

CENTRO UNIVERSITÁRIO SAGRADO CORAÇÃO

FELIPE FÁVARO DE MEDEIROS

AVALIAÇÃO DO EFEITO DE UMA NOVA CISTATINA DERIVADA DA CANA-DE-
AÇÚCAR (CANECPI-5) SOB A VIABILIDADE DE BIOFILME MICROCOSMO:
ESTUDO *IN VITRO*

Bauru
2020

FELIPE FÁVARO DE MEDEIROS

AVALIAÇÃO DO EFEITO DE UMA NOVA CISTATINA DERIVADA DA CANA-DE-
AÇÚCAR (CANECPI-5) SOB A VIABILIDADE DE BIOFILME MICROCOSMO:
ESTUDO *IN VITRO*

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

Orientador: Prof. Dr. Joel F. Santiago
Junior

Bauru
2020

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

| | |
|-------|---|
| M488a | <p>Medeiros, Felipe Fávoro de</p> <p>Avaliação do efeito de uma nova cistatina derivada da cana-de-açúcar (canecpi-5) sob a viabilidade de biofilme microcosmo: estudo in vitro / Felipe Fávoro de Medeiros. -- 2020. 28f. : il.</p> <p>Orientador: Prof. Dr. Joel Ferreira Santiago Junior Coorientadora: Prof.^a Dra. Marília Afonso Rabelo Buzalaf</p> <p>Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia) - Centro Universitário Sagrado Coração - UNISAGRADO - Bauru - SP</p> <p>1. Biofilme dentário. 2. Cárie Dentária. 3. Dentina. 4. Agentes Antimicrobianos. I. Santiago Junior, Joel Ferreira. II. Buzalaf, Marília Afonso Rabelo. III. Título.</p> |
|-------|---|

FELIPE FÁVARO DE MEDEIROS

Avaliação do efeito de uma nova cistatina derivada da cana-de-açúcar (CaneCPI-5)
sob a viabilidade de biofilme microcosmo: estudo *in vitro*

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

Aprovado em: 07/12/2020.

Banca examinadora:

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

Prof. Me. Vinicius Taioqui Pela
Faculdade de Odontologia de Bauru - USP

Prof. Me. João Victor Frazão Câmara
Faculdade de Odontologia de Bauru - USP

Aos meus pais e amigos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais pelo apoio que me deram desde o começo para honrá-los uma graduação.

Agradeço aos meus amigos por estarem sempre ao meu lado ajudando a transformar todo o processo da graduação em momentos felizes.

Agradeço a professora Dr^a Marília Afonso Rabelo Buzalaf e ao João Victor Frazão Câmara pela oportunidade de realizar uma iniciação científica durante minha graduação e por todo aprendizado adquirido na área de pesquisa.

Agradeço ao órgão de fomento FAPESP (Processo 2019/16247-1) pelo financiamento da pesquisa.

Os meus agradecimentos aos professores da graduação por todos os ensinamentos passados com esforço e dedicação. Em especial, agradeço ao Prof. Dr. Joel Ferreira Santiago Junior, pela disposição para nos instruir da melhor forma e pelo seu comprometimento com a docência, nos dando muito apoio e atenção.

Aprendemos quando resolvemos nossas
dúvidas, superamos nossas incertezas e
satisfazemos nossas curiosidades.

(Maria Teresa Mantoan)

RESUMO

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 do esmalte *in vitro*. Em adição, as proteases da matriz são muito importantes para a progressão da cárie em dentina e as cistatinas, incluindo a CaneCPI-5, são inibidores de cisteíno-catepsinas, o que pode ter um efeito adicional na prevenção da cárie em dentina. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de diferentes concentrações da CaneCPI-5 sob a viabilidade de um biofilme microcosmo em dentina. Para a formação do biofilme microcosmo, foi coletada a saliva de 10 indivíduos saudáveis, que escovaram os dentes nas últimas 24h e que não tenham bebido líquidos ou ingerido alimentos nas últimas 2h. A saliva foi 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 dentina bovina (n=45) foram preparadas para a formação do biofilme microcosmo por 5 dias, o qual será tratado diariamente (1x60s/dia) com as concentrações de CaneCPI-5 0,025 e 0,05 mg/ml, clorexidina 0,12% (controle positivo), Fluoreto e PBS (controle negativo). A atividade metabólica do biofilme através da adição de 1,5 ml do corante resazurina diluído em PBS na concentração de 0,0016% e incubadas por um período de 2 h na estufa a 37°C e 5% CO₂. Nas concentrações avaliadas, a CaneCPI-5 não foi capaz de reduzir a atividade metabólica do biofilme de microcosmos em relação ao controle negativo, tendo uma performance menor que a do controle positivo.

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

ABSTRACT

Recently, a new cystatin derived from sugarcane (CaneCPI-5) was produced in a heterologous expression system and demonstrated a high capacity for enamel binding, protecting against enamel erosion *in vitro*. In addition, matrix proteases are very important for the progression of caries in dentin and cystatins, including CaneCPI-5, are cysteine cathepsin inhibitors, which can have an additional effect in preventing dentin caries. The objective of this work was to evaluate the effect of different concentrations of CaneCPI-5 on the viability of a microcosm biofilm in dentin. For the formation of the microcosm biofilm, saliva was collected from 10 healthy individuals who brushed their teeth in the past 24 hours and who have not drunk liquids or ingested food in the past 2 hours. The saliva was diluted (70% saliva and 30% glycerol), and later mixed with McBain's artificial saliva (1:50) to form the cariogenic biofilm. Samples (4 mm x 4 mm) of bovine dentin (n = 45) were prepared for the formation of the microcosm biofilm for 5 days, which will be treated daily (1x60s / day) with the concentrations of CaneCPI-5 0.025 and 0.05 mg / ml, 0.12% chlorhexidine (positive control), Fluorine and PBS (negative control). The metabolic activity of the biofilm through the addition of 1.5 ml of the resazurin dye diluted in PBS at a concentration of 0.0016% and incubated for a period of 2 h in the oven at 37°C and 5% CO₂. In the evaluated concentrations, CaneCPI-5 was not able to reduce the metabolic activity of the microcosm biofilm in relation to the negative control, having a lower performance than that of the positive control.

Keywords: Antimicrobial agents; Dental biofilm; CaneCpi-5; Dental Caries; Dentin.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|---|----|
| Figura 1 – Esquema ilustrativo das etapas de processo de corte, polimento e limpeza das amostras de dentina | 16 |
| Figura 2 – Aspecto final após 2/3 da superfície protegidos com esmalte cosmético de unha para obtenção de áreas controle..... | 17 |
| Figura 3 – Preenchimento com 1,5 mL de inóculo (saliva humana-glicerol + saliva McBain) | 18 |
| Figura 4 – Esquema em fluxograma do cultivo do biofilme microcosmo e o ensaio realizado..... | 19 |
| Figura 5 – Incubação da placa de 48 poços com o reagente de resazurina | 20 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 – Mediana (IC 95%) da atividade metabólica (teste da resazurina) do biofilme de microcosmo formado sobre blocos de dentina bovina por 5 dias, submetido a diferentes tratamentos..... | 22 |
|--|----|

SUMÁRIO

| | | |
|-----|---|----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 12 |
| 2 | OBJETIVO | 14 |
| 3 | METODOLOGIA | 15 |
| 3.1 | Aspectos éticos | 15 |
| 3.2 | Expressão heteróloga da CaneCPI-5 | 15 |
| 3.3 | Coleta da saliva e critérios de inclusão/exclusão dos participantes | 15 |
| 3.4 | Preparo das amostras de dentina e grupos de tratamento..... | 16 |
| 3.5 | Formação do biofilme microcosmo e tratamento | 18 |
| 3.6 | Avaliação da atividade metabólica pelo teste da Resazurina | 19 |
| 3.7 | Análise Estatística | 21 |
| 4 | RESULTADOS | 22 |
| 5 | DISCUSSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS | 23 |
| 6 | REFERÊNCIAS | 25 |

1 INTRODUÇÃO

A cárie dentária é uma das mais importantes doenças crônicas bucais, causada por diferentes espécies de microorganismos acidogênicos e acidúricos, organizados em um biofilme dentário. Estes microorganismos metabolizam açúcares da dieta, especialmente a sacarose, produzindo polissacarídeos extracelulares e ácidos, que alteram o pH do biofilme e induzem a desmineralização dentária (Keyes, 1960; Marsh *et al.*, 2011; Pitts *et al.*, 2017).

Apesar de poder ser facilmente prevenida, a cárie dentária é a doença crônica mais prevalente em todo o mundo, constituindo-se em um importante problema de saúde pública e consumindo recursos consideráveis para o seu tratamento e o de suas sequelas. Sendo a prevalência elevada e suas sequelas indesejáveis, a prevenção é altamente necessária. Devido à sua etiologia multifatorial, várias possibilidades preventivas e terapêuticas têm sido propostas para o controle da cárie (Bowen, 2016).

Recentemente foi identificada e caracterizada uma nova cistatina da cana-de-açúcar, a CaneCPI-5, sendo capaz de inibir eficientemente um grande número de cisteíno-peptidases, incluindo a catepsina B, que se apresenta resistente à inibição por cistatinas. A inibição de catepsina B pode ser importante para a preservação da matriz orgânica desmineralizada da dentina, pois tem-se observado que a expressão de catepsina B, bem como a atividade inespecífica de CCs na dentina cariada são significativamente maiores quando comparadas àquelas da dentina sadia (Nascimento *et al.*, 2011). Em adição, a CaneCPI-5 mostrou-se bem mais solúvel quando produzida em sistema de expressão bacteriano, o que facilita a sua produção e purificação, além de apresentar uma forte aderência a cubetas de quartzo, bem como grande força de ligação ao esmalte dentário (Santiago *et al.*, 2017).

Desta forma, por acumular as características desejáveis mencionadas acima, a CaneCPI-5 será testada no presente projeto, na tentativa de aumentar a resistência a ácidos da película adquirida, bem como de inibir cisteíno-catepsinas dentinárias, o que pode retardar a progressão da cárie na dentina. Devido à homologia existente entre cistatinas de plantas e animais (Margis *et al.*, 1998) e ao

baixo custo de produção das cistatinas de plantas, e alta estabilidade térmica, as mesmas podem ser excelentes alternativas para inserção em produtos odontológicos visando à prevenção da cárie dentária.

Entretanto, antes que novos produtos sejam desenvolvidos para inserção no mercado são necessários mais estudos, testando a aplicação desta proteína para prevenção da cárie. Especialmente em dentina, espera-se um grande efeito protetor, pelo fato de a proteína poder atuar em 3 frentes: fortalecimento da película adquirida, ação antimicrobiana e inibição de CCs, retardando a degradação da matriz orgânica desmineralizada (Miguel, 2014).

2 OBJETIVO

Analisar o efeito de duas concentrações da CaneCPI-5 na viabilidade microbiana utilizando um modelo de biofilme microcosmo em dentina bovina.

3 METODOLOGIA

3.1 Aspectos éticos

O projeto foi submetido à aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da FOB-USP sob registro CAEE 14953719.1.0000.5417. Os voluntários participaram dessa pesquisa após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Devido à utilização de dentes bovinos, o projeto também foi submetido à aprovação do Comitê de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais sob registro 009/2019.

3.2 Expressão heteróloga da CaneCPI-5

A expressão heteróloga da CaneCPI-5 utilizada no estudo foi realizada sob a coordenação do Prof. Flávio Henrique Silva, na UFSCAR. Foi utilizada a cepa bacteriana *E. coli* Rosetta (DE3), transformada com o plasmídeo pET28aCaneCPI-5, como descrito previamente (Miguel, 2014). 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-NTASuperflow (Soares-Costa et al., 2002; Miguel, 2014).

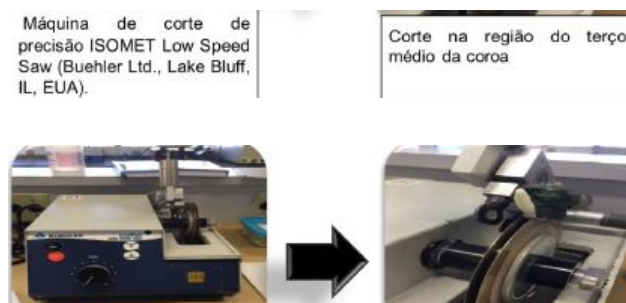
3.3 Coleta da saliva e critérios de inclusão/exclusão dos participantes

A saliva de 10 indivíduos saudáveis, estudantes do curso de Pós-graduação em Ciências Odontológicas Aplicadas da Faculdade de Odontologia de Bauru (25-35 anos de idade) foi coletada. O doador obedeceu aos seguintes critérios de inclusão: 1) fluxo salivar adequado (estimulado > 1 mL/min e não estimulado > 0,3 mL/min), 2) histórico de lesões cáries mas sem cárie ativa (lesões de mancha branca ativa ou lesões cavitadas), 3) sem sinais de gengivite/periodontite (presença de sangramento e mobilidade dentária) e 4) sem ingestão de antibióticos nos últimos 3 meses. Os critérios de exclusão incluíram as condições opostas às apresentadas acima, assim como casos em que o indivíduo apresente doenças sistêmicas crônicas, fumante, gestante ou lactante.

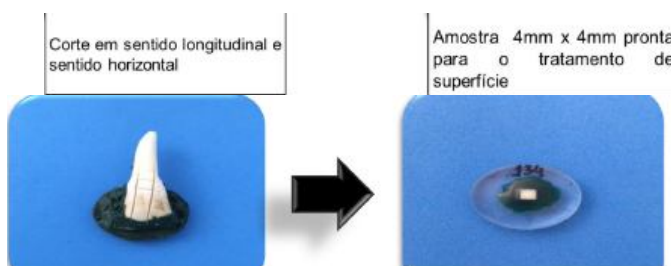
No dia da coleta, os participantes não escovaram os dentes por 24h e se abstiveram da ingestão de comidas e líquidos nas 2h anteriores à coleta de saliva estimulada por mastigação de borracha. A coleta da saliva foi ser realizada no período da manhã (9-10 h), por 10 min, em um ambiente refrigerado e individual, em gelo. O volume de saliva foi coletado e diluído em 70% saliva e 30% glicerol.

3.4 Preparo das amostras de dentina e grupos de tratamento

Quarenta e cinco amostras de esmalte bovino (4 mm x 4 mm) foram preparadas utilizando uma cortadeira de precisão (Buehler, EUA) e discos diamantados para corte. As amostras foram polidas com lixas de granulação 600 (Extec, EUA), utilizando uma politriz (Arotec, Brasil), apenas para remoção de ranhuras/fissuras da superfície. A rugosidade (Ra – rugosidade aritmética média) foi aferida utilizando o perfilômetro de contato (Marh, Alemanha), para a seleção e alocação das amostras nos grupos experimentais de forma que todos os grupos tenham amostras com condições iniciais similares (Ra entre 0,200 e 0,500 μm) (Figura 1). Na sequência, as amostras tiveram 2/3 da superfície protegidos com esmalte cosmético de unha para obtenção de áreas controle (hígida) (Figura 2).



Fonte: Própria autoria.



Fonte: Própria autoria.



Fonte: Própria autoria.

Figura 1: Esquema ilustrativo das etapas de processo de corte, polimento e limpeza das amostras de dentina.



Fonte: Própria autoria.

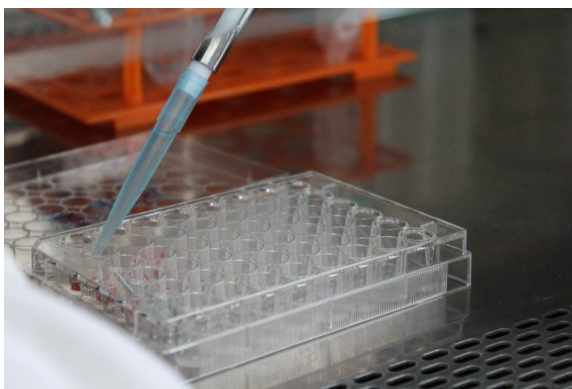
Figura 2: Aspecto final após 2/3 da superfície protegidos com esmalte cosmético de unha para obtenção de áreas controle.

A amostras foram divididas em 5 grupos experimentais (n=9): 1) PBS (controle negativo), 2) clorexidina 0,12% (controle positivo), 3) Fluoreto (500ppm NaF), 4) CaneCPI-5 0,025 mg/ml e 5) CaneCPI-5 0,05 mg/ml. Previamente ao início do experimento, foram esterilizadas por exposição ao gás óxido de etileno por 4 h sob pressão de $0,5 \pm 0,1$ Kgf/cm² previamente ao experimento (ACECIL CENTRAL DE ESTERILIZAÇÃO COM. IND. LTDA - Campinas /SP).

3.5 Formação do biofilme microcosmo e tratamento

Antes da exposição à saliva humana, as amostras foram tratadas com as soluções proteicas, fluoreto, clorexidina e PBS (no caso dos controles positivo e negativo, respectivamente), por 1 min (1,5ml por poço), para que houvesse ligação das proteínas a serem testadas à superfície da dentina.

A saliva humana coletada foi diluída em saliva artificial McBain: 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; CaCl₂ 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) (McBain, 2009). Placas de 48 poços contendo amostras de dentina (n=9 dividido em 3 experimentos independentes) foram preenchidas com 1,5 mL de inóculo (saliva humana-glicerol + saliva McBain) e incubadas em estufa de CO₂ à 37°C por 8h (Figura 3). Somente neste primeiro dia do processo de formação do biofilme foi utilizada a saliva humana-glicerol para permitir a colonização inicial. As outras trocas somente envolveram a saliva artificial de McBain suplementada com sacarose 0,2%.



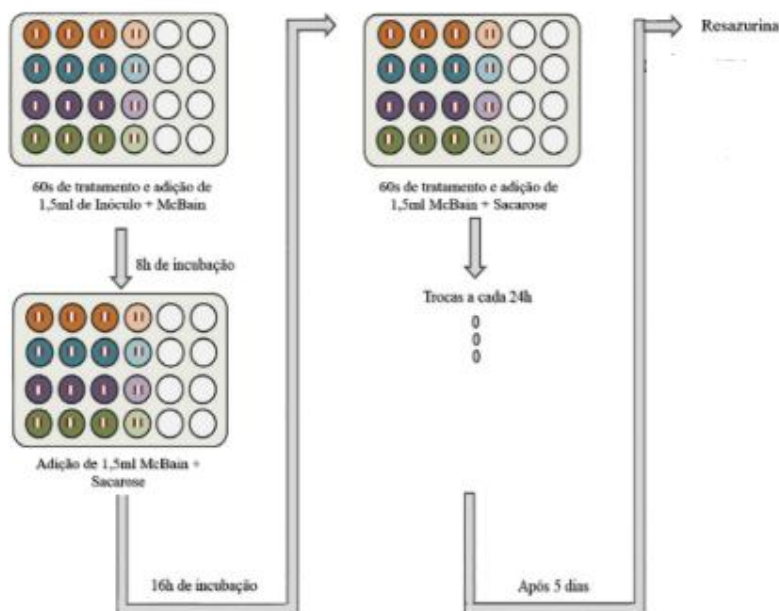
Fonte: Própria autoria.

Figura 3: Preenchimento com 1,5 mL de inóculo (saliva humana-glicerol + saliva McBain).

Após as 8h iniciais, as amostras foram lavadas com PBS durante 5s e 1,5 mL de meio fresco (saliva artificial de McBain) suplementado com sacarose 0,2% foi adicionado em cada poço e incubadas em estufa de CO₂ à 37°C por 16h,

completando as 24h iniciais. A cada 24h, o meio foi trocado até completar 5 dias de cultivo.

A partir do 2º dia de crescimento do biofilme, antes da troca do meio, o biofilme foi tratado, uma vez ao dia. Para tal, as amostras foram expostas a 1,0 ml de solução de tratamento. Após 60s, a solução foi removida e o meio fresco foi adicionado ao poço (Figura 4).



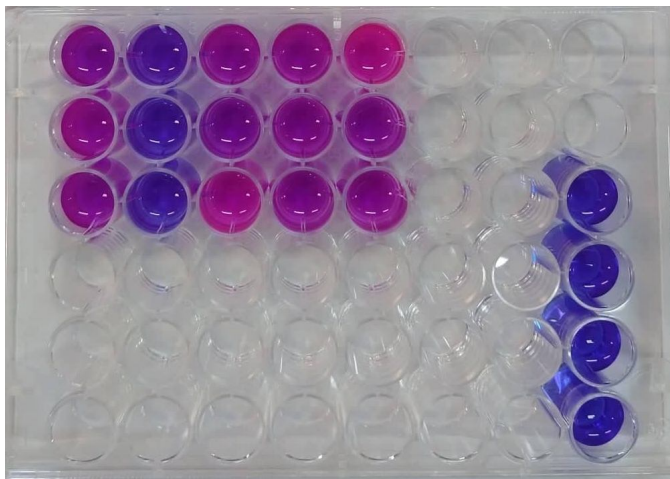
Fonte: Própria autoria.

Figura 4: Esquema em fluxograma do cultivo do biofilme microcosmo e o ensaio realizado.

3.6 Avaliação da atividade metabólica pelo teste da Resazurina

A atividade metabólica do biofilme foi determinada, com algumas modificações. Após exposição aos diferentes tratamentos, os espécimes foram lavados com 1,5 ml de PBS para remover as bactérias mortas/não aderentes. Posteriormente, os espécimes foram alocados para outras 3 placas de 48 poços estéreis, nas quais foi adicionada a quantidade de 1,5 ml do corante resazurina diluído em PBS na concentração de 0,0016%. As placas foram protegidas com papel alumínio e então incubadas por um período de 2h na estufa a 37°C e 5% CO₂. As

microplacas contendo o corante de resazurina (Figura 4) foram levadas para que a leitura fosse realizada. Foi utilizado o leitor de microplaca Synergy H1 (Biotek®) para a leitura em absorvância (570 e 600 nm), acoplado ao software Gen5.



Fonte: Própria autoria

Figura 5: Incubação da placa de 48 poços com o reagente de resazurina.

Dessa maneira, a atividade metabólica do biofilme cariogênico após exposição aos diferentes tratamentos foi determinada baseando-se na porcentagem de viabilidade, que foi calculada pela seguinte fórmula (Alonso *et al.*, 2017):

Porcentagem de Viabilidade =

$$\frac{\epsilon_{OX_{570nm}} \times A_{570nm_{t_0}} - \epsilon_{OX_{570nm}} \times A_{600nm_{t_x}}}{\epsilon_{RED_{570nm}} \times A_{600nm_{t_0}} - \epsilon_{RED_{600nm}} \times A_{570nm_{t_0}}}$$

onde,

- ϵ é o coeficiente de extinção molar para Resazurina (ϵ_{600} 117,216 e ϵ_{570} 80,586; ϵ_{600} 155,677 e ϵ_{570} 14,652);
- A é a absorvância medida em um determinado comprimento de onda;
- t_0 é a primeira medição e t_x é a medida em um determinado momento x .

3.7 Análise Estatística

Foi utilizado o *software* GraphPad InStat versão 3.0 para Windows (GraphPad Software Inc., La Jolla, Ca, USA). Foi aplicado o teste de teste de Kolmogorov-Smirnov para verificar se os dados apresentam distribuição normal e o teste de Bartlett para avaliar a homogeneidade dos mesmos. Após esta checagem inicial, os dados foram avaliados pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn para comparações individuais. O nível de significância adotado foi de 5%.

4 RESULTADOS

O teste de Kruskal-Wallis revelou diferença significativa entre os grupos (KW = 21,236, $p = 0,0003$). O teste de Dunn revelou que apenas a clorexidina 0,12% reduziu significativamente a atividade metabólica do biofilme de microcosmos em relação ao controle negativo e aos grupos tratados ($p < 0,01$), que não diferiram significativamente entre si ($p > 0,05$) (Tabela 1).

Tabela 1. Mediana (IC 95%) da atividade metabólica (teste da resazurina) do biofilme de microcosmo formado sobre blocos de dentina bovina por 5 dias, submetido a diferentes tratamentos.

| Grupos de tratamento | Mediana (IC 95%) |
|-----------------------|----------------------------------|
| PBS | 100,0 (100,0-100,0) ^a |
| Clorexidina 0,12% | 12,5 (6,0 -18,5) ^b |
| NaF 500 ppm | 118,12 (64,8-135,4) ^a |
| CaneCPI-5 0,025 mg/ml | 111,9 (76,6-131,3) ^a |
| CaneCPI-5 0,05 mg/ml | 121,8 (65,9-135,1) ^a |

Letras distintas indicam diferença significativa entre os grupos (Kruskal-Wallis e Dunn, $p < 0,01$). $n=9$.

5 DISCUSSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS

A cárie dentária é uma doença crônica bucal, considerada uma das mais prevalentes mundialmente. Trata-se de uma disbiose, que surge mediante um desequilíbrio no biofilme causado pela ingestão excessiva de açúcares, que leva a uma predominância de microorganismos acidogênicos e acidúricos, os quais promovem a desmineralização dentária (Gupta *et al.*, 2014).

Nesse sentido, a fase inicial da cárie dentária é determinada pelo surgimento da mancha branca ativa, que quando tratada precocemente, evita a cavitação na superfície dentária. Desde a década de 1960 sabe-se que a remoção do biofilme da lesão de mancha branca é capaz de levar à reversão da lesão, sem nenhum tratamento adicional (Dirks, 1961). Entretanto, é muito difícil remover todo o biofilme com a escovação e utilização do fio dental. Dessa forma, a utilização de fluoretos surgiu como um grande aliado da escovação e tem levado ao declínio da prevalência de cárie em todo o mundo, por intervir favoravelmente nas reações de des e remineralização, deslocando o equilíbrio a favor da remineralização (ten Cate & Buzalaf, 2019; Mulu *et al.*, 2014).

Diversos estudos têm investigado alternativas que possam ser tão eficientes como a escovação e como o fluoreto no sentido de prevenir/reverter as lesões cáries, e que possam ser utilizadas de forma segura pela população. Dentre estas alternativas encontra-se a CaneCPI-5, uma cistatina clonada da cana-de-açúcar, com capacidade de inibição de cisteíno-catepsinas, com alta força de ligação à hidroxiapatita, o que a faz inibir a erosão inicial *in vitro* (Santiago *et al.*, 2017) e *in vivo* (Carvalho *et al.*, 2020). Em adição, a CaneCPI-5 tem alta estabilidade térmica e baixo custo de produção. Em virtude destas características, hipotetizamos que a proteína poderia ter um efeito protetor contra a cárie dentinária, atuando em várias frentes. Por se ligar à hidroxiapatita, poderia fortalecer a película adquirida, reduzindo a desmineralização pelos ácidos bacterianos (Santiago *et al.*, 2017). Por inibir cisteíno-catepsinas bacterianas (Santiago *et al.*, 2017; Klein *et al.*, 2016; Kolenbrander, 2000), poderia ter ação antimicrobiana e ao inibir cisteíno-catepsinas dentinárias, poderia retardar a degradação da matriz orgânica desmineralizada (Nascimento *et al.*, 2011; Buzalaf *et al.*, 2015).

Neste trabalho, foi utilizado o modelo de biofilme microcosmo, pois apresenta características desejáveis por mimetizar o ambiente bucal, reproduz as condições de um biofilme supragengival, apresenta comunidades microbianas complexas e é produzido em laboratório (ambiente controlado), o que reduz a possibilidade de viés. (Arthur *et al.*, 2013; Tang *et al.*, 2003). Utilizando este modelo, avaliamos o efeito protetor *in vitro* de diferentes concentrações de CaneCPI-5 em forma de solução, antes e durante a formação do biofilme bacteriano por 5 dias, na atividade metabólica do biofilme de microcosmos formado sobre blocos de dentina bovina dentina, utilizando o teste da resazurina. Trata-se de uma alternativa eficaz para a visualização da leitura de testes em microplacas. Este composto funciona como substrato cromogênico de enzimas desidrogenases, age como indicador de oxirredução, e é reduzido (pelo ganho de hidrogênio) por flavinas ligadas a enzimas relacionadas com o sistema de transporte durante o metabolismo celular (Vaz Crippa *et al.*, 2020).

As concentrações de CaneCPI-5 testadas foram estabelecidas com base em estudo piloto, nos quais foram avaliadas as concentrações de 0,025, 0,05 e 0,1 mg/ml. Levando-se em conta a relação custo/benefício, optamos por avaliar as concentrações mais baixas no presente estudo. Entretanto, nas concentrações avaliadas, a CaneCPI-5 não foi capaz de reduzir a atividade metabólica do biofilme de microcosmos em relação ao controle negativo, tendo uma performance menor que a do controle positivo (clorexidina 0,12%). Estes resultados indicam que sua frente de ação não parece estar relacionada à inibição das cisteíno-catepsinas bacterianas, pelo menos nas concentrações utilizadas no presente estudo. Entretanto, os resultados até aqui obtidos não excluem a possibilidade de que a CaneCPI-5 atue inibindo as cisteíno-catepsinas dentinárias, ou mesmo reforçando a película adquirida e reduzindo o contato com os ácidos bacterianos e, conseqüentemente a desmineralização. Na próxima etapa, faremos avaliações de UFC para microrganismos totais, estreptococos totais, estreptococos mutans e lactobacilos, além de avaliarmos o conteúdo mineral dos blocos de dentina por microrradiografia transversal. Se forem obtidos resultados positivos, a CaneCPI-5 poderá ser incluída em produtos odontológicos visando à prevenção de cárie dentinária, especialmente cárie radicular.

6 REFERÊNCIAS

Alonso B, Cruces R, Perez A, Sanchez-Carrillo C, Guembe M. **Comparison of the XTT and resazurin assays for quantification of the metabolic activity of Staphylococcus aureus biofilm.** *Journal of microbiological methods.* 2017;139:135-7.

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.

Backer Dirks O, Houwink B, Kwant GW. The results of 6 1/2 years of artificial fluoridation of drinking water in the Netherlands. **The Tiel-Culemborg experiment.** *Arch Oral Biol.* 1961;5:284-300.

Bowen WH: **Dental caries - not just holes in teeth! A perspective.** *Mol Oral Microbiol* 2016;31:228-233.

Buzalaf MA, Charone S, Tjaderhane L. 2015. **Role of host-derived proteinases in dentine caries and erosion.** *Caries research.* 49 Suppl 1:30-37.

Carvalho TS, Araújo TT, Ventura TM, Dionizio A, Câmara JVF, Moraes SM, Pelá VT, Martini T, Leme JC, Derbotolli ALB et al. in press. **Acquired pellicle protein-based engineering protects against erosive demineralization.** *J Dent.* 2020;102:103478.

Cheng L, Weir MD, Zhang K, Wu EJ, Xu SM, Zhou X, Xu HH. **Dental plaque microcosm biofilm behavior on calcium phosphate nanocomposite with quaternary ammonium.** *Dent Mater.* 2012; 28:853–862.

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.

Keyes PH: **The infectious and transmissible nature of experimental dental caries. Findings and implications.** Arch Oral Biol 1960;1:304-320.

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.

Margis R, Reis EM, **Villeret V:** Structural and phylogenetic relationships among plant and animal cystatins. Archives of biochemistry and biophysics 1998;359:24-30.

Marsh PD, Moter A, **Devine DA:** Dental plaque biofilms: communities, conflict and control. Periodontol 2000 2011;55:16-35.

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

Miguel MC: **Produção recombinante e caracterização de duas cistatinas de cana-de-açúcar.; in:** Curso de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular. São Carlos, Universidade Federal de São Carlos, 2014, vol Mestrado, p 66.

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.

Nascimento FD, Minciotti CL, Geraldeli S, Carrilho MR, Pashley DH, Tay FR, Nader HB, Salo T, Tjaderhane L, Tersariol IL: **Cysteine cathepsins in human carious dentin.** Journal of dental research 2011;90:506-511.

Pitts NB, Zero DT, Marsh PD, Ekstrand K, Weintraub JA, Ramos-Gomez F, Tagami J, Twetman S, Tsakos G, Ismail A: **Dental caries**. Nat Rev Dis Primers 2017;3:17030.

Santiago AC, Khan ZN, Miguel MC, Gironde CC, Soares-Costa A, Pela VT, Leite AL, Edwardson JM, Buzalaf MAR, Henrique-Silva F: **A New Sugarcane Cystatin Strongly Binds to Dental Enamel and Reduces Erosion**. Journal of dental research 2017;96:1051-1057.

Soares-Costa A, Beltramini LM, Thiemann OH, Henrique-Silva F: **A sugarcane cystatin: recombinant expression, purification, and antifungal activity**. Biochemical and biophysical research communications 2002;296:1194-1199.

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.

Ten Cate JM, Buzalaf MAR. **Fluoride Mode of Action**: Once There Was an Observant Dentist. J Dent Res. 2019;98(7):725-730.

Vaz Crippa G, Zanetti TA, Biazi BI, Baranoski A, Marques LA, Coatti GC, Lepri SR, Mantovani MS. **Up and down-regulation of mRNA in the cytotoxicity and genotoxicity of Plumbagin in HepG2/C3A**. Environ Toxicol Pharmacol. 2020 Apr;75:103328.