral.

A partir desses dados optou-se por realizar um novo experimento, utilizando diferentes parâmetros de fluxo de meio de cultura, e de exposição à sacarose. O objetivo dessa modificação foi proporcionar uma perda mineral menos acentuada e que permitisse experimentos mais longos, de forma semelhante ao que ocorre na cavidade oral.

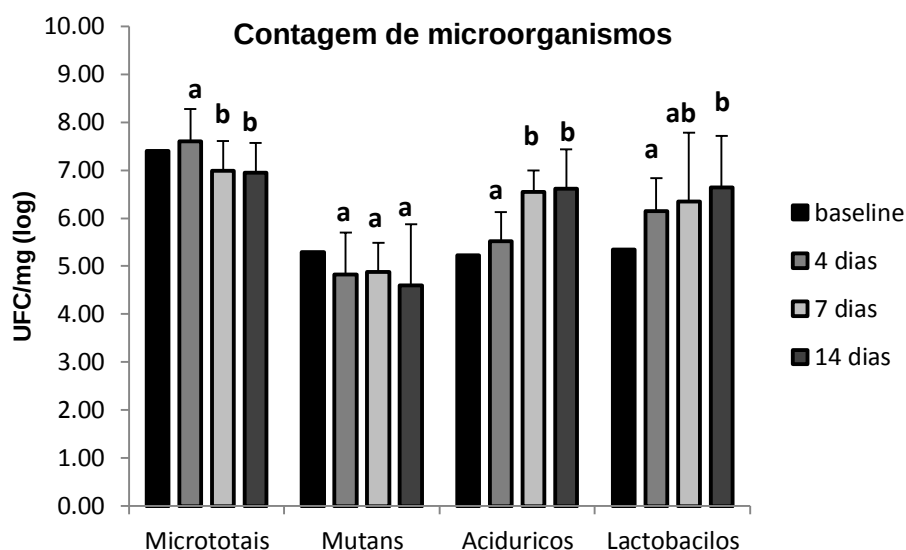


Figura 18 - Média e desvio padrão ($\log_{10}$) das contagens de UFC/mg biofilme para cada tempo experimental do experimento 1 (PE1). Dados do baseline são provenientes da saliva da doadora no mesmo tempo da inoculação. Letras diferentes para cada tempo experimental representam diferença estatística significativa. Anova, Teste de Tukey ($p < 0.05$)

Tabela 3 - Media e desvio padrão dos valores de perda mineral integrada, profundidade de lesão e porcentagem de perda dureza superficial para o Experimento 1 (n=10).

	Perda mineral integrada (Δs)	Profundidade de Lesão (μm)	%PDS
4 dias	7517,4 (1253,9)a	100,0 (31.6)	80,9 (17.3)a
7 dias	14184,4 (5273,6)b	150,0 (31.6)	91,0 (8.5) ab
14 dias	14232,4(6781,8)b	155,0 (35.0)	94,8 (5.4)b

Nota. Letras diferentes representam diferença estatística significativa. Anova, Teste de Tukey ($p < 0.05$).

3.2.7 Comentários e resultados: Experimento 2- (PE2)

De forma a não desencadear um perda mineral acentuada como ocorrido no PE1, padrões da concentração, aplicação diária e quantidade perfundida de sacarose foram diminuídas. Aliado a isso, optou-se por aumentar levemente o fluxo de saliva artificial para que houvesse uma melhor limpeza dos ácidos produzidos pelo metabolismo microbiano sobre o substratos dentais pela ação da saliva. Assim, ele foi delineado com os seguintes parâmetros e tempos experimentais: Os biofilmes foram crescidos por até 21 dias, sendo os tempos experimentais semelhantes ao experimento 1 (4, 7, 14 e 21 dias). Utilizou-se como parâmetros de fluxo: 0,06

mL/min para o DMM, e 0,25 mL/min de sacarose 5% aplicada por 6 minutos, 3x por dia a cada 8 horas (MEI et al., 2013; SISSONS et al., 2001).

Os valores de perda mineral para esse protocolo apresentaram-se mais brandos que o anterior (Tabela 4). A %PDS em 4 dias foi ao redor de 39%, e a maior perda em torno de 51%. Apesar de haver menor perda mineral comparada ao PE1, ela está de acordo com estudos *in situ*, que tentam mimetizar lesões artificiais de cárie com protocolos semelhantes de aplicação de sacarose ou até maiores do que o utilizado nesse modelo (PECHARKI et al., 2000; PAES LEME et al., 2004).

Tabela 4 - Média e desvio padrão dos valores de perda mineral integrada, profundidade de lesão e porcentagem de perda dureza superficial (%PDS) para o experimento 2 (n=10)

	Perda mineral integrada (Δ s)	Profundidade de Lesão (μ m)	%PDS
4 dias	3349,3 (1358,0) ^a	45,0 (5,0)	38,5 (3,60) ^a
7 dias	5789,1 (1275,3) ^b	93,8 (16,5)	46,8 (7,80) ^b
14 dias	5721,4 (898,84) ^b	100,0 (28,9)	52,0 (9,96) ^b
21 dias	5548,6 (1180,0) ^b	107,1 (18,9)	51,7 (6,36) ^b

Nota. Letras diferentes representam diferença estatística significativa. Anova, Teste de Tukey ($p < 0.05$).

O crescimento microbiano desse experimento está representado na figura 19. Assim como no PE1, a microbiota comportou-se de forma esperada à teoria ecológica da placa. Aos 14 dias, esses microorganismos mantiveram-se constantes em comparação aos 7 dias, no entanto, nos 21 dias houve uma diminuição na contagem dos lactobacilos, acidúricos e mutans em relação a segunda e terceira semanas de experimento. Os dados minerais estão de acordo aos dados microbiológicos, mantendo-se também constantes após a primeira semana de experimento, sem progressão da perda mineral.

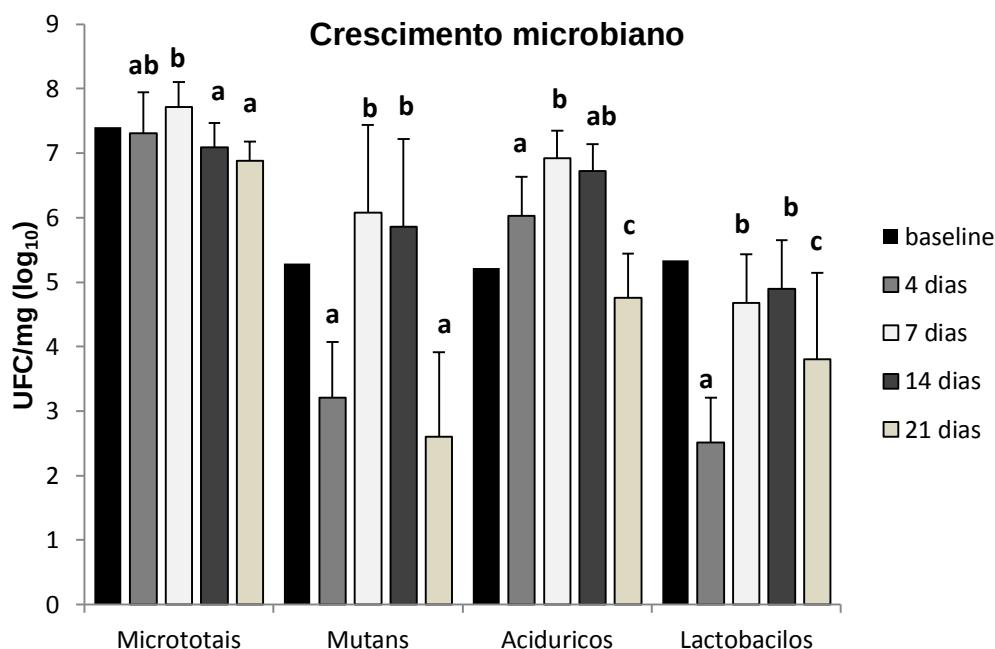


Figura 19 - Média e desvio padrão ($\log_{10}$) das contagens de UFC/mg biofilme para cada tempo experimental do experimento 2 (PE2). Dados do baseline são provenientes da saliva da doadora no mesmo tempo da inoculação. Letras diferentes para cada tempo experimental representam diferença estatística significativa. Anova, Teste de Tukey ($p < 0.05$)

A partir do exposto, selecionou-se o PE2, como protocolo padrão a execução dos outros experimentos de validação dose-resposta e reprodutibilidade. Isso ocorreu pela presença de perda mineral mais branda comparada ao PE1 e pelo fato de aparentemente, o crescimento microbiano entre os dois protocolos terem o mesmo comportamento. Como entre os tempos experimentais não houve diferença em relação a %PDS, ΔS e profundidade de lesão para os dias 7, 14 e 21, optou-se, portanto, pela escolha do tempo experimental mais curto.

3.2.7 Comentários e resultados: Experimento 3- Validação dose-resposta à Clorexidina e reprodutibilidade do modelo.

Para o experimento 3, foi utilizado os parâmetros metodológicos do PE2. A fim de validar o modelo proposto através da dose-resposta à Clorexidina (CLX) utilizou-se quatro concentrações diferenciadas e crescentes: 0,012%, 0,03%, 0,06%, e 0,12%. Como controle utilizou-se solução salina aplicada sob mesmo protocolo que as soluções de CLX.

Como a câmara possui 10 unidades acopladoras, 2 delas foram usadas para cada concentração de CLX. As duas unidades restantes foram usadas como controle e para posterior análise de reprodutibilidade com o experimento 2. Assim, as unidades acopladoras individuais e seus respectivos *inlets* foram aleatoriamente designados para as concentrações de CLX e controle (Figura 20).

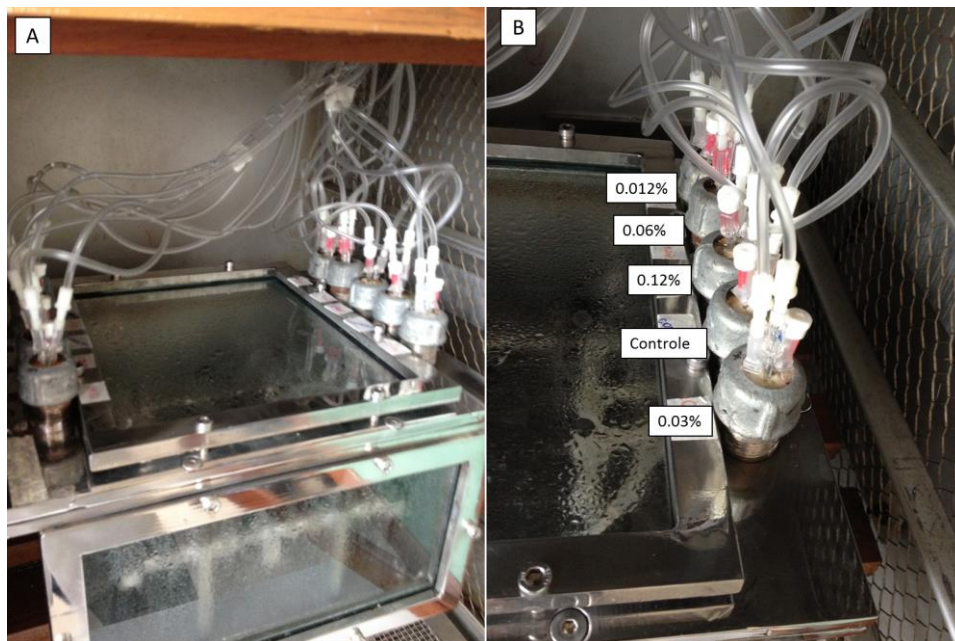


Figura 20 – MOCS. A) Distribuição dos tratamentos (concentrações de CLX). B) Foto em aumento mostrando a distribuição dos tratamentos por unidade acopladora.

Os tratamentos foram aplicados após 24h do crescimento bacteriano. Então a partir do segundo dia de crescimento as concentrações de CLX foram aplicadas duas vezes por dia, com intervalos de 12h entre cada aplicação. Uma aplicação era feita às 7h da manhã e a outra às 19h. Para tal procedimento os fluxos não eram parados. A coleta das amostras microbiológicas e dos discos de esmalte ocorreu no 7º dia de experimento e após 6 h de aplicação das soluções de CLX ou controle.

Os resultados microbiológicos em relação a dose resposta estão expressos na tabela 5 e os dados minerais demonstrados na figura 21. A correlação dos dados de perda mineral com a resposta microbiológica de mutans e micro-organismos totais está demonstrada na tabela 6. Os dados relacionados aos lactobacilos e acidúricos não foram correlacionados uma vez que ocorreu um erro metodológico relacionado ao armazenamento das amostras o qual impediu o correto crescimento

desses micro-organismos. Assim, optou-se por correlacionar somente os dados dos mutans e micro-organismos totais.

Tabela 5 - Média (desvio padrão) das contagem microbianas (UFC/mg) em relação a concentração da solução de CLX e controle para o Experimento 3 (n=10)

	Controle	CHX 0,012%	CHX 0,03%	CHX 0,06%	CHX 0,12%
Mutans	6,37 (0,51)	5,10 (0,66)	4,92 (1,13)	4,51(1,78)	3,94(0,75)
Micro-organismos totais	7,40 (0,46)	6,15 (0,56)	7,11 (0,36)	6,23(1,32)	5,52(0,78)
Lactobacilos	3,53(1,83)	2,63(0,75)	3,04(0,88)	2,25(0,78)	2,89(0,37)
Acidúricos	5,28(1,30)	4,67(1,28)	5,51(1,27)	5,11(1,13)	4,04(0,59)

Tabela 6 - Média (desvio padrão) e Correlação de Pearson entre os valores %PDS e micro-organismos totais e mutans para o experimento 3.

	Controle	CHX 0.012%	CHX 0.03%	CHX 0.06%	CHX 0.12%	r; valor de p
Mutans	6,37 (0,51)	5,10 (0,66)	4,92 (1,13)	4,51(1,78)	3,94 (0,75)	0.55; 0.01*
Micro- organismos totais	7,40 (0,46)	6,15 (0,56)	7,11 (0,36)	6,23 (1,32)	5,52 (0,78)	0.50; 0.003**
%PDS	47,76(6,06)	40,57(5,35)	25,77(2,78)	12,44(4,30)	11,33(5,80)	-

Nota: * Correlação entre %PDS e Mutans. ** Correlação entre Micro-organismos totais e %PDS.

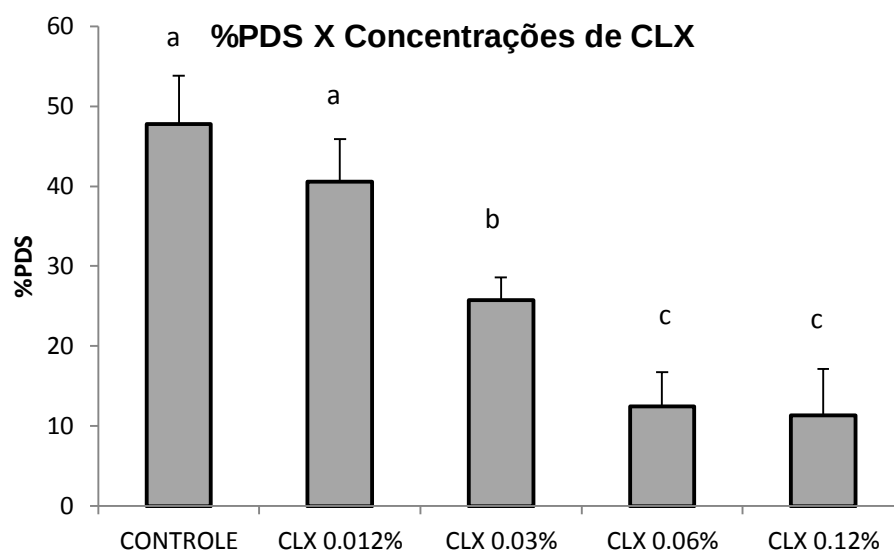


Figura 21 - Médias e desvio padrão da porcentagem de perda de dureza superficial (%PDS) em relação aos tratamentos aplicados e controle. Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística significativa, letras iguais sem diferença (Anova, Teste Tukey, $p < 0.05$).

Dados relacionados a reprodutibilidade do modelo considerando os valores de 7 dias do experimento 2 em relação as amostras designadas para o controle no experimento 3 estão expressos nos gráficos abaixo (Figura 22).

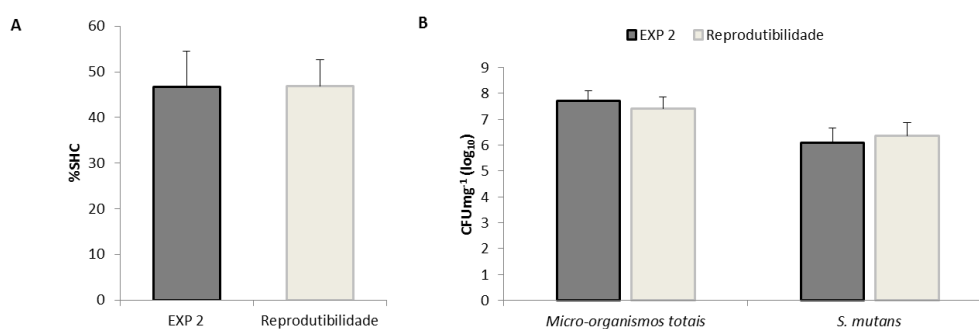


Figura 22 – Médias e desvio padrão dos dados minerais e microbiológicos para reprodutibilidade do Experimento 2 e 3. A) Porcentagem de perda de dureza superficial (%PDS) para o experimento 2 aos 7 dias em relação ao experimento 3 (controle). B) Resposta microbiológica para os experimentos 2 e 3 (controle). Não houve diferença estatística entre os experimentos (Teste T, $p < 0.05$).

4 Artigo 1

***In vitro* biofilm models to study dental caries: a systematic review§**

Maske, T.T^a; van de Sande, F.H^{a,b}; Arthur, R.A^c; Cenci, M.S^a.

^a Post-Graduate Program in Dentistry, Federal University of Pelotas, Pelotas-RS, Brazil.

^b School of Dentistry, IMED Faculdade Meridional, Passo Fundo-RS, Brazil.

^c Department of Preventive and Community Dentistry, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS, Brazil

Short title: Systematic review of biofilm models

***Corresponding author:**

Maximiliano Sérgio Cenci

Rua Gonçalves Chaves 457, Pelotas, RS, Brazil.

96015-560. Phone/Fax: +55-53-3225-6741 ext. 135

E-mail: cencims@gmail.com

Conflict of Interests:

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

§ Artigo formatado segundo as normas do Periódico Caries Research.

Abstract

Aims: Considering the diversity of *in vitro* biofilm models related to dental caries research, this systematic review aims to compare and discuss the key methodological aspects and to verify the reproducibility and dose-response ability of each described model to anti-caries and/or antimicrobial substances.

Methods: PubMed, Isi Web of Science and Scopus were searched until January 2015. The inclusion criteria were divided in Part I: to be an *in vitro* biofilm model that produces potential cariogenic biofilm and/or artificial carious lesion and to allow pH fluctuations; and Part II: models showing an effect of anti-caries and/or antimicrobial substances on carious lesion or biofilm development. Models were divided according to dynamic and batch culture regimen. Bias risk assessment was carried out for studies included in Part II.

Results: The search retrieved 381 records. Fifty-nine studies met the criteria to of Part I whereas 31 met the criteria for Part II. Within the Part I studies, 83.1% represented dynamic biofilm models while 16.9% represented batch models. Within the Part II studies, 90.3% corresponded to dynamic models whereas 9.7 % corresponded to batch ones. Respectively, 19.4% and 16.1% of the selected studies showed validations with dose-response experiments and reproducibility. High risk of bias was found for 32.3% of the studies while medium and low risk for 64.5% and 3.2% of the studies.

Conclusion: Several *in vitro* biofilm models are available for caries-related research. However most of complex and simplified models lacked validation experiments such as dose-response and reproducibility for each established and proposed protocol.

Key words: Biofilm models, caries like-lesion, artificial caries, *in vitro* studies

Introduction

Dental caries is one the most prevalent oral diseases [Selwitz et al., 2007] related to an undisturbed microbial biofilm growth on the surface of the tooth in response to a sucrose-rich diet [Zero et al., 2009]. Its etiology, diagnosis, treatment and control have been extensively studied over the years. The oral cavity is able to influence the microbial diversity and growth of dental biofilm due to a variety of distinct and selective environmental conditions such as teeth location, pH, pO₂, type of substrate among others [Bradshaw and Marsh, 1998]. Environmental changes, physiological disturbances or selective pressures that might occur during dental biofilm growth are able to stimulate the proliferation of certain specific microorganisms which may lead to the development of a potential cariogenic biofilm [Parisotto et al., 2010]. The microbial and physiological complexity of the oral cavity and the ethical issues associated with experimentation in clinical studies has driven to the development of laboratorial models in an effort to simulate those clinical conditions under well-controlled *in vitro* conditions [McBain, 2009; Tang et al., 2003].

Simplified or complex *in vitro* microbial models have been extensively utilized to produce artificial carious lesions. Artificial biofilms have been cultivated from monoculture, defined-multispecies consortia or from complex microbial microcosms using different approaches, such as 24-well plates [Arthur et al., 2013; Filoche et al., 2007; van de Sande et al., 2011], Dishes plaques [Totiam et al., 2007], Multiplaque Artificial Mouth (MAM) [Sissons et al., 1991], Constant Depth Film Fermenter (CDFF) [Peters and Wimpenny, 1988], Chemostats [Bradshaw and Marsh, 1994], CDC Biofilm reactor [Rudney et al., 2012], Flow Chambers and Flow Cell [Lynch and ten Cate, 2006; Seemann et al., 2005b; Seemann et al., 2006], Artificial Mouth Computer Controlled (AMCC) [Mei et al., 2013a; Mei et al., 2013b] or Multi-station continuous-culture biofilm model (MSCBM) [Schwendicke et al., 2014]. Each of these approaches enables the control of specific parameters related to biofilm growth, such as time and frequency of exposure to carbohydrate, carbohydrate source, type of substrate, diversity of microbial inoculum, culture medium, and days of biofilm formation [McBain, 2009; Tang et al., 2003]. However, it is important to consider the shortcomings of modelling clinical aspects under *in vitro* conditions. Physical and physiological variables should be incorporated to modulate microbial shifts during biofilm development and its cariogenic potential and it also must respond to preventive interventions currently used in clinical practice [Sissons, 1997].

Considering the high variability among models present in the literature and the difficulties of retrieving comparisons among them, it is of utmost importance for the cariology research to present summarized information in this subject, to help researchers in the choice of appropriate models for their experiments. Therefore, the aim of this systematic review was to characterize and to discuss key methodological aspects of *in vitro* biofilm models for caries-related research and to verify the reproducibility and dose-response of each model considering the response to anti-caries and/or antimicrobial substances.

Materials and methods

Eligibility Criteria - Part I & II

This systematic review was reported following the PRISMA Statement [Liberati et al., 2009]. In order to investigate the methodological features of *in vitro* biofilm models for dental caries research, the inclusion criteria (Part I) were defined as follows: the study should *i*) use an *in vitro* biofilm model, *ii*) allow the development of potential cariogenic biofilms and/or artificial caries lesions and *iii*) allow pH fluctuations (by intermittent sucrose or other carbohydrate exposure in the model). An additional criterion was set to investigate the ability of the biofilm models used for testing anticariogenic substances. In order to meet the inclusion criteria of Part II, studies should have the criteria *i*, *ii* and *iii* and *iv*) have tested the effect of anti-caries and/or antimicrobial substances. Only studies published as full-text were included in this review. Studies reporting on *in situ* or *in vivo* investigations, non-microbiological models, microbiological models dealing with planktonic cultures and biofilm models that did not present pH oscillations were excluded (Figure 1).

Information Sources and Search Strategy

Three databases (PubMed, Scopus and Isi Web of Science) were used to search for articles. The search strategy included controlled vocabulary and free terms around the terms “Dental Caries”, “Dental Plaque” and “Biofilm models”. First, the search strategy was developed for PubMed and then adapted to the other databases (Appendix Table 1). References of eligible articles, scientific journals in the field and narrative reviews on biofilm models were hand-searched to detect other potential studies of interest. The search was limited to date (1990 up to present) and language (English).

Screening and Study Selection

All retrieved references were managed and stored in EndNote X7® software (Thomson Reuters, San Francisco, CA, USA). The identification and exclusion of duplicates was carried out. Two independent examiners (TTM and FHS) assessed all identified studies in the electronic search of the above-mentioned database. No blinding was carried out regarding authors' names and journals. After title screening, the selected studies had their abstracts carefully appraised. In case of doubt during abstract appraisal, the full-text article was read. The studies considered eligible were identified, and ordered as full-text articles. In case of disagreement, a third reviewer (MSC) was consulted and the decision was made by consensus. During the selection process, studies were included or excluded using pilot tested tables addressing: 1) microbiological model (yes or no); 2) development of cariogenic biofilms and/or artificial caries lesions (yes or no); 3) pH oscillation by carbohydrate (yes or no); 4) evaluation of anticariogenic and/or antimicrobial substances (yes or no).

Data Collection and Risk of Bias Assessment

For Part I, all selected articles had the following data extracted: apparatus used to allow biofilm growth; inoculum source; substrate for biofilm growth; length of the experiment; culture medium and flow-rate; carbohydrate source and time-frequency of exposure of biofilms to carbohydrates. For Part II, collected data involved: evaluation methods; anticariogenic / antimicrobial substances used; dose-response of the model; significance of the effect within the response variables. Two reviewers extracted all data simultaneously under a standardized outline for both Part I and II. A brief description of each biofilm model was carried-out, and they were divided according to the presence or absence of flow-rate of culture medium and/or substrate (batch or dynamic biofilm models).

The quality of studies included in the Part II was assessed using Sarkis-Onofre et al. [2014] criteria with modifications. The following parameters were used: description of sample size calculation, randomization of treatment allocation, presence of a control group, blinding, standardization of samples (teeth or other surfaces), and control of contamination. If the authors reported the parameter listed above, the article received 'Y' (yes); if information was not found; the article received 'N' (no). The articles that obtained 'Y' for 1 to 2 items were considered at high risk, 3 to 4 at medium risk and 5 to 6 at low risk of bias.

Results and Discussion

Study selection

The search retrieved 381 records, and after the removal of duplicates, 297 titles were screened. The appraisal of titles and abstracts resulted in 121 full-text articles selected for reading. Fifty-nine studies met the inclusion criteria for Part I and, 31 of the selected studies evaluated the effect of antimicrobial and/or anticariogenic substances, and, therefore, they were selected for Part II analysis followed by risk of bias assessment. Reasons for exclusion of articles were: not being a microbial model (n=5), not presenting pH oscillation (n=55), and when the full-text article could not be retrieved after two attempts to contact the authors (n=2).

Methodological Features - Part I

Narrative reviews upon the historical and general characteristics of microbial models are well documented in the literature [McBain, 2009; Sissons, 1997; Tang et al., 2003], however, detailed information about the experimental conditions for biofilm growth were not addressed on previous reviews. This review is the first one to describe and discuss the methodological parameters related to the different *in vitro* biofilm models for artificial carious-lesion development. Descriptive data of the methodological features for each study are presented in Table1, and a comparative discussion of each element is presented under the sub-topics below:

a) Batch and Dynamic biofilm models

A brief description of the biofilm models is shown in Appendix (Table 2). For this systematic review the models were divided according to the presence or absence of any kind of flow during biofilm growth.

Both categories were found to produce potential cariogenic biofilms and/or artificial carious lesions (Table 1). Within the studies reporting dynamic models, 36.7% used Flow Chamber/cell, 28.6% used MAM, 18.4% used CDFF, 4.1% used AMCC, 2% used MSCBM, 6.1% used Chemostats, and 4.1% used CDC biofilm reactor. In the batch models approaches, 90% were carried out in 24 well-plates, and 10% in Petri dishes.

In the dynamic models, the output is controlled by peristaltic pumps, which provide a precise flow of medium or carbohydrate to the system according to the study protocol. In general, models simulate the salivary flow-rates that vary from 0.04 to 2.5 ml/min (mimicking an unstimulated or a stimulated condition), whereas some systems, as flow cells or chambers, presented higher flow-rates (60 ml/min). Possible changes in methodological parameters make dynamic *in vitro* models adaptable and flexible to simulate the complexity of oral environment. However, the majority of these models do not present independent biofilm growing and need more than one run for experiment, which makes them high-cost and time-consuming models.

In the CDFF model, biofilms are grown in a set of 15 pans, but samples are not grown in an independent way. Modification in this approach (by rotating 180 degrees back and forward) allows the use of that model in a reciprocal mode in two simultaneous growth conditions (representing two treatment modes) [Deng et al., 2004a], but yet within only one CDFF run. Flow cell/chambers also present this limitation. Models such as MAM, MSCBM and AMCC allow independent biofilm development, but the complex assembly of these models seems to be also a limitation to their use.

On the other hand, multi-well plates, as batch culture based models, are not as effective as dynamic models in mimicking clinical conditions in a laboratorial environment. In these models, bacterial growth occurs in the presence of limited availability of nutrients. Under this condition, the bacterial growth is faster than in oral cavity, representing a rare behaviour in nature [McBain et al., 2009]. That might explain the reason experiments based on batch culture are shorter than the complex ones (Table 1). By lacking flow-rate and shear-stresses, these models seem more suitable for initial investigations e.g. the screening of new substances. A high number of experiments can be performed in short periods of time and the study variable is isolated from other factors which could be included only latter in more complex models.

b) Culture Medium

Eleven different types of artificial saliva solutions and three culture mediums were reported in this review (Table 1). Artificial salivas (AS) compositions are presented in Appendix Table 2. The

choice of the proper solution seems to depend more on the complexity of the inoculum rather than the complexity of the model. Deng et al. [2004a,b] used a simplified medium (BHI) for biofilm growth in a CDFD approach using a pure suspension of *S. mutans* as microbial source, while van de Sande et al. [2011] used the most complex medium (DMM) [Sissons et al., 2001] in a 24-well plate model using saliva as inoculum for biofilm growth.

In general, the nutritional needs of biofilm cultivated from monoculture of pure microorganisms allows the use of a simplified culture medium based on tryptone, peptone, yeast extract, casein and a source of dextrose, such as TSB(S), BHI and UTEYEB medium [Ccahuana-Vasquez and Cury, 2010; Deng et al., 2004a; Deng et al., 2004b; Deng et al., 2005; Diercke et al., 2009; Fontana et al., 2000; Fontana et al., 1996; Giacaman et al., 2013; Seemann et al., 2005a; Seemann et al., 2005b; Seemann et al., 2006; Thneibat et al., 2008]. However, the complexity of biofilms grown from microbial consortium or microcosm requires a more enriched culture medium where the chemical composition tends to be similar to natural saliva. Artificial saliva medium (Appendix Table 2) is based on low carbohydrate content solution, but it contains proteins, electrolytes, amino acids and supplements other than low molecular weight compounds found on simplified media, that allows the growth of microorganisms with different and specific nutritional needs. The reduced carbohydrate availability on AS medium stimulates synergistic and antagonistic metabolic interactions among the microorganisms such as those found on oral cavity [Elias and Banin, 2012].

b) Inoculum Source

While the choice of culture medium seems to depend on type of inoculum, the selection of inoculum source depends on the need of the study or on the research question to be addressed. Monocultures are better indicated for studies aiming to evaluate specific physiological aspects of the biofilm through the response of the test inoculum to some specific experimental conditions. *Streptococcus mutans* have been the microorganism of choice for monoculture biofilms [Ccahuana-Vasquez and Cury, 2010; Deng et al., 2004a; Deng et al., 2004b; Deng et al., 2005; Diercke et al., 2009; Fontana et al., 2000; Fontana et al., 1996; Giacaman et al., 2013; Seemann et al., 2005a; Seemann et al., 2005b; Seemann et al., 2006; Sorvari et al., 1994; Thneibat et al., 2008; Zampatti et al., 1994]. Two studies reported *S. oralis* as inoculum [Macpherson and Dawes, 1991, 1993]. Defined microbial consortia based models, on the other hand, may be chosen to study ecological changes that would otherwise be difficult to measure for reasons of complexity and growth in a more diverse microbial community [McBain, 2009]. The studies included in this review have reported microbial consortia of 3 up to 10 species for cariogenic biofilm development [Bradshaw and Marsh, 1994, 1998; Bradshaw et al., 1996; Donoghue and Perrons, 1991; Filoche et al., 2004; Hodgson et al., 2001; Lynch and ten Cate, 2006; Mei et al., 2013b; Perrons and Donoghue, 1990; Shu et al., 2003; Shu et al., 2000; Xie et al., 2008]. This model may pose an advantage over monoculture ones, since the biofilm is

grown as a result of the interaction among different microorganisms and not only as result of the role of a specific strain. Additionally, since the proportions and types of microorganisms are adjusted in the beginning of the experiment, it is possible to monitor the effect of treatments or conditions on the competition or synergism among the players in the consortium. However, the disadvantage is related to its poor representativeness in comparison with natural biofilms.

Most similar to a true dental biofilm is the microcosm based models. By using saliva or dental plaque as inoculum, thousands of different strains may compete among each other to established a microbial community [Angker et al., 2011; Azevedo et al., 2011; Cenci et al., 2009; Fontana et al., 1996; Mei et al., 2013b; McBain et al., 2003a, b; Pratten and Wilson, 1999; Rudney et al., 2012; Sissons et al., 2007; Sissons et al., 1992; Sissons et al., 1991; Sissons et al., 1995; Sissons et al., 1994a, b; Sissons et al., 1998; van de Sande et al., 2011; Wong and Sissons, 2007; Wong et al., 2002; Zaura et al., 2011]. Dental caries is then produced as a result of metabolic interactions of such diverse communities. It is important to consider that the frequency in which saliva is inoculated vary among experimental models [Cutress et al., 1995; Sissons et al., 1992; Sissons et al., 1995; Sissons et al., 1998; Wong and Sissons, 2001; Wong and Sissons, 2007; Filoche et al., 2008; van de sande et al., 2011]. Wong [2001] compared the frequency of inoculation procedure, viz. 1 and 3 times, in the MAM apparatus, and there was no difference regarding to biofilm patterns of growing. The frequency of saliva use, does not seem to affect the results in that device, however this phenomena was no tested in others biofilm approaches.

Distinct biofilm models are able to produce cariogenic biofilm and artificial caries irrespective of microbial inoculum. Shu et al., [2000] showed that monoculture and microbial consortia were able to produce similar artificial dentine caries lesion. Biofilm generated by microcosm inoculum [Angker et al., 2011; Cutress et al., 1995] and microbial consortia [Yip et al., 2007] also produced artificial caries lesion in bovine and human dental substrates.

c) Time and Frequency of Exposure to Dietary Carbohydrate

The presence of cariogenic diet is an indispensable factor for the development of cariogenic biofilms and caries lesions formation. The effect of carbohydrate intake has been shown to be selective and demonstrates microbiological shifts in low pH presence [Marsh, 2006].

In order to reproduce pH oscillation commonly found on oral cavity, in dynamic models the delivery of carbohydrates is performed in small volumes and at high dilution rates. Under this condition is possible to maintain a degree of control over the cariogenic challenge provided to the biofilm [Hodgson et al., 2001]. The time and frequency of exposure are controlled by peristaltic pumps that provide a precise flow of carbohydrates to the system according to the study protocol. In the CDDF models, frequency and time of exposure varied between 3 to 8 times daily, for 30 to 5 min, respectively [Pratten and Wilson, 1999; Zaura et al., 2011]. In the artificial mouths described by Sissons and Mei [1991; 2013b] the frequency of sucrose exposure were of 3 or 4 times daily for 6

minutes, and the protocols tested did not varied regarding this parameter, while in chamber and Flow Cell several protocols of exposure were reported, varying from 2 [Hodgson et al., 2001; Lee et al., 2010; Xie et al., 2008] to more than 12 times daily [Seemann et al., 2005a,b; Seemann et al., 2006]; and from 1 minute [Lynch and ten Cate, 2006; Macpherson and Dawes, 1991, 1993; Xie et al., 2008] to 1 hour [Donoghue and Perrons, 1991; Perrons and Donoghue, 1990] of exposure. As for Chemostat models included in the present review, carbohydrate was delivery only once a day, whereas in the CDC reactor the exposure occurs 5 times a day for one minute each.

Since the delivery of carbohydrate is performed manually by the researchers or mechanically by pumps, the frequency and exposure times can be easily altered. If and how this difference in frequency and exposure times affects the biofilm or the formation of artificial caries is yet to be examined. Even under distinct regimens of exposure to dietary carbohydrates, it is important to discuss that all studies included in the present review showed a direct relationship between cariogenic diet and caries lesion or cariogenic biofilm development as a response to pH oscillations by sucrose or glucose pulsing. pH oscillations are desired to exert an ecological pressure over the *in vitro* biofilm microbiota selecting acid tolerant species to frequent episodes of pH fall and more fit to produce acids. This is the base of the “Ecological Plaque Hypothesis” discussed by Marsh [2003] and its relation to dental caries. Having a model capable of reproducing the ecological changes found on oral cavity render it closer to a clinical condition. Additionally, the presence of pH oscillations makes the model more representative to the caries lesion development and would be better suitable to produce artificial caries-like lesion.

It is also important to emphasize that most of the studies included in this review used sucrose as a nutrient source and monosaccharide pulsing was only showed by Perrons [1990], Donoghue [1991] and Bradshaw [1994, 1996, 1998] and Giacaman [2013]. In human cariogenic diet, is difficult to find the presence of monosaccharide as available nutrient source [Lingstrom et al., 2000]. Moreover, sucrose is especially able to provide energy to bacteria multiplication, extracellular polysaccharide production and facilitates cariogenic plaque formation [Zero, 2004; Paes Leme et al., 2006]. Thus, sucrose pulsing seems to be more representative of *in vivo* biofilms and may be preferred for dental caries related studies.

d) Substratum for biofilm growth

Several substrata have been used for *in vitro* biofilm growth (Table 1). Human and bovine teeth (enamel, dentine and root dentine) are generally used in an attempt to study carious lesion development whereas inert materials (glass and plastic) or hydroxyapatite discs have been used mainly with the purpose of providing a surface for biofilm growth to study microbial changes during biofilm development or in response to antimicrobial agents [McBain et al., 2003; Sissons et al., 1991; Sissons et al., 1995, 1996; Wong et al., 2002; Xie et al., 2008]. Also, surfaces with specific designs such as

grooves within dentin [Deng et al., 2004a; Deng et al., 2004b; Deng et al., 2005], with standardized gaps between restoration and dentine [Cenci et al., 2009], and sealed fissures from natural teeth were also reported [Seemann et al., 2005a; Seemann et al., 2005b]. Dental materials and dental tissues have also been used to investigate secondary caries development [Cenci et al., 2009; Seemann et al., 2005b] or bonding to caries-affected dentin substrate [Maske et al., 2014; Peixoto et al., 2015]. Thus, depending on the research question a more representative surface may be used for resembling closer the clinical condition or an adequate substrate can be produced for sequential studies focused on remineralization/demineralization or dental materials proprieties.

Biofilm Models and Anticariogenic / Antimicrobial substances -Part II

Data extracted from the 31 papers included under this topic are shown in Table 2. Discussions on evaluation methods and response variables as well as risk of bias assessment are presented in later sub-topics. Twenty-three out of the 31 studies had artificial caries lesions formation and most of them used complex biofilm models (90.3%) to investigate the effect of anticariogenic/antimicrobial substances.

a) Dose-response and reproducibility

A dose-response evaluation was reported in six studies. MAM was validated to fluoride (0, 0.5, 1, 2, 5, 100, 3000 and 5000 ppm) demonstrating dose-response effect on pH, remineralization/demineralization process [Angker et al., 2011, Cutrees et al., 1995]; and also validated with ethanol (10, 20, 30, 40%) altering pH and the microbiota formed in that approach [Sissons et al., 1996]. Lynch [2006] also demonstrated by using calcium glycerophosphate in different concentrations (CaGP 0.10, 0.25, 0.50%) that pH, mineral, and microbial contents were changed in a dose-response manner. Chlorhexidine (0.012, 0.024, 0.03, 0.06 and 0.12%) was used to validate microplate models considering pH, mineral [van de sande et al., 2011] and also microbiological [Chhuana-Vasquez et al., 2010] variables as outcomes. Most of the other included studies evaluated the effect of chlorhexidine (32.3%) and fluoride (25.8%) without showing a dose-response effect.

Ideally, every proposed model should present a dose-response pattern for both anti-caries and antimicrobial substances and this pattern should be reproducible. This would be particularly important for studies where positive and negative controls were not present [Deng et al., 2004a, Deng et al., 2005, Pratten et al., 1999, McBain et al., 2003a, Shu et al, 2000, Sissons et al., 1999, Fontana et al., 2004], because it would demonstrate the sensitiveness of the model regardless of the effect of the investigated substance.

Of the 31 studies selected, five studies reported reproducibility [van de sande et al., 2011; Sissons et al., 1995; 1991; Fontana et al., 2000; Seeman et al., 2006]; however reproducibility to dose-response pattern was only showed by van de Sande [2011]. In this study, enamel surface and pH dose-response to CHX concentrations were compared in a microcosm microplate biofilm model through

experimental repetitions. Other studies showed reproducibility, however the anti-caries or antimicrobial patterns were not tested in reproducible ways. Sissons [1995; 1991] reported reproducibility to plaque growth, PO_4 levels, and pH readings using the MAM. Others chamber/cell flow approaches also demonstrated microbiological [Fontana et al. 2000] and mineral [Seeman et al., 2006] reproducibility to establish a protocol. For the remaining studies included in part II there were no reports found for reproducibility purposes.

Although in this review the reproducibility was only evaluated to studies included for part II, it is important to mention that studies selected for part I (without tests with standardized antimicrobial or anti-caries substances) also demonstrated reproducibility to plaque growth [Edlund et al. 2013, Rudney et al., 2012; Sissons et al. 2007; Deng et al., 2004a; McBain et al., 2003a], pH readings [Sissons et al., 1992; Macpearson et al., 1991], and mineral loss [Fontana et al. 1996; Bradshaw et al., 1996]. This is particularly important because it shows that a biofilm model and its respective protocol, despite of not having anti-caries pattern tested, is able to develop carious lesions and cariogenic biofilms with similar pattern in independent experiments under same protocol of sucrose exposure and nutrient medium.

b) Evaluation Methods and Response Variables

Descriptive information about the selected papers showing significant anticariogenic/antimicrobial effect and bias risk is shown in table 2.

A wide variety of evaluation methods was used in the included studies. Some of them focused on the biofilm microbiological composition (microbiological counts, quantitative polymerase chain reaction (PCR), denaturing gradient gel electrophoresis (DDGE), while others are designed to evaluate chemical and physical biofilm structure (biofilm weight, insoluble and soluble extra polysaccharide analysis, confocal laser scanning microscopy, polarized light microscopy, fourier transform infra-red spectroscopy, fluorescent microscopy, backscattered electron imaging-scanning electron microscopy, and chemical analysis of F, Ca and P ions) and its acidogenicity capacity (pH, organic acid production). Also, when artificial caries were induced, response variables included mineral loss assessment (transverse microradiography, percentage of surface hardness change and scanning electron microscopy).

In a biofilm model, it is important to express, quantitatively, the prevalence of specific groups of microorganisms in order to better understand its relation to the tested experimental conditions. To this aim, most of the reported studies used classical bacterial identification methods based on cultivation of strains on agar plates and determination of CFU counts [Mei et al., 2013 a, b; Deng et al., 2004a; Pratten et al., 1999; McBain et al., 2003a; Yip et al., 2007; Sissons et al., 1991; Lee et al., 2010; Thneibat et al., 2008; Fontana et al., 2004; 2000; Bradshaw et al., 1994; Ccahuana-Vasquez and Cury, 2010]. Although this method has been widely used, the significance of the data is limited by the

total counts of bacteria (irrespective to genus) or counts of specific strains. This method is even less representative for microcosm biofilms since it may underestimate the counts of some important strains [Rudney et al., 2012]. This lack of information impairs the understanding of the ecological role of microorganisms and of the metabolic profile of biofilms during carious lesions development. In this context, only three of the reported studies in this part II (based on microcosm inoculum) used molecular biology methods for the identification of biofilms microbial content [McBain et al., 2003a; Zaura et al., 2011; Cavalcanti et al., 2014]. New approaches including metagenomic, metatranscriptomic, metaproteomic and metabolome analysis of oral biofilm could be able to better the understanding of the microbial community and the ecology of caries [Nyvad et al., 2013], and thus; future studies on *in vitro* biofilm models should be focused also on ecological and metabolic evaluations of a biofilm grown under selected conditions.

c) Risk of Bias Assessment

This review found high (10), medium (20) and one low risk of bias for the reported studies based on the method used for risk of bias assessment described in Table 2. It is worth mentioning that studies should be performed with sufficient methodological detail to allow risk of bias assessment. The low bias risk was only found in the models reported by Cavalcanti et al., (2014), however no mentioned the sample size calculation. These findings and the absence of information in the evaluated studies may not imply that authors did not carry out those procedures, but precludes the verification by the reader.

Future prospects for *in vitro* biofilm models in caries research and final considerations

Although the studies reported in this review have contributed to the understanding of several methodological aspects of artificial carious lesion development, most models lacked of validation experiments and presented medium and high risk of bias.

In vitro models should be performed and described with sufficient methodological details to be considered as more reliable and reproducible. Ideally, an *in vitro* biofilm model for caries-research purposes should be able to show dose-response patterns in terms of frequency of exposure to sucrose as well as for known anticariogenic or antimicrobial substances. Moreover, the reproducibility of the outcome measures should be presented for the chosen protocol parameters.

All studies included in this review showed mineral or microbial response to sucrose exposure once the models were able to develop artificial caries lesions or cariogenic biofilms, although these patterns were not reproducible for all proposed models. Considering the established protocols, the dose-response to anti-caries substances was found for specific models (MAM, microplate and chamber/cell flow), and reproducibility of this dose-response pattern seems to be only found for microplate model.

Additionally, future model development should also take in consideration other important aspects found clinically, such as biofilm removal by brushing or by shear forces and contact with the tongue, and also the chewing movements and the loading of the samples, which would be especially important for the study of secondary caries progression around restorative materials.

Acknowledgement

The first author thanks the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) for the scholarship received during this study.

References:

- Angker L, Swain MV, Wong L, Sissons C: The effects of fluoride and mineralising treatments on plaque microcosm ca, p and f, ph responses and cariogenicity. *New Zealand Dental Journal* 2011;107:12-18.
- Arthur RA, Waeiss RA, Hara AT, Lippert F, Eckert GJ, Zero DT: A defined-multispecies microbial model for studying enamel caries development. *Caries Res* 2013;47:318-324.
- Azevedo MS, van de Sande FH, Maske TT, Signori C, Romano AR, Cenci MS: Correlation between the cariogenic response in biofilms generated from saliva of mother/child pairs. *Biofouling* 2014;30:903-909.
- Azevedo MS, van de Sande FH, Romano AR, Cenci MS: Microcosm biofilms originating from children with different caries experience have similar cariogenicity under successive sucrose challenges. *Caries research* 2011;45:510-517.
- Bradshaw DJ, Marsh PD: Effect of sugar alcohols on the composition and metabolism of a mixed culture of oral bacteria grown in a chemostat. *Caries research* 1994;28:251-256.
- Bradshaw DJ, Marsh PD: Analysis of ph-driven disruption of oral microbial communities in vitro. *Caries research* 1998;32:456-462.
- Bradshaw DJ, Marsh PD, Schilling KM, Cummins D: A modified chemostat system to study the ecology of oral biofilms. *The Journal of applied bacteriology* 1996;80:124-130.
- Cavalcanti YW, Bertolini MM, da Silva WJ, Del-Bel-Cury AA, Tenuta LM, Cury JA: A three-species biofilm model for the evaluation of enamel and dentin demineralization. *Biofouling* 2014;30:579-588.
- Ccahuana-Vasquez RA, Cury JA: S. Mutans biofilm model to evaluate antimicrobial substances and enamel demineralization. *Brazilian oral research* 2010;24:135-141.
- Cenci MS, Pereira-Cenci T, Cury JA, Ten Cate JM: Relationship between gap size and dentine secondary caries formation assessed in a microcosm biofilm model. *Caries Res* 2009;43:97-102.
- Cutress TW, Sissons CH, Pearce EI, Wong L, Anderssen K, Angmar-Mansson B: Effects of fluoride-supplemented sucrose on experimental dental caries and dental plaque ph. *Advances in dental research* 1995;9:14-20.
- Deng DM, Buijs MJ, ten Cate JM: The effects of substratum on the ph response of streptococcus mutans biofilms and on the susceptibility to 0.2% chlorhexidine. *European journal of oral sciences* 2004a;112:42-47.
- Deng DM, ten Cate JM: Demineralization of dentin by streptococcus mutans biofilms grown in the constant depth film fermentor. *Caries Res* 2004b;38:54-61.
- Deng DM, van Loveren C, ten Cate JM: Caries-preventive agents induce remineralization of dentin in a biofilm model. *Caries Res* 2005;39:216-223.
- Diercke K, Lussi A, Kersten T, Seemann R: Isolated development of inner (wall) caries like lesions in a bacterial-based in vitro model. *Clinical oral investigations* 2009;13:439-444.
- Donoghue HD, Perrons CJ: Effect of nutrients on defined bacterial plaques and streptococcus mutans c67-1 implantation in a model mouth. *Caries research* 1991;25:108-115.
- Edlund A, Yang Y, Hall AP, Guo L, Lux R, He X, Nelson KE, Nealson KH, Yooseph S, Shi W, McLean JS: An in vitro biofilm model system maintaining a highly reproducible species and metabolic diversity approaching that of the human oral microbiome. *Microbiome* 2013;1:25.
- Elias S, Banin E: Multi-species biofilms: Living with friendly neighbors. *FEMS microbiology reviews* 2012;36:990-1004.
- Filoché SK, Anderson SA, Sissons CH: Biofilm growth of lactobacillus species is promoted by actinomyces species and streptococcus mutans. *Oral microbiology and immunology* 2004;19:322-326.
- Filoché SK, Soma KJ, Sissons CH: Caries-related plaque microcosm biofilms developed in microplates. *Oral microbiology and immunology* 2007;22:73-79.
- Fontana M, Buller TL, Dunipace AJ, Stookey GK, Gregory RL: An in vitro microbial-caries model used to study the efficacy of antibodies to streptococcus mutans surface proteins in preventing dental caries. *Clinical and diagnostic laboratory immunology* 2000;7:49-54.

- Fontana M, Dunipace AJ, Gregory RL, Noblitt TW, Li Y, Park KK, Stookey GK: An in vitro microbial model for studying secondary caries formation. *Caries research* 1996;30:112-118.
- Fontana M, Haider A, González-Cabezas C: Caries lesion development and biofilm composition responses to varying demineralization times and sucrose exposures. *Biofilms* 2004;1:229-237.
- Giacaman RA, Campos P, Munoz-Sandoval C, Castro RJ: Cariogenic potential of commercial sweeteners in an experimental biofilm caries model on enamel. *Archives of oral biology* 2013;58:1116-1122.
- Goeres DM, Loetterle LR, Hamilton MA, Murga R, Kirby DW, Donlan RM: Statistical assessment of a laboratory method for growing biofilms. *Microbiology (Reading, England)* 2005;151:757-762.
- Hodgson RJ, Lynch RJ, Watson GK, Labarbe R, Treloar R, Allison C: A continuous culture biofilm model of cariogenic responses. *Journal of applied microbiology* 2001;90:440-448.
- Lee VA, Karthikeyan R, Rawls HR, Amaechi BT: Anti-cariogenic effect of a cetylpyridinium chloride-containing nanoemulsion. *J Dent* 2010;38:742-749.
- Li Y, Carrera C, Chen R, Li J, Lenton P, Rudney JD, Jones RS, Aparicio C, Fok A: Degradation in the dentin-composite interface subjected to multi-species biofilm challenges. *Acta biomaterialia* 2014;10:375-383.
- Liberati A, Altman DG, Tetzlaff J, Mulrow C, Gotzsche PC, Ioannidis JP, Clarke M, Devereaux PJ, Kleijnen J, Moher D: The prisma statement for reporting systematic reviews and meta-analyses of studies that evaluate health care interventions: Explanation and elaboration. *PLoS medicine* 2009;6:e1000100.
- Lingstrom P, van Houte J, Kashket S: Food starches and dental caries. *Critical reviews in oral biology and medicine* : an official publication of the American Association of Oral Biologists 2000;11:366-380.
- Lynch RJ, ten Cate JM: Effect of calcium glycerophosphate on demineralization in an in vitro biofilm model. *Caries Res* 2006;40:142-147.
- Macpherson LM, Dawes C: Effects of salivary film velocity on pH changes in an artificial plaque containing streptococcus oralis, after exposure to sucrose. *Journal of dental research* 1991;70:1230-1234.
- Macpherson LM, Dawes C: An in vitro stimulation of the effects of chewing sugar-free and sugar-containing chewing gums on pH changes in dental plaque. *Journal of dental research* 1993;72:1391-1397.
- Marsh PD: Are dental diseases examples of ecological catastrophes? *Microbiology (Reading, England)* 2003;149:279-294.
- Maske TT, Isolan CP, van de Sande FH, Peixoto AC, Faria ESAL, Cenci MS, Moraes RR: A biofilm cariogenic challenge model for dentin demineralization and dentin bonding analysis. *Clinical oral investigations* 2014.
- McBain AJ: Chapter 4: In vitro biofilm models: An overview. *Advances in applied microbiology* 2009;69:99-132.
- McBain AJ, Bartolo RG, Catrenich CE, Charbonneau D, Ledder RG, Gilbert P: Effects of a chlorhexidine gluconate-containing mouthwash on the vitality and antimicrobial susceptibility of in vitro oral bacterial ecosystems. *Applied and environmental microbiology* 2003;69:4770-4776.
- McBain AJ, Bartolo RG, Catrenich CE, Charbonneau D, Ledder RG, Gilbert P: Effects of a chlorhexidine gluconate-containing mouthwash on the vitality and antimicrobial susceptibility of in vitro oral bacterial ecosystems. *Applied and environmental microbiology* 2003a;69:4770-4776.
- McBain AJ, Bartolo RG, Catrenich CE, Charbonneau D, Ledder RG, Gilbert P: Growth and molecular characterization of dental plaque microcosms. *Journal of applied microbiology* 2003b;94:655-664.
- Mei ML, Chu CH, Lo EC, Samaranayake LP: Preventing root caries development under oral biofilm challenge in an artificial mouth. *Medicina oral, patologia oral y cirugía bucal* 2013a;18:e557-563.

- Mei ML, Li Q-l, Chu C-H, Lo EC-M, Samaranayake LP: Antibacterial effects of silver diamine fluoride on multi-species cariogenic biofilm on caries. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 2013b;12.
- Novick A, Szilard L: Description of the chemostat. *Science (New York, NY)* 1950;112:715-716.
- Nyvad B, Crielaard W, Mira A, Takahashi N, Beighton D: Dental caries from a molecular microbiological perspective. *Caries research* 2013;47:89-102.
- Paes Leme AF, Koo H, Bellato CM, Bedi G, Cury JA: The role of sucrose in cariogenic dental biofilm formation--new insight. *Journal of dental research* 2006;85:878-887.
- Parisotto TM, Steiner-Oliveira C, Duque C, Peres RC, Rodrigues LK, Nobre-dos-Santos M: Relationship among microbiological composition and presence of dental plaque, sugar exposure, social factors and different stages of early childhood caries. *Archives of oral biology* 2010;55:365-373.
- Peixoto A, Bicalho A, Isolan C, Maske T, Moraes R, Cenci M, Soares C, Faria ESA: Bonding of adhesive luting agents to caries-affected dentin induced by a microcosm biofilm model. *Operative dentistry* 2015.
- Perrons CJ, Donoghue HD: Colonization resistance of defined bacterial plaques to streptococcus mutans implantation on teeth in a model mouth. *Journal of dental research* 1990;69:483-488.
- Peters AC, Wimpenny JW: A constant-depth laboratory model film fermentor. *Biotechnology and bioengineering* 1988;32:263-270.
- Pratten J, Wilson M: Antimicrobial susceptibility and composition of microcosm dental plaques supplemented with sucrose. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 1999;43:1595-1599.
- Rudney JD, Chen R, Lenton P, Li J, Li Y, Jones RS, Reilly C, Fok AS, Aparicio C: A reproducible oral microcosm biofilm model for testing dental materials. *Journal of applied microbiology* 2012;113:1540-1553.
- Sarkis-Onofre R, Skupien JA, Cenci MS, Moraes RR, Pereira-Cenci T: The role of resin cement on bond strength of glass-fiber posts luted into root canals: A systematic review and meta-analysis of in vitro studies. *Operative dentistry* 2014;39:E31-44.
- Schwendicke F, Dorfer C, Kneist S, Meyer-Lueckel H, Paris S: Cariogenic effects of probiotic lactobacillus rhamnosus gg in a dental biofilm model. *Caries Res* 2014;48:186-192.
- Seemann R, Bizhang M, Kluck I, Loth J, Roulet JF: A novel in vitro microbial-based model for studying caries formation--development and initial testing. *Caries Res* 2005a;39:185-190.
- Seemann R, Kluck I, Bizhang M, Roulet JF: Secondary caries-like lesions at fissure sealings with xeno iii and delton - an in vitro study. *Journal of dentistry* 2005b;33:443-449.
- Seemann R, Kluck I, Kage A: An in vitro microbial-based model for studying caries-preventive agents. *Acta odontologica Scandinavica* 2006;64:27-30.
- Selwitz RH, Ismail AI, Pitts NB: Dental caries. *Lancet* 2007;369:51-59.
- Shu M, Browngardt CM, Chen YY, Burne RA: Role of urease enzymes in stability of a 10-species oral biofilm consortium cultivated in a constant-depth film fermenter. *Infection and immunity* 2003;71:7188-7192.
- Shu M, Wong L, Miller JH, Sissons CH: Development of multi-species consortia biofilms of oral bacteria as an enamel and root caries model system. *Archives of oral biology* 2000;45:27-40.
- Sissons C: Plaque, plaque model systems and ph. *The New Zealand dental journal* 1998;94:56-60.
- Shunmugaperumal T: Analytical techniques useful to study biofilms; in *Biofilm Eradication and Prevention: A Pharmaceutical Approach to Medical devices Infections*. A John Wiley & Sons, inc., publication, pp 116-152.
- Sissons CH: Artificial dental plaque biofilm model systems. *Advances in dental research* 1997;11:110-126.
- Sissons CH, Anderson SA, Wong L, Coleman MJ, White DC: Microbiota of plaque microcosm biofilms: Effect of three times daily sucrose pulses in different simulated oral environments. *Caries research* 2007;41:413-422.
- Sissons CH, Cutress TW, Faulds G, Wong L: Ph responses to sucrose and the formation of ph gradients in thick 'artificial mouth' microcosm plaques. *Archives of oral biology* 1992;37:913-922.

- Sissons CH, Cutress TW, Hoffman MP, Wakefield JS: A multi-station dental plaque microcosm (artificial mouth) for the study of plaque growth, metabolism, ph, and mineralization. *J Dent Res* 1991;70:1409-1416.
- Sissons CH, Wong L, Cutress TW: Patterns and rates of growth of microcosm dental plaque biofilms. *Oral microbiology and immunology* 1995;10:160-167.
- Sissons CH, Wong L, Cutress TW: Inhibition by ethanol of the growth of biofilm and dispersed microcosm dental plaques. *Archives of oral biology* 1996;41:27-34.
- Sissons CH, Wong L, Hancock EM, Cutress TW: Ph gradients induced by urea metabolism in artificial mouth microcosm plaques. *Archives of oral biology* 1994a;39:507-511.
- Sissons CH, Wong L, Hancock EM, Cutress TW: The ph response to urea and the effect of liquid flow in 'artificial mouth' microcosm plaques. *Archives of oral biology* 1994b;39:497-505.
- Sorvari R, Spets-Happonen S, Luoma H: Efficacy of chlorhexidine solution with fluoride varnishing in preventing enamel softening by streptococcus mutans in an artificial mouth. *Scandinavian journal of dental research* 1994;102:206-209.
- Tang G, Yip HK, Cutress TW, Samaranayake LP: Artificial mouth model systems and their contribution to caries research: A review. *Journal of dentistry* 2003;31:161-171.
- Thneibat A, Fontana M, Cochran MA, Gonzalez-Cabezas C, Moore BK, Matis BA, Lund MR: Anticariogenic and antibacterial properties of a copper varnish using an in vitro microbial caries model. *Operative dentistry* 2008;33:142-148.
- Totiam P, Gonzalez-Cabezas C, Fontana MR, Zero DT: A new in vitro model to study the relationship of gap size and secondary caries. *Caries Res* 2007;41:467-473.
- van de Sande FH, Azevedo MS, Lund RG, Huysmans MC, Cenci MS: An in vitro biofilm model for enamel demineralization and antimicrobial dose-response studies. *Biofouling* 2011;27:1057-1063.
- Wong L, Sissons C: A comparison of human dental plaque microcosm biofilms grown in an undefined medium and a chemically defined artificial saliva. *Archives of oral biology* 2001;46:477-486.
- Wong L, Sissons CH: Human dental plaque microcosm biofilms: Effect of nutrient variation on calcium phosphate deposition and growth. *Archives of oral biology* 2007;52:280-289.
- Wong L, Sissons CH, Pearce EI, Cutress TW: Calcium phosphate deposition in human dental plaque microcosm biofilms induced by a ureolytic ph-rise procedure. *Archives of oral biology* 2002;47:779-790.
- Xie Q, Li J, Zhou X: Anticaries effect of compounds extracted from galla chinensis in a multispecies biofilm model. *Oral microbiology and immunology* 2008;23:459-465.
- Yip HK, Guo JH, Wong WH: Incipient caries lesions on cementum by mono- and co-culture oral bacteria. *J Dent* 2007;35:377-382.
- Zampatti O, Roques C, Michel G: An in vitro mouth model to test antiplaque agents: Preliminary studies using a toothpaste containing chlorhexidine. *Caries research* 1994;28:35-42.
- Zaura E, Buijs MJ, Hoogenkamp MA, Ciric L, Papetti A, Signoretto C, Stauder M, Lingstrom P, Pratten J, Spratt DA, Wilson M: The effects of fractions from shiitake mushroom on composition and cariogenicity of dental plaque microcosms in an in vitro caries model. *Journal of biomedicine & biotechnology* 2011;2011:135034.
- Zero DT, Fontana M, Martinez-Mier EA, Ferreira-Zandona A, Ando M, Gonzalez-Cabezas C, Bayne S: The biology, prevention, diagnosis and treatment of dental caries: Scientific advances in the united states. *Journal of the American Dental Association (1939)* 2009;140 Suppl 1:25s-34s.

Legends

Figure 1. Search flowchart of articles as described in the PRISMA statement.

Table 1. Included papers (Part I) and studied conditions description of Dynamic¹ and Batch² biofilm model

Table 2. List of selected papers showing or not dose-response effect, description of the studied conditions and bias risk (Part II)

Appendix Table 1. Search strategy

Appendix Table 2. Description of biofilm models

Appendix Table 3. Artificial Saliva Solution Composition of reported studies

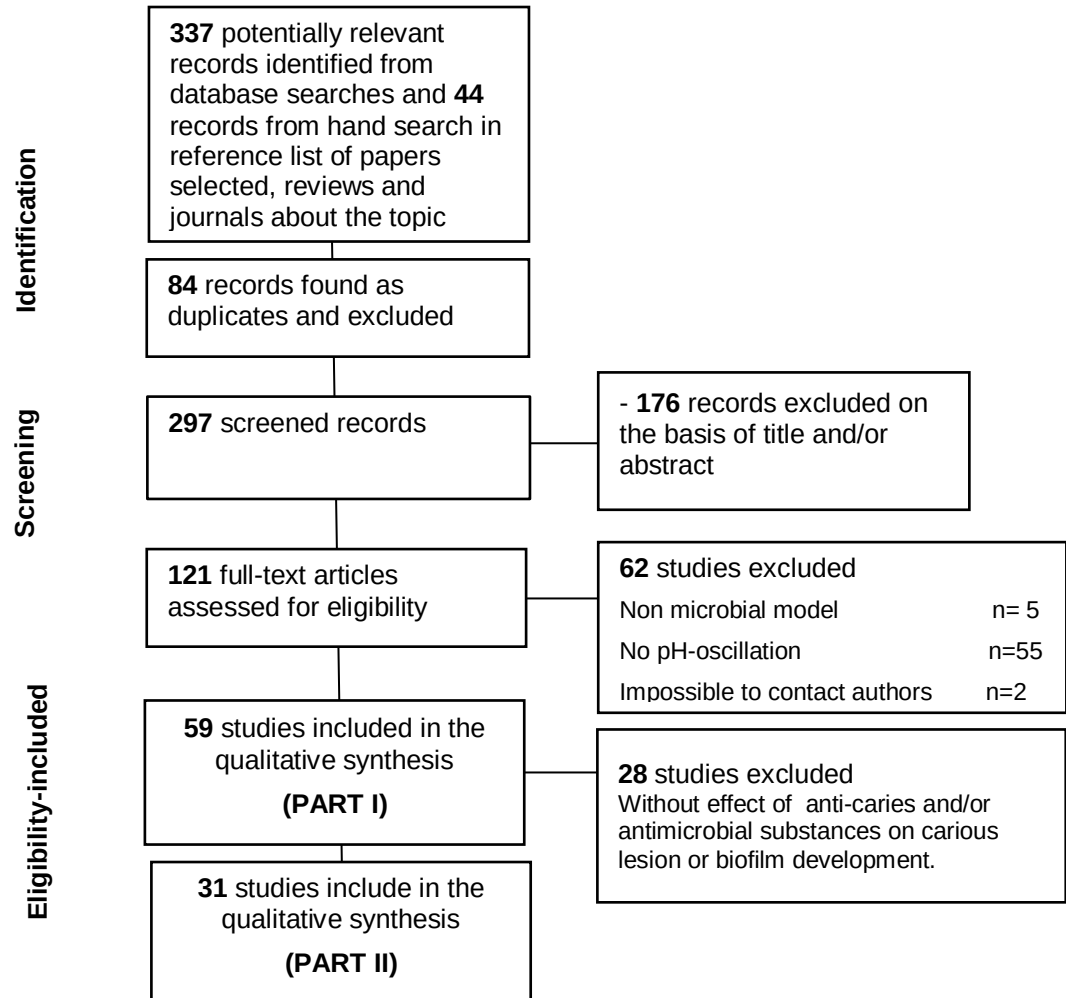


Figure 1. Search flowchart of articles as described in the PRISMA statement.

Table 1. Included papers (Part I) and studied conditions description of Dynamic¹ and Batch² biofilm models

Biofilm model	Papers	Type of inoculum	Type of substrate	Days	Medium and flow	Carbohydrate and flow
AM CC ¹	Mei et al., 2013 a	Consortium (5 species)	Human dentine	21	2.5 ml/h DMM	15 ml/h, 5% Sucrose, 6 min, 3x
	Mei et al., 2013 b	300 µl Saliva	Root human teeth	7	0.06 ml/min DMM	15 ml/h, 5% Sucrose, 6 min, 3x
CDEF ¹	Zaura et al., 2011	9 ml saliva (10 individuals) + 200 ml medium	Bovine dentine	8	0.3 ml/min DMM	1.2 ml/min, 10% Sucrose, 8x, 5 min
	Cenci et al., 2009	10 ml saliva (1 individual) + 200 ml medium	Bovine dentine, gaps restorations	18	0.5 ml/min DMM	1.2 ml/min, 10% Sucrose, 8x, 5 min
	Deng et al., 2005	15 ml <i>S. mutans</i> + 500 ml of medium	Bovine dentine grooves	20	0.5 ml/min BHI buffered	15 ml, 0.5 ml/min 2% Sucrose, 4x, 30 min
	Deng et al., 2004 a	15 ml <i>S. mutans</i> + 500 ml of medium	Bovine dentine and polyacrylate grooves	20	0.5 ml/min BHI buffered	15 ml, 0.5 ml/min, 2% Sucrose, 4x, 30 min
	Deng et al., 2004 b	15 ml <i>S. mutans</i> + 500 ml of medium	Bovine dentine grooves	20	0.5 ml/min BHI buffered	15 ml, 0.5 ml/min 2% Sucrose, 4x or 8x, 30 min
	Mc Bain et al., 2003 a	2,5 ml saliva (3 individuals)	Plastic	5	± 9.6 ml/h AS2*	19 ml/h 0.3% Sucrose, 4x, 30 min
	Mc Bain et al., 2003 b	2,5 ml saliva (1 individual)	Plastic	7	± 9.6 ml/h AS2	19 ml/h 0.3% sucrose, 4x, 30 min
	Shu et al., 2003	Consortium (10 species), 5 ml each culture	Plastic	11	100 ml/h BMM	0.3% sucrose, 100 ml/h
	Pratten et al., 1999	1 ml saliva (10 individuals) + 500 ml AS	Bovine enamel	1 to 11	0,72 l/day AS1*	300 ml Sucrose 10%, 3x , 30 min
MAM ¹	Angker et al., 2011	Saliva	Human enamel	28	2.5 ml/min DMM	1,5 ml 10% sucrose, 5x, 6 min
	Yip et al., 2007	Consortium (4 species), 0,5ml each cultured	Enamel and root dentin human teeth	21	0.2 ml/min BMM	1,5 ml 5% sucrose, 3x , 6 min
	Sissons et al., 2007	Saliva	Plastic	19	2.5 ml/h DMM and BMM	1,5 ml, 5% sucrose, 3x , 6 min
	Filoché et al., 2004	Consortium (6 species), 0,5 ml each culture	Plastic	14-19	2.5 ml/h DMM	1,5 ml, 5% sucrose, 3x , 6 min
	Wong et al., 2001	Saliva (re-innoculated 3 and 5 days)	Plastic	9 to 22	BMM* and DMM* 3.6 ml/h	1,5 ml, 5% sucrose, 3x , 6 min
	Shu et al., 2000	Consortium (4 species, 1ml each culture	Plastic, bovine enamel, root and dentine	7 to 22	3.6 ml/h BMM	1,5 ml, 5% sucrose, 3x or 4x, 6 min
	Sissons et al., 1998	Plaque + saliva (re-innoculated 3 and 5 days)	Plastic	28	3.6 ml/h BMM	1,5 ml, 5% sucrose, 3x, 6 min
	Sissons et al., 1996	5 ml saliva (1 individual)	Plastic	14	3.6 ml/h BMM	1,5 ml, 5% sucrose, 3x, 6 min
	Cutress et al., 1995	Saliva and <i>S. mutans</i> (re-innoculated 2 and 5 day)	Bovine enamel	30	3.5 ml/h BMM	6 ml, 5% sucrose or 10%, 4x, 6 min
	Sissons et al., 1995	Saliva (1 individual/ re-innoculated 3 and 5 day)	Plastic	18	3.6 ml/h BMM	1.5 ml, 5% sucrose, 3x, 6min
	Sissons et al., 1994 b	Saliva	Plastic	49	3.6 ml/h BMM	1.5 ml 5% sucrose, 4x or 3x, 6min
	Sissons et al., 1994 a	Saliva	Plastic	56	3.6 ml/h BMM	1.5 ml 5% sucrose, 4x or 3x, 6min
	Sissons et al., 1992	Saliva (re-innoculated 3 and 5 day)	Plastic	35	3.3-3.6 ml/h BMM	1.5 ml 5% or 10% sucrose, 4x or 3x, 6min
	Sissons et al., 1991	Plaque + saliva	Plastic	42	3.6 ml/h BMM	1.5 ml 5% sucrose, 3x or 6x, 6min
MSCBM ¹	Schwendicke et al., 2014	Monoculture or Consortium (2 species)	Enamel and dentin	10	1.25 ml/ml BMM	1.25 ml/min for 15 min, BHI + 2% sucrose 2x or 6x

Table 1. Continued

Biofilm Models	Papers	Type of inoculum	Type of substrate	Days	Medium and flow	Carbohydrate and flow**
FLOW CELL/CHAMBER ²	Lee et al., 2010	2 ml/min Consortium (2 species)	Human teeth	5	2 ml/min Bacto™ THB	2 ml/min 10% sucrose, 4x, 6min
	Thneibat et al., 2008	5 ml <i>S. mutans</i> + medium TSB	Root human teeth	5	0,7 ml/min MW+TSBS	0.7 ml/min TSBS (5% sucrose), 3x, 30 min
	Diercke et al., 2009	<i>S. mutans</i> + 30 ml medium	Bovine teeth	21	15 min MW+TSB	10% sucrose, 5 min, hourly
	Xie et al., 2008	Consortium (4 species), 15 ml/h	HA. Glass, bovine enamel	5	60 ml/min AS5	10 ml, 0.8% Sucrose, 2x, 1 min
	Lynch et al., 2006	Consortium (7 species), 15ml/h	Bovine enamel and dentine	7	60 ml/min AS5	2 ml, 0.8% Sucrose, 2x, 1 min
	Seemann et al., 2006	<i>S. mutans</i> + 30 ml medium	Enamel human	14	15 min MW+TSB	10% sucrose, 5 min, hourly
	Seemann et al., 2005 a	<i>S. mutans</i> + 30 ml medium	Human upper premolar	21	15 min MW+ TSB	10% sucrose, 5 min, hourly
	Seemann et al., 2005 b	<i>S. mutans</i> + 30 ml medium	Human upper premolar	21	15 min MW+TSB	10% sucrose, 5 min, hourly
	Fontana et al., 2004	Consortium (5 species)	Human enamel	2 to 8	0,7 ml/min MW+TSBS	0.7 ml/min TSBS (5% sucrose), 3x, 30 min
	Hodgson et al., 2001	Consortium (7 species), 15ml/h	HA, bovine enamel	14	60 ml/min AS5*	0.3% and 1.7% Sucrose, 2x
	Fontana et al., 2000	200 µl each 2 strains of <i>S. mutans</i>	Human enamel	4	0,7 ml/min MW+TSBS	0.7 ml/min TSBS (5% sucrose), 3x, 30 min
	Fontana et al., 1996	200 ml bacterial pellet (<i>S. mutans</i> - 2 strains) + 20 ml medium	Human teeth	7 or 12	0,7 ml/min MW*+TSBS	0.7 ml/min TSBS (5% sucrose), 3x, 30 min
	Zapatti et al., 1994	<i>S. mutans</i>	Bovine enamel	5	0.125 ml/min AS6*	0.003% sucrose, 5x, hourly
	Sovari et al., 1994	<i>S. mutans</i>	Human enamel	5	50 ml/h AS7*	3% Sucrose, each 4h
	Macpherson et al., 1993	<i>S. oralis</i>	Square well	0 days, 180 min	86.2mm/min AS4	10% Sucrose, 86.2 mm/min, 1 min
	Macpherson et al., 1991	<i>S. oralis</i>	Square well	0 days, 250 min	86.2mm/min AS4*	10% Sucrose, 0.78, 8.2, and 86.2 mm/min, 1 min
	Donogue et al., 1991	Consortium (4 species)	Human teeth (crown)	2 days, 22h	0,5 ml/h AS3*	0.5 ml/min Glucose 1%, 4x, 1h
	Perrons et al., 1990	Consortium (4 species)	Human teeth (crown)	2 days, 22h	0,5 ml/h AS3*	0.5 ml/min Glucose 1%, 4x, 1h
MICROPLATE ²	Peixoto et al., 2015	Saliva	Human dentine	14 days	DMM static	1% Sucrose, 1x, 4 h
	Maske et al., 2014	Saliva	Bovine dentine	3-21 days	DMM static	1% Sucrose, 1x, 4 h
	Azevedo et al., 2014	Saliva	Bovine enamel	10 days	DMM static	1% Sucrose, 1x, 6h
	Cavalcanti et al., 2014	Saliva	Bovine enamel and dentine	4 days	UTEYEB static	10% Sucrose, 8x, 1 min
	Edlund et al., 2013	Saliva	-	0 days, 48h	SHI static*	SHI medium 1% sucrose, 2h
	Giacaman et al., 2013	2 ml <i>S. mutans</i>	Bovine enamel	5	UTEYEB static	8% Sucrose e fructose 3x, 5 min
	Van de Sande et al., 2011	0.4 ml saliva (1 individual)	Bovine enamel	5	DMM static	1% Sucrose, 1x, 6h
	Azevedo et al., 2011	0.4 ml saliva (1 individual healthy or caries active)	Bovine enamel	10	DMM static	1% Sucrose, 1x, 6h
	Ccahuana-Vasquez et al., 2010	2 ml <i>S. mutans</i>	Bovine enamel	5	UTEYEB static	10% Sucrose, 8x, 1 min
CHEMOS-TAT ³	Bradshaw et al., 1998	Consortium (10 species)	-	10	75 ml/h BMM	7.5 ml 0.5% glucose, 1x
	Bradshaw et al., 1996	Consortium (10 species)	HA	21	75 ml/h BMM	7.5 ml, 0.5% glucose, 1x
	Bradshaw et al., 1994	Consortium (9 species)	-	10	75 ml/h BMM	5 ml, 0.5% glucose, 1x
CDC REACTOR ¹	Li et al., 2014	30 µl Saliva + plaque	Root dentin	3	17 ml/min BMM	20ml/min, 20% sucrose, 3x
	Rudney et al., 2012	30 µl Saliva + plaque	HA, Silicone based composite	3	17 ml/min BMM	20 ml/min, 5% sucrose, 5x
PETRI DISHES ²	Totiam et al., 2007	<i>S. mutans</i>	Human molars	8	MW static	TSBS (sucrose 5%) 1x, 4h

Note: *Different Artificial Saliva (AS1- AS7); each one is described in Table 4. ** Frequency described daily.

Abbreviations: TSB-Trypticase soy broth. TSBS- trypticase soy broth supplemented with 5% sucrose. BMM: basal medium mucin. DMM: defined medium mucin. MW: mineral wash. UTEYEB: Tryptone-yeast extract broth. BHI: Infusion Head and broth. THB: Todd Hewitt broth. HA- Hydroxyapatite SHI: medium name

Table 2. Continued

Biofilm models	Papers	Evaluation Methods	Development of Caries lesion	Cariogenic biofilm	Dose-response	Outcome- Significant effect				Others significant effects	Reproducibility reported	BIAS RISK	
						Anticariogenic antimicrobial substance	pH/ acid production	Demineralization/ remineralization	Microbiologic			Sample size calculation/ Randomization of treatment allocation/ control group/ blinding/ sample standardization/ Sterelization	LOW - L MEDIUM -M HIGH -H
FLOW CEL/CHAMBER	Lee et al, 2010	TMR, CFU	Y	Y	-	0.12% CHX, CCPN	-	+	+	-	N	N / Y / Y / N / Y / Y	M
	Xie et al, 2008	PLM, pH, FM	Y	Y	-	228 ppmF,, <i>Galla ginensis</i> extract	+	+	-	-	N	N / N / Y / N / Y / Y	M
	Thneibat et al., 2008	CLSM, pH, CFU	Y	Y	-	1% CHX varnish, copper seal	+	+	-	-	N	N / Y / Y / N / Y / Y	M
	Seemann et al., 2006	CLSM	Y	Y	-	NaF, Glycan	na	+	na	-	Y	N / N / Y / N / Y / Y	M
	Lynch et al., 2006	TMR, %TVC	Y	Y	0.10, 0.25 and 0.50% CaGP	CaGP	+	+	-	-	N	N / N / Y / N / Y / Y	M
	Seemann et al., 2005a	CLSM	Y	Y	-	Sealants	na	+	na	-	N	N / Y / Y / N / Y / Y	M
	Seemann et al., 2005b	CLSM	Y	Y	-	Sealants	na	+	na	-	N	N / Y / Y / N / Y / Y	M
	Fontana et al., 2004	pH, CLSM, CFU	Y	Y	-	0.25 ppmF	-	+	+	No differents fluoride concentrati ons	N	N / Y / N / N / Y / Y	M
	Fontana et al., 2000	CFU, CLSM	Y	Y	-	CsAb and 59Ab	na	+	-	Affected deminerali zation; no bacteria	Y	N / Y / Y / N / Y / Y	M
	Sorvari et al., 1994	Microhardne ss, pH	Y	Y	-	0.2% CHX+ F varnish, 0.2 % CHX,and F varnish	+	+	na	-	N	N / N / Y / N / Y / N	H
CHEMOSTAT	Zapatti et al., 1994	SEM	N	Y	-	0.004% CHX in toothpaste	na	na	+	-	N	N / N / Y / N / N / Y	H
	Bradshaw; Marsh, 1994	pH, CFU	N	Y	-	0.4% Xilytol, Sorbitol	+	na	+	Positive effect to Xilytol	N	N / N / Y / N / Y / N	H
MICROPLATE	Cavalcanti et al. 2014	pH, %SHC, CLSM, qPCR, SEM	Y	Y	-	0.05% NaF	+	+	+	-	N	N / Y / Y / Y / Y / Y	L
	van de Sande et al., 2011	% SHL, pH	Y	Y	0.03; 0.06 and 0.12% CHX	CHX	+	+	na	-	Y	N / N / Y / N / Y / Y	M
	Ccahuana-Vasquez et al., 2010	%SHL, CFU, pH, dry weight, IEPS, SEPS	Y	Y	0.012,0.02 4, 0.12% CHX	CHX, 0.05% NaF	+	+	+	NaF without antimicrob ial effect	N	N / Y / Y / N / Y / Y	M

Note: Acid Prod- Acid Production, Ca- calcium, CaGP- calcium glycerophosphate, BSE-SEM- Backscattered electron imaging-scanning electron microscopy, CCPN- cetylpyridinium chloride- containing nanoemulsion (25 vol.% soybean oil, 65 vol.% deionized water, 10 vol.%, Triton X-100, 1 wt.% cetylpyridinium chloride.), CFU- colony forming unit, CLSM- confocal laser scanning microscopy, CHX- chlorhexidine, CHXM- Chlorhexidine gluconate-containing mouthwash CPMU- calcium phosphate monofluorophosphate urea, CsAb -antibodies to *Streptococcus mutans* cell surface proteins, DGGE- denaturing gradient gel electrophoresis, EDS- energy dispersive spectroscopy, F- fluoride, FM- fluorescence microscope, FTIR- Fourier transform infra-red spectroscopy, GIC- glass ionomeric cement, IEPS- insoluble extrapolyasaccharide, MHB- Methyl paraben MIC-minimum inhibitory concentration, MBC- Minimum Bactericidal Concentration, NaF- Sodium Floride, P- phosphate, PLM- polarized light microscopy, qPCR- quantitative polymerase chain reaction, SEM- scanning electron microscopy, SDF- Silver diamine fluoride, SF4 and SF5- subfraction of shiitake extract, SEPS- soluble extrapolyasaccharide, SM- *Streptococcus mutans*, TMR- Transverse microradiography, %TVC- percentage of the total viable count, 59Ab- cell surface 59-kDa protein (59Ab); %SHL-percentage surface hardness change. +: effect, -: no effect na: no applicable; Y- yes; N-no; qPCR- quantitative polymerase chain reaction

Appendix Table 1. Search strategy

	Search Terms in Isi Web of Science
#4	Search #1 AND #2 AND #3 Timespan=1990-2015. Search language=English
#3	Topic=(dental caries OR spot white OR spots, white OR white spot OR dental white spots OR white spot, dental OR caries like-lesion OR artificial caries OR demineralization OR tooth hypo mineralization OR hypomineralization, tooth OR hypomineralization, tooth OR tooth hypomineralizations OR demineralization, tooth) <i>Timespan=1990-2015</i> <i>Search language=English</i>
#2	Topic=(biofilm or dental plaque or Plaque, Dental or biofilm model or biofilm models or microcosm or microcosms or multi-species or defined-multispecies or multispecies or consortium or Consortia, Microbial or Microbial Consortium or Consortium, Microbial) <i>Timespan=1990-2015 Search language=English</i>
#1	Topic=(caries OR spot white OR spots, white OR white spot OR dental white spots OR white spot, dental OR caries like-lesion OR artificial caries OR demineralization OR tooth hypo mineralization OR hypomineralization, tooth OR hypomineralization, tooth OR tooth hypomineralizations OR demineralization, tooth) <i>Timespan=1990-2015 Search language=English</i>
	Search Terms in Pubmed
#4	Search #1 AND #2 AND #3 Search ((((((Dental Caries[Mesh] OR Decay, Dental OR Dental Decay OR Caries, Dental OR Dental White Spot OR White Spots, Dental OR White Spots OR Spot, White OR Spots, White OR White Spot OR Dental White Spots OR White Spot, Dental OR Tooth Demineralization[Mesh] OR tooth hypomineralization OR hypomineralization, tooth OR hypomineralization, tooth OR tooth hypomineralizations OR demineralization, tooth))) AND (((Biofilms [Mesh] OR biofilm OR Dental Plaque[Mesh] OR Plaque, Dental OR biofilm model OR biofilm models OR microcosm OR microcosms OR multi-species or defined-multispecies or multispecies or consortium or Consortia, Microbial or Microbial Consortium or Consortium, Microbial)) AND ("1990/01/01"[PDat] : "2015/01/15"[PDat]))) AND ((flow cell OR flow cells OR biochemical reactors OR biochemical reactor OR chemostat system OR CDFF OR Constant depth film fermenter OR artificial mouth OR multiplaque artificial mouth OR MAM OR multi-well plates OR multi-well plate OR microplates OR microplate OR bioreactor or bioreactors or Fermentors or Fermentor or 24 well-plate or 24 well-plates))) AND "english"[Filter]) Filters: Publication date from 1990/01/01 to 2015/01/15
#3	Search (flow cell OR flow cells OR biochemical reactors OR biochemical reactor OR chemostat system OR CDFF OR Constant depth film fermenter OR artificial mouth OR multiplaque artificial mouth OR MAM OR multi-well plates OR multi-well plate OR microplates OR microplate OR bioreactor or bioreactors or Fermentors or Fermentor or 24 well-plate or 24 well-plates)
#2	Search (Biofilms [Mesh] OR biofilm OR Dental Plaque[Mesh] OR Plaque, Dental OR biofilm model OR biofilm models OR microcosm OR microcosms OR multi-species or defined-multispecies or multispecies or consortium or Consortia, Microbial or Microbial Consortium or Consortium, Microbial)
#1	Search (Dental Caries[Mesh] OR Decay, Dental OR Dental Decay OR Caries, Dental OR Dental White Spot OR White Spots, Dental OR White Spots OR Spot, White OR Spots, White OR White Spot OR Dental White Spots OR White Spot, Dental OR Tooth Demineralization[Mesh] OR tooth hypomineralization OR hypomineralization, tooth OR hypomineralization, tooth OR tooth hypomineralizations OR demineralization, tooth)
	Search Term in Scopus
#4	Search #1 AND #2 AND #3 (biofilm OR "dental plaque" OR "Plaque, Dental" OR "biofilm model" OR "biofilm models" OR "microcosm" OR "microcosms" OR "multi-species" OR "defined-multispecies" OR "multispecies" OR "consortium" OR "Consortia, Microbial" OR "Microbial Consortium" OR "Consortium, Microbial") AND ("flow cell" OR "flow cells" OR "biochemical reactors" OR "biochemical reactor" OR "chemostat system" OR cdff OR "Constant depth film fermenter" OR "artificial mouth" OR "multiplaque artificial mouth" OR mam OR "multi-well plates" OR "multi-well plate" OR microplates OR microplate OR bioreactor OR bioreactors OR fermentors OR fermentor OR "24 well-plate" OR "24 well-plates") AND ("dental caries" OR "spot white" OR "spots, white" OR "white spot" OR "dental white spots" OR "white spot, dental" OR "caries like-lesion" OR "artificial caries" OR demineralization OR "tooth hypomineralization" OR "hypomineralization, tooth" OR "hypomineralization, tooth" OR "tooth hypomineralizations" OR "demineralization, tooth") AND (LIMIT-TO(SUBJAREA, "DENT")) AND (LIMIT-TO(LANGUAGE, "English"))
#3	"flow cell" OR "flow cells" OR "biochemical reactors" OR "biochemical reactor" OR "chemostat system" OR cdff OR "Constant depth film fermenter" OR "artificial mouth" OR "multiplaque artificial mouth" OR mam OR "multi-well plates" OR "multi-well plate" OR microplates OR microplate OR bioreactor OR bioreactors OR fermentors OR fermentor OR "24 well-plate" OR "24 well-plates"
#2	biofilm OR "dental plaque" OR "Plaque, Dental" OR "biofilm model" OR "biofilm models" OR "microcosm" OR "microcosms" OR "multi-species" OR "defined-multispecies" OR "multispecies" OR "consortium" OR "Consortia, Microbial" OR "Microbial Consortium" OR "Consortium, Microbial"
#1	"dental caries" OR "spot white" OR "spots, white" OR "white spot" OR "dental white spots" OR "white spot, dental" OR "caries like-lesion" OR "artificial caries" OR demineralization OR "tooth hypomineralization" OR "hypomineralization, tooth" OR "hypomineralization, tooth" OR "tooth hypomineralizations" OR "demineralization, tooth"

Appendix Table 2. Description of biofilm models.

Biofilm model approaches		Brief description
Dynamic models	Constant Depth Film Fermenter (CDEF)	Consists of glass vessel with a stainless-steel end-plate, with ports for the entries of flow (medium, carbohydrate and gas) and another port for waste medium. The vessel accommodates 15 polytetrafluoroethylene sampling pans rotating under a polytetrafluoroethylene scraper bar that smeared the incoming medium over the pans and maintained the formed biofilms at a constant depth. Each sampling pan has 5 cylindrical holes and permits the sample positioning [Peters and Wimpenny, 1988; McBain 2009]. This approach could be used with differentiated operate mode. That mean that turntable rotates 180° instead 360°, allowing two simultaneous growth conditions (treatment modes) without carry over effect [Deng et al., 2005].
	Multiplaque Artificial Mouth (MAM)	It is characterized as a glass cylinder with five plaque growth stations. Each station contains head assembly with 3 lines for flow (nutrients and experimental treatments), access for plaque sample, inoculation assembly and used for electrode access, supplementary access and access for plaque growth assembly [Sissons et al., 1991].
	Multi-station continuous-culture biofilm Model (MSCBM)	It is a computer controlled system and is based on MAM and Dibbin (1976) principle. MSCBM has three different chambers and nutrition and saliva supply via peristaltic multi-channel pumps [Schwendicke et al., 2014].
	Artificial Mouth Computer Controlled (AMCC)	The principle is similar to the Multiplaque Artificial Mouth, but with modification related to design. AMCC is composed by glass cylinder with plaque growth stations. The stations contain places to inoculation, entrance of flow, access to plaque sample, supplementary assembly and the flow is controlled by computer [Mei et al., 2013].
	Flow cell /chamber	Biofilm flow chamber are apparatus where the bacteria grow under continuous hydrodynamic controlled conditions. Biofilms can form and be continually fed fresh nutrients. In general the system consists of five components: medium reservoir, peristaltic pump, bubble traps, flow cells/chamber and effluent reservoir. Flow cells are considered small chamber with transparent surfaces where submerged biofilms can also be formed. Flow cells are associated to a microscopically analysis [Shunmugaperumal, 2010].
	Chemostat	Consists of a glass vessel sandwiched between two stainless steel plates [Bradshaw et al., 1996], and are considered bioreactors to which fresh medium is continuously added, while culture liquid is continuously removed to keep the culture volume constant [Novick and Szilard, 1950].
	CDC Biofilm Reactor	Consists of a glass vessel with an effluent positioned to provide an operational fluid capacity. A polyethylene top supported independent and removable polyethylene rods, a medium-inlet port, and a port to gas exchange. Each rod held removable coupon with surfaces to biofilm growing- sampling opportunities [Goeres et al., 2005; McBain, 2009].
Batch biofilm model	Microplates model and Disches plaque model	These two approaches are considered a batch culture models [McBain, 2009]. Both models are developed in a plate; 24-well- plate and petri dishes, respectively. In these systems each micro-well or the entire petri plaque receives a specific amount of culture medium and it is changed daily. Sometimes, different regimens such as sucrose exposure could be used in each one model [van de Sande et al., 2011; Cahuana-Vasquez et al., 2010, Giacaman et al., 2013].

Appendix Table 3. Artificial saliva solution composition of the reported studies

Saliva Type	Artificial saliva composition
AS1	Lab-lemco 1 g/l, yeast extract 2 g/l, proteose peptone 5 g/l, type III hog gastric mucin 2.5 g/l, sodium chloride 0.2 g/l, potassium chloride 0.2 g/l, calcium chloride 0.3 g/l; 1.25 ml/l of a 0.2 mm filter sterilized solution of 40% urea was added after steam sterilization.
AS2	(g/l): Mucin (type II; porcine; gastric), 2.5; bacteriological peptone, 2.0; tryptone, 2.0; yeast extract, 1.0; NaCl, 0.35; KCl, 0.2; CaCl ₂ , 0.2; cysteine hydrochloride, 0.1; hemin, 0.001; and vitamin K1, 0.0002.
AS3	0.33 g/l KH ₂ PO ₄ , 0.34 g/l Na ₂ HPO ₄ , 1.27 g/l KCl, 0.16 g/l NaSCN, 0.58 g/l NaCl, 0.17 g/l CaCl ₂ .2.H ₂ O, 0.16 g/l NH ₄ Cl, 0.2 g/l urea, 0.03 g/l glucose, 0.002 g/l vitamin C and 2.7 g/l mucin.
AS4	(in mmol/l): KCl = 14; NaH ₂ PO ₄ =5; NaHCO ₃ =5; MgCl ₂ = 0.03; CaCl ₂ = 0.3; pH = 6.95 (unstimulated) and KCl = 14; NaH ₂ PO ₄ = 3; NaHCO ₃ = 14; MgCl ₂ =-0.03; CaCl ₂ =0.3; pH = 7.3
AS5	2.5 g/l hog gastric mucin Type III, 2 g/l proteose peptone, 1 g/l trypticase peptone, 1 g/l yeast extract, 0.5 g/l glucose, 2.5 g/l KCl and 0.1 g/l cysteine-HCl, pH 7.4
AS6	(in mmol/l): 10.2 NaCl, 10.7 KCl, 0.29 KH ₂ PO ₄ , 4.59 K ₂ HPO ₄ , 2.38 NaHCO ₃ , 0.25g Bio-Trypticase, 0.25g yeast extract.
AS7	Na ₂ S= 0.0008g; Mg ₃ P ₂ O ₇ = 0.0008g; Mucin= 2.0000g; CO(NH ₂) ₂ = 0.5000g; Na ₂ HPO ₄ = 0.3000g; CaCl ₂ = 0.3000g; KCl= 0.2000g; NaCl= 0.2000g and 500 ml of distilled H ₂ O.
BMM	2.5 g/l partially purified pig gastric mucin type III, 10.0 g/l proteose peptone, 5.0 g/l trypticase peptone, 5.0 g/l yeast extract, 2.5 g/l KCl, 5 mg/l haemin, 1 mg/l menadione, 1 mmol/l urea and 1 mmol/l arginine, pH 7.0.
DMM	Salts (mmol/l): CaCl ₂ 1.0, MgCl ₂ 0.2, KH ₂ PO ₄ 3.5, K ₂ HPO ₄ 1.5, NaCl 10.0, KCl 15.0, NH ₄ Cl 2.0, Urea 1.0, Mucin (g/l) 2.5, 5 g/l casein. Basal salivary amino acids (μmol/l): Alanine 50, Arginine 50, Asparagine 25, Aspartic acid 25, Cysteine 50, Glutamic acid 25, Glutamine 25, Glycine 100, Histidine 10, Isoleucine 25, Leucine 25, Lysine 50, Methionine 10, Phenylalanine 25, Proline 100, Serine 25, Taurine 75, Threonine 25, Tryptophan 10, Tyrosine 15, Valine 25. Vitamins and growth factors (μmol/l): Choline chloride 100, Citrate 50, Uric acid 50, Haemin 10, Inositol 10, Ascorbic acid 5, Menadione 5, Niacin 5 0.24, Pyridoxine 4, Creatinine 1, p-Aminobenzoic acid 1, Pantothenic acid 1, Thiamine 1, Riboflavin 0.3, Biotin 0.1, Cyanocobalamin 0.05, Folic acid 0.025.
MW	(mg/l): KCl 624.6, NaCl 866.6, K ₂ HPO ₄ 33.8, MgCl ₂ 59.6, CaCl ₂ .2H ₂ O 166.6.
SHI	proteose peptone 10 g/l; trypticase peptone 5.0 g/l; yeast extract 5.0 g/l; KCl 2.5 g/l; sucrose 5 g/l; haemin 5 mg/l; VitK 1 mg/l; urea 0.06 g/l, arginine 0.174 g/l; mucin (type III, porcine, gastric) 2.5 g/l; sheep blood 5% and N -acetylmuramic acid (NAM) 10 mg/l.

Note: Artificial saliva described according to paper citation. For references see Table 3.

5 Artigo 2

An *in vitro* biofilm model for mineral and antimicrobial dose-response studies in a multifunctional oral cavity simulator§

Maske, T.T^a; Brauner, K.V^a; Nakanishi, L.^a; van de Sande, F.H^a; Arthur, R.A^c; Cenci, M.S^a.

^a Laboratory of Oral Microbiology, Post-graduate Program in Dentistry, Federal University of Pelotas, Pelotas-RS, Brazil.

^b School of Dentistry, IMED Faculdade Meridional, Passo Fundo-RS, Brazil.

^c Department of Preventive and Community Dentistry, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS, Brazil

*Corresponding author:

Maximiliano Sérgio Cenci

Rua Gonçalves Chaves 457, Pelotas, RS, Brazil.

96015-560. Phone/Fax: +55-53-3225-6741 ext. 135

E-mail: cencims@gmail.com

§Artigo formatado segundo as normas da Revista Biofouling.

Abstract

Some complex biofilm models have the limitation of not presenting independent biofilm growth units and the need for multiple experiments, which makes them high-cost and time-consuming models. The general aim of this study was to develop and validate a complex multifunctional oral cavity simulator (MOCS) as a biofilm model able to fulfil this purpose. Microcosm biofilms were grown from saliva on bovine enamel discs for up to 21 days under two different protocols. Study outcomes were percentage of enamel surface hardness change, integrated hardness loss and CFU counts from the biofilms. A dose-response evaluation was performed with chlorhexidine, which significantly affected the mineral loss and microbial counts. Overall, the findings suggest that 7 days of biofilm growth with 0.06 ml min^{-1} of salivary flow under exposure to 5 % sucrose (3x daily, 1.2 ml min^{-1} , 6 min) was suitable as a reproducible pre-clinical model for enamel demineralization and antimicrobial studies.

Key words: Biofilm model. Enamel demineralization. Artificial dental caries. Chlorhexidine.

Introduction

The oral cavity is a complex environment where biofilm communities are naturally formed. The inherent variability of the microbial composition and of the physical features of this environment altogether with the ethical issues associated to clinical studies makes experimental clinical conditions difficult to be investigated *in vivo*. Then, the development of laboratorial models that allow biofilms formation under controlled conditions have been useful to simulate the oral environment *in vitro* and to study natural process of biofilm formation and the development of carious lesions (McBain 2009, Tang et al. 2003).

Simplified or complex laboratorial biofilm models developed from monoculture, defined-multispecies consortia or from microbial microcosms have been used to produce cariogenic biofilm or artificial carious lesion using different approaches such as 24-well plate (Arthur et al. 2013, Azevedo et al. 2014, van de Sande et al. 2011), Constant Depth Film Fermenter (CDFF) (Cenci et al. 2009, Zaura et al. 2011), Chemostats (Bradshaw and Marsh, 1994), CDC Biofilm reactor [Rudney et al., 2012], Flow Chambers (Lynch and ten Cate, 2006; Seemann et al., 2005; Seemann et al., 2006), and Artificial Mouths with different settings (Mei et al. 2013, Schwendicke et al. 2014, Sissons et al. 1991). The choice for an appropriate microbiological *in vitro* model to study the development of carious lesions depends toughly on the researcher preference, on the logistical facility or on the question that needs to be addressed (McBain 2009).

Microplaque systems seem to be a reasonable alternative to obtain results in a time-effective manner and when several experimental conditions need to be addressed at the same time; these models, however, seem more suitable for initial investigations (Cavalcanti et al. 2014, Guggenheim et al. 2004, van de Sande et al. 2011). On the other hand, although complex biofilm models require the use of sophisticated culture equipment, they allow biofilm growth for longer times (weeks) and may lead to more relevant and directly clinical-related results once they are able to simulate the dynamic and physiological conditions of oral environment in means of salivary flow, pH oscillations due to the exposure to dietary carbohydrates (differing in concentration and frequency regimens) and the shear stresses that might influence the bacterial attachment (Tang et al. 2003).

In spite of allowing simple and easy maintenance over long-time experiments, recharge of culture chambers under sterile conditions, independent inoculation of microbial strains, controlled flow of natural or synthetic saliva and programmed supply of suitable nutrients for the biofilm growth, some complex models such as CDFF, CDC reactors, Chemostats, and cell/chamber flow approaches do not allow independent biofilm growth and need more than one run for experiment, which makes them high-cost and time-consuming models. In addition to that, although with individual biofilm formation, other models as artificial mouths approaches require a sophisticated assembly and lacked of compactness. Then, the general aim of this study was to develop and validate a complex laboratory model which allows independent biofilm growth, with simple assembly, compactness, and simultaneous runs for the same tested condition. Specific aims were to evaluate enamel

demineralization response to cariogenic conditions and to validate the model with a dose-response evaluation to chlorhexidine.

Materials and Methods

Ethical approval was granted by the local Ethics in Research Committee (School of Medicine, Federal University of Pelotas- Pelotas, RS, Brazil) under protocol number 453023/2013.

Design of Multifunctional Oral Cavity Simulator (MOCS)

The culture chamber and fittings of MOCS are shown in Fig. 1. Briefly, the simulator consists of a chamber system coupled to a microbiological incubator ($37\pm 2^{\circ}\text{C}$). Inside this chamber, there are ten independent units for simultaneous experimental sample accommodation. Each of the units has a removable device which allows the insertion of up to five samples and has specific recessions that are able to direct the flow over the samples.

The chamber and its components are stainless steel made. The system is composed by tempered glass windows that are located on the upper and front portions of the chamber. These windows are used for the insertion and removal of the samples as needed. The device simulates an oxygen controlled environment through anaerobic gas supplementation (10% CO_2 , 10% H_2 and 80% N_2). Three individual feeding inlets (one for artificial saliva solution and treatment, one for sucrose and another one for bacterial inoculum) are located over each sample-accommodating unit. Sterile silicone pipes running from outside containers (containing sucrose and artificial saliva solutions), cross the infusion system by two 10-channels peristaltic pumps (FC 100, ChaoChuing, China) and reaches the respective inlets. A computer was coupled to the peristaltic pumps and a software was developed for solutions flow control (Daxta, Pelotas, Brazil). The flows from the containers reach the accommodation units, flow over the samples and fall to an inferior chamber, with directs the waste to a specific container.

Experimental design and conditions

A multifunctional oral cavity simulator was established for cariogenic biofilm growth and artificial carious lesions development. Human saliva was used as microbial inoculum and bovine enamel as substratum. The nutrient medium used for biofilm growth was a defined medium enriched with mucin (DMM), pH adjusted to 6.8 (Wong and Sissons 2001). Two independent experiments (Studies 1 and 2) were carried out to set the experimental conditions for the establishment of the biofilm model (Study 3). Biofilms were grown for up to 21 days under two different growth conditions (Figure 2). The microbial model was dose-response validated with chlorhexidine solution (CHX) at the concentrations of 0.012, 0.03, 0.06, and 0.12% (Study 3). Sterile saline solution was used as control. For each CHX concentration and control, five biofilms were grown in duplicate ($n=10$ / CHX concentration). For all studies mentioned above, the response variables were enamel mineral loss

which was evaluated by the determination of the percentage of surface hardness change (%SHC) and microbial counts on biofilms which was expressed as colony-forming-units (CFU mg⁻¹ wet biofilm). For Studies 1 and 2, enamel mineral content was also evaluated in means of integrated hardness loss and lesion depth via cross-sectional hardness analysis.

Enamel discs specimens

Enamel discs (5mm diameter and 2 mm thickness) were obtained from bovine incisors. Both dentine and enamel surface were wet ground with 600 and 600, 1200 and 2500 grit silicon carbide papers, respectively, until obtaining plan-parallel surfaces. The baseline enamel surface hardness (SH1) was assessed by three indentations placed at the centre of the enamel surface and spaced 100 µm of each other by using a Knoop diamond indenter loaded with a 50 g weight for 5 s (Micro Hardness Tester, FM 700, Future-Tech Corp., Tokyo, Japan) (Sousa et al. 2009). Baseline hardness of the selected enamel discs was 317.97±24.59 (Knoop Hardness number, kgf/mm²).

Standard ditches were then confectioned in both sides of the enamel discs using diamond drill (from top to bottom, 1mm depth). The discs were fixed in a holder prepared with orthodontic wire which was placed around these ditches. Nail varnish was applied on the sides and bottom of the discs, leaving only the enamel surface exposed. The discs were fixed on the removable device (n=5/device), placed on the independent units and kept at position until the experimental procedures. The MOCS and enamel samples were sterilized by autoclave (121°C for 15 min) (van de Sande et al. 2011).

Saliva collection and baseline analysis

For each study, fresh stimulated saliva was collected from a healthy volunteer (female, aged 50), who had been abstained from oral hygiene for 24h as well as from food ingestion for 2 h prior to the saliva collection. The donor had not been under antibiotic therapy for at least 1 year. The saliva was collected (20 ml) directly into sterile tubes kept on ice and immediately used for baseline analysis (baseline microbial composition - CFUml⁻¹) and inoculation procedures for biofilm growth. In both cases, whole saliva was used and no processing was performed.

Inoculation procedures and biofilm growth

Saliva collected (12 ml) was immediately added to 240 ml of sterile DMM. The solution was gently hand homogenized and provided to the chambers. Twenty-one ml of saliva-enriched DMM was injected inside each unit through the specific inoculum feeding inlet. One hour after initial microbial inoculation, sterile DMM started to be pumped at flow-rate of 0.04 or 0.06 ml min⁻¹ (Studies 1 and 2, respectively). Sucrose pulses started 2 h later for Study 1 (10% sucrose solution, 1.2 ml min⁻¹, 5 min of exposure, 5x daily, with 2 hours intervals and approximately 12 hour period for overnight resting) and 8h later for Study 2 (5% sucrose solution, 0.25 ml min⁻¹, 6 min of exposure, 3x daily with 8 hours intervals). The experiments were carried out up to 21 days and biofilm samples and enamel discs were

aseptically collected after 4, 7, 14 or 21 days of biofilm growth. For each experimental time, one sample was randomly collected from each of the ten independent units (n=10).

For Study 3 the biofilms were grown for 7 days based on data and protocol provided by Study 2. The treatments solutions were provided to the biofilms 24 h after the initial biofilm formation and were applied twice daily with 12 hours of intervals. First and last treatments were applied one hour before and three hours after sucrose feeding. CHX or control treatments (5 ml) were applied on each independent unit for 1 minute using the inoculum inlet. DMM flow was not interrupted during treatment time. For all experiments the biofilms were maintained under anaerobic atmosphere by gas supplementation (10% CO₂, 10% H₂ and balance of 80% N₂, 3x daily, at flow of 250 ml min⁻¹ during half hour) and at constant temperature (37±2°C).

Microbial analysis: saliva baseline and biofilm formation

After the microbial inoculation process for studies 1 and 2, an aliquot of the fresh whole saliva sample was dispersed by vortex agitation for 2 s, serially diluted (10⁰–10⁻⁷; v/v) in sterile saline solution, and cultivated in duplicate on the following culture media: Columbia blood agar enriched with 5% of sheep/horse blood (total microorganism counts), Brain Heart Infusion agar adjusted to pH = 4.8 (total aciduric counts), Mitis Salivarius agar supplemented with 0.2 U/ml of bacitracin (mutans streptococci) and Rogosa agar (lactobacilli). The agar plates were incubated for 96 h at 37°C under 5–10% CO₂, <1% O₂ (Anaerobac – Probac do Brasil produtos Bacteriologicos Ltda, Santa Cecília, SP, Brazil) in anaerobic jars (Probac do Brasil produtos Bacteriologicos Ltda). CFU were counted and the results (CFU ml⁻¹) were used for baseline microbiological data.

For the biofilm and enamel discs collections at specific time-points, the chamber was externally disinfected by 70° alcohol and the upper window was opened. This process was carried out with fire flame always close to the window. Then, the enamel discs were individually removed from each removable device by a sterile gripper (n=10) and placed on codified sterile acrylic plaque kept on ice. Part of the biofilms were collected from the enamel surface with sterile microbrush and placed in pre-weighted microtubes. The wet weight of each sample was determined and 1 ml of sterile saline solution was added to each microtube. The biofilms were dispersed by vortex agitation for 1 min and sonicated for 30s at 20w. The biofilm suspension was serially diluted (10⁰–10⁻⁷) and also inoculated in duplicate onto the above mentioned agar mediums. All agar plates were incubated in anaerobic jars (Probac do Brasil produtos Bacteriologicos Ltda) for 96 hours (37°C) and CFU were counted by one trained operator. The results were expressed as CFU mg⁻¹ of biofilm (wet weight). For Study 3, only total microorganisms and mutans streptococci were cultivated for the dose-response evaluation against the tested solutions.

Measurements of surface microhardness change and integrated hardness loss

After the biofilm collection, the enamel discs were cleaned with distilled water and brushed with a soft-bristle tooth brush. The surface hardness was again recorded for all enamel discs by placing three indentations (SH2) spaced 100 μm to the left/right of the baseline indentations and under the same parameters described before. The percentage of surface hardness change (%SHC) was calculated as: $\%SHC = 100 (SH2 - SH1)/SH1$ (Cury et al. 2000), where SH1 refers to the baseline surface readings and SMH2 to the post-biofilm surface readings.

After surface hardness analysis, the cross-sectional hardness test was performed to determine integrated hardness loss (ΔS) and lesion depth values. Then, the enamel discs were longitudinally sectioned through their centre with a water-cooled diamond saw. One half of the disc was embedded in poly(methyl methacrylate) and wet polished with 600-, 1200-, 1500-, and 2000-grit abrasive papers, followed by a final polishing with a 1- μm diamond suspension. Two columns with eight indentations each were made per disc, the first at 225 μm far from the edge of the disc and the second 50 μm distant from the first column. The indentations were made for both columns at depths of 10, 20, 30, 40, 50, 100, 150, and 200 μm from the surface of the disc. The integrated hardness loss was calculated by subtracting the hardness profile (Knoop hardness number, kgf/mm^2) of the artificial caries formed from the hardness values obtained for sound enamel, as previously described (Souza et al. 2009). One blind and trained examiner carried out all evaluations.

Statistical analysis

The assumptions of equality of variances and normal distribution of errors were checked for each variable. When the variables did not fill these assumptions the data were transformed and when this was no possible non-parametric statistic was used [Box et al., 1978]. Different transformations were applied to studies 1, 2 and 3 as follow: 1) lactobacilli and ΔS values were transformed by ranks; %SHC and other microorganisms evaluated transformed by $\log_{10}$; 2 and 3) total acidurics were transformed by ranks and the others microorganisms by $\log_{10}$.

In Studies 1 and 2, the %SHC, ΔS and microbiological data were analysed by One-way ANOVA followed by all pairwise comparisons with Tukey's method. Lesion depth data of studies 1 and 2 were analysed by ANOVA on Ranks followed by Tukey and Dunn's tests, respectively.

In Study 3, mineral and microbiologic data were analysed by One-way ANOVA and Tukey test. Correlation between dose-response to Chlorhexidine concentrations, %SHC and streptococci mutans and total microorganisms was estimated by Pearson correlation analysis. T-test was used to compare the %SHC and microbial data of the control group of Study 3 with those data provided by 7-days-old biofilms of Study 2 to evaluate the model reproducibility. For all tests the significant level was 5%, and the statistical program used was SigmaStat v.11.0 (Systat Software Inc., Chicago, IL, USA).

Results

Study 1

Mutans streptococci counts remained constant at all time-points of the biofilm growth ($P=0.790$). After 14 days of biofilm growth, total microorganisms, total aciduric microorganisms, and lactobacilli counts did not show significant differences when compared to their respective counts found in 7-days-old biofilms. Higher total aciduric and lactobacilli counts were found in 14 days-old biofilms than in 4-days-old ($P\leq 0.036$) while lower counts of total microorganisms were found in comparison with 4-days-old biofilms (Table 1).

Regarding mineral content of enamel discs, no statistical differences were found for %SHC, lesion depth and ΔS between 7-days and 14-days-old biofilms, but they were higher than those found after 4-days of biofilm growth (Table 1).

Study 2

Statistically higher counts of mutans streptococci, total aciduric microorganisms and *Lactobacilli* ($p\leq 0.015$) were found in 7-days and in 14-days-old biofilms, which were not different between them. There were no statistical differences in counts of total microorganisms among 4-days, 14-days and 21-days-old biofilm ($p>0.08$). However, counts of total microorganisms were statistically higher in 7-days-old biofilms than those found after 14 days and 21 days of biofilm growth ($p\leq 0.011$) (Table 2). No statistical differences were found for %SHC, lesion depth and ΔS values among 7-days, 14-days and 21-days-old biofilms, but those values were statistically higher than those found after 4 days of biofilm growth ($P\leq 0.017$).

Study 3

A dose-response effect was found for microbial counts in the biofilms and also for the %SHC in relation to increased CHX concentrations. Significant lower counts of total microorganisms and mutans streptococci were found under exposure to 0.12 and 0.06% CHX when compared to control group ($P < 0.03$; Table 3).

Statistically lower %SHC was found in the presence of 0.06 and 0.12% CHX, which were not statistically different between them. % SHC was higher in control group than under exposure to 0.012 and 0.03% CHX (Figure 3) ($p<0.001$). There was a progressive mineral increase in enamel discs in response to increased CHX concentration. There was a dose-response correlation between the %SHC, mutans streptococci and total microorganisms counts (Table 3). Considering the model reproducibility, there were statistical similarities among microbial data in biofilms and %SHC in enamel discs in at 7-days of growth between studies 2 and 3.

Discussion

The present study established a complex laboratory microcosm biofilm model that permits independent biofilm growth and simultaneous runs for each experiment for carious lesions development and for antimicrobial test studies in a multifunctional oral cavity simulator (MOCS). This model was able to induce enamel demineralization and shifts on microbial composition of the biofilms in response to distinct cariogenic conditions and to different CHX concentrations.

Two carigenic protocols regimens were tested in studies 1 and 2. In both of them, the flow of artificial saliva solution was set up (0.04 and 0.06 ml min^{-1}) to represent *in vivo* unstimulated salivary flow (Bretz et al. 2001, Shumi et al. 2010) which has also been used in established protocols for artificial mouths systems (Mei et al. 2013, Shu et al. 2003, Sissons, et al. 1991, Wong and Sissons 2001). The low salivary flow associated to high frequency of sucrose exposure (5 x daily) (study 1) unleashed a huge enamel demineralization (Table 1). Severe damage on enamel surface was found in two enamel discs exposed to the cariogenic condition for 14 days which unable a proper carious lesions assessment. This suggests that frequent pH falls on biofilms surrounding in response to sucrose pulses induced an extreme challenge to enamel surfaces which promoted their breakdown and the loss of surface layers. Interestingly, although the %SHC found on enamel discs exposed to the cariogenic conditions for 7 days were as high as those found for 14 days, no enamel surface breakdown was found after 7 days of cariogenic challenge (study 1).

On the other hand, data of study 2 showed that lower frequency of sucrose exposure (3x daily) and lower sucrose concentration (5%) associated to slight increase in the flow or artificial saliva (0.06 ml min^{-1}) maintained the integrity of enamel surface up to 21 days under that cariogenic challenge. Therefore, the experimental conditions of study 2 were considered adequate to promote sufficient cariogenic challenge and not damage the surface of the enamel discs. Moreover, the %SHC values obtained under that cariogenic challenge are according to values founded in *situ* studies with similar or stronger cariogenic protocols (Paes Leme et al. 2004, Pecharki et al. 2005). It is important to point out that a laboratorial model that simulates and reproduces carious lesions at the same extent of those found in short-term clinical studies may pose an advantage over those clinical studies mainly in respect to the ethical and methodological issues related to the latter ones. Additionally, biofilm models may provide less variability of the response variables when compare to *in situ* ones. Therefore, the experimental parameters tested on study 2 were adopted for study 3 in a way to develop standardized carious lesions and to evaluate a dose-response effect to CHX concentrations.

A linear dose-response effect was found for %SHC and mutans streptococci counts in relation to CHX concentrations (Table 3 and Figure 3). The higher the CHX concentration, the lower %SHC. It seems that a plateau was reached in the presence of CHX at 0.06% since no statistical differences were found for %SHC in comparison with CHX 0.12%. There was also a tendency for the decrease in counts of mutans streptococci in response to increased CHX concentrations. Additionally, a significant

correlation between %SHC and total microorganisms and mutans streptococci counts was also found (Table 3) suggesting that the present biofilm model is dose-responsive to different CHX concentrations. These findings indicate that the present biofilm model present methodological validity. Nonetheless, further evaluations should be carried out to verify the ability of this model to respond to different anticariogenic treatments.

When the data of %SHC, total microorganisms and mutans streptococci counts at 7-days-old biofilms of studies 2 and 3 were compared, it was possible to observe that this model produces standardized carious lesions and biofilms with similar microbial composition. The Test-T used to compare both studies did not demonstrate statistical differences for the above mentioned response variables between those independent studies. This finding strengthens the hypotheses that when the microbial inoculum is exposed to the same cariogenic conditions, the mineral loss and microbial response is similar (Azevedo et al. 2011; 2014). Furthermore, these data indicate that the biofilm model present reproducibility.

The microbial data obtained from studies 1 and 2 suggest a shift on the microbial composition of the biofilms which is according to the ecological plaque hypothesis (Marsh 2003, Marsh 2006). Under a cariogenic challenge and in response to an acidic pH, counts of total aciduric microorganisms and *Lactobacilli* increased showing a selection of cariogenic microorganisms. In respect of mutans streptococci, increased counts were found on study 2 in response to the experimental conditions, however, no differences in their counts were found in study 1 (Tables 1 and 2). *S. mutans* are frequently related to caries development (Tanzer et al. 2001), but the representativeness and relation between their high counts on biofilms and the carious lesion development are still under debate (Takahashi and Nyvad 2011). Thus, the shifts in aciduric and *Lactobacilli* counts are an indicative that MOCS simulate the plaque ecological theory successfully (Marsh 2006).

It was possible to observe that no statistical differences were found on counts of mutans streptococci, total aciduric and *Lactobacilli* between 7- and 14-days of biofilm growth for both studies 1 and 2 (Tables 1 and 2). There was also a decrease on the counts of these microorganisms at 21-days of biofilm growth (study 2, Table 2) but counts of total microorganisms remained unchanged. These findings could be related to climax community formation, represented by a dynamic equilibrium (homeostasis) among microorganisms present in the biofilm. It is possible that after 14 days of biofilm growth other species could be found in higher proportions in detriment of *Lactobacilli*, total aciduric microorganisms and mutans streptococci. Our culture method was unable to evidence this fact; however, future molecular analysis must be done to better address this question. We also hypothesized this ecological climax stage could be led to similar carious lesions development induced by biofilms older than 7 days (Tables 1 and 2).

In this proposed biofilm model, chamber-pH readings were not performed as done in other laboratorial models such as MAM, CDFP or Flow cells (Lynch et al. 2006; Sissons et al. 1991; Zaura et al. 2011). However, the carious lesions development and the shifts on the composition of the

biofilms which the selection of cariogenic microorganism may lead us to assume that Stephan curves frequently occurred. However, future experiments will be designed to allow multiple pH readings during biofilm growth.

The MOCS model proposed in the study has particular advantages over separate culture chambers due to its compactness and be easy of handling. The possibility to grown independent biofilms exposed to the same temperature and gas-phase fluctuations, associated to compactness and simple assembly make it as a suitable and easy approach to dental caries studies. Different from the previously described artificial mouths settings (Mei et al. 2013a, Schwendicke et al. 2014, Sissons et al. 1991), the MOCS has only one culture chamber and allows up to ten independent units to biofilm formation. Multiple runs are not required as happen which CDFF, Chemostat or Chamber flow approaches (Sissons et al., 1997; Tang et al., 2003). Then, the MOCS seems a low-cost model and it is not as time-consuming as another complex models.

In conclusion, the MOCS allowed independent and controlled evolution of biofilms and artificial caries development from the same mixed oral flora (saliva) with a common environment. The device reached our specific requirements; the advantages and flexibility of this system appear to offer opportunities for a variety of biofilms experiments for development of carious lesions and antimicrobial studies. The data of the present study also suggested that this model presents validity and reproducibility.

Acknowledgment

The authors thank the laboratory technicians Carmen Lúcia Machado Lopes and Lizângela Ferreira (Microbiological Laboratory-School of Dentistry, UFPel, Pelotas, RS, Brazil). This study is based on the first author's Masters study (Graduate Program in Dentistry, Restorative Dentistry Area, School of Dentistry, UFPel). The first author received scholarships during this study from National Council for Scientific and Technological Development (CNPq- Brazil) [Process No. 130090/2013-1] and Grants from this Council also supported this study (Process No. 486810/2013-7).

References

- Arthur RA, Waeiss RA, Hara AT, Lippert F, Eckert GJ, Zero DT. 2013. A defined-multispecies microbial model for studying enamel caries development. *Caries Res.*47:318-324.
- Azevedo MS, van de Sande FH, Maske TT, Signori C, Romano AR, Cenci MS. 2014. Correlation between the cariogenic response in biofilms generated from saliva of mother/child pairs. *Biofouling*. Sep;30:903-909. Epub 2014/09/04.
- Azevedo MS, van de Sande FH, Romano AR, Cenci MS. 2011. Microcosm biofilms originating from children with different caries experience have similar cariogenicity under successive sucrose challenges. *Caries research*.45:510-517. Epub 2011/10/05.
- Box GEP, Hunter WG, Hunter JS: *Statistics for Experimenters*. New York, Wiley, 1978.
- Bradshaw DJ, Marsh PD. 1994. Effect of sugar alcohols on the composition and metabolism of a mixed culture of oral bacteria grown in a chemostat. *Caries research*.28:251-256. Epub 1994/01/01.
- Bretz WA, do Valle EV, Jacobson JJ, Marchi F, Mendes S, Nor JE, Cancado MF, Schneider LG. 2001. Unstimulated salivary flow rates of young children. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics*. May;91:541-545. Epub 2001/05/11.
- Cavalcanti YW, Bertolini MM, da Silva WJ, Del-Bel-Cury AA, Tenuta LM, Cury JA. 2014. A three-species biofilm model for the evaluation of enamel and dentin demineralization. *Biofouling*.30:579-588. Epub 2014/04/16.
- Cenci MS, Pereira-Cenci T, Cury JA, Ten Cate JM. 2009. Relationship between gap size and dentine secondary caries formation assessed in a microcosm biofilm model. *Caries research*.43:97-102. Epub 2009/03/27.
- Cury JA, Rebelo MA, Del Bel Cury AA, Derbyshire MT, Tabchoury CP. 2000. Biochemical composition and cariogenicity of dental plaque formed in the presence of sucrose or glucose and fructose. *Caries research*. Nov-Dec;34:491-497. Epub 2000/11/28.
- Lynch RJ, ten Cate JM. 2006. Effect of calcium glycerophosphate on demineralization in an in vitro biofilm model. *Caries research*.40:142-147. Epub 2006/03/02.
- Guggenheim B, Guggenheim M, Gmur R, Giertsen E, Thurnheer T. 2004. Application of the Zurich biofilm model to problems of cariology. *Caries Res*. May-Jun;38:212-222.
- Marsh PD. 2003. Are dental diseases examples of ecological catastrophes? *Microbiology (Reading, England)*. Feb;149:279-294. Epub 2003/03/08.
- Marsh PD. 2006. Dental plaque as a biofilm and a microbial community - implications for health and disease. *BMC oral health*.6 Suppl 1:S14. Epub 2006/08/29.
- McBain AJ. 2009. Chapter 4 In *Vitro Biofilm Models*.69:99-132.
- Mei ML, Chu CH, Lo EC, Samaranayake LP. 2013. Preventing root caries development under oral biofilm challenge in an artificial mouth. *Medicina oral, patologia oral y cirugia bucal*. Jul;18:e557-563. Epub 2013/03/26.
- Paes Leme AF, Dalcico R, Tabchoury CP, Del Bel Cury AA, Rosalen PL, Cury JA. 2004. In situ effect of frequent sucrose exposure on enamel demineralization and on plaque composition after APF application and F dentifrice use. *Journal of dental research*. Jan;83:71-75. Epub 2003/12/24.
- Pecharki GD, Cury JA, Paes Leme AF, Tabchoury CP, Del Bel Cury AA, Rosalen PL, Bowen WH. 2005. Effect of sucrose containing iron (II) on dental biofilm and enamel demineralization in situ. *Caries research*. Mar-Apr;39:123-129. Epub 2005/03/03.
- Rudney JD, Chen R, Lenton P, Li J, Li Y, Jones RS, Reilly C, Fok AS, Aparicio C. 2012. A reproducible oral microcosm biofilm model for testing dental materials. *Journal of applied microbiology*. Dec;113:1540-1553. Epub 2012/08/29.
- Schwendicke F, Dorfer C, Kneist S, Meyer-Lueckel H, Paris S. 2014. Cariogenic effects of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG in a dental biofilm model. *Caries Res*.48:186-192. Epub 2014/02/01.
- Seemann R, Bizhang M, Kluck I, Loth J, Roulet JF. 2005. A novel in vitro microbial-based model for studying caries formation--development and initial testing. *Caries research*. May-Jun;39:185-190. Epub 2005/05/26.
- Seemann R, Kluck I, Kage A. 2006. An in vitro microbial-based model for studying caries-preventive agents. *Acta odontologica Scandinavica*. Feb;64:27-30.

- Shu M, Browngardt CM, Chen YYM, Burne RA. 2003. Role of Urease Enzymes in Stability of a 10-Species Oral Biofilm Consortium Cultivated in a Constant-Depth Film Fermenter. *Infection and Immunity*.71:7188-7192.
- Shumi W, Lim J, Nam S-W, Lee K, Kim SH, Kim M-H, Cho K-S, Park S. 2010. Environmental factors that affect *Streptococcus mutans* biofilm formation in a microfluidic device mimicking teeth. *BioChip Journal*.4:257-263.
- Sissons CH. 1997. Artificial dental plaque biofilm model systems. *Advances in dental research*. Apr;11:110-126. Epub 1997/04/01.
- Sissons CH, Cutress TW, Hoffman MP, Wakefield JS. 1991. A multi-station dental plaque microcosm (artificial mouth) for the study of plaque growth, metabolism, pH, and mineralization. *Journal of dental research*. Nov;70:1409-1416. Epub 1991/11/01.
- Sousa RP, Zanin IC, Lima JP, Vasconcelos SM, Melo MA, Beltrao HC, Rodrigues LK. 2009. In situ effects of restorative materials on dental biofilm and enamel demineralisation. *J Dent*. Jan;37:44-51. Epub 2008/11/26.
- Takahashi N, Nyvad B. 2011. The role of bacteria in the caries process: ecological perspectives. *Journal of dental research*. Mar;90:294-303. Epub 2010/10/07.
- Tang G, Yip H-K, Cutress TW, Samaranayake LP. 2003. Artificial mouth model systems and their contribution to caries research: a review. *Journal of Dentistry*.31:161-171.
- Tanzer JM, Livingston J, Thompson AM. 2001. The microbiology of primary dental caries in humans. *Journal of dental education*. Oct;65:1028-1037. Epub 2001/11/09.
- van de Sande FH, Azevedo MS, Lund RG, Huysmans MC, Cenci MS. 2011. An in vitro biofilm model for enamel demineralization and antimicrobial dose-response studies. *Biofouling*. Oct;27:1057-1063.
- Wong L, Sissons C. 2001. A comparison of human dental plaque microcosm biofilms grown in an undefined medium and a chemically defined artificial saliva. *Arch Oral Biol*. Jun;46:477-486. Epub 2001/04/20.
- Zaura E, Buijs MJ, Hoogenkamp MA, Ciric L, Papetti A, Signoretto C, Stauder M, Lingstrom P, Pratten J, Spratt DA, et al. 2011. The effects of fractions from shiitake mushroom on composition and cariogenicity of dental plaque microcosms in an in vitro caries model. *Journal of biomedicine & biotechnology*.2011:135034. Epub 2011/09/24.

Legend captions

Table 1. Average (SD) of microbial (CFU mg⁻¹/log₁₀) and mineral data of Study 1(n=10).

Table 2. Average (SD) of microbial (CFU mg⁻¹/log₁₀) and mineral data of Study 2 (n=10).

Table 3. Average (SD) of mutans streptococci and total microorganisms counts in respect to the treatments. Pearson correlation between %SHC^s and these microbiological data (CFU mg⁻¹).

Figure 1. Multifunctional Oral Cavity Simulator. A) Culture chamber (0.30 x 0.28 x 0.18m) coupled to microbiological incubator. Note upper and frontal windows; 1- independent units (0.0835x0.023x0.0095m) with 0.033m of space between each one; note the slope to allow flow passage 2- Inlets for inoculum, DMM and sucrose; 3- inlet for anaerobic gas; B) removable device (0.082 x 0.022 x 0.0095m) with space for five discs accommodation.

Figure 2. Experimental designs of studies 1, 2 and 3.

Figure 3. %SHC data in response to increasing concentrations of CHX. Different letters demonstrate statistical significance differences among treatments by Tukey Test, p<0.05.

Figure 4. Biofilm model reproducibility. A) %SHC values for 7 days B) CFU counts for 7 days. There was no statistical difference between studies 2 and 3 (control group). T-Test, P<0.05.

Table 1. Average (SD) of microbial (CFU mg-1/log10) and mineral data of Study 1(n=10)

	Total microorganisms	Mutans streptococci	Total aciduric	<i>Lactobacillus</i>	%SHC	Integrated mineral loss (ΔS)	Lesion depth (μm)
Saliva baseline	7.41	5.30	5.22	5.35	-	-	-
4 days	7.60 (0.67)a	4.83(0.66)a	5.52(0.61)a	6.14(0.69)a	80.93(17.28)a	7517.4 (1253.9)a	100 (31.6)a
7 days	6.99(0.61)b	4.88(0.61)a	6.55(0.44)b	6.35(1.43)ab	90.97(8.48)ab	14184.4 (5273.6)b	150 (31.6)b
14 days	6.95(0.61)b	4.59(1.28)a	6.62(0.82)b	6.64(1.07)b	94.76(5.42)b	14232.37(6781.8)b	155 (35.0)b

Different superscript letters demonstrate statistical significance differences among different time points by Tukey Test, $p < 0.05$.

Table 2. Average (SD) of microbial (CFU mg⁻¹/log₁₀) and mineral data of Study 2 (n=10)

	Total microorganisms	Mutans streptococci	Total aciduric	<i>Lactobacillus</i>	%SHC	Integrated mineral loss (ΔS)	Lesion depth (μm)
Saliva baseline	7.4	5.29	5.22	5.34	-	-	-
4 days	7.31 (0.63)ab	3.21(0.36)a	6.0 (0.38)a	2.51(0.3)a	38.53(3.60)a	3349.3(1358.0)a	45.0 (5.0)a
7 days	7.72 (0.86)b	6.08(0.59)b	6.92(1.36)b	4.68(1.31)b	46.75(7.80)b	5789.1(1275.3)b	93.8(16.5)b
14 days	7.09 (0.61)a	5.86(0.37)b	6.72(0.42)ab	4.9(0.68)b	51.99(9.96)b	5721.4(898.84)b	100.0(28.9)b
21 days	6.88 (0.69)a	2.6 (0.92)a	4.76(0.75)c	3.8(1.34)c	51.72(6.36)b	5548.55(1180.0)b	107.1(18.9)b

Different superscript letters demonstrate statistical significance differences among different time points by Tukey Test, p<0.05).

Table 3. Average (SD) of mutans streptococci and total microorganisms counts in respect to the treatments. Pearson correlation between %SHC[§] and these microbiological data (CFU mg⁻¹/log₁₀).

	Control	0.012% CHX	0.03% CHX	0.06% CHX	0.12% CHX	R ² ; p-value
Mutans streptococci	6.37 (0.51)a	5.10 (0.66)ab	4.92 (1.13)ab	4.51(1.78)b	3.94 (0.75)b	0.55; 0.01*
Total microorganisms	7.40 (0.46)a	6.15(0.56)bcd	7.11 (0.36)ac	6.23 (1.32)bc	5.52 (0.78)bd	0.50; 0.003**

* Pearson correlation between %SHC and *S. mutans*. ** Pearson correlation between total microorganismos and %SHC. Different superscript letters demonstrate statistical significance differences among different treatments by Tukey Test, p<0.05. [§]%SHC values are show in the figure 3.

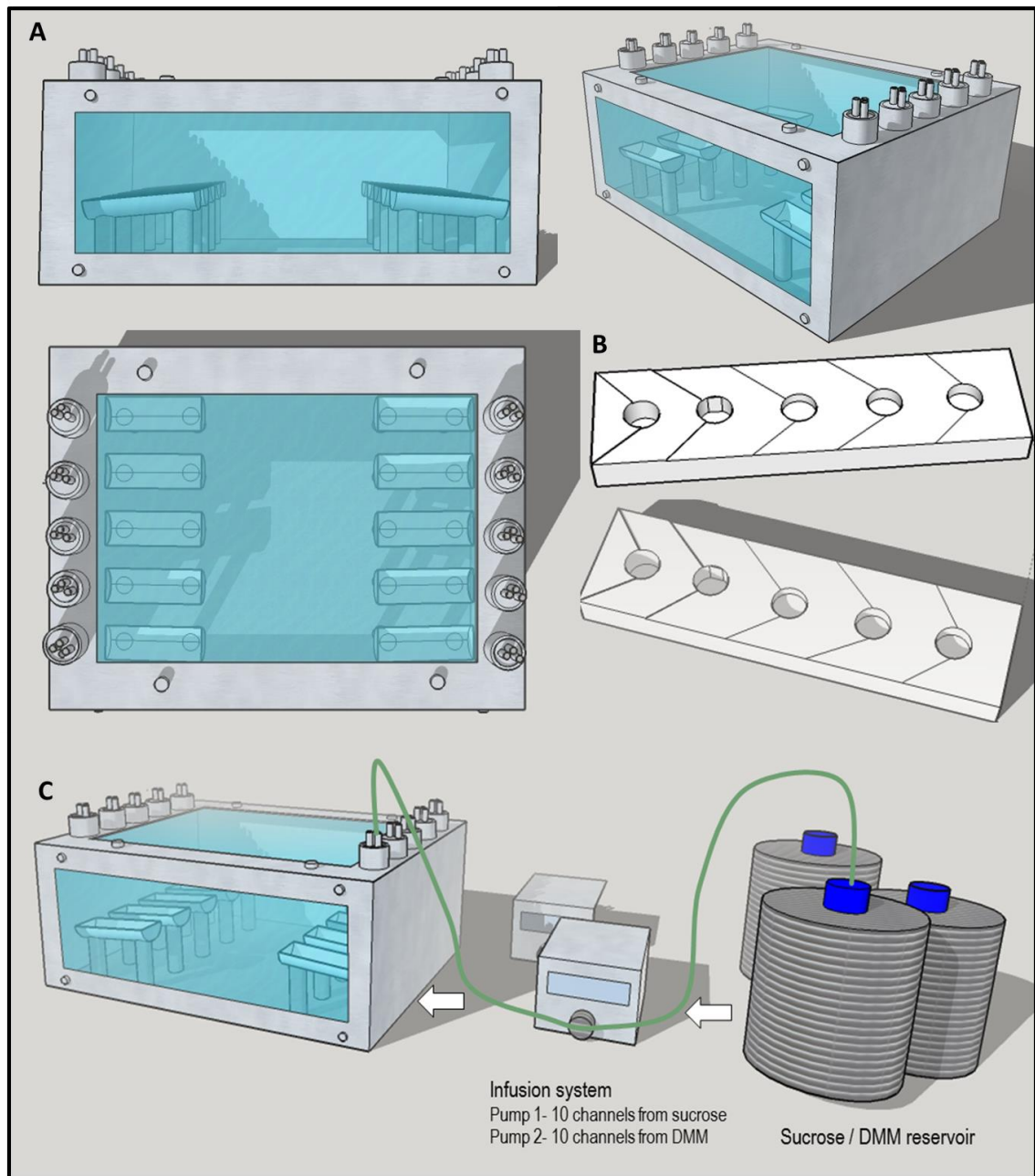


Figure 1. Multifunctional Oral Cavity Simulator. A) Culture chamber (0.30 x 0.28 x 0.18m) coupled to microbiological incubator. Note upper and frontal windows; 1- independent units (0.0835x0.023x0.0095m) with 0.033m of space between each one; note the slope to allow flow passage 2- Inlets for inoculum, DMM and sucrose; 3- inlet for anaerobic gas; B) removable device (0.082 x 0.022 x 0.0095m) with space for five discs accommodation (6mm diameter and 2.5 mm thickness); C) Infusion system of culture medium and sucrose. Two bottles for DMM medium (5 silicone tubes from each one), and one bottle for sucrose solution (10 silicone tubes for each).

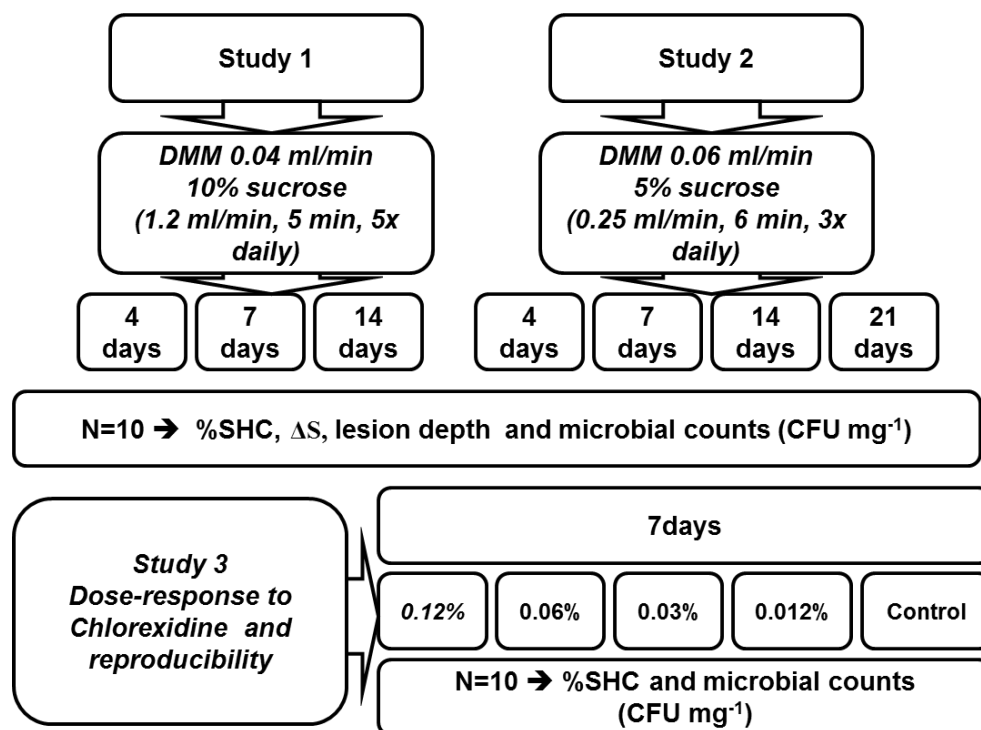


Figure 2. Experimental designs of studies 1, 2 and 3.

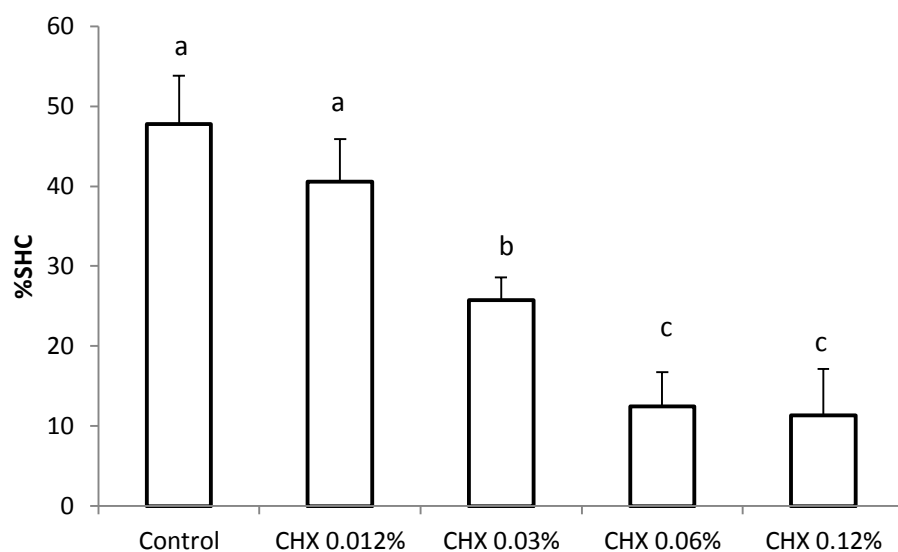


Figure 3. %SHC data in response to increasing concentrations of CHX. Different letters demonstrate statistical significance differences among treatments by Tukey Test, $p < 0.05$

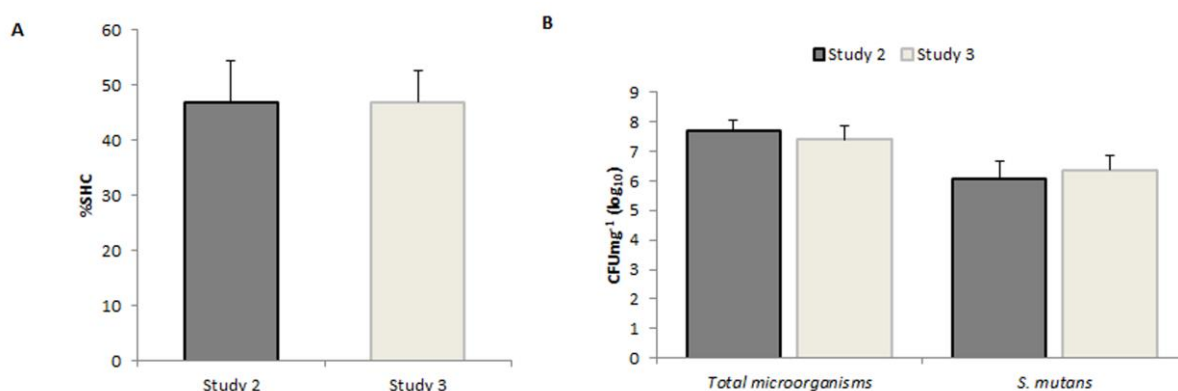


Figure 4. Biofilm model reproducibility. A) %SHC values for 7 days B) CFU counts for 7 days. There was no statistical difference between studies 2 and 3 (control group). T-Test, $P < 0.05$.

6 Considerações finais

Diante do trabalho apresentado conclui-se que inúmeros são os modelos laboratoriais disponíveis para estudos da cárie dentária, no entanto, nem todos possuem validação dose-resposta à substâncias antimicrobianas ou anticariogênicas, e a reprodução de padrão de resposta mineral ou antimicrobiana.

O modelo de biofilme de microcosmos proposto em um simulador multifuncional de cavidade oral, o qual possui fluxo contínuo de saliva, presença de fluxo intermitente de sacarose, condições de temperatura e atmosfera, foi capaz de desencadear perda mineral do substrato e promover a seleção de bactérias cariogênicas frente a protocolos de desafio cariogênicos mais ou menos brandos. Além disso, o modelo obteve dose-resposta mineral e antimicrobiana à concentrações crescentes de clorexidina e ainda demonstrou reprodutibilidade de seus dados em dois experimentos independentes.

O modelo de biofilme complexo desenvolvido na MOCS apresenta dose-resposta à clorexidina e reprodutibilidade, e portanto; parece ter evidência para uso em estudos pré-clínicos relacionados à cárie dentária.

Referências

ANGKER, L.; SWAIN, M. V.; WONG, L.; SISSONS, C. The effects of fluoride and mineralising treatments on plaque microcosm Ca, P and F, pH responses and cariogenicity. **New Zealand Dental Journal**, v.107, n.1, p.12-18, 2011.

ARTHUR, R. A.; WAEISS, R. A.; HARA, A. T.; LIPPERT, F.; ECKERT, G. J.; ZERO, D. T. A defined-multispecies microbial model for studying enamel caries development. **Caries Research**, v.47, n.4, p.318-324, 2013.

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

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

BOWDEN, G. H. W.; LI, Y. H. Nutritional Influences on Biofilm Development. **Advances in Dental Research**, v.11, n.1, p.81-99, 1997.

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

BRADSHAW, D. J.; MCKEE, A. S.; MARSH, P. D. Effects of carbohydrate pulses and pH on population shifts within oral microbial communities in vitro. **Journal of Dental Research**, v.68, n.9, p.1298-1302, 1989.

BRETZ, W. A.; DO VALLE, E. V.; JACOBSON, J. J.; MARCHI, F.; MENDES, S.; NOR, J. E.; CANCADO, M. F.; SCHNEIDER, L. G. Unstimulated salivary flow rates of young children. **Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics**, v.91, n.5, p.541-545, 2001.

CAVALCANTI, Y. W.; BERTOLINI, M. M.; DA SILVA, W. J.; DEL-BEL-CURY, A. A.; TENUTA, L. M.; CURY, J. A. A three-species biofilm model for the evaluation of enamel and dentin demineralization. **Biofouling**, v.30, n.5, p.579-588, 2014.

CCAHUANA-VASQUEZ, R. A.; CURY, J. A. S. mutans biofilm model to evaluate antimicrobial substances and enamel demineralization. **Brazilian Oral Research**, v.24, n.2, p.135-141, 2010.

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

COENYE, T.; NELIS, H. J. In vitro and in vivo model systems to study microbial biofilm formation. **Journal of microbiological methods**, v.83, n.2, p.89-105, 2010.

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

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

CUTRESS, T. W.; SISSONS, C. H.; PEARCE, E. I.; WONG, L.; ANDERSEN, K.; ANGMAR-MANSSON, B. Effects of fluoride-supplemented sucrose on experimental dental caries and dental plaque pH. **Advances Dental Research**, v.9, n.1, p.14-20, 1995.

DAVEY, M. E.; O'TOOLE G, A. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.64, n.4, p.847-867, 2000.

DENG, D. M.; BUIJS, M. J.; TEN CATE, J. M. The effects of substratum on the pH response of Streptococcus mutans biofilms and on the susceptibility to 0.2% chlorhexidine. **European Journal Oral Science**, v.112, n.1, p.42-47, 2004.

DENG, D. M.; TEN CATE, J. M. Demineralization of dentin by Streptococcus mutans biofilms grown in the constant depth film fermentor. **Caries Research**, v.38, n.1, p.54-61, 2004.

DENG, D. M.; VAN LOVEREN, C.; TEN CATE, J. M. Caries-preventive agents induce remineralization of dentin in a biofilm model. **Caries Research**, v.39, n.3, p.216-223, 2005.

DIERCKE, K.; LUSSI, A.; KERSTEN, T.; SEEMANN, R. Isolated development of inner (wall) caries like lesions in a bacterial-based in vitro model. **Clinical Oral Investigations**, v.13, n.4, p.439-444, 2009.

DONOGHUE, H. D.; PERRONS, C. J. Effect of nutrients on defined bacterial plaques and *Streptococcus mutans* C67-1 implantation in a model mouth. **Caries Research**, v.25, n.2, p.108-115, 1991.

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

FILOCHE, S. K.; ANDERSON, S. A.; SISSONS, C. H. Biofilm growth of *Lactobacillus* species is promoted by *Actinomyces* species and *Streptococcus mutans*. **Oral Microbiology and Immunology**, v.19, n.5, p.322-326, 2004.

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

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

FONTANA, M.; BULLER, T. L.; DUNIPACE, A. J.; STOOKEY, G. K.; GREGORY, R. L. An In vitro microbial-caries model used to study the efficacy of antibodies to *Streptococcus mutans* surface proteins in preventing dental caries. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v.7, n.1, p.49-54, 2000.

FONTANA, M.; DUNIPACE, A. J.; GREGORY, R. L.; NOBLITT, T. W.; LI, Y.; PARK, K. K.; STOOKEY, G. K. An in vitro microbial model for studying secondary caries formation. **Caries Research**, v.30, n.2, p.112-118, 1996.

FONTANA, M.; HAIDER, A.; GONZÁLEZ-CABEZAS, C. Caries lesion development and biofilm composition responses to varying demineralization times and sucrose exposures. **Biofilms**, v.1, n.4, p.229-237, 2004.

GIACAMAN, R. A.; CAMPOS, P.; MUNOZ-SANDOVAL, C.; CASTRO, R. J. Cariogenic potential of commercial sweeteners in an experimental biofilm caries model on enamel. **Archives Oral Biology**, v.58, n.9, p.1116-1122, 2013.

GOLD, O. G.; JORDAN, H. V.; VAN HOUTE, J. A selective medium for *Streptococcus mutans*. **Archives Oral Biology**, v.18, n.11, p.1357-1364, 1973.

GUGGENHEIM, B.; GUGGENHEIM, M.; GMUR, R.; GIERTSEN, E.; THURNHEER, T. Application of the Zurich biofilm model to problems of cariology. **Caries Research**, v.38, n.3, p.212-222, 2004.

GUGGENHEIM, M.; SHAPIRO, S.; GMUR, R.; GUGGENHEIM, B. Spatial arrangements and associative behavior of species in an in vitro oral biofilm model. **Applied and Environment Microbiology**, v.67, n.3, p.1343-1350, 2001.

GUSSY, M. G.; WATERS, E. G.; WALSH, O.; KILPATRICK, N. M. Early childhood caries: current evidence for aetiology and prevention. **Journal Paediatric Child Health**, v.42, n.1-2, p.37-43, 2006.

HASHIZUME, L. N.; SHINADA, K.; KAWAGUCHI, Y.; YAMASHITA, Y. Sequence of ultrastructural changes of enamel crystals and *Streptococcus mutans* biofilm in early enamel caries in vitro. **Journal Medicine Dental Science**, v.49, n.2, p.67-75, 2002.

HODGSON, R. J.; LYNCH, R. J.; WATSON, G. K.; LABARBE, R.; TRELOAR, R.; ALLISON, C. A continuous culture biofilm model of cariogenic responses. **Journal of Applied Microbiology**, v.90, n.3, p.440-448, 2001.

KLEINBERG, I. A mixed-bacteria ecological approach to understanding the role of the oral bacteria in dental caries causation: an alternative to *Streptococcus mutans* and the specific-plaque hypothesis. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**, v.13, n.2, p.108-125, 2002.

LEE, V. A.; KARTHIKEYAN, R.; RAWLS, H. R.; AMAECHI, B. T. Anti-cariogenic effect of a cetylpyridinium chloride-containing nanoemulsion. **Journal Dentistry**, v.38, n.9, p.742-749, 2010.

LI, Y.; CARRERA, C.; CHEN, R.; LI, J.; LENTON, P.; RUDNEY, J. D.; JONES, R. S.; APARICIO, C.; FOK, A. Degradation in the dentin-composite interface subjected to multi-species biofilm challenges. **Acta Biomaterialia**, v.10, n.1, p.375-383, 2014.

LI, Y. H.; BOWDEN, G. H. Characteristics of accumulation of oral gram-positive bacteria on mucin-conditioned glass surfaces in a model system. **Oral Microbiology Immunology**, v.9, n.1, p.1-11, 1994.

LIBERATI, A; ALTMAN, DG; TETZLAFF, J; MULROW, C; GOTZSCHE, PC; IOANNIDIS, JP; CLARKE, M; DEVEREAUX, PJ; KLEIJNEN, J; MOHER, D. The prisma statement for reporting systematic reviews and meta-analyses of studies that evaluate health care interventions: Explanation and elaboration. **Journal Clinical Epidemiolog.**, v.62, n.10 p.1-34, 2009.

LINGSTROM, P; VAN HOUTE, J; KASHKET, S. Food starches and dental caries. **Critical reviews in oral biology and medicine**, v.11, n.3, p.366-380, 2000.

LYNCH, R. J.; TEN CATE, J. M. Effect of calcium glycerophosphate on demineralization in an in vitro biofilm model. **Caries Research**, v.40, n.2, p.142-147, 2006.

MACPHERSON, L. M.; DAWES, C. Effects of salivary film velocity on pH changes in an artificial plaque containing *Streptococcus oralis*, after exposure to sucrose. **Journal of Dental Research**, v.70, n.9, p.1230-1234, 1991.

MACPHERSON, L. M.; DAWES, C. An in vitro stimulation of the effects of chewing sugar-free and sugar-containing chewing gums on pH changes in dental plaque. **Journal of Dental Research**, v.72, n.10, p.1391-1397, 1993.

MARSH, P. D. The role of microbiology in models of dental caries. **Advances Dental Research**, v.9, n.3, p.244-254; discussion 255-269, 1995.

MARSH, P. D. Microbiologic aspects of dental plaque and dental caries. **Dental Clinics of North America**, v.43, n.4, p.599-614, v-vi, 1999.

MARSH, P. D. Are dental diseases examples of ecological catastrophes? **Microbiology**, v.149, n.Pt 2, p.279-294, 2003

MARSH, P. D. Dental plaque: biological significance of a biofilm and community life-style. **Journal of Clinical Periodontology**, v.32 Suppl 6, 7-15, 2005.

MARSH, P. D. Dental plaque as a biofilm and a microbial community - implications for health and disease. **BMC Oral Health**, v.6 Suppl 1, S14, 2006.

MARSH, P. D.; BRADSHAW, D. J. Physiological approaches to the control of oral biofilms. **Advances Dental Research**, v.11, n.1, p.176-185, 1997.

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

MCBAIN, A. J. Chapter 4: In vitro biofilm models: an overview. **Advances Applied Microbiology**, v.69, 99-132, 2009.

MCBAIN, A. J.; BARTOLO, R. G.; CATRENICH, C. E.; CHARBONNEAU, D.; LEDDER, R. G.; GILBERT, P. Effects of a chlorhexidine gluconate-containing mouthwash on the vitality and antimicrobial susceptibility of in vitro oral bacterial ecosystems. **Applied and Environment Microbiology**, v.69, n.8, p.4770-4776, 2003.

MCBAIN, A. J.; BARTOLO, R. G.; CATRENICH, C. E.; CHARBONNEAU, D.; LEDDER, R. G.; GILBERT, P. Growth and molecular characterization of dental plaque microcosms. **Journal Applied Microbiology**, v.94, n.4, p.655-664, 2003.

MCBAIN, A. J.; BARTOLO, R. G.; CATRENICH, C. E.; CHARBONNEAU, D.; LEDDER, R. G.; RICKARD, A. H.; SYMMONS, S. A.; GILBERT, P. Microbial Characterization of Biofilms in Domestic Drains and the Establishment of Stable Biofilm Microcosms. **Applied and Environment Microbiology**, v.69, n.1, p.177-185, 2003.

MEI, M. L.; LI, Q. L.; CHU, C. H.; LO, E. C.; SAMARANAYAKE, L. P. Antibacterial effects of silver diamine fluoride on multi-species cariogenic biofilm on caries. **Annals of Clinical Microbiology Antimicrobials**, v.12, 4, 2013.

MEI, M.L.; CHUN-HUNG, C.; CHIN-MAN, L. E.; LAKSHMAN-PERERA, S. Preventing root caries development under oral biofilm challenge in an artificial mouth. **Medicina Oral Patología Oral y Cirugia Bucal**, v.e557-e563, 2013.

PAES LEME, A. F.; DALCICO, R.; TABCHOURY, C. P.; DEL BEL CURY, A. A.; ROSALEN, P. L.; CURY, J. A. In situ effect of frequent sucrose exposure on enamel demineralization and on plaque composition after APF application and F dentifrice use. **Journal of Dental Research**, v.83, n.1, p.71-75, 2004.

PARISOTTO, T. M.; STEINER-OLIVEIRA, C.; DUQUE, C.; PERES, R. C.; RODRIGUES, L. K.; NOBRE-DOS-SANTOS, M. Relationship among microbiological composition and presence of dental plaque, sugar exposure, social factors and

different stages of early childhood caries. **Archives Oral Biology**, v.55, n.5, p.365-373, 2010.

PEARCE, E. I.; CUTRESS, T. W.; SISSONS, C. H.; COOTE, G. E. Supplementation of domestic sugar (sucrose) with fluoride. Effects on experimental dental caries, plaque pH, and fluoride levels in plaque and enamel. **New Zealand Dental Journal**, v.88, n.393, p.84-88, 1992.

PECHARKI, G. D.; CURY, J. A.; PAES LEME, A. F.; TABCHOURY, C. P.; DEL BEL CURY, A. A.; ROSALEN, P. L.; BOWEN, W. H. Effect of sucrose containing iron (II) on dental biofilm and enamel demineralization in situ. **Caries Research**, v.39, n.2, p.123-129, 2005.

PEIXOTO, I. T. A.; ENOKI, C.; ITO, I. Y.; MATSUMOTO, M. A. N.; NELSON-FILHO, P. Evaluation of home disinfection protocols for acrylic baseplates of removable orthodontic appliances: A randomized clinical investigation. **American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics**, v.140, n.1, p.51-57, 2011.

PERES, M. A.; DE OLIVEIRA LATORRE MDO, R.; SHEIHAM, A.; PERES, K. G.; BARROS, F. C.; HERNANDEZ, P. G.; MAAS, A. M.; ROMANO, A. R.; VICTORA, C. G. Social and biological early life influences on severity of dental caries in children aged 6 years. **Community Dentistry and Oral Epidemiology**, v.33, n.1, p.53-63, 2005.

PERRONS, C. J.; DONOGHUE, H. D. Colonization resistance of defined bacterial plaques to *Streptococcus mutans* implantation on teeth in a model mouth. **Journal of Dental Research**, v.69, n.2, p.483-488, 1990.

PRATTEN, J.; WILSON, M. Antimicrobial susceptibility and composition of microcosm dental plaques supplemented with sucrose. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.43, n.7, p.1595-1599, 1999.

ROSENTRITT M, HAHNEL S, GRÖGER G, MÜHLFRIEDEL B, BÜRGERS R, HANDEL G. Adhesion of *Streptococcus mutans* to various dental materials in a laminar flow chamber system. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 86, n. 1, p. 36-44, Jul. 2008

RUBY, J.; BARBEAU, J. The buccale puzzle: The symbiotic nature of endogenous infections of the oral cavity. **Canadian Journal of Infection Disease**, v.13, n.1, p.34-41, 2002.

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

SARKIS-ONOFRE, R.; SKUPIEN, J. A.; CENCI, M. S.; MORAES, R. R.; PEREIRA-CENCI, T. The role of resin cement on bond strength of glass-fiber posts luted into root canals: a systematic review and meta-analysis of in vitro studies. **Operative Dentistry**, v.39, n.1, p.E31-44, 2014.

SCHWENDICKE, F.; DORFER, C.; KNEIST, S.; MEYER-LUECKEL, H.; PARIS, S. Cariogenic effects of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG in a dental biofilm model. **Caries Research**, v.48, n.3, p.186-192, 2014.

SEEMANN, R.; BIZHANG, M.; KLUCK, I.; LOTH, J.; ROULET, J. F. A novel in vitro microbial-based model for studying caries formation--development and initial testing. **Caries Research**, v.39, n.3, p.185-190, 2005.

SEEMANN, R.; KLUCK, I.; BIZHANG, M.; ROULET, J. F. Secondary caries-like lesions at fissure sealings with Xeno III and Delton--an in vitro study. **Journal Dentistry**, v.33, n.5, p.443-449, 2005.

SEEMANN, R.; KLUCK, I.; KAGE, A. An in vitro microbial-based model for studying caries-preventive agents. **Acta Odontologica Scandinavica**, v.64, n.1, p.27-30, 2006.

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

SHU, M.; BROWNGARDT, C. M.; CHEN, Y. Y.; BURNE, R. A. Role of urease enzymes in stability of a 10-species oral biofilm consortium cultivated in a constant-depth film fermenter. **Infection and Immunity**, v.71, n.12, p.7188-7192, 2003.

SHU, M.; WONG, L.; MILLER, J. H.; SISSONS, C. H. Development of multi-species consortia biofilms of oral bacteria as an enamel and root caries model system. **Archives Oral Biology**, v.45, n.1, p.27-40, 2000.

SHUMI, W.; LIM, J.; NAM, S.-W.; LEE, K.; KIM, S. H.; KIM, M.-H.; CHO, K.-S.; PARK, S. Environmental factors that affect *Streptococcus mutans* biofilm formation in a microfluidic device mimicking teeth. **BioChip Journal**, v.4, n.4, p.257-263, 2010.

SIMONSSON, T.; HVID, E. B.; RUNDEGREN, J.; EDWARDSSON, S. Effect of delmopinol on in vitro dental plaque formation, bacterial acid production and the

number of microorganisms in human saliva. **Oral Microbiology and Immunology**, v.6, n.5, p.305-309, 1991.

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

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

SISSONS, C. H.; CUTRESS, T. W.; FAULDS, G.; WONG, L. pH responses to sucrose and the formation of pH gradients in thick 'artificial mouth' microcosm plaques. **Archives Oral Biology**, v.37, n.11, p.913-922, 1992.

SISSONS, C. H.; CUTRESS, T. W.; HOFFMAN, M. P.; WAKEFIELD, J. S. A multi-station dental plaque microcosm (artificial mouth) for the study of plaque growth, metabolism, pH, and mineralization. **Journal of Dental Research**, v.70, n.11, p.1409-1416, 1991.

SISSONS, C. H.; WONG, L.; CUTRESS, T. W. Patterns and rates of growth of microcosm dental plaque biofilms. **Oral Microbiology and Immunology**, v.10, n.3, p.160-167, 1995.

SISSONS, C. H.; WONG, L.; CUTRESS, T. W. Inhibition by ethanol of the growth of biofilm and dispersed microcosm dental plaques. **Archives Oral Biology**, v.41, n.1, p.27-34, 1996.

SISSONS, C. H.; WONG, L.; HANCOCK, E. M.; CUTRESS, T. W. The pH response to urea and the effect of liquid flow in 'artificial mouth' microcosm plaques. **Archives Oral Biology**, v.39, n.6, p.497-505, 1994.

SISSONS, C. H.; WONG, L.; SHU, M. Factors affecting the resting pH of in vitro human microcosm dental plaque and *Streptococcus mutans* biofilms. **Archives Oral Biology**, v.43, n.2, p.93-102, 1998.

SORVARI, R.; SPETS-HAPPONEN, S.; LUOMA, H. Efficacy of chlorhexidine solution with fluoride varnishing in preventing enamel softening by *Streptococcus mutans* in an artificial mouth. **Scandinavian Journal of Dental Research**, v.102, n.4, p.206-209, 1994.

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

TAKAHASHI, N.; NYVAD, B. The role of bacteria in the caries process: ecological perspectives. **Journal of Dental Research**, v.90, n.3, p.294-303, 2011.

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

TEN CATE, J. M. Biofilms, a new approach to the microbiology of dental plaque. **Odontology**, v.94, n.1, p.1-9, 2006.

TENUTA, L. M.; RICOMINI FILHO, A. P.; DEL BEL CURY, A. A.; CURY, J. A. Effect of sucrose on the selection of mutans streptococci and lactobacilli in dental biofilm formed in situ. **Caries Research**, v.40, n.6, p.546-549, 2006.

THNEIBAT, A.; FONTANA, M.; COCHRAN, M. A.; GONZALEZ-CABEZAS, C.; MOORE, B. K.; MATIS, B. A.; LUND, M. R. Anticariogenic and antibacterial properties of a copper varnish using an in vitro microbial caries model. **Operative Dentistry**, v.33, n.2, p.142-148, 2008.

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

TOTIAM, P.; GONZALEZ-CABEZAS, C.; FONTANA, M. R.; ZERO, D. T. A new in vitro model to study the relationship of gap size and secondary caries. **Caries Research**, v.41, n.6, p.467-473, 2007.

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

VICKERMAN, M. M.; JONES, G. W. Sucrose-dependent accumulation of oral streptococci and their adhesion-defective mutants on saliva-coated hydroxyapatite. **Oral Microbiology and Immunology**, v.10, n.3, p.175-182, 1995.

WHITE, D. J. The application of in vitro models to research on demineralization and remineralization of the teeth. **Advances Dental Research**, v.9, n.3, p.175-193; discussion 194-177, Nov. 1995.

WIMPENNY, J. W. The validity of models. **Advances Dental Research**, v.11, n.1, p.150-159, 1997.

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

WONG, L.; SISSONS, C. H. Human dental plaque microcosm biofilms: effect of nutrient variation on calcium phosphate deposition and growth. **Archives Oral Biology**, v.52, n.3, p.280-289, 2007.

WONG, L.; SISSONS, C. H.; PEARCE, E. I.; CUTRESS, T. W. Calcium phosphate deposition in human dental plaque microcosm biofilms induced by a ureolytic pH-rise procedure. **Archives Oral Biology**, v.47, n.11, p.779-790, 2002.

XIE, Q.; LI, J.; ZHOU, X. Anticaries effect of compounds extracted from *Galla chinensis* in a multispecies biofilm model. **Oral Microbiol Immunol**, v.23, n.6, p.459-465, 2008.

YIP, H. K.; GUO, J.; WONG, W. H. Protection offered by root-surface restorative materials against biofilm challenge. **Journal of Dental Research**, v.86, n.5, p.431-435, 2007.

YIP, H. K.; GUO, J. H.; WONG, W. H. Incipient caries lesions on cementum by mono- and co-culture oral bacteria. **Journal Dentistry**, v.35, n.5, p.377-382, 2007.

YUE, S. L.; ZHOU, X. D.; LI, J. Multibacterial artificial plaque. A model for studying carious process. **Chinese Medical Journal**, v.105, n.1, p.25-29, 1992.

ZAMPATTI, O.; ROQUES, C.; MICHEL, G. An in vitro mouth model to test antiplaque agents: preliminary studies using a toothpaste containing chlorhexidine. **Caries Research**, v.28, n.1, p.35-42, 1994.

ZAURA, E.; BUIJS, M. J.; HOOGENKAMP, M. A.; CIRIC, L.; PAPETTI, A.; SIGNORETTO, C.; STAUDER, M.; LINGSTROM, P.; PRATTEN, J.; SPRATT, D. A.; WILSON, M. The effects of fractions from shiitake mushroom on composition and cariogenicity of dental plaque microcosms in an in vitro caries model. **Journal Biomedicine and Biotechnology**, v.2011, 135034, 2011.

Apêndices

Apêndice A. Termo de consentimento livre e esclarecido



Universidade Federal de Pelotas
Faculdade de Odontologia
Programa de Pós-Graduação em Odontologia

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Titulo do projeto: **ESTABELECIMENTO E VALIDAÇÃO DOSE-RESPOSTA DE UM MODELO DE BIOFILME DE MICROCOSMOS EM FLUXO CONTÍNUO.**

Pesquisadora responsável pelo estudo: Tamires Timm Maske (Tel. 91269830)

Eu, _____
_____ documento de identidade nº _____, concordo em participar da pesquisa “Estabelecimento e validação dose-resposta de um modelo de biofilme de microcosmos em fluxo contínuo” com a doação de saliva para reprodução em laboratório das condições presentes na boca através de um modelo que simule o ambiente bucal e o crescimento de seus microorganismos.

A coleta de saliva será realizada na clínica odontológica da Pós-graduação da Faculdade de Odontologia (UFPEL) pelo pesquisador responsável, em uma única vez. Sei que o procedimento oferece risco mínimo a minha saúde, uma vez que necessitarei passar 24 horas sem realizar a minha higiene oral. Sei também que esse risco é anulado pela escovação dentária e limpeza com fio dental que realizarei após a coleta da saliva.

Se houver necessidade de algum tratamento dentário para adequação de minhas necessidades bucais, sei que o tratamento será realizado pelo pesquisador responsável na clínica odontológica da Pós-graduação da Faculdade de Odontologia e não haverá nenhum custo.

Sei que minha identidade não será revelada, que as informações sobre os exames e tratamentos odontológicos somente serão vistas pelos pesquisadores e que será mantida a minha privacidade quando da divulgação dos dados em revistas de odontologia. Sei também que a divulgação dos dados dessa pesquisa me trará benefícios indiretos relacionados ao tratamento da doença cárie.

Estou ciente que uma cópia desse documento ficará comigo e que os pesquisadores garantem respostas as minhas perguntas e esclarecimentos sobre minhas dúvidas. Além disso, sei que os pesquisadores me garantem a gratuidade de todas as etapas da presente pesquisa.

Pelotas, ____ de _____ de 2__.

Assinatura do voluntário

Assinatura do pesquisador

Apêndice B. Representação tridimensional da câmara do simulador

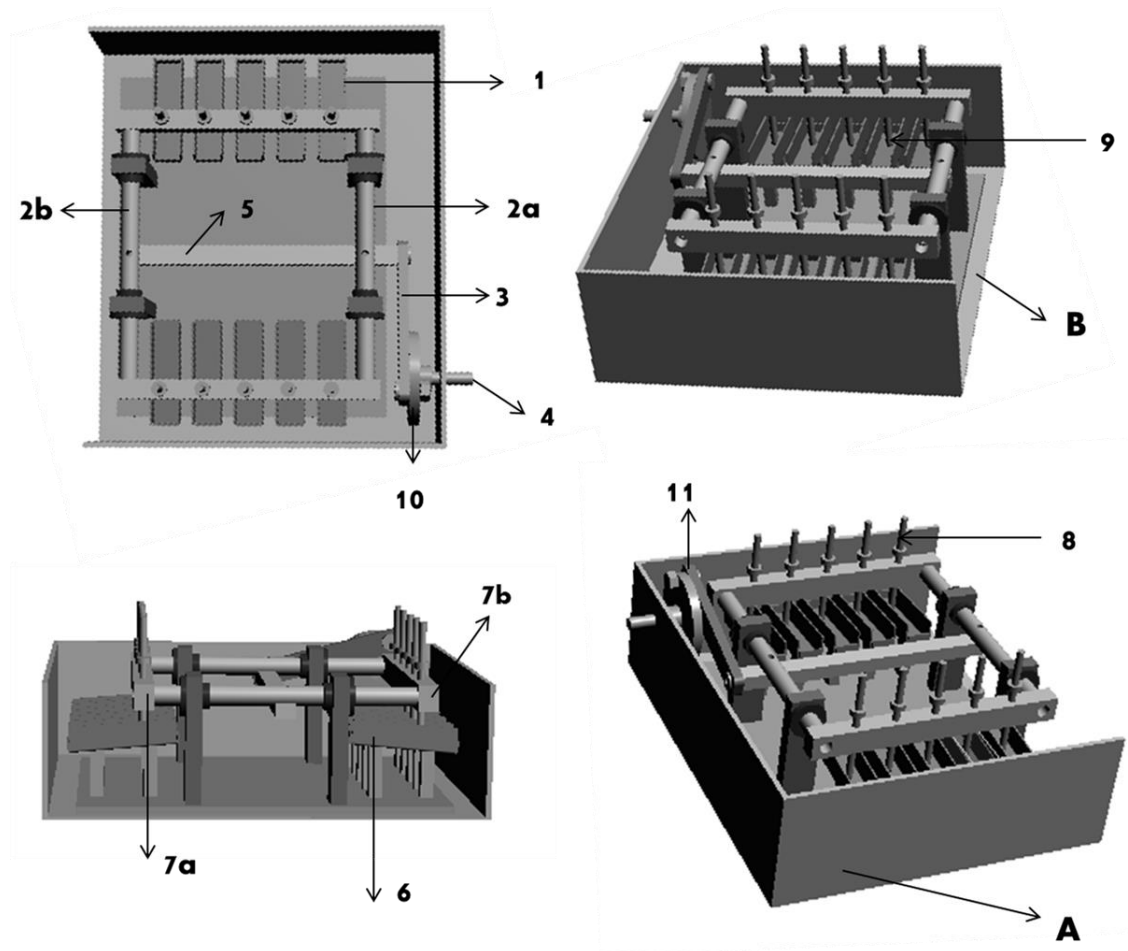


Figura 1 - Representação tridimensional da câmara do dispositivo (0.30 x 0.28 x 0.18m). **Elementos 1-** Unidades individuais de acomodação (0.0835x0.023x0.0095m); **2a e 2b** – Braços de articulação; **3-** braço ligado a polia e aos outros braço de articulação 2a e 2b; **4-** eixo do motor; **5-** Braço de articulação central; **6-** Unidades de acomodação individual vista lateral; **7a e 7b-** braços articulados sobre as unidades e transpassados pelas hastes cilíndricas; **8-** haste cilíndrica superior; **9-** haste cilíndrica inferior; **10-** polia; **11-** Porção articulada da polia ao braço (3); **Porção A-** Parede lateral da câmara; **Porção B-** Base da câmara. **Somente os elementos 1, 6, 7a, 7b foram utilizadas para o modelo de biofilme. As outras partes citadas permaneceram inertes e sem função.*

Anexos

Anexo A. Aprovação comitê de ética em pesquisa

FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE
PELOTAS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ESTABELECIMENTO E VALIDAÇÃO DOSE-RESPOSTA DE UM MODELO DE BIOFILME DE MICROCOSMOS EM FLUXO CONTÍNUO

Pesquisador: Maximiliano Sérgio Cenci

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 23941413.6.0000.5317

Instituição Proponente: Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Pelotas

Patrocinador Principal: MINISTERIO DA CIENCIA, TECNOLOGIA E INOVACAO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 453.023

Data da Relatoria: 31/10/2013

Apresentação do Projeto:

O biofilme dental está diretamente envolvido na etiologia da doença cárie. A análise dos mecanismos que envolvem a sua formação e desenvolvimento podem auxiliar em um melhor entendimento do surgimento e progressão da cárie dentária, bem como definir seu tratamento mais efetivo. Assim, metodologias que permitem investigar as interações presentes no conjunto formado pelo tecido dental e biofilme cariogênico são essenciais para o avanço em pesquisa pré-clínica. O objetivo desse trabalho, portanto, será o desenvolvimento de um modelo de biofilme, em câmara de fluxo, que tenha capacidade de mimetizar os eventos mediados pelo biofilme dental que ocorre em condições clínicas na cavidade bucal, tais como oscilações de pH, sucessões microbianas e o surgimento de lesões de cárie. Será realizado um estudo in vitro, no qual serão formados biofilmes em câmaras de fluxo sobre discos de esmalte, tendo como inóculo saliva humana (microcosmos) que serão crescidos independentemente por 3, 6, 10 e 14 dias (n=8). Serão realizados 3 experimentos independentes relacionados ao desenvolvimento do modelo, a validação doseresposta

à Clorexidina e a reprodutibilidade. No primeiro, será realizado o crescimento microbiano por até 14 dias, em meio definido de mucina (DMM) associado com pulsos de sacarose. No segundo ocorrerá crescimento microbiano por até 6 dias para diferentes concentrações de

Endereço: Rua Prof Araujo, 465 sala 301

Bairro: Centro

CEP: 96.020-360

UF: RS

Município: PELOTAS

Telefone: (53)3284-4960

Fax: (53)3221-3554

E-mail: cep.famed@gmail.com

FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE
PELOTAS



Continuação do Parecer: 453.023

Clorexidina (CLX) e no terceiro, uma condição de CLX associada a 6 dias de crescimento microbiano será selecionada para o experimento. As análises serão compostas por determinação das alterações em esmalte decorrente ao processo de desafio cariogênico por microdureza de superfície e longitudinal, e composição microbiológica do biofilme através da contagem das unidades formadoras de colônias.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo geral é desenvolver um modelo de biofilme de microcosmos em fluxo contínuo para o estudo de aspectos relacionados ao desenvolvimento de lesões de cárie dental.

Os objetivos específicos serão validar o presente modelo através da avaliação de dose-resposta a Clorexidina e testar a sua reprodutibilidade.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

O trabalho oferece risco mínimo, pois suspender a escovação 24h oferece, ainda que temporariamente, danos ao paciente.

Benefícios:

O paciente apresentando atividade de cárie receberá o tratamento necessário baseado em seu exame clínico bucal completo. Todos os tratamentos necessários serão realizados na clínica odontológica da Pós-graduação da Faculdade de Odontologia de Pelotas (UFPEL) e não haverá custo algum para o doador.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Será realizado um estudo in vitro, completamente aleatorizado, no qual serão formados biofilmes em câmaras de fluxo sobre discos de esmalte, tendo como inóculo saliva (microcosmos) de um voluntário adulto e saudável. Os biofilmes serão crescidos independentemente por até 14 dias sobre discos de esmalte presentes nas câmaras de fluxo.

Serão realizados 3 experimentos independentes: o primeiro para desenvolvimento do modelo (experimento 1), o segundo para validação dose-resposta à CLX (experimento 2), e o terceiro para testar a reprodutibilidade do modelo (experimento 3).

Em todos os experimentos, as variáveis de resposta serão obtidas por: determinação das alterações em esmalte por microdureza de superfície e longitudinal e por composição microbiológica do biofilme.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

OK

Endereço: Rua Prof Araujo, 465 sala 301

Bairro: Centro

CEP: 96.020-360

UF: RS

Município: PELOTAS

Telefone: (53)3284-4960

Fax: (53)3221-3554

E-mail: cep.famed@gmail.com

FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE
PELOTAS



Continuação do Parecer: 453.023

Recomendações:

OK

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

OK

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PELOTAS, 11 de Novembro de 2013

Assinador por:
Patricia Abrantes Duval
(Coordenador)

Endereço: Rua Prof Araujo, 465 sala 301

Bairro: Centro

CEP: 96.020-360

UF: RS

Município: PELOTAS

Telefone: (53)3284-4960

Fax: (53)3221-3554

E-mail: cep.famed@gmail.com