



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

WESLANNY DE ANDRADE MORAIS

***ANÁLISE *IN VITRO* DA CARIOGENICIDADE DE SOROTIPOS DE
STREPTOCOCCUS MUTANS EM BIOFILME MONOESPÉCIE E ASSOCIADO À
CANDIDA ALBICANS***

FORTALEZA

2023

WESLANNY DE ANDRADE MORAIS

ANÁLISE *IN VITRO* DA CARIOGENICIDADE DE SOROTIPOS DE *STREPTOCOCCUS MUTANS* EM BIOFILME MONOESPÉCIE E ASSOCIADO À *CANDIDA ALBICANS*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Odontologia.

Área de concentração: Clínica Odontológica/Setor de Estudos: Cariologia.

Orientadora: Profa. Dra. Lidiany Karla Azevedo Rodrigues Gerage.

FORTALEZA

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

M826a Morais, Weslanny de Andrade.
Análise in vitro da cariogenicidade de sorotipos de *Streptococcus mutans* em biofilme monoespécie e associado à *Candida albicans* / Weslanny de Andrade Morais. – 2023.
88 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Fortaleza, 2023.
Orientação: Prof. Dr. Lídiany Karla Azevedo Rodrigues Gerage.

1. Cárie Dentária. 2. Dentina. 3. Desmineralização. 4. *Streptococcus mutans*. 5. *Candida albicans*. I.
Título.

CDD 617.6

WESLANNY DE ANDRADE MORAIS

ANÁLISE *IN VITRO* DA CARIOGENICIDADE DE SOROTIPOS DE *STREPTOCOCCUS MUTANS* EM BIOFILME MONOESPÉCIE E ASSOCIADO À *CANDIDA ALBICANS*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Odontologia.

Aprovada em: ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Lidiany Karla Azevedo Rodrigues Gerage (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Iriana Carla Junqueira Zanin dos Santos
Universidade Federal do Ceará (UFC-Sobral)

Profa. Dra. Beatriz Gonçalves Neves
Universidade Federal do Ceará (UFC-Sobral)

Profa. Dra. Juliana Paiva Marques Lima Rolim
Centro Universitário Christus (Unichristus)

Profa. Dra. Simone Duarte
Indiana University School of Dentistry (IUSS)

Profa. Dra. Vanara Florêncio Passos (Suplente)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, que sempre me deu força e acalmou meu coração nos dias mais cansativos e ansiosos de uma rotina corrida, em que era preciso revezar entre cuidar da família, cuidar de um trabalho com 40 horas semanais em uma empresa privada e cuidar de uma pesquisa que requer total presencialidade. A Ele, que nos fez ressignificar tantas coisas quando nos pegou de surpresa com a Pandemia Mundial de COVID-19, fazendo-nos crer que nada na vida tem sentido sem sua Graça e misericórdia diárias. O amor Dele nos constrange.

A minha família, Regina Fátima de Andrade Moraes, Josimar de Sousa Moraes e Wesley de Andrade Moraes, que sempre me apoiaram nos estudos e torcem diariamente pelo meu sucesso e felicidade profissional. Obrigada, minha mãe, por suas preocupações e orações diárias. Obrigada por vocês entenderem minhas ausências e infinitas idas ao laboratório em feriados e fins de semana.

Ao meu esposo, Felipe Maia Balbuena da Silva, que há dez anos acompanha minha rotina dividida entre trabalhos e estudos. Obrigada por escolher compartilhar a vida comigo, entender minhas ausências, me apoiar, me acalmar e me fazer rir nos momentos mais necessários. Este projeto, além de tudo, é por nossa nova família.

À Profa. Dra. Lidiany Karla Azevedo Rodrigues Gerage, pela paciência, pela compreensão, pela ajuda e, sobretudo, pela confiança. Uma longa jornada de 12 anos trabalhando juntas, na qual eu, ainda menina, entrava no grupo de pesquisa mais animado da Microbiologia do PPGO, em 2010, e hoje saio com muito aprendizado. Passaram-se a Iniciação científica, depois veio o Mestrado, a docência ao seu lado no período como professora substituta da UFC e aqui estamos na finalização de um Doutorado. Sua forma de trabalhar faz com que crescamos e aprendamos a resolver os problemas e percalços que aparecem no meio do caminho. Precisamos estar atentos e sempre pensando em um plano B para nos anteciparmos e trabalharmos da melhor maneira possível com o que temos. A docência entrou em minha vida graças a uma ligação sua em uma tarde. Foi um incentivo em algo que nem eu mesma acreditava que daria certo. Deixei que Deus conduzisse todas as coisas e me dediquei até aqui. Muito Obrigada!

Às professoras e colegas de profissão, Dra. Mary Anne Sampaio de Melo, Dra. Ramille Araújo Lima, Dra. Vanara Florêncio Passos e Dra. Juliana Marques Paiva Lima, tanto me ensinaram, ainda ensinam e inspiram desde a graduação.

Aos meus companheiros de laboratório do PPGO, Sussan Daniela Salazar Segales, Fábio Ruan Louzeiro Lima, Wanessa Fernandes Matias Regis, Héllen Súzany Freire Silva, Maria Tayara Marques de Freitas e tantos outros colegas do PPGO com quem tive o prazer de conviver e dividir tantos momentos juntos no laboratório durante todos os anos de Pós-Graduação. Nenhuma pesquisa é possível de sair do papel sem o apoio e trabalho braçal em equipe. Tantas vezes vocês surgiam como anjos para ajudar nos dias mais corridos e puxados de laboratório. Infinitamente obrigada pela disponibilidade e lanchinhos com conversas e risadas na partilha dos problemas diários ou até mesmo as risadas diante das privações dos lanchinhos durante os experimentos.

Aos colegas de trabalho do curso de Odontologia da Universidade de Fortaleza, minha segunda casa, que sempre se disponibilizaram a ajudar durante as minhas ausências nas disciplinas e torciam pela finalização da pesquisa com sucesso. Esses foram mais alguns vários anjos parceiros que Deus me presenteou para também cuidarem de mim durante a Pós-Graduação.

Às amigas que a faculdade me presenteou, Gabriela Costa Parente, Camille Mangueira de Lacerda, Bruna Lima Braga de Melo e Francisca Jamila Ricarte Alexandrino, pelo incentivo frequente que me deram.

Aos alunos de iniciação científica, Raissa Oliveira da Silveira e Vitor Hugo Vasconcelos Bueno, que desenvolveram tarefas essenciais que facilitaram a organização da pesquisa e a sua finalização. Como teria sido proveitoso se tivéssemos a ajuda de vocês desde o início. Ajuda esta que em parte foi perdida pelas normas de biossegurança estabelecidas no período de restrições de convívio da Pandemia. Obrigada pela disponibilidade.

Aos pesquisadores brasileiros que tanto insistem e persistem em pesquisas de alto nível, mesmo diante da dificuldade de falta de fomento para a aquisição de insumos, equipamentos adequados ou até mesmo verba para manutenção de equipamentos importantes já instalados nos laboratórios locais. Não é simples fazer pesquisa do mesmo nível daquela existente em grandes laboratórios do exterior com algumas situações brasileiras.

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

À Universidade Federal do Ceará, na pessoa do magnífico reitor Prof. Dr. José Cândido Lustosa Bittencourt de Albuquerque.

À Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, da Universidade Federal do Ceará, na pessoa de sua diretora, Profa. Dra. Lidiany Karla Azevedo Rodrigues Gerage.

Ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, da Universidade Federal do Ceará, na pessoa de sua coordenadora, Profa. Dra. Cristiane Sá Roriz Fonteles.

Aos professores participantes das bancas examinadoras de pré-defesa e defesa, Profa. Dra. Iriana Carla Junqueira Zanin dos Santos, Dra. Marcia Maria de Negreiros Pinto Rocha, Prof. Dr. Juliano Sartori Mendonça, Profa. Dra. Juliana Paiva Marques Lima Rolim, Profa. Dra. Beatriz Gonçalves Neves, Profa. Dra. Simone Duarte e Profa. Dra. Vanara Florêncio Passos, pela disponibilidade, tempo dedicado para a leitura, além das valiosas colaborações e sugestões concedidas ao estudo.

“Então a nossa boca se encheu de riso, e a nossa língua de júbilo. Então entre as nações se dizia: ‘Grandes coisas o Senhor tem feito por eles’. De fato, grandes coisas o Senhor fez por nós, por isso, estamos alegres” (Salmo 126: 2,3).

RESUMO

A existência de genes que expressam proteínas de ligação ao colágeno (collagen-binding protein - CBP's) em alguns sorotipos de *Streptococcus mutans*, assim como sua relação com a presença de *Candida albicans* em cáries dentinárias, pode resultar em padrões mais severos de progressão da cárie no substrato dentário. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar *in vitro* lesões de cárie dentinária e as características do biofilme formado utilizando diferentes sorotipos de *S. mutans* que apresentam (+) ou não (-) genes de CBP (UA159: sorotipo *c*(-), NN2002: sorotipo *e* (-), OMZ175: sorotipo *f* (+), YT1: sorotipo *k* (+) e FT1: sorotipo *k*(-), em biofilme mono e duoespécie com *C. albicans* (ATCC 40119). No capítulo 1, foi realizada a formação de biofilme mono em triplicatas biológicas, cultivados durante 3 e 5 dias sobre blocos de dentina humana em fundo de poço (n=12). No capítulo 2, o biofilme duo foi cultivado em triplicatas biológicas, durante 3 dias, sobre blocos de dentina bovina cobertos com película adquirida simulada, sendo cultivados de duas formas: em fundo de poço (n=9) e suspensos em dispositivos metálicos (n=9). Para isso, utilizou-se placas de 24 poços com meio de cultura (TSB/extrato de levedura/sacarose) incubadas em condições de microaerofilia com 5% de CO₂ a 37 °C. Os biofilmes monoespécie foram avaliados quanto à dosagem de polissacarídeos extracelulares solúveis (PEC-S) e quantificação de biomassa. Já nos blocos, foram avaliadas as profundidade e características das lesões de cárie formadas através de microdureza longitudinal (ΔS) e microscopia eletrônica de varredura (MEV). Os biofilmes duoespécie foram avaliados quanto à contagem de UFC/mL e peso seco total. Em ambos os experimentos (mono e duo), o arcabouço dos biofilmes formados com 3 dias em fundo de poço foi avaliado por microscopia confocal. Os dados paramétricos foram submetidos à análise estatística ANOVA, seguidos do teste de Tukey e Bonferroni; e os dados não paramétricos, por teste Qui-quadrado de Fisher, utilizando o *software* estatístico GraphPad Prisma® e nível de significância de (p<0,005). Este estudo sugere que os diferentes sorotipos avaliados têm potencial cariogênico para provocar lesões de cárie em dentina em biofilme mono e duoespécie, entretanto, os sorotipos CBP+ (*f*, *k*+) não causaram lesões mais severas ou biofilmes mais densos quando comparados aos sorotipos CPB- (*c*, *e*, *k*-) sobre o substrato dentinário, mesmo quando cultivados de diferentes formas e em associação com a *C. albicans*.

Palavras-chave: Cárie dentária. Dentina. Desmineralização. *Streptococcus mutans*. *Candida albicans*.

ABSTRACT

The existence of genes that express collagen-binding proteins (CBP's) in some serotypes of *Streptococcus mutans*, as well as their relationship with the presence of *Candida albicans* in dentin caries, may result in more severe patterns of caries progression on the dental substrate. Therefore, the objective of this study was to evaluate in vitro dentin caries lesions and the characteristics of the biofilm formed using different serotypes of *S. mutans* that present (+) or not (-) CBP genes (UA159: serotype *c*(-), NN2002: serotype *e*(-), OMZ175: serotype *f*(+), YT1: serotype *k*(+) and FT1: serotype *k*(-), in mono and duospecies biofilm with *C. albicans* (ATCC 40119). In chapter 1, the formation of mono biofilm was carried out in biological triplicates, cultivated for 3 and 5 days on blocks of human dentin in the well (n=12). In chapter 2, the duo biofilm was cultivated in biological triplicates, for 3 days, on bovine dentin blocks covered with simulated acquired pellicle, being cultivated in two ways: in the bottom of a well (n=9) and suspended in metallic devices (n=9). For this, 24-well plates with culture medium were used (TSB/yeast extract/sucrose) incubated under microaerophilic conditions with 5% CO₂ at 37° C. The monospecies biofilms were evaluated for soluble extracellular polysaccharides (PEC-S) and biomass quantification. In the blocks, the depth and characteristics of the caries lesions formed through longitudinal microhardness (ΔS) and scanning electron microscopy (SEM) were evaluated. The duospecies biofilms were evaluated for CFU/mL count and total dry weight. In both experiments (mono and duo), the scaffold of biofilms formed after 3 days in the well was evaluated by confocal microscopy. Parametric data were submitted to ANOVA statistical analysis, followed by the Tukey and Bonferroni test; and non-parametric data by Fisher's chi-square test using the statistical software GraphPad Prisma® and significance level of (p<0,005). This study suggests that the different serotypes evaluated have cariogenic potential to cause caries lesions in dentin in mono and duospecies biofilms, however the CBP+ serotypes (*f* and *k*+) did not cause more severe lesions or denser biofilms when compared to the CPB- serotypes (*c*, *e* and *k*-) on the dentin substrate.

Keywords: Dental caries. Dentin. Demineralization. *Streptococcus mutans*. *Candida albicans*.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	13
2. PROPOSIÇÃO.....	22
3. OBJETIVOS.....	24
3.1 Objetivo geral.....	24
3.2 Objetivos específicos.....	24
4. CAPÍTULOS.....	26
CAPÍTULO 1.....	27
CAPÍTULO 2.....	53
5. CONCLUSÃO GERAL.....	75
REFERÊNCIAS.....	77
APÊNDICE A.....	82
ANEXO A.....	84

