

CENTRO UNIVERSITÁRIO SAGRADO CORAÇÃO

GABRIEL DOMINGUES CAMILOTI

AVALIAÇÃO DO EFEITO DE UMA NOVA CISTATINA DERIVADA DA CANA-DE-  
AÇÚCAR (CANECPI5) SOBRE A VIABILIDADE DE BIOFILME MICROCOSMO E A  
PREVENÇÃO DA DESMINERALIZAÇÃO DO ESMALTE

BAURU

2020

GABRIEL DOMINGUES CAMILOTI

AVALIAÇÃO DO EFEITO DE UMA NOVA CISTATINA DERIVADA DA CANA-DE-  
AÇÚCAR (CANECPI5) SOBRE A VIABILIDADE DE BIOFILME MICROCOSMO E A  
PREVENÇÃO DA DESMINERALIZAÇÃO DO ESMALTE

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado como parte dos requisitos  
para obtenção do título de bacharel em  
Odontologia - Centro Universitário  
Sagrado Coração.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr. Thiago Amadei  
Pegoraro

BAURU- SP

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com  
ISBD

C183a	<p>Camiloti, Gabriel Domingues</p> <p>Avaliação do efeito de uma nova cistatina derivada da cana-de-açúcar (caneçpi-5) sobre a viabilidade de biofilme microcosmo e a prevenção da desmineralização do esmalte / Gabriel Domingues Camiloti. -- 2020. 28f. : il.</p> <p>Orientador: Prof. Dr. Thiago Amadei Pegoraro</p> <p>Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia) - Centro Universitário Sagrado Coração - UNISAGRADO - Bauru - SP</p> <p>1. Agentes antimicrobianos. 2. Biofilme dentário. 3. CaneCPI-5. 4. Cárie dentária. I. Pegoraro, Thiago Amadei. II. Título.</p>
-------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

GABRIEL DOMINGUES CAMILOTI

AVALIAÇÃO DO EFEITO DE UMA NOVA CISTATINA DERIVADA DA CANA-DE-  
AÇÚCAR (CANECPI-5) SOBRE A VIABILIDADE DE BIOFILME MICROCOSMO E A  
PREVENÇÃO DA DESMINERALIZAÇÃO DO ESMALTE

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado como parte dos requisitos  
para obtenção do título de bacharel em  
Odontologia - Centro Universitário  
Sagrado Coração.

Aprovado em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_.

Banca examinadora:

---

Prof. Dr. Thiago Amadei Pegoraro (Orientador)  
Centro Universitário Sagrado Coração

---

Me. Vinicius Taióqui Pelá  
Universidade Federal de São Carlos

---

Prof. Dr. Joel Ferreira Santiago Junior  
Centro Universitário Sagrado Coração

*Dedico este trabalho a minha família e  
amigos.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a todos que contribuíram no decorrer desta jornada, especialmente:

A Deus, por me dar forças para continuar a fazer aquilo que gosto.

A minha família que sempre me apoiou nos estudos e nas escolhas tomadas e que sempre estiveram ao meu lado, trabalhando duro para que eu pudesse realizar meu sonho.

Agradeço a professora Dra. Marília Afonso Rabelo Buzalaf e o Me. Vinicius Taióqui Pelá pela oportunidade de realizar três iniciações científicas durante minha graduação e por todo o apoio e aprendizado adquirido na área de pesquisa.

Agradeço ao órgão de fomento FAPESP pelo financiamento das pesquisas.  
Processo: 2018/02345-9

E meus maiores agradecimentos a todos os professores desta instituição por nos passar toda a sabedoria e experiência na área, em especial o professor Dr. Thiago Amadei Pegoraro pela disposição para nos instruir da melhor forma e pelo seu comprometimento com a docência, nos inspirando e mostrando o quão linda é a odontologia e a diferença que podemos fazer na vida das pessoas.

Aos meus colegas, hoje amigos, por fazer esses quatro anos uma das experiências mais incríveis que já tive, sem vocês não seria o mesmo.

*"Só porque você enfrenta adversidades e dificuldades, isso não é nenhuma razão para desistir deste mundo. Uma pessoa, disposta a jogar fora todas as memórias de seus amigos e companheiros, nunca vai encontrar paz de espírito. Se você perseverar e suportar, alguém vai estar lá para apoiá-lo."*

*HATAKE, K.*

## RESUMO

Na odontologia, diversas doenças como a cárie e erosão dentária têm sido estudadas. Recentemente, uma nova cistatina derivada da cana-de-açúcar (CaneCPI-5) foi produzida em sistema de expressão heteróloga e demonstrou uma alta capacidade de ligação ao esmalte, protegendo contra a erosão dentária *in vitro*. Entretanto, o efeito protetor da CaneCPI-5 contra a cárie dentária, causada por ácidos produzidos por microrganismos estruturalmente organizados em um biofilme, em decorrência do consumo de açúcares, nunca foi estudado. O objetivo deste trabalho será avaliar o efeito de diferentes concentrações da CaneCPI-5 sobre a viabilidade de um biofilme microcosmo e na prevenção da desmineralização do esmalte. Para a formação do biofilme microcosmo, será coletada a saliva de 10 indivíduos saudáveis, que não tenham escovado os dentes nas últimas 24h e que não tenham bebido líquidos ou ingerido alimentos nas últimas 2h. A saliva será diluída (70% saliva e 30% glicerol), e posteriormente misturada à saliva artificial de McBain (1:50) para formação do biofilme cariogênico. Amostras (4 mm x 4 mm) de esmalte bovinos (n= 48) serão preparadas para a formação do biofilme microcosmo por 5 dias, o qual será tratado diariamente (1x60s/dia) com as concentrações de CaneCPI-5 0,1 ou 1,0 mg/ml, clorexidina 0,12% (controle positivo), ou PBS (controle negativo). No Ensaio 1, as bactérias vivas e mortas no biofilme serão evidenciadas por fluorescência com microscópio confocal. No Ensaio 2, a desmineralização provocada pelo biofilme nas condições estudadas será mensurada por microradiografia transversal. Os dados serão submetidos à análise estatística apropriada (teste paramétrico ou não paramétrico,  $p < 0,05$ ).

**Palavras-chave:** Agentes antimicrobianos; biofilme dentário; CaneCPI-5; cárie dentária.

## ABSTRACT

Evaluation of effect of a new cystatin derived from sugarcane on the viability of microcosm biofilm and on enamel demineralization prevention in dentistry, various diseases such as caries and tooth erosion have been studied. Recently, a new cystatin derived from sugarcane (CaneCPI-5) was produced in a heterologous expression system and was shown to strongly bind to enamel, protecting against tooth erosion *in vitro*. However, the protective effect of CaneCPI-5 against dental caries, caused by acids produced by bacteria organized in a biofilm, after sugar consumption, has never been evaluated. The objective of this study is to evaluate the effect of different concentrations of CaneCPI-5 on the viability of a microcosm biofilm as well as on the prevention of enamel demineralization. For the formation of a microcosm biofilm, saliva will be collected from 10 healthy subjects, who have not brushed their teeth in the last 24 hours and have not ingested food or drinking liquids in the last 2 hours. Saliva will be diluted (70% saliva and 30% glycerol) and further mixed to McBain saliva (1:50) for the formation of a cariogenic biofilm. Bovine enamel samples (4 mm x 4 mm) (n=48), will be prepared for the formation of a microcosm biofilm for 5 days, which will be treated daily (1x60s/day), with two concentrations of CaneCPI-5 (0.1 or 1.0 mg/ml), 0.12% chlorhexidine (positive control) or PBS (negative control). In Step 1, live and dead bacteria in the biofilm will be evidenced by fluorescence using confocal microscope. In Step 2, the demineralization caused by the biofilm in the studied conditions will be measured by transverse microradiography. The data will be subjected to appropriate statistical (parametric or non-parametric test,  $p < 0.05$ ).

**Key-words:** Antimicrobial agent; dental biofilm; CaneCPI-5; dental caries.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### FIGURAS

Figura 1: Gráfico de bactérias vivas e mortas .....22

### TABELAS

Tabela 1: Média e d.P. da porcentagem de bactérias vivas e mortas após os tratamentos e formação do biofilme por 5 dias .....23

Tabela 2: Perda mineral e profundidade da lesão do esmalte bovino sob tratamento com diferentes soluções no biofilme microcosmo formado em 5 dias.....23

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>12</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>16</b>
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
<b>3. METODOLOGIA</b> .....	<b>17</b>
3.1 EXPRESSÃO HETERÓLOGA DA CANECPI-5.....	17
3.2 PREPARO DAS AMOSTRAS DE ESMALTE E GRUPOS DE TRATAMENTO .....	18
3.3 FORMAÇÃO DO BIOFILME MICROCOSMO E TRATAMENTO .....	19
3.4 ENSAIOS .....	20
3.4.1 <i>Ensaio 1: Análise da viabilidade do biofilme por microscopia confocal</i> .....	20
3.4.2 <i>Ensaio 2: Análise da desmineralização por microradiografia transversal</i> .....	21
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	22
<b>4 RESULTADOS</b> .....	<b>22</b>
<b>5. DISCUSSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>24</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>26</b>

## 1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A cárie dentária é uma doença multifatorial, que acomete a estrutura dentária (esmalte e dentina), causada pela presença de microrganismos estruturalmente organizados em um biofilme. Estes microrganismos podem ser classificados como acidogênicos e ácido tolerantes (*Streptococcus mutans*, *S. sobrinus* e *Lactobacillus casei*), que alteram o pH do biofilme a partir do metabolismo da sacarose, oriunda da dieta, causando a desmineralização da estrutura dentária.

No Brasil, a maior incidência da cárie dentária está nas regiões Norte e Nordeste, apesar de todos os programas voltados à prevenção e promoção à saúde bucal. A prevalência da cárie dentária está associada a fatores socioeconômicos, sendo mais suscetíveis aqueles indivíduos com baixo acesso à educação e com higiene bucal precária.

De acordo com o último levantamento epidemiológico de saúde bucal realizado no Brasil, percebemos que houve um declínio na prevalência das lesões de cárie, devido ao uso de fluoreto e programas educativos. Segundo os dados do levantamento de 2010 no Brasil, a doença encontra-se polarizada, concentrando as piores condições em populações desfavorecidas. Segundo os dados 46,6% das crianças aos 5 anos de idade estão livres de cárie, 43,5% aos 12 anos, 23,9% entre 15 anos a 19 anos e 0,9% entre 35 a 44 anos. Apesar da prevalência e severidade terem diminuído ao longo dos anos, a cárie dentária interfere negativamente na qualidade de vida do paciente.

Como já descrito anteriormente um dos principais fatores associados à cárie dentária é o acúmulo de biofilme devido à má higienização. O biofilme dentário é formado por uma comunidade de microrganismos que se agrupam tridimensionalmente por coadesão sobre a superfície da estrutura dentária, sendo os principais microrganismos cariogênicos *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus*, bifidobactérias e fungos. *Streptococcus mutans*, além de produzirem ácidos, produzem polissacarídeos extracelulares insolúveis a partir da sacarose na matriz

funcional, tendo assim maior eficiência metabólica e proteção contra os mecanismos de defesa do hospedeiro, aumentando a sua virulência.

A primeira cistatina de cana-de-açúcar produzida em sistema de expressão heteróloga foi denominada Canacistatina (CaneCPI-1). Esta proteína apresentou atividade inibitória contra cisteíno peptidases, inclusive catepsinas humanas. Além da CaneCPI-1, outras 5 cistatinas de cana-de-açúcar foram produzidas de forma recombinante e estudadas quanto à sua atividade inibitória. A proteína CaneCPI-4 apresentou expressiva atividade inibitória contra catepsinas humanas B e L. Recentemente foram identificadas e caracterizadas duas novas cistatinas da cana-de-açúcar: CaneCPI-5 e CaneCPI-6. A cistatina CaneCPI-5 mostrou atividades muito semelhantes àsquelas da CaneCPI-4, sendo capaz de inibir eficientemente um grande número de cisteíno peptidases, incluindo a Catepsina B, que se apresenta resistente à inibição por cistatinas. Por outro lado, mostrou-se bem mais solúvel quando produzida em sistema de expressão bacteriano, o que facilita a sua produção e purificação. Desta forma, por acumular estas características desejáveis, será a escolhida para ser testada no presente projeto, na tentativa de proteger a cárie dentária. Devido à homologia existente entre cistatinas de plantas e animais e ao baixo custo de produção das cistatinas de plantas, as mesmas podem ser excelentes alternativas para inserção em produtos odontológicos visando à prevenção da cárie e erosão dentária. Um experimento recentemente concluído pelo nosso grupo de pesquisa avaliou efeito da modificação da película adquirida pela incorporação da canacistatina CaneCPI-5 na proteção do esmalte contra a erosão inicial *in vitro*. No terceiro dia, todos os tratamentos com cistatinas (54,4±8,6, 55,5±10,7 e 53,1±9,3% para cistatina B, CaneCPI-5 e CaneCPI-5 aplicada antes da formação da película) reduziram significativamente a (surface hardness change / alteração da dureza superficial - %SHC) em comparação ao controle. Em adição, o tratamento com a CaneCPI-5 antes da formação da película reduziu significativamente - %SHC em comparação à combinação mucina/caseína (64,4±9,4%). Convém ressaltar que as concentrações de cistatina B e de CaneCPI-5 empregadas no presente estudo foram determinadas, na verdade pela disponibilidade que tínhamos de cistatina B no nosso laboratório. Por ser este um reagente muito caro (R\$ 3000,00 o frasco com 50 µg), ao adquirirmos 50 µg da

proteína a concentração máxima que conseguimos utilizar para tratar os 15 espécimes do grupo foi de 0,025  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ . Assim, utilizamos a mesma concentração de CaneCPI-5 no experimento, para que pudéssemos ter uma comparação fidedigna. Recentemente, avaliamos o efeito de concentrações crescentes de CaneCPI-5 (entre 0,025 e 1,0  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) em solução na proteção contra a erosão inicial *in vitro*. No primeiro dia de avaliação, as concentrações de 0,1 e 1,0  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  inibiram completamente a erosão inicial, mas a diferença entre as mesmas não foi significativa, o que indica que a melhor concentração a ser empregada de CaneCPI-5 em solução, para prevenção da erosão inicial, é 0,1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ . Em um outro estudo realizado em colaboração com o Prof. John Michael Edwardson, da Universidade de Cambridge, a CaneCPI-5 na concentração de 0,086  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  foi acoplada a pontas de nitrido de silicone de um microscópio de força atômica (AFM) através de um ligante de polietilenoglicol flexível, sendo feitas medições de força de interação com o esmalte bovino. A força medida para a  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  foi de  $0,933\pm 0,108$  nN, cerca de 6 vezes maior (significativo) em relação ao controle ( $0,177\pm 0,031$  nN). As forças obtidas para mucina e caseína não diferiram do controle. Também foram feitas imagens topográficas de amostras de esmalte recobertas com mucina 2,7  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , caseína 10  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  e CaneCPI-5 0,086  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , antes e após incubação com ácido cítrico (0,65%, pH 3,4 por 1 min). Apenas a CaneCPI-5 protegeu o esmalte contra o dano induzido pelo ácido cítrico.

Estes resultados deixam claro o grande potencial da CaneCPI-5 em prevenir a erosão dentária pela sua capacidade de interação com o esmalte dentário. Trata-se ainda de uma proteína de baixo custo de produção e alta estabilidade, o que a torna ideal para inclusão em produtos odontológicos, inclusive voltados para a prevenção da cárie dentária. Nosso grupo de pesquisa está terminando a redação de um pedido de patente intitulado “Cistatinas recombinantes da cana-de-açúcar (CaneCPI-5) e sua aplicação para a diminuição da erosão dentária”, que será brevemente submetido ao INPI, tendo como titulares a Universidade Federal de São Carlos, Universidade de São Paulo e a Universidade de Cambridge. Entretanto, antes que novos produtos sejam desenvolvidos para inserção no mercado são necessários mais estudos, em especial testando o efeito protetor da CaneCPI-5 sobre a viabilidade de biofilme microcosmo e a prevenção da desmineralização do esmalte, já que um estudo

prévio do nosso grupo de pesquisa mostrou que a concentração de cistatina B foi aumentada cerca de 13 vezes na película adquirida do esmalte *in vivo* após um bochecho com ácido láctico, o que sugere que a cistatina é capaz de proteger o esmalte contra ácidos bacterianos. Em adição, devido ao fato de inibir cisteíno peptidases, incluindo a catepsina B, é provável que a CaneCPI-5 apresente propriedades antimicrobianas.

Dentre os modelos laboratoriais para a realização dos testes *in vitro*, o biofilme microcosmo é o que mais se aproxima da situação clínica. O modelo de biofilme microcosmo tenta mimetizar o ambiente bucal, reproduzindo as condições de

um biofilme supragengival que pode ser cariogênico uma vez exposto à sacarose. O modelo de biofilme microcosmo possibilita comunidades microbianas complexas e heterogêneas a partir da saliva humana, com a vantagem de ser produzido em um ambiente controlado. Os microcosmos formados *in vitro* incluem aproximadamente 60% das espécies provenientes do inóculo original, sendo que a sua composição pode ser alterada de acordo com a quantidade de sacarose fornecida e as condições de crescimento.

Portanto, o presente projeto visa comparar diferentes concentrações da solução CaneCPI-5 utilizando um modelo de biofilme microcosmo, o qual é mais semelhante ao biofilme desenvolvido *in vivo*, em relação às alterações de viabilidade, assim como avaliar o impacto destas soluções sobre o desenvolvimento da cárie dentária (desfecho mais importante) *in vitro*.

Assim, torna-se de grande interesse avaliar o efeito da CaneCPI-5 na proteção contra a cárie dentária, pela sua possível capacidade antimicrobiana e de proteção do esmalte e dentina contra ácido bacterianos.

## 2. OBJETIVOS

Comparar o efeito antimicrobiano e anticariogênico de duas concentrações da CaneCPI-5 na viabilidade microbiana e na prevenção da desmineralização do esmalte bovino utilizando um modelo de biofilme microcosmo.

### 2.1 Objetivos específicos

- Comparar a porcentagem de bactérias vivas e mortas presentes no biofilme entre os tratamentos, por fluorescência utilizando microscópio confocal;
- Comparar a desmineralização do esmalte (perda mineral e profundidade da lesão) provocada pelo biofilme microcosmo submetido aos tratamentos por microrradiografia transversal.

### **3. METODOLOGIA**

#### **Coleta da saliva e critérios de inclusão dos participantes**

Primeiramente o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos – CEP/FOB-USP, CAAE: 86780918.5.0000.5417. Os participantes da pesquisa foram selecionados de acordo com critérios de inclusão e exclusão e, concordando em participar, os mesmos leram a carta de informação e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

A saliva de 10 indivíduos saudáveis, estudantes do curso de Pós-graduação em Ciências Odontológicas Aplicadas, área de Estomatologia e Biologia Oral, da Faculdade de Odontologia de Bauru (22-35 anos de idade) foi coletada. Os doadores deveriam apresentar os seguintes critérios de inclusão: 1) fluxo salivar adequado (estimulado > 1 mL/min e não estimulado > 0,3 mL/min), 2) histórico de lesões cariosas mas não cárie ativos (com lesões de mancha branca ativa ou lesões cavitadas), 3) sem sinais de gengivite/periodontite (presença de sangramento e mobilidade dentária) e 4) não terem ingerido antibióticos nos últimos 3 meses. Os critérios de exclusão incluíam as condições opostas as apresentadas acima, assim como indivíduos com doenças sistêmicas crônicas, fumantes, gestantes e lactantes.

No dia da coleta, os participantes não escovaram os dentes por 24 h e não ingeriram comidas e líquidos nas 2 h anteriores à coleta de saliva estimulada realizada por mastigação de borracha. A coleta da saliva foi realizada sob imersão em gelo, às 9h, por 10 min, individualmente, em um ambiente refrigerado. O volume de saliva total foi diluído em glicerol (70% saliva e 30% glicerol). Alíquotas de 1 ml foram armazenadas a

-80°C para uso subsequente (Pratten et al., 2003).

#### **3.1 Expressão heteróloga da CaneCPI-5**

A expressão heteróloga da CaneCPI-5 foi realizada sob a coordenação do Prof. Flávio Henrique Silva, na UFSCAR. Foi utilizada uma cepa bacteriana *E. coli* Rosetta (DE3), transformada com o plasmídeo pET28aCaneCPI-5. A proteína expressa foi purificada da fração solúvel de culturas bacterianas induzidas por IPTG (Isopropil-beta- D-Thiogalactosídeo), submetidas a centrifugação e sonicação. A

purificação foi feita por cromatografia de afinidade, utilizando colunas contendo resina de níquel Ni-NTA Superflow (Qiagen), conforme descrito previamente.

### **3.2 Preparo das amostras de esmalte e grupos de tratamento**

Sessenta amostras de esmalte bovino (4 mm x 4 mm) foram preparadas. Previamente ao preparo, os dentes bovinos passaram por um processo de triagem e limpeza (remoção de tecido mole) para posterior início do corte. Para tal, foi feita a separação das porções radicular e coronária. O dente íntegro, foi colado em placa acrílica com godiva termoativa (Kerr Corporation, Orange, CA, EUA) e adaptada em máquina de corte de precisão ISOMET Low Speed Saw (Buehler Ltd., Lake Bluff, IL, EUA), com o auxílio de disco diamantado (Extec Diamont Wafering Blade, Enfield, CT, EUA) foi feito um corte na região amelocementária, assim separando a porção radicular da porção coronária.

Após a separação, cada espécime (esmalte bovino) foi colado em placas contendo godiva e foi feita sua secção. Para isso, foi utilizado espaçador contendo 4 mm de espessura e dois discos diamantados. Após ter feito o corte em sentido longitudinal, o dente então foi reposicionado e feito seu corte no sentido horizontal. Vale lembrar que este corte em velocidade baixa tinha seu aumento de temperatura constantemente controlado pela imersão em água deionizada (a fim de se evitar o aquecimento do espécime).

As amostras 4 mm x 4 mm foram polidas com lixas de granulação 320 (Extec, EUA) para planificação da dentina e obtenção de amostras com 2,5 - 3,0 mm de espessura, e com lixas de granulação 600 (Extec, EUA) por 30 s, para remoção das ranhuras do esmalte e padronização da rugosidade, utilizando uma politriz metalográfica (Arotec, Brasil) .

A média de desgaste do esmalte pelo polimento foi de  $0,29 \pm 0,12$  mm. A rugosidade aritmética do esmalte foi aferida utilizando o perfilômetro de contato (Marh, Alemanha) e o software Marh Surf XCR20, para a seleção e alocação das amostras nos grupos experimentais, de forma que todos os grupos tivessem amostras com condições iniciais similares (média de  $R_a$ :  $0,170 \pm 0,065$   $\mu\text{m}$ ). Foram excluídas as amostras com média de  $R_a$  inferior a 0,100 e superior a 0,300  $\mu\text{m}$  ou

com manchas brancas. Na sequência, 2/3 da superfície das amostras foram protegidos com esmalte cosmético de unha para obtenção de áreas controle (híidas).

As amostras foram esterilizadas por exposição ao gás óxido de etileno por 4 horas sob pressão de  $0,5 \pm 0,1$  Kgf/cm<sup>2</sup>, ao início de cada experimento (Acecil Central de Esterilização COM. IND. LTDA - Campinas /SP). As amostras (total: 48 amostras) foram então divididas em 4 grupos de acordo com a média de rugosidade aritmética: 1) CaneCPI-5 0,1 mg/ml; 2) CaneCPI-5 1,0 mg/ml; 3) Clorexidina 0,12% (controle positivo); 4) PBS (controle negativo).

### **3.3 Formação do Biofilme microcosmo e Tratamento**

O estoque de saliva humana-glicerol (inoculo) foi diluído em saliva artificial McBain (2009): mucina - tipo II gástrica de porco 2,5 g/L; peptona bacteriológica 2,0 g/L; triptona 2,0 g/L; extrato de levedura 1,0 g/L; NaCl 0,35 g/L, KCl 0,2 g/L; CaCl<sub>2</sub> 0,2 g/L; cloreto de cisteína 0,1 g/L; haemina 0,001 g/L; vitamina K1 0,0002 g/L, pH 7, na proporção de 1:50 (inóculo: saliva Mc Bain). Foram utilizadas placas de 24 poços contendo 20 amostras de esmalte bovino por ensaio (n=4 poços/grupo, triplicata biológica). Cada poço contendo as amostras de esmalte foi preenchido com 1,5 mL de inoculo + saliva Mc Bain e a placa incubada a 5% de CO<sub>2</sub>, a 37°C por 8 h. Somente no primeiro dia do processo de formação do biofilme utilizou-se o inoculo. As outras trocas do meio somente envolveram a saliva artificial de McBain que foi então suplementada com sacarose a 0,2%.

Após as 8 h iniciais, o meio foi removido, as amostras foram lavadas com PBS por 5 s e receberam 1,5 mL de meio fresco (saliva artificial de McBain suplementada com sacarose a 0,2%), e foram incubadas a 5% de CO<sub>2</sub>, 37°C por 16h, completando as 24 h iniciais. A cada 24 h, o meio foi trocado até completar 5 dias de cultivo.

A partir do 2º dia, antes da troca do meio, o biofilme foi lavado com PBS por 5 s e então tratado com os enxagatários bucais, uma vez ao dia. Para tal, as amostras foram expostas a 1 mL de cada tratamento por 60 s. Na sequência, a solução foi removida e a amostra gentilmente lavada com PBS por 5 s. Na

sequência, meio fresco foi adicionado ao poço. A imagem 6 explica a sequência dos procedimentos de cultivo e tratamento.

### **3.4 Ensaios**

#### **3.4.1 Ensaio 1: Análise da viabilidade do biofilme por microscopia confocal**

Primeiramente realizou-se o preparo do corante em fluxo laminar, utilizando o Kit L7007 LIVE/DEAD. Com o auxílio de uma micropipeta foi retirado 1  $\mu$ L de cada eppendorf (A e B) do kit e então adicionado a outro eppendorf com 1 mL de PBS, sob agitação em vórtex.

As bactérias presentes no biofilme foram lavadas com 1 mL de PBS por 5 s para a retirada das bactérias pouco aderidas ao biofilme. Após a retirada do PBS, as amostras foram coradas durante 15 min com 10  $\mu$ L do corante diluído em PBS por poço sob ausência de luz.

As imagens foram capturadas utilizando o programa Leica Application Suite-Advanced Fluorescence acoplado ao Microscópio Confocal de Varredura a Laser Leica TCS SPE (LAS AF, Leica Mannheim, Alemanha). O microscópio percorreu a amostra verticalmente, a cada 1  $\mu$ m de espessura, mostrando imagens das bactérias vivas (em verde) e mortas (em vermelhas) em cada leitura, em um total de três leituras para cada amostra.

As imagens foram superpostas utilizando o software bioImageL 2.0, que propicia avaliação da espessura e distribuição do biofilme assim como da proporção de bactérias vivas e mortas (%). Os dados de cada campo foram tabulados em planilha do excel e as médias de cada amostra por grupo foram obtidas.

O experimento foi realizado em triplicata biológica contendo em cada experimento um n=3 por grupo. Os dados (% bactérias vivas e % bactérias mortas) foram estatisticamente analisados utilizando o Graph Pad Software (San Diego, USA). Após a verificação da homogeneidade (Bartlett) e normalidade (Kolmogorov & Smirnov) optou-se pela comparação entre os grupos utilizando ANOVA seguida do teste Tukey-Kramer. O nível de significância adotado foi de 5% (n=9).

### 3.4.2 Ensaio 2: Análise da desmineralização por microradiografia transversal TMR

As amostras de esmalte e dentina oriundas do ensaio de viabilidade foram cortadas longitudinalmente para análise da desmineralização por microradiografia transversal (TMR). Metade da amostra foi adicionalmente seccionada longitudinalmente no centro da superfície, por meio de um aparelho de corte de precisão (Buehler, EUA), e polida manualmente com lixas de granulação 600 e 1200 (Extec, EUA), possibilitando a obtenção de vários fragmentos com a espessura apropriada para a análise (aproximadamente 100  $\mu\text{m}$  para esmalte). Este corte possibilitou a obtenção de espécimes com as áreas protegidas (hígida) e desmineralizada pelo biofilme.

As amostras foram coladas com fita adesiva no porta-amostra, contendo o padrão de alumínio com diferentes espessuras, o qual gera diferentes gradações de cinza ("stepwedge"). O porta amostra foi inserido no cassete, juntamente à placa de vidro em ambiente escuro, sendo o cassete envolvido em um saco preto e inserido dentro do gerador de raio X (Softex, Japão). Dessa forma, a placa de vidro foi sensibilizada pelo raio-x (20 kV e 20 mA) por 13 minutos. Após cada exposição, a placa de vidro foi revelada, fixada em ambiente escuro a 20°C e lavada.

A análise da imagem foi realizada utilizando microscópio (Zeiss, Alemanha) com câmera CCD (Canon, Japão) e acessórios acoplado a um computador com software 2012 para captura e 2006 para a análise (Inspektor Research System bv, Holanda). A perda mineral ( $\Delta Z$ ) e profundidade da lesão ( $\mu\text{m}$ ) foram calculadas a partir de valores de cinza de microradiografias padrão usando a fórmula de Angmar et al. 1963.

O  $\Delta Z$  (%vol. $\mu\text{m}$ ) é o produto da diferença entre a porcentagem de volume mineral do esmalte sadio (87%) ou dentina sadia (50%) e porcentagem de volume mineral do esmalte ou dentina desmineralizados e a profundidade da lesão ( $\mu\text{m}$ ). A profundidade da lesão é definida pela distância da superfície (ld, 0% vol min) até a profundidade em que esmalte ou dentina apresenta um conteúdo mineral igual ou maior que 95% do conteúdo mineral do esmalte ou dentina hígidos ( $\mu\text{m}$ ) (Arends and Bosch, 1992). Os dados de cada amostra foram tabulados em planilha do Excel e as médias de duas imagens de cada grupo foram obtidas

### **3.5 Análise estatística**

Os dados referentes a perda mineral integrada (%vol min.µm) e profundidade de lesão (µm) (Ensaio 2) foram tabulados e submetidos à análise estatística utilizando programas Graph Pad Software (San Diego, EUA). Verificou-se se os dados apresentam distribuição normal e se eram homogêneos (teste de Kolmogorov e Smirnov/ teste de Bartlett, respectivamente). Após esta verificação foi aplicado o teste estatístico mais adequado (Kruskal-Wallis/Dunnn). O nível de significância adotado em todos os testes foi de 5%.

## 4 RESULTADOS

### Viabilidade do biofilme

Todas as soluções de tratamento, exceto 0,1 mg / mL CaneCPI-5, tiveram um desempenho igual e foram capazes de reduzir significativamente o número de bactérias vivas e aumentar o número de bactérias mortas em comparação com o controle negativo (PBS) (Fig.1). Além disso, CaneCPI-5 a 0,1 mg / mL não diferiu significativamente de CaneCPI-5 de 1,0 mg / mL e clorexidina 0,12% (Fig. 1).

Figura 1: Gráfico comparativo entre os tratamentos em relação ao número de bactérias vivas e mortas

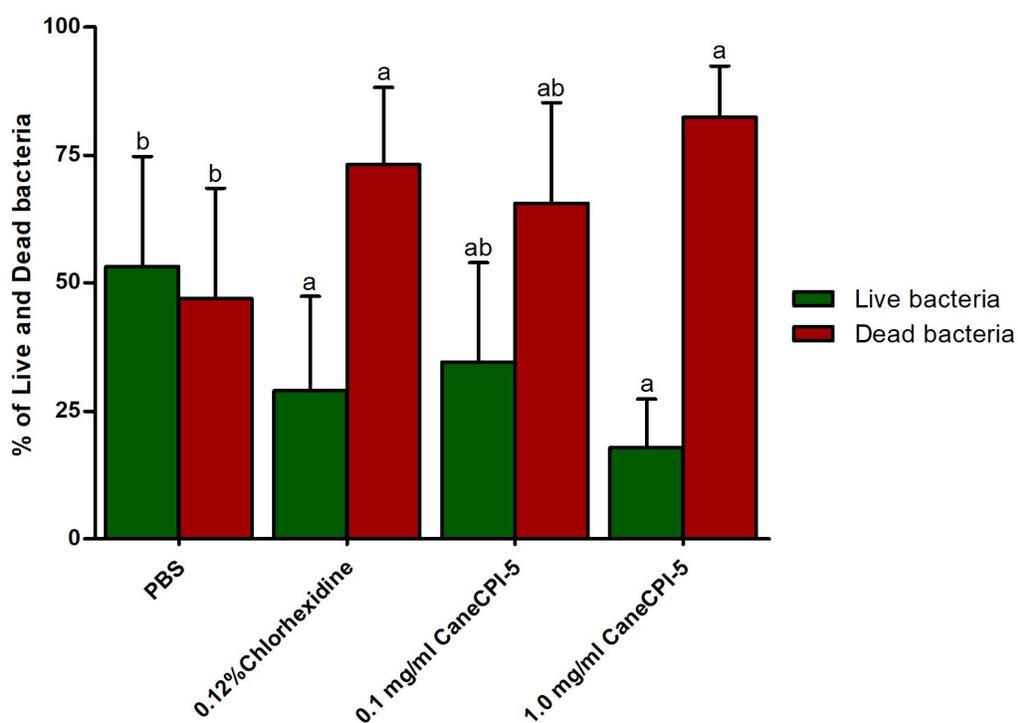


Tabela 1: Média e d.P. da porcentagem de bactérias vivas e mortas após os tratamentos e formação do biofilme por 5 dias

Tratamentos	% Bactérias vivas	% Bactérias mortas
PBS (controle negativo)	53.10±21.64	46.90±21.64
CaneCPI-5 0,1 mg/ml	34.57±19.30	65.62±19.64
CaneCPI-5 1,0 mg/ml	17.97±9.4	82.37±10.01
Clorexidina 0,12%	28.99±18.29	73.13±15.07

### Microrradiografia transversal (TMR)

Com relação à perda mineral, apenas a clorexidina 0,12% teve desempenho significativamente melhor do que o PBS, mas não diferiu significativamente da CaneCPI-5 0,1 mg / mL.

Tabela 2: Perda mineral e profundidade da lesão do esmalte bovino sob tratamento com diferentes soluções no biofilme microcosmo formado em 5 dias.

<b>Treatments</b>	<b><math>\Delta Z</math> (%vol.<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>Lesion depth (<math>\mu\text{m}</math>)</b>
<b>PBS</b>	8030 (7213-9115) <sup>b</sup>	166 (135-240) <sup>b</sup>
<b>0.12% Chlorhexidine</b>	2610 (1683-4343) <sup>a</sup>	78 (64-101) <sup>a</sup>
<b>0.1 mg/mL CaneCPI-5</b>	7850 (5718-8668) <sup>ab</sup>	158 (124-185) <sup>b</sup>
<b>1.0 mg/mL CaneCPI-5</b>	8100 (7435-9108) <sup>b</sup>	149 (124-198) <sup>b</sup>

Para cada variável, as médias seguidas de letras distintas são significativamente diferentes (teste de Kruskal-Wallis e Dunns,  $p < 0,05$ ).  $n = 12$

## 5. DISCUSSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com a alta prevalência das lesões de cárie, vários estudos têm sido realizados para promover o controle da progressão da doença. Assim, esse trabalho buscou alternativas viáveis de aplicação de agentes preventivos da progressão da doença cárie. Diante disso, foi utilizado como tratamento um novo conceito, utilizando uma proteína derivada da cana-de-açúcar.

Com os resultados obtidos foi possível observar através das imagens obtidas de um campo do biofilme microcosmo submetido aos diferentes tratamentos utilizando microscopia confocal, que o grupo contendo a proteína derivada da cana-de-açúcar (CaneCPI-5) na concentração de 1,0 mg/ml apresentou um efeito antimicrobiano (reduzindo o número de bactéria vivas), quando comparado ao nosso grupo controle (PBS). Porém, este mesmo efeito não foi tão expresso para o grupo da (CaneCPI-5) na concentração de 0,1 mg/ml.

Além da CaneCPI-5, o grupo contendo Clorexidina 0,12% também foi capaz de reduzir o número de bactérias vivas e aumentar o número de bactérias mortas em comparação ao PBS ( $p < 0,0001$ ). Em adição, a clorexidina é considerada como grande importância a alternativa mais utilizada na prevenção de lesões cariosas, pois estes compostos tem a capacidade de interferir no equilíbrio dinâmico da dês/remineralização. (Tagomori, Morioka 1989; May et al., 2013). Um estudo de Fernandez Y Mostajo e colaboradores, avaliou o efeito do enxaguatório Perioaid®, contendo clorexidina 0,12% sobre o biofilme microcosmo formado a partir de saliva com placa dentária. Os resultados mostraram que a clorexidina reduziu significativamente a quantidade de espécies microbianas após contagem da UFC/ml.

Por outro lado, a análise da desmineralização por microradiografia transversal (TMR) permitiu avaliar a progressão da cárie, pois esta técnica tem a capacidade de medir a perda mineral integrada, bem como a profundidade da lesão, além de ser possível a visualização da área degradada (Salomão et al., 2016).

Entretanto, diante dos nossos resultados obtidos das análises por TMR, utilizando os mesmos blocos que foram avaliados nas análises por microscopia confocal, obtivemos um resultado diferente, quando comparado com as análises da microscopia. Apenas o grupo da clorexidina a 0,12% apresentou um resultado

significativamente melhor que o grupo do PBS, mas a clorexidina 0,12% não diferiu significativamente do grupo da Cane-CPI-5 0,1 mg/mL.

Acreditamos que os grupos experimentais (Cane-CPI-5) não apresentaram um resultado significativo devido o tempo prolongado de exposição dos espécimes (esmalte bovino) sobre as bactérias cariogênicas presente na saliva aplicada durante o período experimental (5 dias). Já que foi nitidamente observado a cavitação na maioria dos blocos pela TMR. Assim, por se tratar de um estudo pioneiro, envolvendo proteínas recombinantes (Cane-CPI-5), este projeto foi essencial para servir de base para os futuros projetos que serão realizados na sequência.

Em conclusão, sob este modelo experimental, o efeito da CaneCPI-5 não foi refletido em seu potencial anticárie. Entretanto, futuros estudos serão realizados avaliando uma duração reduzida durante o tratamento com a saliva contendo bactérias cariogênicas, já que a cavitação foi observada em muitos espécimes usando este modelo *in vitro*.

## REFERÊNCIAS

- ABRAHAMSON, M., **Cystatins - Protein inhibitors of papain-like cysteine proteinases**. Journal of the Brazilian Association of the Advancement of Science, 1993. 45(5): p. 299-304.
- ANGMAR B, Carlström D, Glas JE. **Studies on the ultrastructure of dental enamel**. IV The mineralization of normal human enamel. J. Ultrastruct. Res. 1963;8:12–33.
- ARENDS J, Ten Bosch JJ. **Demineralization and remineralization evaluation techniques**. J Dent Res. 1992;71:924-928.
- 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, Romano AR, Cenci MS. **Microcosm biofilms originating from children with different caries experience have similar cariogenicity under successive sucrose challenges**. Caries Res. 2011;45:510–517.
- BRAGA AS, Pires JG, Magalhães AC. **Effect of different commercial mouthrinses on the viability and activity of microcosm biofilm and on enamel demineralization**. Biofouling. 2018 (In press).
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Projeto SB Brasil 2010: condições de saúde bucal da população brasileira: resultados principais**. Brasília: Ministério da Saúde; 2011. 92 p.
- COLAK H, Dülgergil ÇT, Dalli M, Hamidi MM. **Early childhood caries update: A review of causes, diagnoses, and treatments**. J Nat Sci Biol Med. 2013;4(1):29–38.
- CUETO AU, Barraza AS, Muñoz DA, Chang S. **Evaluation of an Oral Health Promotion and Preventive Programme: A Case-Control Study**. Oral Health Prev Dent. 2016;14:49-54.
- DELECRODE TR, Siqueira WL, Zaidan FC, Bellini MR, Leite AL, Xiao Y, Rios D, Magalhaes AC, Buzalaf MA: **Exposure to acids changes the proteomic of acquired dentine pellicle**. Journal of dentistry 2015a;43:583-588.

ENGELMANN JL, Tomazoni F, Oliveira MD, Ardenghi TM. **Association between dental caries and socioeconomic factors in schoolchildren-A Multilevel Analysis.** Braz Dent J. 2016;27(1):72-78.

FILOCHE SK, Soma D, van Bekkum M, Sissons CH. **Plaques from different individuals yield different microbiota responses to oral-antiseptic treatment.** FEMS Immunol Med Microbiol. 2008;54:27–36.

FILOCHE SK, Soma KJ, Sissons CH. **Caries-related plaque microcosm biofilms developed in microplates.** Oral Microbiol Immunol. 2007;22:73–79.

GIANOTTI, A., et al., **Inhibitory effect of the sugarcane cystatin CaneCPI-4 on cathepsins B and L and human breast cancer cell invasion.** Biol Chem, 2008. 389(4): p. 447-53.

GIANOTTI, A., et al., **Recombinant expression, purification, and functional analysis of two novel cystatins from sugarcane (*Saccharum officinarum*).** Protein Expr Purif, 2006. 47(2): p. 483-9.

GUPTA P, Gupta N, Singh HP. **Prevalence of dental caries in relation to body mass index, daily sugar intake, and oral hygiene status in 12-year-old school children in Mathura city: a pilot study.** Int J Pediatr.2014:921823.

JAFER M, Patil S, Hosmani J, Bhandi SH, Chalisserry EP, Anil S. **Chemical plaque control strategies in the prevention of biofilm-associated oral diseases.** J Contemp Dent Pract. 2016; 17(4):337-343.

KLEIN MI, DeBaz L, Agidi S, Lee H, Xie G, Lin AH, et al. **Dynamics of *Streptococcus mutans* transcriptome in response to starch and sucrose during biofilm development.** PLoS ONE 2010;5:e13478.

KOLENBRANDER PE. **Oral microbial communities: biofilms, interactions, and genetic systems.** Annu. Rev. Microbiol. 2000;54:413–437.

LEDDER RG, Madhwani T, Sreenivasan PK, De Vizio W, McBain AJ. **An *in vitro* evaluation of hydrolytic enzymes as dental plaque control agents.** J. Med. Microbiol. 2009;58:482–491.

LI F, Weir MD, Fouad AF, Xu HHK. **Effect of salivary pellicle on antibacterial activity of novel antibacterial dental adhesives using a dental plaque microcosm biofilm model.** Dent Mater. 2014;30(2):182–191. 21

MARGIS, R., E.M. Reis, and V. Villeret, **Structural and phylogenetic relationships among plant and animal cystatins.** Arch Biochem Biophys, 1998. 359(1): p. 24-30.

MARSH PD, Moter A, Devine DA. **Dental plaque biofilms**: communities, conflict and control. *Periodontology* 2000. 2011;55:16–35

MARSH PD. **Dental plaque as a microbial biofilm**. *Caries Res*. 2004;38:204-211.

MARTINS MT, Sardenberg F, Vale MP, Paiva SM, Pordeus IA. **Dental caries and social factors**: impact on quality of life in Brazilian children. *Braz Oral Res* [online]. 2015;29(1):1-7. 18

MCBAIN AJ. ***In vitro* biofilm models**: an overview. *Adv Appl Microbiol*. 2009;69:99-132.

MIGUEL, M.C., **Produção recombinante e caracterização de duas cistatinas de cana-de açúcar.**, in Curso de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular. 2014, Universidade Federal de São Carlos: São Carlos. p. 66.

MOIMAZ SAS, Borges HC, Saliba O, Garbin CAS Saliba NA. **Early childhood caries**: epidemiology, severity and sociobehavioural determinants. *Oral Health Prev Dent*. 2016;14:77-83.

MULU W, Demilie T, Yimer M, Meshesha K, Abera B. **Dental caries and associated factors among primary school children in Bahir Dar city**: a cross-sectional study. *BMC Res Notes*. 2014;7(1):949.

NEWBRUN E. **Cariology**. Ed. Williams and Wilkins. 2ª edição. 1983.

OLIVA, M.L., et al., **Inhibitory selectivity of canecystatin**: a recombinant cysteine peptidase inhibitor from sugarcane. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004. 320(4): p. 1082-6.

PRATTEN J, Wilson M, Spratt DA. **Characterization of *in vitro* oral bacterial biofilms by traditional and molecular methods**. *Oral Microbiol Immunol*. 2003;18:45– 49.

RAMOS-JORGE J, Alencar BM, Pordeus IA, Soares MEC, Marques LS, RamosJorge ML, et al. **Impact of dental caries on quality of life among preschool children**: emphasis on the type of tooth and stages of progression. *Eur J Oral Sci*. 2015;123:88– 95.

RUDNEY JD, Chen R, Lenton P, Li J, Li Y, Jones RS, et al. **A Reproducible oral microcosm biofilm model for testing dental materials**. *J Appl Microbiol*. 2012;113(6):1540–1553.

SANTIAGO A. C., et al. **A New Sugarcane Cystatin Strongly Binds to Dental Enamel and Reduces Erosion.** J Dent Res. 2017. 96(9): p. 1051-1057.

SIM CPC, Dashper SG, Reynolds EC. **Oral microbial biofilm models and their application to the testing of anticariogenic agents.** J Dent. 2016;50:1–11. 20

Simón-Soro A, Mira A. **Solving the etiology of dental caries.** Trends Microbiol. 2015; 23(2):76-82.

SOARES-COSTA, A., et al., **A sugarcane cystatin: recombinant expression, purification, and antifungal activity.** Biochem Biophys Res Commun, 2002. 296(5): p. 1194-9. 19

TANG G, Yip HK, Cutress TW, Samaranayake LP. **Artificial mouth model systems and their contribution to caries research: a review.** J Dent. 2003;31:161-171.

WALSH T, Oliveira-Neto JM, Moore D Walsh. **Chlorhexidine treatment for the prevention of dental caries in children and adolescents (Review).** Cochrane Database Syst Rev. 2015; (4):CD008457.

ZHANG K, Cheng L, Imazato S, Antonucci JM, Lin NJ, Lin-Gibson S, et al. **Effects of dual antibacterial agents MDPB and nano-silver in primer on microcosm biofilm, cytotoxicity and dentin bond properties.** J Dent. 2013;41(5):464-474.