

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**

**Curso de Graduação em Biotecnologia**



**Trabalho de Conclusão de Curso**

**CARACTERIZAÇÃO DE BIOFILMES ORAIS FORMADOS *IN SITU* NA  
PRESENÇA E AUSÊNCIA DE CLOREXIDINA**

**Katielle Valente Brauner**

**Pelotas, 2014**

**KATIELLE VALENTE BRAUNER**

**“Caracterização de biofilmes orais formados *in situ* na presença e ausência de clorexidina”**

Trabalho acadêmico apresentado ao Curso de Bacharelado em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Biotecnologista.

Orientador Acadêmico: Prof. Dr. Maximiliano Sérgio Cenci

Orientador de Estágio: CD. Tamires Timm Maske

Pelotas, 2014

**Dados de catalogação na fonte:**

Ubirajara Buddin Cruz – CRB-10/901

Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

**B825c      Brauner, Katielle Valente**

**Caracterização de biofilmes orais formados *in situ* na presença e ausência de clorexidina / Katielle Valente Brauner. – 54f. – Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Biotecnologia). Universidade Federal de Pelotas. Centro de Desenvolvimento Tecnológico. Pelotas, 2014. – Orientador Maximiliano Sérgio Cenci.**

**1.Biotecnologia. 2.Biofilme. 3.VicR. 4.Clorexidina. 5.*In situ* 6.ftf. I.Cenci, Maximiliano Sérgio. II.Título.**

CDD: 660.6

**KATIELLE VALENTE BRAUNER**

**“CARACTERIZAÇÃO DE BIOFILMES ORAIS FORMADOS *IN SITU* NA  
PRESENÇA E AUSÊNCIA DE CLOREXIDINA”**

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado, como requisito parcial para obtenção do grau de Biotecnologista, Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 10/12//2014

Banca Examinadora:

---

Professor Doutor Maximiliano Sérgio Cenci, Doutor em Odontologia pela Universidade Estadual de Campinas, Brasil (2008).

---

Professor Doutor Rafael Ratto de Moraes, Doutor em Odontologia pela Universidade Estadual de Campinas, Brasil (2009).

---

Professor Doutor Vinicius Farias Campos, Doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas, Brasil (2011).

---

Suplente: Cirurgiã Dentista Tamires Timm Maske, Universidade Federal de Pelotas (2012).

Dedico este trabalho aos meus pais, Rogério e Viviane,  
que são minha inspiração e o grande  
motivo de eu ter chego até aqui.

## **Agradecimentos**

Agradeço primeiramente aos meus pais, Rogério e Viviane, por tudo que me ensinaram e fizeram por mim desde meus primeiros dias de vida. Tenho muito orgulho de ser filha de pessoas tão honestas, batalhadoras e determinadas. Os tenho como exemplo pra tudo, e devo e dedico cada uma das minhas conquistas, principalmente essa, a vocês.

À minha irmã Isadora, por todo amor e afeto em todos os momentos.

Aos meus avós Alice, Carlos, Clara e Luíz, que são a base da minha família, e à todos familiares por terem sempre torcido por mim.

À querida amiga, parceira e atual orientadora de estágio, Tamires. Não tenho palavras pra agradecer tudo o que fizeste por mim nesses mais de dois anos trabalhando juntas. Foste uma pessoa sem igual, a qual eu tive muita sorte de encontrar no meu caminho, e espero que continuemos essa parceria por muito tempo.

Ao meu Orientador, Prof. Dr. Maximiliano, por ter me recebido de braços abertos na Faculdade de Odontologia, e ter me dado todas as oportunidades e ensinamentos ao longo da minha Iniciação Científica.

Às minhas amigas e amigos por estarem sempre ao meu lado, me incentivando, dando força em todas as horas, e entendendo minhas ausências, sem vocês tudo seria mais difícil.

Aos queridos: Rodrigo Alex, Tatiana Cenci, e Vinicius Campos por tudo que acrescentaram e colaboraram na execução desse trabalho.

À Carmem, Lizângela e Cácia Signori que sempre estiveram no laboratório dispostas a me ajudar e me acalmar.

Aos meus queridos voluntários: Camila Ferrúa, Leina Nakanishi, Lucas Uarth, Karen Nascimento e Thaianne Schroeder, que não hesitaram em nenhum momento em me ajudar. Obrigada pela ajuda e compreensão de vocês.

E à ATBIOTEC 2014/2 por tudo que vivemos nesses 4 últimos anos, em especial, Ana Sofia e Maitê, que estiveram comigo diariamente durante toda essa trajetória.

*“A utopia está lá no horizonte. Me aproximo dois passos, ela se afasta dois passos. Caminho dez passos e o horizonte corre dez passos. Por mais que eu caminhe, jamais alcançarei. Para que serve a utopia? Serve para isso: para que eu não deixe de caminhar.”*

Eduardo Galeano

## Resumo

BRAUNER, Katielle Valente. “**Caracterização de biofilmes orais formados *in situ* na presença e ausência de clorexidina**”. 2014. 54f. Trabalho de Conclusão de Curso – Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Esse trabalho objetivou avaliar e caracterizar as respostas microbiológicas, minerais, e moleculares produzidas por um modelo de biofilme *in situ* frente a presença e ausência de um antimicrobiano: Clorexidina 0,12% (CLX). O presente estudo *in situ* foi randomizado, cego em relação aos voluntários (n=6) e do tipo boca-dividida, no qual espécimes de esmalte dental bovino foram submetidos a tratamentos em dois níveis: sacarose 20%, 8x/dia (grupo controle), e sacarose 20%, 8x/dia em associação a aplicação de clorexidina 0,12%, 2x/dia (grupo teste). Os espécimes (8 em cada lado) foram inseridos em pequenas recessões presentes nos dispositivos intraorais palatinos recobertos com tela plástica, o que permitiu que todo o biofilme formado sobre os blocos de esmalte dental permanecesse estagnado na superfície do bloco. O biofilme formado foi coletado aos 14 e 21 dias do experimento (n=4 espécimes/dia de coleta/tratamento). O biofilme coletado foi submetido à análise microbiológica, e a expressão dos genes *ftf* e *vicR*. Os espécimes de esmalte avaliados através de teste de microdureza de secção transversal para determinação da perda mineral integradas lesões artificiais de cárie formadas em cada condição experimental. Analisou-se os dados com ANOVA de duas vias e Teste Tukey ( $p < 0,05$ ). Não houve diferença na quantidade de microrganismos encontrados entre os tratamentos ( $p > 0,05$ ). Menores perdas minerais foram encontradas no grupo tratado com CLX aos 14 dias ( $P = < 0,001$ ) e aos 21 dias ( $P = 0,003$ ). O gene *VicR* não apresentou diferenças em relação ao tempo ( $p = 0,3224$ ) nem ao tratamento ( $p = 0,0753$ ). Já para o *ftf*, o teste mostrou que houve diminuição da expressão em relação ao tempo ( $p = 0,0015$ ) ao tratamento ( $p < 0,0001$ ) na expressão deste gene. A CLX não reduziu as contagens de microrganismos, mas foi eficiente na redução de cárie.

Palavras-chave: Biofilme; clorexidina; *VicR*; *ftf*; *in situ*.

## Abstract

BRAUNER, Katielle Valente. **"In situ characterization of oral biofilms formed in chlorhexidine presence or absence"**. 2014. 54f. Completion of course work (undergraduate) - Graduate in Biotechnology. Federal University of Pelotas, Pelotas.

This study aimed to evaluate the effect of 0.12 % Chlorhexidine (CHX) on the microbiological and molecular responses and on the enamel demineralization produced by an in situ biofilm model. This study had a randomized, blinded regarding volunteers (n=6), and split-mouth design, in which bovine enamel discs were submitted to treatments at two levels: 20% sucrose, 8x/day (control group), and 20% sucrose, 8x/day in combination with CHX, 2x/day (test group). Discs were inserted into small recessions present into palatal appliances and covered with a plastic mesh, which enabled biofilm formation. The biofilm formed was collected after 14 and 21 days of experimental time (n=4 discs/day/treatment). Biofilms were submitted to microbiological analysis, and evaluation of *ftf* and *VicR* genes expression. Enamel discs were evaluated by cross-sectional microhardness for integrated mineral loss ( $\Delta S$ ) determination. Data were analyzed with Two-way ANOVA and Tukey's test ( $p < 0.05$ ). There was no difference in the number of microorganisms between treatments ( $p > 0.05$ ). Lower  $\Delta S$  were observed in the CHX group at 14 and at 21 days ( $P < 0.003$ ). *VicR* gene showed no differences over time ( $p = 0.3224$ ) or for treatment ( $p = 0.0753$ ). *ftf* gene expression was increased with longer times ( $p = 0.0015$ ) and in the absence of CHX treatment ( $p < 0.0001$ ). CHX did not show to reduce the counts of microorganisms, however, it was effective in reducing the mineral loss.

Key-words: Biofilm; chlorhexidine; *VicR*; *ftf*; *in situ*.

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1</b> Primers específicos para os genes avaliados.....	31
<b>Tabela 2</b> Contagem de microrganismos totais, S. mutans, Acidúricos e Lactobacilos na presença e ausência de clorexidina nos dois tempos experimentais. Média em log (Desvio padrão).....	34

## Lista de figuras

<b>Figura 1</b> Desenho esquemático dos dispositivos acrílicos.....	29
<b>Figura 2</b> Estudo piloto: comportamento dos microrganismos antes e depois da aplicação de clorexidina 0,12%.....	33
<b>Figura 3</b> Média da perda de dureza integrada ( $\Delta S$ ) dos espécimes de esmaltes frente aos tratamentos nos dois tempos experimentais.....	34
<b>Figura 4</b> Expressão relativa de mRNA frente aos tratamentos nos dois tempos experimentais.....	35

## Sumário

<b>1</b>	<b>Introdução</b>	12
<b>2</b>	<b>Objetivos</b>	14
<b>3</b>	<b>Revisão bibliográfica</b>	15
3.1	Biofilme dental	15
3.2	Cárie dental	16
3.2.1	Influência da dieta na formação de lesões de cárie	17
3.3	Principais microrganismos envolvidos no biofilme	18
3.3.1	Streptococos do grupo mutans	18
3.3.2	Lactobacilos	20
3.4	Clorexidina como agente antimicrobiano	21
3.5	Modelos <i>in situ</i> para estudos de biofilme	22
3.6	Expressão gênica	23
<b>4</b>	<b>Materiais e métodos</b>	25
4.1	Aspectos éticos	25
4.2	Delineamento experimental	25
4.3	Cálculo da amostra	25
4.4	Voluntários	26
4.5	Obtenção e preparo dos espécimes	26
4.6	Confeção dos aparelhos	27
4.7	Tratamentos	27
4.8	Coleta do biofilme	28
4.9	Análise microbiológica	29
4.10	Análise molecular - Extração e purificação de RNA	29

4.11 PCR Quantitativo em Tempo Real (RT-PCR).....	30
4.12 Análise da perda mineral.....	31
4.13 Estudo exploratório .....	31
4.14 Análise estatística.....	32
<b>5 Resultados .....</b>	<b>33</b>
<b>6 Discussão.....</b>	<b>36</b>
<b>7 Conclusão.....</b>	<b>39</b>
<b>Referências bibliográficas.....</b>	<b>40</b>
<b>Apêndices.....</b>	<b>47</b>
<b>Anexos.....</b>	<b>51</b>

## 1 Introdução

A Cárie dentária é considerada uma das doenças orais mais comuns em seres humanos (SELWITZ *et al.*, 2007), e resulta de um desequilíbrio da atividade metabólica do biofilme (NYVAD *et al.*, 2013). 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 microrganismos patogênicos (MARSH, 2005; MARSH; PERCIVAL, 2006). Os microrganismos são selecionados no biofilme pelo ambiente ácido criado pela fermentação do açúcar, porém o efeito dos polissacarídeos extracelulares (PECS) nas contagens de bactérias cariogênicas não é totalmente claro (TENUTA *et al.*, 2006), por isso, métodos moleculares têm apresentado dimensões novas e estimulantes para o estudo e compreensão da microbiologia, patogenicidade e interações bacterianas.

O biofilme dental é composto por um grupo heterogêneo de microrganismos nos diferentes sítios e tende a se estabilizar com o passar do tempo. Suas atividades metabólicas causam flutuações de pH até mesmo em condições de repouso. Tais flutuações de pH causam alterações no fluido do biofilme ou placa dental, resultando em um distúrbio no equilíbrio na interface dente e placa, levando a intermitente perda e ganho de minerais na superfície dental (MANJI *et al.*, 1991) que levam à presença de cárie.

Modelos *in vitro* e *in situ* têm tentado mimetizar a formação de biofilme e consequente processo de desenvolvimento de cárie em um ambiente mais controlado, uma vez que o estudo das variáveis relacionadas a cárie dentária em estudos *in vivo* traz consigo a complexidade relacionada a doença e as dificuldades inerentes a questões éticas (MCBAIN, 2009).

A clorexidina é um eficaz agente antimicrobiano para o controle de placa (BRAL; BROWNSTEIN, 1988; LANG; BRECX, 1986), e vem sendo utilizada como padrão-ouro de controle químico da placa bacteriana. Entretanto, evidências recentes demonstram claramente a diminuição de sua eficácia no biofilme supragengival formado, o que reforça a necessidade de uma deplacagem prévia a sua utilização para potencializar seu efeito antiplaca e anti-gengivite, bem como diminuir seus efeitos adversos de manchamento e formação de cálculo (ZANATTA e RÖSING, 2007).

Assim, este trabalho teve como objetivo caracterizar biofilmes orais formados *in situ* buscando entender como as bactérias presentes na cavidade oral se comportam tanto na presença, como na ausência de clorexidina, avaliando os efeitos na contagem de microrganismos, na sua expressão gênica, e na formação de lesões de cárie.

### **3 Objetivo geral**

Avaliar e caracterizar o efeito de clorexidina 0,12% na formação de biofilmes *in situ* quanto à contagem e expressão gênica de microrganismos e na formação de lesões de cárie.

### 3 Revisão bibliográfica

#### 3.1 Biofilme dental

O conceito de biofilme foi dado a comunidades bacterianas que se estabelecem em ambientes úmidos como rochas existentes em mares e rios, cascos de barcos, interior de tubulações, dentre outros (COSTERTON et al.1995). Assim, a placa bacteriana entendida como um biofilme traz o conceito de que as bactérias orais não se comportam como uma entidade bacteriana isolada e sim como uma ou mais comunidades de microrganismos agrupadas em uma matriz extracelular de polímeros de origem bacteriana e do hospedeiro (MARSH 2004; MARSH 2005). Essa organização é espacialmente estruturada a partir de interações físicas, metabólicas e moleculares entre as bactérias, sendo essa integração essencial para a adesão, crescimento e sobrevivência das células bacterianas. Assim, organizando-se num biofilme, tornam-se possíveis a colonização e o crescimento bacteriano em inúmeras estruturas duras como dentes, restaurações, próteses e implantes (SOCRANSKY e HAFFAJEE 2002).

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, 2000).

A cavidade oral contém habitats distintos que suportam uma diversificada flora bacteriana. Biofilmes dentais abrigam mais de 700 espécies bacterianas, a maior parte das bactérias são estreptococos não patogênicos (KAZOR *et al.*, 2003, PASTER *et al.*, 2001, SAKAMOTO *et al.*, 2005) e as superfícies dentais são recobertas por depósitos microbianos, com espessura determinada de acordo com sua localização. Os microrganismos precisam

aderir-se firmemente a uma superfície porque, se não, são levados pelo fluxo salivar e deglutidos, dessa forma a maioria dos microrganismos são encontrados em áreas de estagnação (MARSH e NYVAD, 2003). O biofilme dental assim formado é composto por um grupo heterogêneo de microrganismos nos diferentes sítios e tende a se estabilizar com o passar do tempo. Essa homeostase bacteriana resulta de um processo dinâmico nas interações microbianas (MARSH, 1989) e a atividade metabólica causa flutuações de pH até mesmo em condições de repouso. Tais flutuações de pH causam alterações no fluído do biofilme ou placa dental, resultando em um distúrbio no equilíbrio na interface dente e placa, levando a intermitente perda e ganho de minerais na superfície dental (MANJI *et al.*, 1991).

As razões pelas quais as bactérias se estruturam num biofilme são claras, pois em biofilme elas adquirem inúmeras vantagens como, por exemplo, maior proteção contra defesas do hospedeiro, substâncias tóxicas, antimicrobianos, maior capacidade de troca de nutrientes, possibilidade de viver em ambientes com diferentes potências de oxirredução, bem como o desenvolvimento de uma maior diversidade de expressões genóticas e fenotípicas modificando muitas propriedades de suas células como a adesão, motilidade, requisição nutricional, secreção de produtos e enzimas, dentre outros. Todas essas características permitem às células bacterianas se organizarem em uma comunidade e uma vez estruturadas como um biofilme potencializarem seus fatores de virulência, bem como lidarem com condições estressantes adversas mais facilmente do que se estivessem em formas puramente planctônicas (MARSH 2004; MARSH 2005; SOCRANSKY e HAFFAJEE, 2002; SOCRANSKY e HAFFAJEE, 2005; FUX *et al.* 2003).

### **3.2 Cárie Dental**

A cárie dental tem sido considerada uma das mais prevalentes doenças encontradas em humanos (SELWITZ *et al.*, 2007) e resulta de um desequilíbrio da atividade metabólica do biofilme (NYVAD *et al.*, 2013). É uma doença de caráter crônico, causada pelo processo de desmineralização da superfície dental por ácidos orgânicos provenientes da fermentação dos carboidratos da dieta, pelas bactérias (NEWBRUM, 1988). 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 microrganismos 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 microrganismos patogênicos; desencadeando o estado de doença e a consequente presença da cárie (PARISOTTO *et al.*, 2010).

### **3.2.1 Influência da dieta na formação de lesões de cárie**

Sabe-se que a dieta exerce um papel muito importante no desenvolvimento de cárie, estudos mostram a forte relação entre o consumo de carboidratos fermentáveis e o desenvolvimento de lesões cariosas (JOHANSSON e BIRKED, 1995; NISENGARD e NEWMAN, 1994). Muitas bactérias do biofilme utilizam açúcares presentes na dieta para seu metabolismo energético. O amido (polissacarídeo da glicose) pode ser utilizado após a degradação em carboidratos de baixo peso molecular pela amilase salivar e bacteriana. Os carboidratos são fermentados de modo direto, mas, na presença de grandes quantidades, são armazenados na forma de polissacarídeos intra (PIC) e extracelulares (PEC). A fermentação de carboidratos no metabolismo anaeróbico das bactérias resulta na produção de ácidos, principalmente o ácido lático. O aumento na concentração do íon hidrogênio (pH ácido) causa subsaturação do cálcio e do fosfato na fase fluida ao redor do dente, ocasionando o processo de desmineralização dos tecidos dentais. Este pH é um dos responsáveis pela instalação no biofilme dental de uma comunidade microbiana acidúrica e acidogênica. O pH próximo da neutralidade encontrado em biofilmes na ausência de carboidratos significa um período de repouso onde há saturação de cálcio e fosfato. Se os ataques ácidos forem muito frequentes ou tiverem longa duração em relação aos períodos de pH neutro, o resultado final será uma lesão cariada. O equilíbrio

destes é determinado por diversos fatores como o conteúdo nos alimentos de indutores ou protetores contra a cárie; padrão de ingestão de alimentos; a composição da saliva; a suscetibilidade da superfície dental e a concentração de flúor no ambiente do biofilme dental (JOHANSSON e BIRKHED, 1995).

Diversas espécies bacterianas do biofilme dental, quando em contato com a sacarose, podem sintetizar vários tipos de polissacarídeos ou convertê-la em ácido. Os polissacarídeos formados podem ser polímeros de glicose, formados pela enzima glicosiltransferase a partir da sacarose. Os glicanos com a maioria das ligações  $\alpha(1-6)$  são denominados dextranos e os com predominância  $\alpha(1-3)$  são chamados mutanos. Estes últimos são altamente insolúveis e rígidos e podem formar agregados fibrosos, enquanto que os dextranos formam cadeias flexíveis sendo mais solúveis. Também podem ser formados os polímeros de frutose (Frutanos), formados pela enzima frutossiltransferase a partir da sacarose. Os frutanos são polímeros extracelulares de frutose, bastante solúveis, com ligações  $\beta(2-6)$ , que são formados em uma extensão menor do que os glicanos. Quando termina a sacarose, frutanos são rapidamente metabolizados pelas bactérias do biofilme dental. As bactérias orais também apresentam a capacidade de estocar carboidratos como polissacarídeos intracelulares como o glicogênio. Diferentes polissacarídeos extracelulares, que são formados essencialmente a partir da sacarose, os PIC podem ser formados a partir de qualquer tipo de açúcar que possa ser convertido em glicose 1-P e são metabolizados quando outras fontes de carboidratos estão ausentes, como no período entre as refeições. Assim a sacarose mostra-se mais cariogênica, pois, além de ser substrato para a produção de ácidos, há uma correlação positiva entre dieta rica em sacarose e aumento da produção de PIC e PEC no biofilme bacteriano (GAWRONSKI *et al.*, 1975, NISENGARD e NEWMAN, 1994, LEITES *et al.*, 2006).

### **3.3 Principais microrganismos cariogênicos envolvidos no biofilme**

#### **3.3.1 Estreptococos do grupo mutans**

São cocos Gram positivos, anaeróbios facultativos, microaerófilos, acidogênicos e acidúricos, e capazes de formar polissacarídeos extracelulares. (LEITES *et al.*, 2006). Entre as muitas espécies de bactérias que colonizam e

persistem na cavidade oral, *Streptococcus mutans* é uma das poucas espécies que têm sido consistentemente associadas com a formação de cáries (LOESCHE 1986). A dissolução do esmalte do dente marca o início das lesões cáries dentais devido à exposição repetida ao ácido láctico gerado por *S. mutans* e outras bactérias orais como um produto metabólico final do metabolismo de carboidratos. Além da produção de ácido, quando sacarose dietética está disponível, *S. mutans* os utiliza para sintetizar polissacarídeos extracelulares que promovem a formação do biofilme placa também contribui para a sua patogenicidade (YAMASHITA *et al.* 1993, MUNRO *et al.* 1991).

A situação taxonômica dos estreptococos cariogênicos está bem definida em “Estreptococos do Grupo Mutans” (EGM). Existem sete espécies que estão incluídas no EGM: *S. mutans*, *S. sobrinus*, *S. cricetus*, *S. rattus*, *S. ferus*, *S. macacae*, *S. downei*. Dessas espécies, somente o *S. mutans* e *S. sobrinus* apresentam potencial cariogênico em humanos. As outras espécies são encontradas em animais e, se estão presentes em humanos, não parecem ser altamente cariogênicas (MALTZ, 2000).

Segundo a literatura, EGM é um grupo de microrganismos altamente cariogênico por diferentes características: Capacidade de colonizar a superfície dentária: Essas bactérias colonizam superfícies que não descamam (dentes, materiais restauradores, acrílicos). Portanto, só colonizam a cavidade bucal após a erupção dos dentes e em pacientes edentados, desde que portadores de próteses (BERKOWITZ e JORDAN, 1975; FLÓRIO *et al.*, 2004); Produzir polissacarídeos extracelulares do tipo glicano a partir da sacarose, o que favorece a formação de biofilme espesso. (SHKLAIR *et al.*, 1979; Capacidade acidogênica: a produção de ácido láctico é determinante fundamental para a patogenicidade, sendo responsável pela desmineralização do esmalte na etapa inicial da cárie. É um pré-requisito essencial para que um microrganismo seja considerado cariogênico (MENAKER *et al.*, 1984); Capacidade acidúrica: sobrevivência do microrganismo em pH ácido, permitindo que o microrganismo desenvolva suas atividades metabólicas em ambientes de pH baixo, tais como sulcos e fissuras dos dentes. (HAMADA e SLADY, 1980); Acúmulo de polissacarídeos intracelulares de glicose do tipo amilopectina a partir de carboidratos da dieta do hospedeiro. Esses polímeros são metabolizados quando os açúcares exógenos estão esgotados, resultando na formação de

ácido láctico; Fermentadores de grande quantidade de carboidratos, incluindo manitol e sorbitol (LEITES *et al.*, 2006).

### 3.3.2 Lactobacilos

São bastonetes Gram positivos, anaeróbios facultativos e às vezes microaerófilos. Uma característica importante é a sua capacidade acidogênica (produzir ácido) e acidúrica (sobreviver nomeio ácido) e sua capacidade de realizar tanto o metabolismo oxidativo como fermentativo. As espécies *L. casei*, *L. acidophilus*, *L.plantarum*, *L. salivarius*, são homofermentativas, produzem ácido láctico. *L. fermentum*, *L. brevis*, *L. bu chneri* e *L. cellobiosus* são heterofermentativos, produzem vários ácidos orgânicos (ácido acético, ácido láctico) além do etanol e dióxido de carbono (UZEDA, 2002).

BUNTING e PALMERLEE (1925) declararam que os lactobacilos eram os fatores etiológicos da cárie depois de realizarem um experimento em que inocularam lactobacilos acidófilos em caldo glicosado contendo dente. Observaram queda para abaixo de 5,0 no pH e que após sete dias o esmalte dentário apresentava descalcificação superficial.

A idéia de que os lactobacilos seriam os principais agentes etiológicos da cárie durou até a década de 60 (Era dos Lactobacilos). A justificativa para tal era que os lactobacilos, sendo acidogênicos e acidúricos, poderiam se multiplicar no pH baixo observado no biofilme e nas lesões cariosas além da constatação clínica de que os sítios de crescimento dos lactobacilos correspondiam aos sítios das lesões cariosas clinicamente diagnosticadas (FITZGERALD *et al.* 1980, 1981). Entretanto, a ideia que os lactobacilos eram os agentes etiológicos da cárie dental não era universal. À medida que foram obtidas mais informações sobre a composição microbiana do biofilme, observou-se que estes constituíam apenas uma pequena fração do biofilme, 0,01% (GIBBONS, 1964). Sua frequência predominava em áreas profundas de cárie de dentina (EWARDSSON, 1974).

Em relação à cárie de superfície lisa de esmalte ou superfície radicular, esse microrganismo parece não desempenhar papel preponderante como agente etiológico do início da lesão de cárie. Por não serem capazes de formar polissacarídeos extracelulares, não se aderem a superfícies lisas, necessitando de sítios retentivos para a sua colonização (sulcos, fissuras e regiões

interproximais). Os lactobacilos parecem ser invasores secundários em algumas lesões de cárie, devendo contribuir para a progressão destas graças as suas características acidogênicas e estão associados ao desenvolvimento da cárie dentária sob circunstâncias específicas, como o consumo frequente e alto de sacarose (MALTZ, 1996). Com o desenvolvimento e o emprego de métodos quantitativos e de meios de cultura seletivos em estudo bacteriológicos do biofilme, foi demonstrado que os lactobacilos eram mais uma consequência do que causa de iniciação da cárie. (LEITES *et al.*, 2006)

### 3.4 Clorexidina como agente antimicrobiano

A clorexidina (CLX) foi sintetizada nos anos 40 e introduzida no mercado em 1954 como um antisséptico para ferimentos na pele (DAVIES *et al.* 1954). Ela se caracteriza por ser um detergente catiônico, da classe das bisbiguanidas, disponível nas formas de acetato, hidrocloreto e digluconato, sendo este último, o sal mais comumente empregado em fórmulas e produtos. Ela possui um amplo espectro de ação, agindo sobre bactérias gram-positivas, gram-negativas, fungos, leveduras e vírus lipofílicos (TORTORA *et al.*, 2000).

Após um bochecho com solução de clorexidina, aproximadamente 30% da droga fica retida na boca. Devido à sua natureza catiônica, ela adsorve-se a compostos aniônicos como glicoproteínas salivares, radicais fosfatados e carboxílicos presentes no biofilme dental como bactérias e polissacarídeos extracelulares, película dental e macromoléculas presentes na mucosa oral (RÖLLA e MELSEN, 1975; GJERMO *et al.*, 1974; BONESVOLL *et al.*, 1974).

A clorexidina apresenta uma substantividade, isto é, tempo de permanência ativa na cavidade bucal, de aproximadamente 12 horas, o que é explicado pela sua natureza dicatiônica. Assim, uma extremidade catiônica da molécula se prende à película, que apresenta carga negativa, e a outra extremidade catiônica fica livre para interagir com bactérias que buscam colonizar o dente. Desta forma, ela exercerá uma ação bactericida inicial imediatamente depois do bochecho, combinada com uma ação bacteriostática prolongada (ZANATTA e RÖSING, 2007).

Infelizmente, o uso da clorexidina é limitado pelos efeitos adversos relacionados, como manchamento de dentes, restaurações, próteses e língua,

alterações do paladar, principalmente para o sal, formação de cálculo supragengival e, raramente, tumefação reversível nos lábios ou glândulas parótidas, descamações na mucosa oral, urticária, dispneia e choque anafilático (FLÖTRA *et al.*, 1971; ADDY *et al.*, 1979; OKANO *et al.*, 1989; CIANCIO, 1995). Dentre estes efeitos, o manchamento dental destaca-se como a principal queixa por parte dos pacientes (ALBANDAR *et al.* 1994) sendo o principal fator limitante do uso da clorexidina por períodos prolongados.

O manchamento dental acomete entre 30-50% dos usuários de clorexidina (FLÖTRA 1973; LÖE *et al.*, 1976), sendo que sua maior ocorrência se dá no terço cervical da coroa dentária e nas áreas proximais (AL-TANNIR e GOODMAN, 1994). Dentre os fatores que interferem na prevalência e severidade do manchamento, estão a concentração e o volume da clorexidina que está sendo usado. Assim, concentrações menores, em volumes maiores, a despeito de apresentarem eficácia e efetividade semelhantes (SEGRETO *et al.*, 1986), mostraram causar menor manchamento dentário (CUMMING e LÖE, 1973).

Mesmo com todos esses fatores, o uso da clorexidina na prevenção da cárie tem sido um tema controverso entre os educadores odontológicos. Descobertas recentes indicam que o efeito de um agente antimicrobiano para reduzir os níveis de estreptococos mutans ou de redução de placas pode nem sempre se correlacionar com a eventual redução da cárie. (AUTIO-GOLD, 2008).

### **3.5 Modelos *in situ* para estudos de biofilme**

Modelos *in situ* de cárie dentária têm sido delineados e amplamente aplicados para reponderem questões fundamentais e aplicadas sobre biofilmes orais e cárie dental. Esses modelos vêm sendo usados para estudar/validar mecanismo de ação de flúor, avaliar agentes remineralizadores e fatores de virulência microbianos, bem como a cariogenicidade ou efeito protetor de alimentos, dentre outras aplicações (ZERO *et al.*, 2005). Apesar de modelos *in situ* apresentarem a vantagem de não induzirem o desenvolvimento da lesão de cárie nos dentes naturais dos voluntários da pesquisa, permitindo que a lesão de cárie seja formada apenas em substratos específicos e sob condições experimentais controladas tendo como ambiente as condições dinâmicas da

cavidade bucal do indivíduo, eles demonstram a desvantagem de expressarem grande variabilidade de resultados como consequência da atuação de fatores intrínsecos do paciente, tais como fluxo salivar, capacidade tampão da saliva, mas principalmente relacionados aos seus hábitos dietéticos e de higiene bucal. (AIRES *et al.*, 2008; VAN STRIJP *et al.*, 2008, TENUTA *et al.*, 2006; ZERO *et al.*, 2005).

### 3.6 Expressão gênica

Investigações genéticas têm mostrado que as bactérias assim que se estruturam num biofilme realizam diversas modificações genéticas como, por exemplo, a bactéria *Staphylococcus aureus* uma vez no interior do biofilme passa a codificar os genes fosfogliceratomutase, trifosfato isomerase e álcool desidrogenase, permitindo então que ela realize os processos de glicólise e fermentação, possibilitando uma melhor adaptação no biofilme com provável carência de oxigênio. A transferência gênica também pode ser observada como, por exemplo, quando o plasmídeo de uma bactéria é transmitido para uma outra bactéria que não o contenha, recombinando-se com o material genético da bactéria receptora e, dessa forma, tornando-a mais resistente. No biofilme, pode também ser observada uma notável comunicação interbacteriana que acontece tanto de maneira vertical como horizontal. Essa comunicação, denominada *Quorum Sensing*, acontece através de sinais que passam de célula para célula e desempenha um importante papel no agrupamento e desagrupamento de novas espécies. Assim, o biofilme seleciona novas bactérias para adesão, conforme sua necessidade, bem como expulsa ou não permite a fixação de espécies que não ofereçam vantagem ao biofilme (DONLAN, 2000; XIE *et al.*, 2000; GHIGO, 2001; MARSH, 2005).

Modelos *in vitro* e *in situ* tem sido desenvolvidos para o estudo do biofilme dental. Protocolos que simulem episódios de “fartura-miséria” quando açúcares da dieta estão presentes na cavidade bucal e permitam avaliação de cárie dental são necessários. Por outro lado, poucos estudos da expressão gênica de biofilmes formados *in situ* estão sendo realizados. (CCAHUANA VÁSQUEZ, 2010). *S. mutans* é considerado um importante microrganismo no desenvolvimento da cárie dental humana (HAMADA; SLADE, 1980; LOESCHE, 1986), porque além de utilizar carboidratos fermentáveis da dieta para produzir

ácidos, ele sintetiza polímeros de glucano a partir de sacarose através da ação de três glucosiltransferases secretadas (GTFS): codificadas pelos genes *gtfB*, *gtfC* e *gtfD* (KURAMITSU, 1993), e uma única frutossiltransferase (FTF), produto do gene *fff*, que catalisa a síntese de frutanos de elevado peso molecular em sacarose (EBISU *et al.*, 1975;. SHIROZA E KURAMITSU, 1988). Os frutanos produzidos por *S. mutans* são feitos para funcionar primariamente como compostos de armazenagem extracelulares que podem ser metabolizados durante períodos de privação de nutrientes (BURNE *et al.*, 1996).

Sistemas de transdução do sinal de dois componentes (STSs) são utilizados por bactérias para detectar os sinais ambientais e regular a expressão de genes em resposta a eles (HOCH, 1995). STSs são tipicamente compostos de um sensor histidina quinase (HK) ligado a membrana (LOO *et al.*, 2000) que percebe um sinal e transmite-o através da transferência de um grupo fosfato para o regulador de resposta citoplasmática (RR) (GAO E STOCK, 2009). Em *Streptococcus mutans* o STS VicR/K é essencial e regula os principais atributos de virulência, como competência genética, formação de biofilme, adesão mediada por sacarose, tolerância ao stress oxidativo, produção de ácido, tolerância ácida, e metabolismo da parede celular. E em estudo prévios VicR mostrou se ligar e regular a um montante de genes de virulência, incluindo, *gtfB*, *gtfC*, *fff*, e *gbpB* (SENADHEERA *et al.*, 2012).

## **4 Materiais e Métodos**

### **4.1 Aspectos éticos**

O projeto foi encaminhado ao Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Pelotas e obteve parecer favorável ao desenvolvimento da pesquisa (ANEXO 1).

### **4.2 Delineamento experimental**

O estudo *in situ* foi randomizado, cego em relação aos voluntários e do tipo boca-dividida, no qual espécimes de esmalte dental bovino foram submetidos a tratamentos em dois níveis: sacarose 20% 8x/dia (grupo controle), esacarose 20% 8x/dia em associação a aplicação de clorexidina 0,12%, 2x/dia (grupo teste). Os espécimes foram inseridos em pequenas recessões presentes nos dispositivos intraorais palatinos, confeccionados com resina acrílica quimicamente ativável, e recobertos com tela plástica, o que permitiu que todo o biofilme formado sobre os blocos de esmalte dental permanecesse estagnado na superfície do bloco. Cada dispositivo intraoral continha 8 espécimes de esmalte dental do lado direito e 8 espécimes no lado esquerdo. O tempo experimental do estudo foi de 21 dias e o biofilme formado sobre os espécimes de esmaltes foram coletados após 14 e 21 dias de formação para ambos os grupos experimentais (n= 4 espécimes/dia de coleta/tratamento). O biofilme coletado foi submetido a análise microbiológica para identificação e quantificação de unidades formadoras de colônia (UFC), a análise molecular da expressão dos genes *fff* e *vicR* e os espécimes de esmalte, por sua vez, foram avaliados através de teste de microdureza de secção transversal para determinação da profundidade das lesões cariosas formadas bem como para determinação da área da lesão de cárie desenvolvida em cada condição experimental.

### **4.3 Cálculo da amostra**

O cálculo amostral foi feito no programa Sigmastat® (Versão 3.5, Systat Software Inc.) presumindo-se que seria feita posteriormente uma Análise de Variância, considerando 02 grupos experimentais e adotando os seguintes

parâmetros: poder do estudo de 80%, erro tipo alfa de 5%, valores da diferença entre as médias de perda mineral de 30% e desvio padrão médio presumido de 15% em volume mineral. Para as médias e desvios esperados foram utilizados os dados de microdureza Knoop convertidos em % de volume mineral perdido em esmalte do trabalho de van Strijp et al. (2008). Através do teste de ANOVA, obteve-se um “n” amostral calculado de cinco indivíduos. Considerando que a perda estimada de voluntários em estudos *in situ* é de 10%, 6 voluntários foram convidados a participar deste estudo. Esses voluntários foram considerados como unidades experimentais e blocos estatísticos para efeito de análise estatística dos resultados.

#### **4.4 Voluntários**

Seis voluntários (18 – 35 anos de idade), com média de fluxo salivar estimulado  $\geq 0,7$  ml/min. e sem fazer uso de antibióticos nos últimos dois meses do início do estudo, ou uso de qualquer forma de medicação que altera a secreção salivar, uso de aparelho ortodôntico fixo ou removível, doença periodontal, doença geral/sistêmica, participaram deste estudo. Eles foram informados sobre o protocolo do estudo e assinaram o termo de consentimento escrito antes do início do estudo (APÊNDICE 1).

#### **4.5 Obtenção e preparo dos espécimes**

Para a confecção das amostras foram selecionados 80 incisivos bovinos permanentes cujo esmalte dental não apresentava imperfeições e falhas. Os dentes foram limpos e seccionados com broca tipo trefina de núcleo de diamante sob irrigação ao nível do terço médio da coroa, a fim de obterem-se discos de esmalte padronizados (5mm de diâmetro). Posteriormente os discos foram desgastados nas laterais e em espessura através de lixa d'água (#320) sob irrigação em politriz, a fim de diminuir o tamanho do espécime sem que se perdesse aérea em demasia (1mm de espessura x 2.5 de largura e 5mm de comprimento). Para padronização do esmalte superficial foi realizada planificação da com lixas de granulometria #600, 1200, 2000 e polimento com feltro e pasta diamantada em politriz. Foi realizada uma pequena cobertura

com esmalte de unha na parte superior da amostra para que servisse de controle negativo dentro da própria amostra.

#### 4.6 Confeção dos aparelhos

Para cada voluntário foi confeccionado um dispositivo intraoral em resina acrílica. Em cada dispositivo acrílico foram confeccionadas 4 recessões tanto no lado direito, quanto do lado esquerdo, nas quais foram inseridas os espécimes de esmalte dental (8 espécimes em cada lado, 2 em cada recesso). Os espécimes ficaram dispostos o mais próximo possível dos dentes naturais de cada indivíduo e recobertos com uma tela plástica para permitir formação e acúmulo de biofilme sobre a superfície desses espécimes. O lado de aplicação de CHX foi pintado com esmalte de unha da cor dourada. Essa distinção foi necessária para facilitar a diferenciação das soluções a serem gotejadas pelos voluntários nos espécimes de esmalte dental (Figura 1)

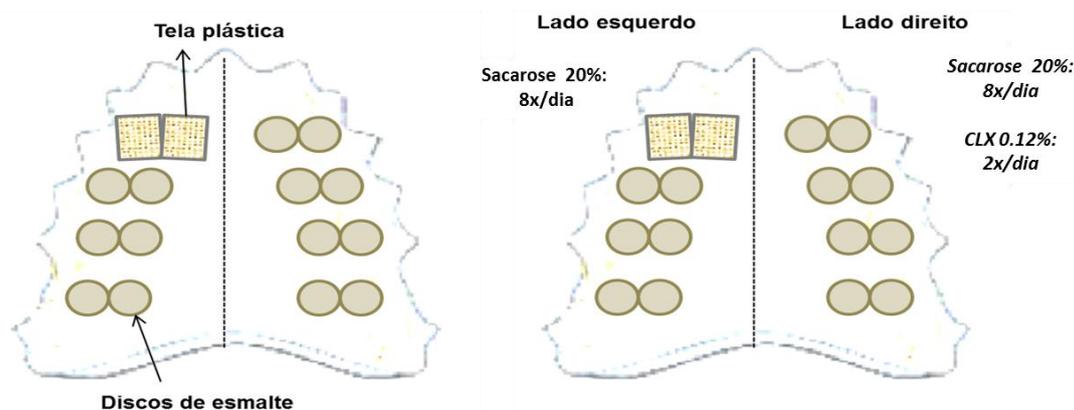


Figura 1 - Desenho esquemático dos dispositivos acrílicos. A) Configuração geral. B) Exemplo de disposição dos tratamentos.

#### 4.7 Tratamentos

Solução de 20% de sacarose (S) sob frequência de 8x/dia foi utilizada como desafio cariogênico (AIRES et al, 2006; CCAHUANA-VASQUEZ et al 2007), e solução de clorexidina 0,12% (CHX) aplicada 2x/dia foi utilizada como tratamento antimicrobiano/anticariogênico. Os frascos contendo solução de CHX foram identificados na cor dourada e os voluntários foram orientados a gotejá-la no lado especificado com dourado no dispositivo intraoral (o lado de aplicação do

tratamento variou entre os voluntários). Dessa mesma forma, foram orientados a gotejarem a solução de sacarose 20%, em todos os blocos.

Foram instruídos também, a retirarem os aparelhos da cavidade oral e pingarem uma gota da solução de sacarose 20% para cada recesso contendo dois espécimes de esmalte, em cada lado do dispositivo nos seguintes horários: 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 e 22 horas. Imediatamente após o gotejamento, os dispositivos eram mantidos fora da boca do voluntário, porém armazenados durante 5 minutos à temperatura ambiente em caixas plásticas do tipo porta-aparelho. Nesse momento, o excesso de líquido que eventualmente escorresse do recesso de cada bloco para a região central do dispositivo intraoral era removido com gaze. Decorridos esses 5 minutos, o dispositivo era reinserido na boca.

A solução CHX (frasco identificado com dourado) era aplicada somente em um dos lados do dispositivo. (Figura 1), nos horários de 8 e 20 horas. Esse tratamento era aplicado 5 min. após a solução de sacarose, onde era gotejado uma gota da solução CHX em cada recesso do lado especificado do dispositivo intraoral palatino. O dispositivo era mantido fora da boca do voluntário durante 1 minuto à temperatura ambiente em caixas plásticas do tipo porta-aparelho. O excesso de solução que eventualmente extravasasse para a recessão central do aparelho era removido com gaze e o dispositivo intraoral era imediatamente recolocado no ambiente oral. Os voluntários foram instruídos a usar os aparelhos o tempo todo, removendo-os somente durante as refeições (CURY *et al.*, 2000) ou quando ingerissem líquidos, com exceção de água. Ao longo de todo o experimento, os voluntários escovaram os dentes naturais e o aparelho, com exceção da área onde estão os espécimes esmalte, com o mesmo creme dental fornecido pelo pesquisador responsável. Considerando-se o desenho boca dividida deste estudo, nenhuma restrição foi feita em relação à dieta de voluntários. Os mesmos receberam informações orais e escritas para não usar qualquer substância antibacteriana, e de como proceder durante o experimento (APÊNDICE 2).

#### **4.8 Coleta de biofilme**

Após cada período experimental, o biofilme formado sobre quatro espécimes de esmalte dental foi coletado em dois níveis, um para análise

microbiológica e outro para molecular, de forma aleatória de cada um dos lados do dispositivo intraoral palatino e transferidos para tubos de microcentrífuga estéreis, pré-pesados e codificados. As coletas foram realizadas às 8h da manhã do 14<sup>o</sup> e 21<sup>o</sup> dia, e os voluntários foram instruídos a aplicarem apenas solução S às 8h, sendo o último horário de aplicação de CLX, às 20h do dia anterior, além de se manterem em jejum, pelo menos, 3h antes da coleta. Sendo assim, a coleta foi realizada 12h depois da última aplicação do tratamento. Pelo menos  $1,0 \pm 0,01$  mg de biofilme úmido foi coletado para análise microbiológica, essas amostras foram suspensas em 1 ml de solução de NaCl a 0,9% e sonicadas em 7 W por 60 s para análise microbiológica. Para a análise da expressão gênica, parte do biofilme remanescente do recesso correspondente foi coletado e mantido em solução *RNA later* (Ambion, Austin, ex., EUA), para preservação da integridade do RNA. As amostras de esmalte foram removidas dos recessos e armazenadas em ambiente úmido para posteriores análises. O dispositivo palatino teve os recessos da coleta recobertos por cera utilidade e foi novamente entregue ao voluntário.

#### **4.9 Análise Microbiológica**

Uma alíquota de 50 $\mu$ l da suspensão sonicada foi diluída em NaCl a 0,9% e diluições seriadas foram inoculadas em duplicata (gotas de 20 $\mu$ l) nos seguintes meios de cultura: Ágar Sangue para cultivo da microbiota anaeróbica total (MT); Ágar Mitis Salivarius Bacitracina (MSB), para contagem de estreptococos mutans (SM), Ágar Rogosa para contagem de lactobacilos, e Brain Heart Infusion Ágar (pH 4.8) para contagem de acidúricos totais. As placas foram incubadas em anaerobiose por 96h. As unidades formadoras de colônia (UFC) foram quantificadas e os resultados expressos como UFC/mg de peso úmido do biofilme.

#### **4.10 Análise Molecular - Extração e purificação de RNA**

As extrações de RNA foram realizadas de acordo com Cury e Koo (2007) e modificações de Aires et al. (2008). Os biofilmes coletados para análise molecular foram armazenados em microtubos livres de RNA, pesados e mantidos em solução *RNA later* (500 $\mu$ l) a -70°C. Para o processo de extração, a solução *RNA later* foi removida com o auxílio de uma pipeta, sem alterar o

biofilme. A essa solução foi adicionado PBS, e centrifugado à 5500g em temperatura ambiente por 10 min. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e ressuspenso novamente em PBS e sonificado a 7 W durante 30s e centrifugado a 5500g a 4°C durante 10 min. O sobrenadante foi descartado e o mesmo procedimento repetido três vezes. O pellet foi ressuspenso tampão NAES (Tampão acetato de sódio 50 mM, EDTA 10 mM e SDS 1%, pH 5) e o tubo centrifugado por 1 min. Então, se adicionou ácido fenol/clorofórmio (5:1, pH 4,5) à suspensão. A mistura foi transferida para microtubos contendo 0,8 g de pérolas de vidro (0,5 milímetros diâmetro). Em um ribolizador, três pulsos de 40s com intervalo de 1 min foram realizados. A suspensão homogeneizada foi centrifugada (10.000g, 4°C por 5min). A fase aquosa foi coletada e transferida para um novo tubo eppendorf ao qual foi adicionado igual volume de ácido fenol/clorofórmio (5:1, pH 4,5). O tubo foi deixado em repouso durante 1 min em temperatura ambiente. Em seguida, a amostra foi centrifugada a 14.000g, 4°C durante 5 min. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo ao qual se adicionou álcool clorofórmio/isoamílico (24:1). O tubo foi “invertido” e delicadamente vortexado e centrifugado a 14.000g, 4°C durante 5 min.

Em seguida, se removeu a fase aquosa e, então se adicionou acetato de sódio 3 M (pH 5) e isopropanol. As misturas foram mantidas à -20°C por 30 min. E o RNA precipitado foi recuperado por centrifugação (14.000g, 4°C por 15 min). Então, o pellet foi lavado com etanol 75% por três vezes seguido de lavagem com 0,5mL de etanol 99%. Após esse procedimento, o RNA foi ressuspenso em água ultrapura e quantificado em espectrofotômetro NanoVue Plus™.

#### **4.11 PCR Quantitativo em Tempo Real (RT-PCR)**

Foi realizado RT-PCR para avaliar a expressão dos genes *ftf*, e *vicX*. RNA e *primers* específicos para cada um dos genes descritos acima foram utilizados para gerar o cDNA (kit de síntese de cDNA iScript, Bio-Rad Laboratories, CA, EUA). Os cDNAs resultantes foram amplificados por um sistema de detecção em tempo real de PCR usando o SYBR Green Supermix (Bio-Rad Laboratories, Inc., na Califórnia, EUA) e *primers* específicos para os

mesmos genes (Tabela 1). O número total de cDNA foi normalizado, utilizando gene *S. mutans* específico 16S rRNA (Koo et al., 2006).

Tabela 1. Primers específicos para os genes avaliados

Gene	Primers
<i>ftf</i>	F: 5'-ATTGGCGAACGGCGACTTACTC R: 5'-CCTGCGACTTCATTACGATTGGTC
<i>vicR</i>	F: 5'-CGCAGTGGCTGAGGAAAATG R: 5'-ACCTGTGTGTGTGCTAAGTGATG
16s rRNA	F 5'-CTTACCAGGTCTTGACATCCCG -3' R 5'-ACCCAACATCTCACGACACGAG -3'

#### 4.12 Análise da perda mineral

Após cada período experimental, os espécimes (n=4/grupo) foram coletados e seccionados longitudinalmente a partir do centro de cada disco, embutidos em resina acrílica e polidos para determinar a microdureza de secção transversal (MST). Esta determinação foi realizada de acordo com Cury et al. (2000), nas endentações de 10, 20, 30, 40, 50, 100, 150, e 200 µm de distância da superfície externa do esmalte. Os valores de MST foram utilizados para o cálculo da área integrada de desmineralização ( $\Delta S$ ) para cada tratamento (SOUSA et al., 2009). As análises foram realizadas em duplicata com um microdurômetro Future-Tech FM acoplado a um endentador Knoop. As endentações foram realizadas com cargas de 50g por 5s.

#### 4.13 Estudo exploratório

Foi realizado um estudo exploratório após a observação dos resultados para analisar como deveria ser o comportamento dos microrganismos frente à aplicação de clorexidina 0,12%. Para isso, foi coletado 1ml de saliva de 5 voluntários, 3 deles participantes do estudo *in situ*, antes da aplicação de clorexidina (*baseline*), 10 minutos, uma hora e 12 horas depois de um bochecho durante 1 minuto com 15 ml de clorexidina 0,12%. Todas as coletas foram diluídas em NaCl a 0,9% e diluições seriadas foram inoculadas em duplicata (gotas de 20µl) nos mesmos meios de cultura que seriam utilizados para o estudo *in situ*: Ágar Sangue para cultivo da microbiota anaeróbica total;

Ágar Mitis Salivarius Bacitracina (MSB), para contagem de estreptococos mutans, Ágar Rogosa para contagem de lactobacilos, e Brain Heart Infusion Ágar (BHI) para contagem de acidúricos totais. As placas foram incubadas em anaerobiose por 96h. As unidades formadoras de colônia (UFC) foram quantificadas e os resultados expressos como UFC/ml de saliva.

#### **4.14 Análise Estatística**

Os dados de MST e contagem microbiana foram analisados usando o Programa SigmaStat v.3.5 (Systat Software Inc., Chicago, USA). As premissas de igualdade de variâncias e distribuição normal de erros foram verificadas para todas as variáveis de resposta testadas e aquelas que não satisfizeram esses pressupostos foram transformadas. Os dados de MST e a contagem de UFC (exploratório e *in situ*) foram submetidos separadamente a testes de ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Tukey. Os dados da expressão dos genes *ftf* e *VICR* foram analisados usando o Programa GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc. California, USA) através do teste de ANOVA de duas vias, seguida pelo teste de Tukey. Para todos os testes,  $p < 0.05$  foi considerado como significativo.

## 5 Resultados

Os resultados do estudo piloto exploratório estão presentes na Figura 2. Com exceção do grupo *S. mutans* ( $p=0,001$ ), nenhum outro microrganismo apresentou diferença estatística entre *baseline* e tempos após aplicação de CLX (totais ( $p=0,160$ ), acidúricos ( $p=0,209$ ) e lactobacilos ( $p=0,248$ )).

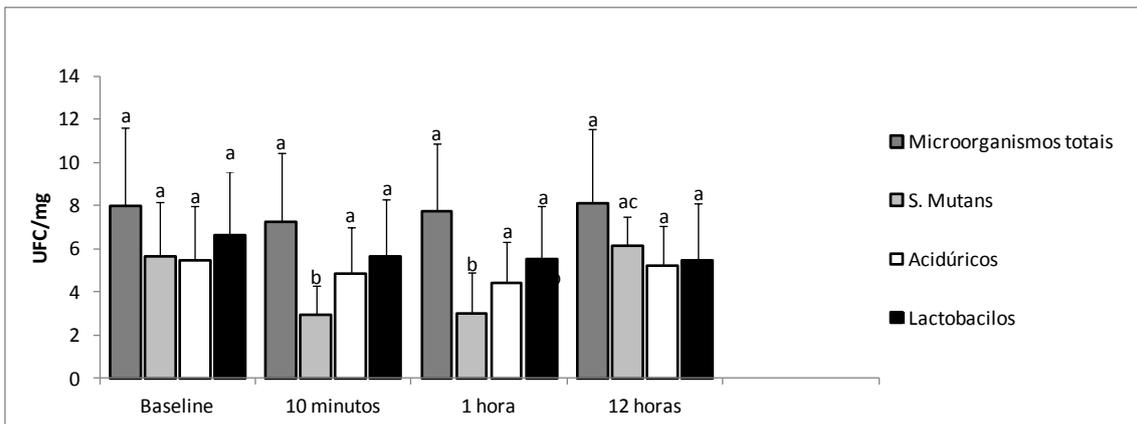


Figura 2. Estudo piloto: comportamento dos microrganismos antes e depois da aplicação de clorexidina 0,12%. Letras minúsculas diferentes demonstram diferença estatística entre o mesmo microrganismo nos diferentes tempos ( $p<0,05$ ).

Os resultados referentes às análises microbiológicas do estudo *in situ* estão demonstrados na tabela 2.

Não houve diferença estatística entre nenhum grupo de microrganismos frente ao tratamento com CLX ( $p>0,05$ ). Maiores médias de microrganismos totais foram encontradas para o grupo da Clorexidina tanto no 14<sup>o</sup> como no 21<sup>o</sup> dia.

Contagem de microrganismos totais, *S. mutans*, Acidúricos e Lactobacilos na presença e ausência de clorexidina nos dois tempos experimentais. Média em log (Desvio padrão)

Microrganismo	14 dias(CFU x 10 <sup>7</sup> )		21 dias(CFU x 10 <sup>7</sup> )	
	Sacarose	Clorexidina	Sacarose	Clorexidina
Totais	7,21(0,13)	7,59(0,70)	7,18 (0,52)	7,47(0,30)
<i>S. mutans</i>	4,61(1,47)	4,42(0,84)	3,66(1,36)	3,76(0,70)
Acidúricos	5,33(2,03)	5,14(1,39)	5,97(1,05)	5,49(1,03)
Lactobacilos	5,39(2,01)	4,97(1,18)	6,51(1,14)	5,76(0,95)

Nota: Na linhas, letras minúsculas iguais indicam que não houve diferença entre os tratamentos para o mesmo tempo experimental. Letras maiúsculas iguais indicam que não houve diferença entre o mesmo tratamento entre os dois tempos experimentais. Anova de duas vias; Tukey ( $p < 0.05$ ).

Os dados de perda mineral integrada do esmalte ( $\Delta S$ ) estão expressos na figura 3. O grupo sacarose apresentou maiores valores de  $\Delta S$  em 21 dias comparado aos 14 dias ( $P = 0.038$ ). Houve diferença significativa para os tratamentos ( $P < 0.001$ ). CLX apresentou menores valores de  $\Delta S$  ao 14 e 21 dias.

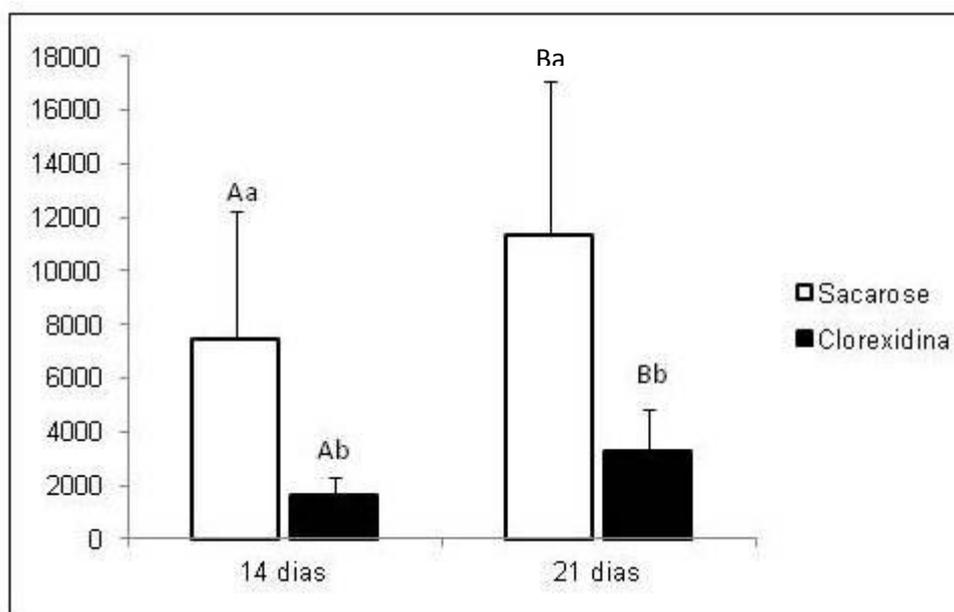


Figura 3 – Média da perda de dureza integrada ( $\Delta S$ ) dos esmaltes frente aos tratamentos nos dois tempos experimentais. Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística entre os grupos CLX e sacarose no mesmo tempo experimental. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística para o mesmo tratamento nos diferentes tempos experimentais. ANOVA de duas vias, Tukey ( $p < 0.05$ ).

Os resultados das expressões dos genes VicR e *fff* estão presentes na figura 4. O gene VicR não apresentou diferença nem em relação ao tempo ( $p=0,3224$ ) nem ao tratamento ( $p=0,0753$ ). Já o gene *fff*, apresentou maiores valores de sacarose aos 21 dias ( $p<0,05$ ), e para CLX, a expressão do gene não mostrou diferença entre os tempos ( $p>0,05$ ). Além disso, o gene *fff* foi mais expresso no grupo da sacarose. O teste mostrou que houve influência do tempo ( $p=0,0015$ ) e do tratamento ( $p<0,0001$ ) na expressão deste gene.

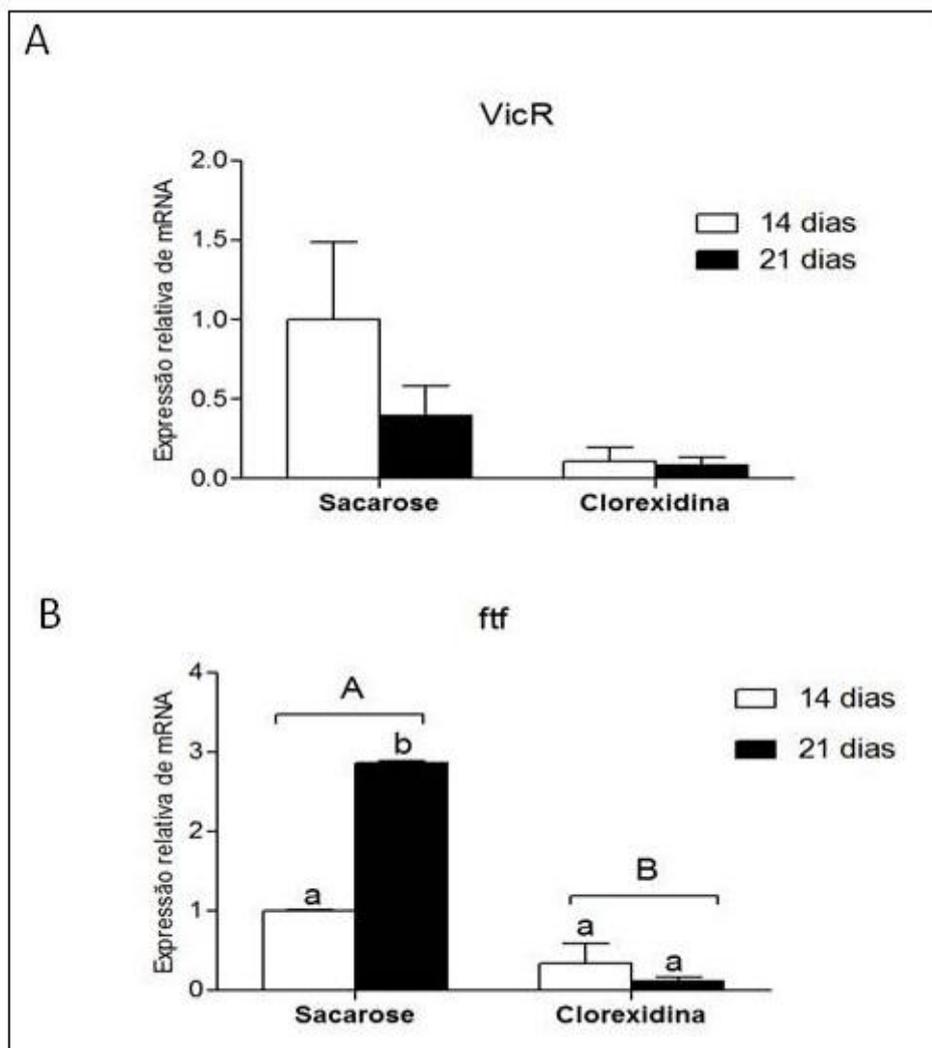


Figura 4 – Expressão relativa de mRNA frente aos tratamentos nos dois tempos experimentais. A) Expressão referente ao gene VicR. B) Expressão referente ao gene *fff*. Letras minúsculas diferentes indicam diferença entre os tempos do mesmo tratamento. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença entre os tratamentos.

## 6 Discussão

Modelos *in situ* de cárie dentária têm sido delineados e amplamente aplicados para reponderem questões fundamentais e aplicadas sobre o ambiente oral (AIRES *et al.*, 2008; VAN STRIJP *et al.*, 2008, TENUTA *et al.*, 2006; ZERO *et al.*, 2005). Dentro desse contexto, questões sobre comportamento do biofilme e perda mineral do esmalte dentário, podem ser reproduzidas e respondidas através de análises feitas sobre o material formado nesses aparelhos palatinos. Modelos desse tipo são caracterizados por apresentarem grande variabilidade de resultados como consequência da atuação de fatores intrínsecos do paciente (ZERO *et al.*, 2005). Os dados apresentados nesse estudo demonstram essa variabilidade, apresentando altos valores para desvios padrões. Além da variabilidade entre indivíduos, dados microbiológicos e minerais, em geral, apresentam ampla dispersão de valores em estudos *in situ* e *in vitro* (CURY *et al.*, 2000; VAN DE SANDE *et al.*, 2011; AZEVEDO *et al.*, 2014).

Antissépticos a base de clorexidina têm sido utilizados em odontologia há muitos anos como padrão-ouro de controle químico do biofilme em geral (ZANATTA E RÖSING, 2007). E segundo Bonesvoll e Gjermo (1978), por ter uma natureza dicatiônica, permanece ativa na cavidade bucal por aproximadamente 12 horas. No presente estudo *in situ*, a análise da quantidade de microrganismos na cavidade bucal após o uso de clorexidina aconteceu entre 12-14 horas após a última aplicação do antisséptico, e mostrou que, embora imediatamente após sua utilização os microrganismos diminuam, depois de mais de 12h de intervalo eles voltam a colonizar a superfície dentária. Isso pôde ser verificado em ambos os estudos (exploratório e *in situ*), onde, mesmo sem diferença estatística, se verificou maiores quantidades de microrganismos totais para os grupos tratados com clorexidina após 12 horas.

Isso indica que seu uso só se mostra eficiente na redução de placa bacteriana, quando o tratamento for contínuo e corrobora com estudos recentes que avaliam a ação da clorexidina ao longo do tempo (VAN STRIJP *et al.*, 2008; HANNIG *et al.*, 2013), em contrapartida, já está documentado na literatura há

bastante tempo, que seu uso prolongado gera diferentes efeitos adversos, como o manchamento de dentes (ALBANDAR *et al.*, 1994).

A cárie dentária é uma doença multifatorial, de caráter crônico, causada pelo processo de desmineralização da superfície dental por ácidos orgânicos provenientes da fermentação dos carboidratos da dieta realizada pelas bactérias (SELWITZ, 2007). O uso da CLX na prevenção da cárie tem sido um tema controverso entre os educadores odontológicos, pois descobertas recentes indicam que o efeito de um agente antimicrobiano para reduzir os níveis de estreptococos mutans ou de redução de placa pode nem sempre se correlacionar com a eventual redução da cárie, porém, o resultado clinicamente importante é a comprovada redução da cárie. (AUTIO-GOLD, 2008). Nesse estudo, a resposta mineral da CLX se mostrou eficiente na redução de cárie, e isso foi apresentado da forma que, os esmaltes bovinos apresentaram menor desmineralização quando comparados com o grupo que somente recebeu sacarose ao longo do dia. A utilização de CLX neste caso mostrou-se capaz de reduzir a perda mineral com uso contínuo e está coerente ao que se afirma na literatura. CLX tendo efeito antimicrobiano imediato teria efeito na diminuição de microorganismos cariogênicos, e por consequência a diminuição da produção de ácidos que atuaram no processo de desmineralização dentária.

A expressão de *fff* está intimamente ligada ao metabolismo microbiano e à utilização de sacarose para a produção de polissacarídeos extracelulares. Sua expressão medeia a ligação de *S. mutans* não só nas superfícies, mas também ativa bactérias que são favoráveis para a colonização persistente das superfícies dos dentes (SCHILLING E BOWEN, 1992), aumentando fatores de virulência, e induzindo a formação de lesão de cárie. Bactérias expostas a ambientes transientes podem desencadear respostas adaptativas pelo desencadeamento diferencial da expressão de genes por meio de dois elementos de regulação que consistem de uma histidina quinase (VicK) e regulador de resposta (VicR). O sistema de transdução de sinal VicR está envolvido na regulação de vários processos fisiológicos importantes em *S. mutans* (SENADHEERA *et al.*, 2005; BISWAS, 2006) e parece regular a expressão de vários genes associados à virulência que afetam a síntese e a adesão a polissacarídeos, incluindo o *fff* (SENADHEERA *et al.*, 2005). Então,

na tentativa de entender o funcionamento de genes como o *ftf* e *VicR* em biofilmes formados *in situ*, se investigou suas expressões nos mesmos. Grupos não tratados com antimicrobiano apresentaram maior expressão de ambos os genes, principalmente o gene *ftf*, indicando maiores fatores de virulência presentes no biofilme, o que induz, de forma favorável, a formação de lesões de cárie. Cabe salientar que pequenas quantidades de biofilme e de RNA bruto foram obtidos por indivíduos para o grupo da CLX e dados apresentados para a expressão gênica frente a esse tratamento podem não corresponder a veracidade e tragam uma limitação a essa parte experimental e aos seus resultados. O protocolo utilizado ( KOO, 2006) preconiza amostras de  $\pm 100$ mg, e foi obtido  $\sim 20$ mg por indivíduo. Para tentar compensar a menor quantidade de RNA bruto proveniente das amostras, optou-se por não realizar uma padronização de cDNA. Talvez, fatores como o peso úmido de biofilme e concentração final de RNA podem ter interferido nos resultados apresentados, indicando a necessidade da repetição do experimento, a fim de comprovar os valores finais obtidos.

O uso de CLX 0,12%, de forma geral, mostrou ser eficiente para a redução de cárie, quando utilizada de modo contínuo. Isso pode ter ocorrido devido a diminuição da expressão de genes ligados, principalmente, à adesão de *S. mutans*, tendo em vista que a recolonização de microrganismos voltava a ocorrer antes de cada nova aplicação de CLX. Porém, novos estudos devem ser feitos a fim de provar a interferência de antimicrobianos na expressão de genes virulentos, e que assim, diminuam a incidência de patogêneses no ambiente oral.

## **7 Conclusão**

Dentro das limitações do estudo, embora o uso de clorexidina 0,12% não tenha apresentado efeito na redução de microrganismos depois de 12 horas, este uso foi efetivo na modulação da atividade cariogênica do biofilme, reduzindo a expressão do gene virulento *ftf* e a desmineralização no esmalte.

## Referências

- Addy M, Prayitno S, Taylor L, Cadogan S: An in vitro study of the role of dietary factors in the aetiology of tooth staining associated with the use of chlorhexidine. *J Periodontal Res.* 1979;14(5):403-10.
- Aires CP, Del BelCury AA, Tenuta LMA, Klein MI, Koo H, Duarte S, Cury JA. Effect of starch and sucrose on dental biofilm formation and on root dentine demineralization. *Caries Research* 2008; 42:380–386.
- Albandar JM, Gjermo P, Preus HR: Chlorhexidine use after two decades of over-the-counter availability. *J Periodontol.* 1994;65(2):109-12.
- al-Tannir MA, Goodman HS: A review of chlorhexidine and its use in special populations. *Spec Care Dentist.* 1994;14(3):116-22.
- Autio-Gold, J. The Role of Chlorhexidine in Caries Prevention. *Operative Dentistry*, 2008, 33-6, 710-716
- Beltrami M, Bickel M, Baehni PC. The effect of Supragingival plaque control on the composition of the subgingivalmicroflora in human periodontitis. *J Clin Periodontol.*1987;14:161–4.
- BERKOWITZ, R. J. Acquisition and transmission of mutans streptococci. *J. Calif. Dent. Assoc.*, Sacramento, v. 31, n. 2, p. 135-8, 2003.
- BERKOWITZ, R. J. et al. Maternal salivary levels of *Streptococcus mutans* and primary oral infection of infants. *Arch. Oral Biol.*, Oxford, v. 26, p. 147-149, 1981.
- BERKOWITZ, R. J.; JORDAN, H. Similarity of bactiocins of *Streptococcus mutans* from mother and infants. *Arch. Oral Biol.*, Oxford, v. 20, p. 125-130, 1975.
- Bonesvoll P, Lökken P, Rølla G: Influence of concentration, time, temperature and pH on the retention of chlorhexidine in the human oral cavity after mouth rinses. *Arch Oral Biol.*1974;19(11):1025-9.
- Bral M, Brownstein CN. Antimicrobial agents in the prevention and treatment of periodontal diseases. *Dent Clin North Am.* 1988;32:217–41.
- BUISCHI, Y. P. Promoção de Saúde Bucal na Clínica Odontológica. São Paulo: Artes Médicas EAP - APCD, 2000. 359p.

- BUNTING, R. W.; PALMERLEE, F. The role of bacillus acidophilus in dental caries. J. Am. Dental Association, Chicago, v. 12, p. 381-411, 1925. In: Newburn, E. Cariologia, 2 ed. São Paulo: Santos, 1988.
- Burne, R. A., Chen, Y. M., Wexler, D. L., Kuramitsu, H. & Bowen, W. H. (1996). Cariogenicity of *Streptococcus mutans* strains with defects in fructan metabolism assessed in a program-fed specific-pathogen-free rat model. *J Dent Res* 75, 1572-1577.
- CAUFIELD, P. W. et al. Initial acquisition of mutans streptococci infections in infants: evidence for a discrete window of infectivity. *J. Dental Res.*, Chicago, v. 72, p. 37-45, 1993.
- CAUFIELD, P. W.; GRIFFEN A. L. Dental Caries. An infectious and transmissible disease. *Pediat. Clin. North. Am.*, Philadelphia, v. 47, n. 5, p. 1001-1019, 2000.
- Ccahuana-Vasquez RA, Cury JÁ. Desenvolvimento e validação de um modelo de crescimento de biofilmes de *S. mutans* e estudo do efeito da sacarose na expressão de gtfBCD e dexA em biofilmes dentais formados in vitro e in situ. Tese de doutorado, Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, 2010.
- CHHOUR, K. L. et al. Molecular analysis of microbial diversity in advanced caries. *J. Clin. Microbiol.*, Washington, v. 43, n. 2, p. 843-849, 2005.
- Cumming BR, Loe H: Optimal dosage and method of delivering chlorhexidine solutions for the inhibition of dental plaque. *J Periodontal Res.* 1973;8(2):57-62.
- Cury JA and Koo H. Extraction and purification of total RNA from *S. mutans* biofilms. *Anal Biochem* 2007, 365:208-214.
- Cury JA, Rocha EP, Koo H, Francisco SB, Del Bel Cury AA. Effect of saccharin on antibacterial activity of chlorhexidine gel. *Braz Dent J.* 2000;11(1):29-34.
- Davies GE, Francis J, Martin AR, Rose FL, Swain G: 1:6-Di-4'-chlorophenyldiguanidohexane (hibitane); laboratory investigation
- Ding Y, Wang W, Fan M, Tong Z, Kuang R, Jiang W, Ni L. Antimicrobial and anti-biofilm effect of Bac8c on major bacteria associated with dental caries and *Streptococcus mutans* biofilm. *Peptides* 2014;52:61-67.

Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *AnalytChem* 1956; 28:350-356.

DUCHIN, S.; VAN HOUTE, J. Relationship of *Streptococcus mutans* and lactobacilli to incipient smooth surface dental caries in man. *Arch. Oral Biol.*, Oxford, v. 23, p. 779-786, 1978.

Ebisu, S., Keijiro, K., Kotani, S. & Misaka, A. (1975). Structural differences in the fructans elaborated by *Streptococcus mutans* and *Strep. salivarius*. *J Biochem* 78, 879-887.

EDWARDSSON, S. Bacteriological studys on deep areas of carious dentine. *Odont. Revy.*, Lund, v. 25, Sp. 32, 1974.

EMANUELSSON, I. M. R.; WANG, X. Demonstration of identical strains of mutans streptococci withing Chinese families by genotyping. *Eur. J. Oral Sci.*, Copenhagen, v. 106, p. 788-794, 1998.

Flötra L, Gjermo P, Rölla G, Waerhaug J: Side effects of chlorhexidine mouth washes. *Scand J Dent Res.* 1971;79(2):119-25.

Gao R, Stock AM (2009) Biological insights from structures of two-component proteins. *Annu Rev Microbiol* 63: 133–154. doi: 10.1146/annurev.micro.091208.073214

Gjermo P, Bonesvoll P, Rölla G: Relationship between plaqueinhibiting effect and retention of chlorhexidine in the human oral cavity. *Arch Oral Biol.* 1974;19(11):1031-4.

Hashino E, Kuboniwa M, Alghamdi SA, Yamaguchi M, Yamamoto R, Cho H, Amano A. Erythritol alters microstructure and metabolomic profiles of biofilm composed of *Streptococcus gordonii* and *Porphyromonasgingivalis*. *Molecular Oral Microbiology* 2013; 28(6):435-51.

Hoch JA, Silhavy TJ, editors (1995) *Two-Component Signal Transduction*. Washington, D.C.: ASM Press. 488 p.

Kazo CE, Mitchell PM, Lee AM, Stokes LN, Loesche WJ, Dewhirst FE, Paster BJ. Diversity of bacterial populations on the tongue dorsa of patients with halitosis and healthy patients. *J. Clin. Microbiol.* 2003, 41:558-563.

- Koo H, Nino de Guzman P, Schobel BD, Vacca Smith AV, Bowen WH. Influence of Cranberry Juice on Glucan-Mediated Processes Involved in *Streptococcus mutans* Biofilm Development. *Caries Res* 2006;40:20–27.
- Kuramitsu, H. K. (1993). Virulence factors of *mutans streptococci*: role of molecular genetics. *Crit Rev Oral Biol Med* 4, 159-176.
- Lang NP, Brex MC. Chlorhexidinedigluconate - an agent for chemical plaque control and prevention of gingival inflammation. *J Periodontal Res.* 1986;21:74–89.
- Leites AC; Pinto MB, Sousa, ER: Aspectos Microbiológicos Da Cárie Dental. Microbiological. *Salusvita*, Bauru, V. 25, N. 2, P. 135-148, 2006.
- Loesche, WJ. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol. Rev.* 50:353-380.
- Loo CY, Corliss DA, Ganeshkumar N (2000) *Streptococcus gordonii* biofilm formation: identification of genes that code for biofilm phenotypes. *J Bacteriol* 182: 1374–1382. doi: 10.1128/jb.182.5.1374-1382.2000
- McBain, A. J. Chapter 4: In vitro biofilm models: an overview, *Adv Appl Microbiol* 69 (2009) pp. 99-132.
- Monton, M.R. and Soga, T Metabolome analysis by capillary electrophoresis-mass spectrometry. *J Chromatogr A* 2007; 1168: 237–246.
- Moron BM, Magalhães AC. Comparação entre diferentes métodos para produção e análise de lesão de cárie artificial em esmalte e dentina. Dissertação de mestrado. Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, 2011.
- Munro, CS. Michalek SM, Macrina FL. Cariogenicity of *Streptococcus mutans* V403 glucosyl transferase and fructosyl transferase mutants constructed by allelic exchange. *Infect. Immun.* 1991, 59:2316-2323.
- Nyvad B, Crielaard W, Mira A, Takahashi N, Beighton D. Dental caries from a molecular microbiological perspective. *Caries Research* 2013;47:89–102.
- of a new antibacterial agent of high potency. *Br J Pharmacol Chemother.* 1954;9(2):192-6.

- Okano M, Nomura M, Hata S, Okada N, Sato K, Kitano Y, et al: Anaphylactic symptoms due to chlorhexidine gluconate. *Arch Dermatol*. 1989;125(1):50-2.
- Paes Leme AF, Cury JÁ. Efeito da associação da aplicação tópica profissional de flúor e dentifrício fluoretado na desmineralização do esmalte e na composição bioquímica e microbiológica da placa dental *in situ*. Dissertação de mestrado. Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, 2002.
- Paster BJ, Boches SK, Galvin JL, Ericson RE, Lau CN, Levanos VA, Sahasrabudhe SA, Dewhirst FE. Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J. Bacteriol*. 2001, 183:3770-3783.
- Rölla G, Melsen B: On the mechanism of the plaque inhibition by chlorhexidine. *J Dent Res*. 1975;54 Spec No B:B57-62.
- Sakamoto M, Umeda M, Benno Y. Molecular analysis of human oral microbiota. *J. Periodontal Res*. 2005, 40:277-285.
- Schilling KM, Bowen WH. Glucans synthesized *in situ* in experimental salivary pellicle function as specific binding sites for *Streptococcus mutans*. *Infect Immun* 1992;60:284-95.
- Segreto VA, Collins EM, Beiswanger BB, De La Rosa M, Isaacs RL, Lang NP, et al: A comparison of mouthrinses containing two concentrations of chlorhexidine. *J Periodontol Res*. 1986;21Suppl 16:23-32.
- Selwitz RH, Ismail AI, Pitts NB. Dental caries. *Lancet*. 2007: 6;369(9555):51-9.
- Senadheera DB, Cordova M, Ayala EA, Chavez de Paz LE, Singh K, et al. (2012) Regulation of bacteriocin production and cell death by the VicRK signaling system in *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol* 194: 1307–1316. doi: 10.1128/jb.06071-11
- Senadheera MD, Guggenheim B, Spatafora GA, Huang YC, Choi J, Hung DC, Treglown JS, Goodman SD, Ellen RP, Cvitkovitch DG. A VicRK signal transduction system in *Streptococcus mutans* affects *gtfBCD*, *gpbB*, and *ftf* expression, biofilm formation, and genetic competence development. *J Bacteriol* 2005; 187: 4064–4076.

Senadheera MD, Lee AW, Hung DC, Spatafora GA, Goodman SD, Cvitkovitch DG. The *Streptococcus mutans* *gtfX* gene product modulates *gtfB/C* expression, biofilm formation, genetic competence, and oxidative stress tolerance. *J Bacteriol* 2007; 189: 1451–1458.

Shiroza, T. & Kuramitsu, H. K. (1988). Sequence analysis of the *Streptococcus mutans* fructosyltransferase gene and flanking regions. *J Bacteriol* 170, 810-816.

Sousa, R. P.; Zanin, I. C.; Lima, J. P.; Vasconcelos, S. M.; Melo, M. A.; Beltrão, H. C.; Rodrigues, L. K. In situ effects of restorative materials on dental biofilm and enamel demineralisation. *J Dent*, v.37, n.1, p.44-51, Jan. 2009.

Swerts MSO, Groisman S. Uso de xilitol, própolis, clorexidina e associações no tratamento da cárie: enfoques para clínica odontológica. *PerioNews* 2008; 2(1):69-73.

Tenuta LMA, Ricomini Filho AP, Del Bel Cury AA, Cury JA. Effect of sucrose on the selection of mutans Streptococci and Lactobacilli in dental biofilm formed in situ. *Caries Research* 2006;40:546–549

Tortora GJ, Funke BR, Case CL: Controle do crescimento microbiano. In: Tortora GJ, Funke BR, Case CL. *Microbiologia*. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2000. p.181-206.

van Strijp AJP, Gerardu VAM, Buijs MJ, van Loveren C, ten Cate JM. Chlorhexidine Efficacy in Preventing Lesion Formation in Enamel and Dentine: An in situ Study. *Caries Res* 2008;42:460–465.

Yamashita Y, Bowen WH, Burne RA, Kuramitsu HK. Role of the *Streptococcus mutans* *gtf* genes in caries induction in the specific-pathogen-free rat model. *Infect. Immun.* 1993, 61:3811-3817.

Yin JL, Shackel NA, Zekry A, McGuinness PH, Richards C, Putten KV, McCaughan GW, Eris JM, Bishop GA. Real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction for measurement of cytokine and growth factor mRNA expression with fluorogenic probes or SYBR Green I. *Immunol Cell Biol* 2001, 79:213-221.

Zanatta FB, Rösing CK: Chlorhexidine: Action's Mechanisms And Recent Evidences Of It's Efficacy Over Supragingival Biofilm Context. Scientific-A 2007;1(2):35-43

Zero DT: In Situ caries models. Adv Dent Res 1995; 9(3):214-230

## Apêndice 1

### Universidade Federal de Pelotas Faculdade de Odontologia

#### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Titulo do projeto: **VALIDAÇÃO IN SITU DE UM MODELO DE BIOFILME DE MICROCOSMOS EM FLUXO CONTÍNUO: ANÁLISE MINERAL, MOLECULAR E BIOQUÍMICA**

Pesquisadora responsável pelo estudo: Katielle Valente Brauner

O objetivo deste estudo será avaliar e caracterizar as funções da placa bacteriana formada em um aparelho removível colocado em seu céu da boca, a partir de exposições diárias de sacarose 20% em associação a utilização de uma solução antimicrobiana (clorexidina a 0,12%) e assim, comparar um modelo de desenvolvimento de placa dentária (biofilme de microcosmos) desenvolvido em laboratório. A solução antimicrobiana está disponível no mercado odontológico e já foi previamente avaliada quanto as suas propriedades físicas e biológicas, sem demonstrar nenhum risco a integridade do ser humano frente a um estudo controlado como este que você irá participar.

Caso aceite participar desta pesquisa, você irá receber um aparelho removível para ser colocado no seu céu da boca. Nesse dispositivo, haverá amostras de esmalte dentário estéril coberto por uma tela plástica protetora para evitar que possa haver deslocamento das amostras durante o uso e higienização. Os riscos que ocorrem nesse tipo de estudo são mínimos. Referem-se, principalmente, ao acúmulo de placa dentária nas amostras protegidas pela tela plástica. É importante ressaltar que você poderá continuar a limpeza normal de seus dentes. Todos os voluntários receberão tratamento dentário caso haja necessidade. Esse tratamento será realizado na Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Pelotas (FO-UFPeI) por alunos de pós-graduação devidamente autorizados e envolvidos nesse estudo.

Quaisquer outras informações podem ser consultadas pelo pesquisador responsável, pelo número 53-84124199.

Por este instrumento que atende as exigências legais, o(a) senhor(a) \_\_\_\_\_, ficha no: \_\_\_\_\_ portador(a) da cédula de identidade no: \_\_\_\_\_, SSP/\_\_\_\_, após leitura atenta das informações

descritas acima, e ciente das etapas do estudo os quais será submetido(a), não restando dúvidas a respeito do lido e do explicado, firma CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO em concordância a participar da pesquisa proposta no que lhe é cabível, conforme a carta de informação ao paciente.

Fica claro que o participante ou seu representante legal pode, a qualquer momento, retirar seu consentimento livre e esclarecido, sem ser prejudicado no tratamento, deixando de participar do estudo alvo da pesquisa e estando ciente que todo trabalho realizado torna-se informação confidencial guardada por força do sigilo profissional. Vale ressaltar, que as amostras coletadas do aparelho de cada paciente ficarão retidas na universidade para estudos futuros.

Por estarem entendidos e conformados, assinam o presente termo.

Pelotas, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_.

\_\_\_\_\_  
Assinatura do paciente

\_\_\_\_\_  
Assinatura do pesquisador

Fone: 53 84124199

## Apêndice 2.

**Começar aplicação das soluções:** Dia XX/XX/2014

**Coletas de biofilme:** XX, XX, XX, XX de XX de 2014

**Entregar o dispositivo:** Dia XX/XX/2014

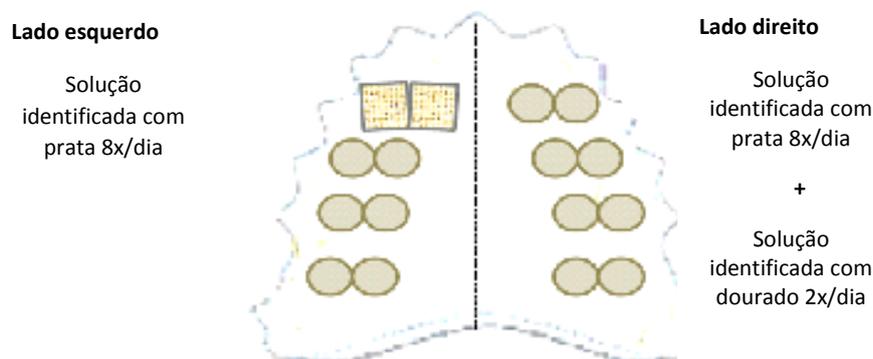
Tempo total de uso: 21 dias

### INSTRUÇÕES PARA USO

Você receberá um dentífrício fluoretado, uma escova dental, um frasco conta-gotas contendo 3 soluções diferentes, um pacote de gaze estéril, um estojo de dispositivo ortodôntico (acomodação do dispositivo) e um dispositivo intra-oral.

**O dispositivo deve ser utilizado seguindo as instruções de forma correta para que ao final ele cumpra seu papel!**

**Seu dispositivo deverá receber a aplicação de soluções conforme descrito abaixo:**



### SOLUÇÃO S

Deve ser aplicada 8x/dia em ambos os lados.

**Siga os horários:** 8h, 10h, 12h, 14h, 16h, 18h, 20h e 22h

#### Modo de aplicação:

Em cada período de aplicação, remover o dispositivo da boca e secar o excesso de saliva com a gaze fornecida. Uma gota de **solução S** deve ser aplicada em cada recesso ( São 4 recessos, colocar 1 gota em cada), deixar agir por **5 minutos**. Remover o excesso com uma nova gaze e recolocar no ambiente oral.

### SOLUÇÃO IDENTIFICADA COM DOURADO E PRATA:

Deve ser aplicada 2x/dia,

DOURADA: LADO DIREITO

PRATEADA: LADO ESQUERDO

**Siga os horários:** 8h e 20h

#### Modo de aplicação:

Esse tratamento deve ser aplicado 5 min após a solução S. Após remover o excesso da solução S, aplicar uma gota da **solução** em cada recesso (São 4 recessos, colocar 1 gota em cada), deixar agir por **1 min**. Remover o excesso com gaze e recolocar no ambiente oral.

### QUAL PERÍODO DE UTILIZAÇÃO DO DISPOSITIVO?

Você deverá utilizar o dispositivo todo dia, exceto durante a escovação e alimentação (incluindo mascar chicletes). Utilizar todo dia, também significa o seu uso durante a noite, para dormir.

### **O QUE FAZER COM O DISPOSITIVO QUANDO ESTIVER COMENDO OU FAZENDO A MINHA HIGIENE ORAL?**

Seu dispositivo deve ficar em repouso e umedecido com uma gaze. Para isso, posicione o dispositivo no seu recipiente; umedeça um pedaço de gaze com solução de água destilada e posicione em cima das telas protetoras do aparelho intraoral. Quando for usar, somente remova a gaze e reintroduza na boca.

### **COMO PROCEDER COM A MINHA HIGIENE ORAL E A LIMPEZA DO DISPOSITIVO INTRA-ORAL?**

#### **Instruções gerais:**

- Durante os 21 dias de experimento, utilizar apenas o dentífrício dado pelo pesquisador;
- Para higiene oral do dispositivo, utilizar a escova do kit entregue. Sua higiene pode ser feita com sua escova de uso habitual;
- não utilizar bochechos, fio dental com flúor, clorexidina.

#### **Limpeza do dispositivo:**

Sempre após sua higiene oral, o dispositivo deve também ser limpo. Para isso ele deve ser escovado com o dentífrício fornecido e retomado para a boca imediatamente após a escovação.

- Escovar todo o dispositivo exceto a tela plástica que cobre os recessos. (Não passar a escova sobre ela).
- Se a espuma do dentífrício for sobre a tela, não há tanto problema. Se acontecer, colocar a espuma formada sobre a área da tela, mas não escovar.
- Durante a escovação não deixe que jatos de água da torneira atinjam diretamente a tela plástica que cobre os blocos esmalte. Isso pode causar perda da placa dental ali acumulada.

### **COMO PROCEDER NOS DIAS DE COLETA DO BIOFILME FORMADO NO DISPOSITIVO?**

Nos dias de coleta do biofilme, você aplicará apenas a Solução S meia hora antes do material ser coletado. A partir da coleta, o processo continua normalmente (soluções deverão ser aplicadas nos mesmos horários).

### **ONDE SERÁ A COLETA DO BIOFILME FORMADO NOS DISPOSITIVOS?**

A entrega acontecerá no laboratório de microbiologia (7º andar da Faculdade de Odontologia UFPel) em horário a combinar.

**Muito obrigada pela participação de vocês!**

**Em caso de qualquer dúvida: 84124199 ou [katiellevb@gmail.com](mailto:katiellevb@gmail.com)**

## ANEXO 1

FACULDADE DE MEDICINA DA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
PELOTAS



PARECER DO COLEGIADO

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** Biofilme in situ: análise mineral, molecular e bioquímica

**Pesquisador:** Maximiliano Sérgio Cenci

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 32607014.6.0000.5317

**Instituição Proponente:** Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Pelotas

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio  
Conselho Nacional de Desenvolvimento e Tecnologia

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 709.854

**Data da Relatoria:** 24/06/2014

**Apresentação do Projeto:**

Esse trabalho objetiva avaliar as respostas minerais, bioquímicas e moleculares produzidas por um modelo de biofilme in situ para comparação e validação à modelos de biofilme complexo in vitro já desenvolvidos e utilizados amplamente na pesquisa odontológica. O presente estudo in situ será randomizado, duplo-cego e do tipo boca-dividida, no qual discos de esmalte dental bovino serão submetidos a tratamentos em 2 níveis: sacarose 20%, 8x/dia (grupo controle), ou sacarose 20%, 8x/dia em associação a aplicação de clorexidina 0,12%, 2x/dia (grupo teste). Os discos serão inseridos em pequenas recessões presentes nos dispositivos intraorais palatinos, que serão confeccionados com resina acrílica quimicamente ativável, e serão recobertos com tela plástica que permitirá que todo o biofilme formado sobre os blocos de esmalte dental permaneça estagnado na superfície do bloco. Cada dispositivo intraoral conterá 8 discos de esmalte dental do lado direito e 8 discos no lado esquerdo. O estudo será composto de uma fase experimental de 28 dias. Biofilme formado sobre os discos de esmaltes serão coletados após 7, 14, 21 e 28 dias de formação para ambos os grupos experimentais (n= 2 discos/ dia de coleta/ tratamento). O biofilme coletado

**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: 709.854

será analisado através de cromatografia gasosa e espectrometria de massa (GC/MS) e análise molecular da expressão dos genes *gtfB*, *gtfC*, *ftf*, *comD*, *comE*, *vicR*, *gbpB*, *luxS* e *vicX*. Os discos de esmalte, por sua vez, serão avaliados através de teste de microdureza de secção transversal para determinação da profundidade das lesões cariosas formadas bem como para determinação da área da lesão de cárie desenvolvida em cada condição experimental analisada.

**Objetivo da Pesquisa:**

Objetivo Primário:

O objetivo geral do estudo é avaliar as respostas minerais, bioquímicas e moleculares de um biofilme desenvolvido *in situ*. Objetivos específicos serão: 1) Permitir a posterior comparação da dose-resposta à Clorexidina de um modelo *in vitro* de biofilme com a dose-resposta do biofilme formado *in situ*. 2) Comparar a capacidade de desenvolvimento de lesões artificiais de cárie (desmineralização) de modelo *in vitro* de biofilme com o modelo *in situ*. 3) Proporcionar a comparação de um modelo de biofilme *in vitro* através da expressão gênica de microrganismos e das características bioquímicas e metabólicas dos biofilmes produzidos em relação à essas mesmas características do biofilme formado *in situ*.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Riscos:

Os riscos que ocorrem nesse tipo de estudo são mínimos. Referem-se, principalmente, ao acúmulo de placa dentária nas amostras protegidas pela tela plástica. Mas é importante ressaltar que o participante poderá continuar a limpeza normal de seus dentes.

Benefícios:

Tomando como base que estudos de *in situ* possuem certas desvantagens, o presente estudo visa produzir respostas minerais, biológicas e moleculares para comparação e validação de estudos de biofilmes complexos *in vitro* para que a participação de voluntários não seja necessária.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

O Trabalho é de relevância científica.

**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: 709.854

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Sem particularidades.

**Recomendações:**

Unir a carta de informação ao paciente com o "TCLE" apresentado ao CEP, confeccionando, assim, um único TCLE com linguagem simplificada.

Informar no novo TCLE que as amostras ficarão retidas para estudos futuros.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Avaliar e considerar as recomendações.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

PELOTAS, 05 de Julho de 2014

---

**Assinado 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