PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ

ESCOLA DE CIÊNCIAS DA VIDA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO DENTÍSTICA

SHEILA REGINA BERNINI POLAQUINI

EFEITO INIBITÓRIO *IN VITRO* DE ARGININA, SERINA E GLUTAMINA SOBRE FORMAÇÃO DE BIOFILME E DESMINERALIZAÇÃO DE ESMALTE HUMANO

Curitiba
2018

SHEILA REGINA BERNINI POLAQUINI

EFEITO INIBITÓRIO *IN VITRO* DE ARGININA, SERINA E GLUTAMINA SOBRE FORMAÇÃO DE BIOFILME E DESMINERALIZAÇÃO DE ESMALTE HUMANO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Odontologia, Área de Concentração em Dentística.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Nunes Rached

Curitiba

2018

Dados da Catalogação na Publicação
Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/PUCPR
Biblioteca Central
Giovanna Carolina Massaneiro dos Santos – CRB 9/1911

Polaquini, Sheila Regina Bernini
P762e Efeito inibitório *in vitro* de arginina, serina e glutamina sobre formação de
2018 biofilme e desmineralização de esmalte humano / Sheila Regina Bernini;
orientador: Rodrigo Nunes Rached. – 2018.
62 f. : il. ; 30 cm

Tese (doutorado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, 2018
Inclui bibliografias.

1. Odontologia. 2. *Streptococcus mutans*. 3. Biofilme. 4. Arginina. 5. Serina. 6. Glutamina. 7. Cáries dentárias. 8. Esmalte dentário. I. Rached, Rodrigo Nunes. II. Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. III. Título.

CDD 22. ed. – 617.6

Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Escola de Ciências da Vida
Programa de Pós-Graduação em Odontologia

TERMO DE APROVAÇÃO

SHEILA REGINA BERNINI POLAQUINI

EFEITO INIBITÓRIO IN VITRO DE ARGININA, SERINA E GLUTAMINA SOBRE FORMAÇÃO DE BIOFILME E DESMINERALIZAÇÃO DE ESMALTE HUMANO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como parte dos requisitos parciais para a obtenção do Título de **Doutor em Odontologia**, Área de Concentração em **Dentística**.

Orientador (a): Prof. Dr. Rodrigo Nunes Rached
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, PUCPR

Prof. Dr. Edvaldo Antonio Ribeiro Rosa
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, PUCPR

Profª Drª Luciana Reis Azevedo Alanis
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, PUCPR

Profª Drª Mitsue Fujimaki
Programa de Pós-Graduação em Odontologia Integrada, UEM

Profª Drª Raquel Sano Suga Terada
Programa de Pós-Graduação em Odontologia Integrada, UEM

Curitiba, 04 de julho de 2018.

Rua Imaculada Conceição, 1155 - Prado Velho - CEP 80215901 - Curitiba - Paraná - Brasil
Tel.: (41) 3271 1637 Fone/Fax: (41) 3271 1405 Site: www.pucpr.br Email: ppgo@pucpr.br

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese às pessoas mais importantes na minha vida, meu filho Guilherme (o *que mais ela vai inventar agora?*) e meu marido Wanderci (à sua revelia) e ao meu pai.

"Educação é uma descoberta progressiva de nossa própria ignorância."
(Voltaire)

AGRADECIMENTOS

Primeiro de tudo, é preciso agradecer a Deus por me guiar, iluminar e me dar tranquilidade para seguir em frente com os meus objetivos e não desanimar com as dificuldades.

Agradeço aos meu marido, Wanderci Polaquini, companheiro de tantos anos, que entendeu, de novo, meus momentos de afastamento e reclusão. Ao meu filho Guilherme e minha nora Jéssica, estimuladores constantes.

Agradeço muito ao professor Rodrigo Nunes Rached. Pela paciência e respeito com que me tratou sempre, e especialmente pela confiança na condução do trabalho.

Agradeço aos demais professores do Programa de Pós-graduação. Tirar os alunos da zona de conforto faz parte do trabalho de vocês, e é disso que eu precisava.

Meu obrigado ao professor Sérgio Ignácio, cuja paixão pela estatística faz a gente gostar um pouquinho dela.

Agradeço aos funcionários da PUCPR, onde fui tão bem recebida, na pessoa da secretária Neide Reis Borges, pela disponibilidade em ajudar sempre, e ao Cleomar Rodrigues Lemos, pelo auxílio nos primeiros passos do laboratório.

Em especial, agradeço a Rosimeire Rosa pela inestimável ajuda no laboratório. Muito obrigado de coração.

Agradeço às contribuições da banca do exame de qualificação, e à participação dos membros da banca examinadora de defesa.

À Raquel Terada, pelo amor e carinho com que sempre me recebe. Você é iluminada! À Mitsue Fujimaki, pelas palavras de apoio.

Agradeço as minhas amigas, irmãs do coração, e companheiras do dia a dia de trabalho, Alline França e Adriana Beloti. Vocês acompanharam todo o processo, sei que torciam diariamente por mim.

Agradeço a todos os colegas de doutorado, que vivenciaram momentos de estudo, e de tensão, no decorrer desta jornada, Marta, Berthy, Gabi, Ana Paula, Claudinha, Marcelo, vocês estão em meu coração. E aos que estão longe, Elisa e Rachel, saudades...

Aos meus amigos e colegas de trabalho na UniCesumar, com eles aprendi o verdadeiro valor das palavras na educação, o espírito de trabalho em equipe e amadureci como profissional.

SUMÁRIO

ARTIGO EM PORTUGUÊS 1
Página título 1
Resumo 2
Introdução 3
Material e Método 4
Resultados 9
Discussão 13
Referências 18
ARTIGO EM INGLÊS 24
Title page 24
Abstract 25
Introduction 26
Material and Methods 27
Results 32
Discussion 36
References 41
ANEXO 46
Carta resposta aos membros da banca de qualificação 46
Parecer do comitê de ética 47
Normas para publicação 52

ARTIGO EM PORTUGUÊS

Página título

Efeito inibitório in vitro de arginina, serina e glutamina sobre formação de biofilme e desmineralização de esmalte humano

Short title

Microdureza do esmalte e formação de biofilme na presença de aminoácidos.

Sheila Regina Bernini Polaquini

Aluna de Doutorado, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Área de Concentração em Dentística, Escola de Ciências da Vida, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, PR, Brasil.

R. Ingá, 60, Maringá – PR Brasil,

CEP: 87060-300

Tel: 55 (44) 3028-3555

E-mail: srbernini@gmail.com

Rodrigo Nunes Rached

Professor Titular, Programa de Pós-graduação em Odontologia, Escola de Ciências da Vida, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, PR, Brasil.

Autor correspondente:

Rodrigo Nunes Rached

R. Imaculada Conceição, 1155, Curitiba – PR, Brasil

CEP: 80215-901

Tel: 55 (41) 3271-2161

Fax: 55 (41) 3271-1405

E-mail: r.rached@pucpr.br

Resumo

Este estudo foi conduzido com objetivo de avaliar o efeito inibitório *in vitro* dos aminoácidos arginina, serina e glutamina sobre a formação de biofilme, liberação de Ca^{2+} e PO_4^{3-} e dureza superficial de esmalte humano. Biofilmes de *S. mutans* foram formados sobre 60 blocos de esmalte obtidos a partir de 60 terceiros molares humanos e subsequentemente expostos (8x ao dia) a soluções de aminoácidos (arginina, serina ou glutamina 8%), sacarose 10% (controle -) ou salina 0,9% (controle +). O meio de cultura foi trocado a cada doze horas, antes da primeira e após a oitava exposição às soluções, durante 96 horas de incubação. A liberação de Ca^{2+} e PO_4^{3-} e o pH foram mensurados a cada troca de meio. Após 96 horas, a dureza final dos blocos de esmalte foi mensurada e o biofilme formado foi coletado para quantificação da biomassa e contagem de células viáveis. Arginina e serina induziram menor perda de dureza em comparação à glutamina, a sacarose e ao controle ($p<0,05$). A sacarose apresentou os menores valores de pH no final do experimento. Todos os aminoácidos apresentaram pH acima de 6,5 ao longo do experimento. A serina apresentou a menor liberação de Ca^{2+} e PO_4^{3-} e a menor formação de biomassa entre os grupos ($p<0,05$). Arginin e serina apresentaram contagem de células viáveis maior que a salina e menor que a sacarose ($p<0,05$), enquanto a glutamina não apresentou diferença se comparada à sacarose. Concluindo, a arginina e a serina foram superiores à glutamina em inibir formação de biofilme e desmineralização de esmalte humano.

Palavras-chave: *Streptococcus mutans*; Biofilme; Arginina, Serina, Glutamina; Cárie dentária, Esmalte dentário

Introdução

Na década de 1960, a produção de ácidos como determinante para a instalação das cáries era o conceito dominante [Bowen, 2013; Wijeyeweera, and Kleinberg, 1989]. No final da década de 1970 e no início dos anos 1980 [Marquis, 1988; Kleinberg et al., 1982], alguns estudos ilustraram que a produção de bases através de substratos salivares, especialmente arginina e ureia, poderia representar um papel importante na homeostasia do pH da placa e na inibição das cáries [Hyatt, and Hayes, 1975]. Assim, a capacidade dos biofilmes em produzir bases que possam neutralizar e prevenir o aparecimento da microbiota cariogênica é um fator crítico na prevenção ou inibição da progressão das lesões cariosas [Marsh, 2003; Burne, and Marquis, 2000; Huang et al., 2012; Sheng et al., 2010].

A arginina é um exemplo de substrato para geração de bases em biofilmes orais [Li et al., 2015]. A arginina na forma livre é secretada na saliva em concentrações próximas a 50 mM, e também é abundante em peptídeos salivares e proteínas [Vranić et al., 1991][. A arginina é primariamente catabolizada em ornitina, amônia e CO_2 por algumas espécies de estreptococos, lactobacilos e espiroquetas. Uma forte correlação entre níveis elevados de arginina livre na saliva e resistência às cáries tem sido observada [Reyes et al., 2014; Bijle et al., 2018; Fonteles et al., 2009; Nascimento et al., 2009]. Além disso, a placa dental de indivíduos cárie-resistentes parece ter pH mais alto quando comparados à indivíduos suscetíveis, e esse pH mais alto tem sido relacionado à elevados níveis de amônia [Kesel et al., 1946; Burne, and Marquis, 2000; Nascimento et al., 2009].

A glutamina é o aminoácido livre mais abundante no plasma e no tecido muscular [Watford, 2015] e é encontrada na saliva em concentrações que giram em torno de 40µmol/L [Masoudi Rad et al., 2014]. A glutamina está envolvida na síntese de ácidos nucléicos, nucleotídeos e proteínas, sendo o maior doador de nitrogênio, que é hidrolisado pela glutaminase em NH_4, precursor da amônia [Lu et al., 2013; Masoudi Rad et al., 2014]. Os aminoácidos com efeito sobre as cáries precisam aumentar a quantidade de NH_4 e os amino grupos da serina podem ser diretamente convertidos em NH_4 [Liu et al., 2003; Nagata et al., 2006].

A serina é encontrada na saliva em concentrações próximas a 30 µmol/L e é precursora da glicina [Masoudi Rad et al., 2014]. Serina e glutamina apresentaram correlação positiva com baixa prevalência de cáries crianças [Masoudi Rad et al., 2014].

A utilização de aminoácidos no controle das cáries aumenta diretamente o pH da placa, que leva o balanço em favor da remineralização e longe da desmineralização, e favorece a sobrevivência de bactérias associadas à saúde, enquanto desencoraja o crescimento das bactérias cariogênicas que dependem de baixo pH para garantir vantagens ecológicas, como o *S. mutans* [Marquis, 1988; Nascimento et al., 2013; Huang et al., 2015a].

Considerando todo o exposto acima, são necessários estudos para confirmar se a presença de aminoácidos precursores da amônia na placa é de fato efetiva contra as cáries. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de redução da desmineralização (perda de dureza superficial) do esmalte dental humano exposto a biofilme de *S. mutans* na presença dos aminoácidos arginina, serina e glutamina *in vitro*, e comparar a produção de biomassa e a liberação de Ca^{2+} e PO_4^{3-} no meio de cultura, na presença destes aminoácidos.

As hipóteses testadas foram de que não há diferença de efeito entre os aminoácidos arginina, serina e glutamina quanto às propriedades de perda de dureza, liberação de Ca^{2+} e PO_4^{3-} e biomassa de biofilme de *S. mutans*.

Material e Método

O presente estudo *in vitro* foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da instituição local (1.672.860) e conduzido utilizando um modelo de biofilme cariogênico proposto por Ccahuana-Vásquez [Ccahuana-Vásquez, and Cury, 2010].

O fator de estudo foi a atividade da arginina, serina e glutamina sobre o biofilme de *Streptococcus mutans* cepa ATCC® 25175™. A cepa foi mantida sob congelamento (freezer -20 ºC), em alíquotas de 5,0 ML em BHI (Brain Heart Infusion, Kasvi, Liofilchem, Italy), adicionado de 10% de glicerol, e repicadas 24 h antes de cada experimento em BHI a 37 °C e p CO_2 10%.

O biofilme de *S. mutans* foi cultivado sobre blocos de esmalte humano com dureza previamente determinada, cobertos por uma película adquirida e suspensos verticalmente em meio de cultura extrato de levedura (Acumedia Co, Lansing, MI) com triptona (Biobras Ltda, Montes Claros, Minas Gerais, Brasil) filtrado (TYEB) [Koo et al., 2003; Sonia et al., 2015] a 37°C e p CO_2 10% por 5 dias [Ccahuana-Vásquez, and Cury, 2010] distribuídos em 5 diferentes grupos (n=12) e expostos por 1 min, oito vezes ao dia a soluções de D sacarose 10% (Dinamica Ltda, São Paulo, Brasil) NaCl 0,9%(controle) e L-arginina 8% (Inlab Ltda, Brasil) L serina 8% (Inlab Ltda, Brasil) e L glutamina 8% (Inlab Ltda, Brasil) [Koopman et al., 2017; Wang et al., 2016]. Depois de 96 h, a biomassa, a contagem de bactérias viáveis e a liberação de Ca^{2+} e PO_4^{3-} acumuladas no meio de cultura foram determinadas e a perda mineral do esmalte foi analisada. O pH e as concentrações de Ca^{2+} e PO_4^{3-} no meio de cultura foram analisados diariamente, a cada troca do meio. (Figura 1)

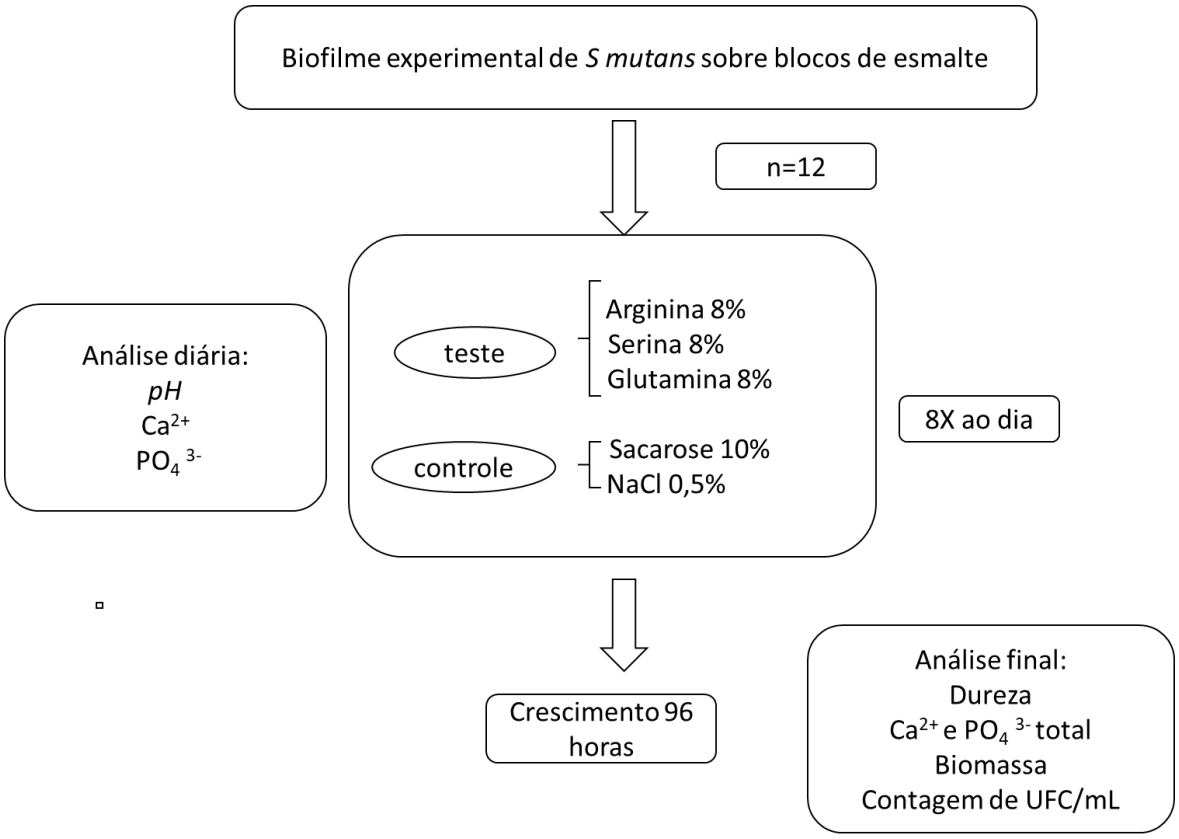


Figura 1: delineamento experimental

Preparo dos blocos de esmalte

Sessenta terceiros molares extraídos, livres de defeitos de esmalte aparentes, trincas macroscópicas e manchas verificadas por exame visual obtidos no banco de dentes da instituição local foram usados para este estudo *in vitro.* Os dentes foram mantidos em solução de cloramina T 0,5% (Dinamica Ltda, São Paulo, Brasil) a 4°C por no máximo seis meses. 60 blocos de esmalte (4mm X 4mm X 2mm) foram recortados com disco diamantado refrigerado por água em uma cortadeira de precisão IsoMet™ Low Speed (Precision Cutter, Buehler, Lake Bluff, IL). As superfícies a serem tratadas foram polidas com lixa SIC (carbeto de silício) de granulações 600#, 800#, 1200#, 1500#, 2000# e 3000# (3M do Brasil, Sumaré, SP, Brasil), e com pasta de polimento diamantada (Arotec Ind e Com, Cotia, SP, Brasil) de 1µm e ¼ µm em politriz automática Aropol® 2v (Arotec Ind e Com, Cotia, SP, Brasil) em sequência, por 30 segundos cada. As dimensões finais dos blocos foram verificadas com paquímetro digital CD-15CX (Mitutoyo Co, Tóquio, Japão). A dureza inicial foi medida utilizando um microdurômetro HMV-2T (Shimadzu Co, Tóquio, Japão) com 3 indentações com espaço de 100 µm entre elas, utilizando uma ponta diamantada Knoop aplicada com carga de 25g por 5 segundos [Ccahuana-Vásquez, and Cury, 2010]. Os espécimes com dureza média de 355± 9,8 KHN foram selecionados e alocados aleatoriamente em 5 grupos de 12 espécimes. Os blocos foram colocados em placas de cultura de células com 24 poços com fundo chato Costar™ (Corning Inc, NY), em posição vertical utilizando um dispositivo feito com fio ortodôntico 0,8 e submetidos à esterilização por óxido de etileno [Thomas et al., 2007; Viana et al., 2017].

Modelo de biofilme

O modelo de biofilme proposto inicialmente por Ccahuana Vásquez [Ccahuana-Vásquez, and Cury, 2010], foi aplicado com modificações [Fernández et al., 2016; Costa Oliveira et al., 2017]. Para preparar o inóculo as colônias foram transferidas para caldo de extrato de levedura com triptona filtrado (TYEB; 2,5% de triptona e 1,5% de extrato de levedura), suplementado com glicose 1% [Ccahuana-Vásquez, and Cury, 2010; Fernández et al., 2016; Costa Oliveira et

al., 2017] e incubadas por 12 horas a 37ºC e p CO_2 10%. As células foram então centrifugadas a 4000 *g*, lavadas duas vezes com solução salina e ressuspensas em meio TYEB fresco. O inóculo foi padronizado em espectrofotômetro em OD_{600} em 1,6 ± 0,5 [Ccahuana-Vásquez, and Cury, 2010]. Antes da adesão bacteriana os espécimes foram imersos em saliva a 37º C por 30 min [Fernández et al., 2016] para formar película adquirida. Saliva humana fresca foi previamente coletada de dois doadores saudáveis. A estimulação salivar foi feita com mastigação de um bloco de parafina e a saliva foi coletada em tubos de 50 ml de polipropileno no gelo por 30 minutos. A saliva foi centrifugada (4000 *g*, 4º C) e filtrada em membrana de 0,22 µm de diâmetro.

Os blocos de esmalte cobertos pela película de saliva foram transferidos para poços contendo 2 mL de meio TYEB fresco tamponado e o inóculo bacteriano (1:500v/v) e incubados 37ºC e 10% CO_2, em agitação, por 8 horas para promover a adesão inicial. Depois desse período, os espécimes foram transferidos para meio TYEB fresco acrescido de glicose 1mM e incubados em estufa por 16 h a 37ºC e p CO_2 10%. No dia seguinte, os espécimes foram transferidos para um meio fresco e expostos oito vezes ao dia por 1 minuto às soluções de aminoácidos a 8% (arginina, serina e glutamina, em grupos individuais), solução de sacarose 10% como controle negativo e solução salina 0,9% como controle positivo. Esse procedimento foi repetido por quatro dias consecutivos. Após a exposição às soluções os espécimes eram lavados 3 vezes com solução salina 0,9% estéril. O pH do meio de cultura foi determinado duas vezes ao dia, antes da primeira exposição e antes da última exposição aos aminoácidos. A cada substituição, o meio de cultura foi armazenado em microtubos de 2 mL (Axygen, Union City, CA) e congelado a - 20°C (Figura 2)

Para a determinação da capacidade de produção de ácido pelas amostras, foram realizadas medições do pH do meio de cultura duas vezes ao dia, com um medidor de pH PG1800 (Labstore Com. e Ind. Ltda, Brasil), calibrado a cada medição.

Análise do meio de cultura

O pH do meio de cultura coletado duas vezes ao dia foi analisado, e

posteriormente verificada a concentração de Ca^{2+} e PO_4^{3-}. O Ca^{2+} e PO_4^{3-} dos meios armazenados por congelamento foram analisados por ensaio colorimétrico usando Arsenazo III e o molibdato de amônio [Rankine et al., 1985; Tenuta, LMA; Del bel Cury, AA; Bortolin, MC, Vogel, GL; Cury, 2006], e a absorbância lida a 650 nm em microplacas de 96 poços (Greiner Bio-one, Americana, São Paulo, Brasil/ TP-Reader®, Thermo Plate, China).

A avaliação da concentração de Ca^{2+} e PO_4^{3-} liberados no meio de cultura foi realizada em relação à concentração inicial de Ca^{2+} e PO_4^{3-} no meio, sendo executada a medida a cada troca de meio (12 h).

Ao final do 4º dia de incubação, os espécimes foram removidos do meio de cultura e lavados com solução salina 0,9% e colocados em microtubos de 2 mL previamente pesados contendo 1 ml de solução salina. Os biofilmes dos espécimes foram removidos em agitador de tubos AP56 (Phoenix, Araraquara, SP, Brasil) por 30 segundos a 3800 rpm, e os blocos de esmalte armazenados para o ensaio de desmineralização. A suspensão de biofilme foi centrifugada a 10000 *g* por 5 minutos, o sobrenadante removido cuidadosamente, e o precipitado pesado para obter a biomassa.

Viabilidade bacteriana

Uma alíquota de 100 µl da suspensão foi diluída em série em solução salina 0,9% até atingir a concentração de 10^{-4} UFC/mL [Koo et al., 2003] e duas gotas de 20 µl de cada diluição foram inoculadas em meio BHI ágar (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany) para determinar o número de células viáveis. As placas foram incubadas por 48 h a 37°C e p CO_2 10%, e a contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) foi realizada com o auxílio de um contador de colônias eletrônico [Ccahuana-Vásquez, and Cury, 2010].

Determinação da desmineralização

A dureza superficial foi utilizada como indicador da desmineralização do esmalte. Três indentações, separadas por 100 µm, foram feitas nos espécimes antes e depois do experimento, utilizando um microdurômetro. A porcentagem de perda de dureza superficial Knoop (%SHL) foi expressa como a percentagem da

perda de dureza, calculada pela equação [Fernández et al., 2016]:

$$\%SHL = \frac{(Dureza\ inicial - Dureza\ final)}{Dureza\ inicial}\ X\ 100$$

Análise de dados

Os dados foram inicialmente avaliados quanto à normalidade utilizando os testes de Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk.

A análise do efeito dos tratamentos nas variáveis dependentes pH, dureza de esmalte, biomassa formada e contagem de células viáveis foi determinada pelo teste não-paramétrico de Kruskall-Wallis para amostras independentes.

A liberação de Ca^{2+} e PO_4^{3-} no meio e a variação de pH foi medida diariamente e analisada por estatística descritiva. As comparações múltiplas entre os tratamentos para as variáveis liberação de Ca^{2+} e PO_4^{3-}, variação de pH e perda de dureza foram determinadas por meio do teste não-paramétrico de Dunn.

A análise de correlação de Pearson (r) verificou a correlação entre as diferentes variáveis avaliadas foi realizada.

Todos os testes estatísticos foram conduzidos no software SPSS 23.0 (IBM, Chicago, IL), com nível de significância de 5%.

Resultados

A Tabela 1 apresenta as comparações entre os grupos para cada variável dependente analisada.

Tabela 1. Médias e desvios-padrão das variáveis analisadas para cada ratamento

	%SHL	Biomassa (µg)	UFCxmL (log10)	Ca^{2+} total	PO_4^{3-} total
Arginina	16,59 (16,21) [a]	9,82 (6,64) [a]	6,58 (0,08) [a]	2,32 (1,53) [ab]	0,70 (2,05) [a]
Serina	22,34 (14,70) [a]	4,99 (1,47) [b]	6,59 (0,08) [a]	0,32 (1,94) [ca]	-0,86 (2,92) [a]
Glutamina	54,00 (13,49) [b]	9,55 (5,38) [a]	6,65 (0,09) [b]	-0,18 (1,62) [c]	15,60 (2,87) [b]
Salina	55,85 (9,65) [b]	13,28(5,56) [ac]	6,40 (0,05) [c]	7,80(5,53) [bd]	57,84(14,24) [c]
Sacarose	78,86 (8,21) [c]	13,42 (3,66) [c]	6,69 (0,22) [b]	11,13 (3,36) [d]	12,46 (3,03) [b]

Letras distintas nas colunas unem tratamentos que diferem significativamente entre si (p<0,05)

Houve diferenças estatisticamente significantes entre os tratamentos para a variável perda de dureza superficial do esmalte (%SHL). A arginina e a serina não diferiram entre si ($p>0,05$), porém apresentaram menor perda de dureza em comparação à glutamina, salina e sacarose ($p<0,05$). Glutamina e salina diferiram da sacarose ($p<0,05$), e essa apresentou a maior perda de dureza superficial.

O tratamento com solução salina permitiu a obtenção de menor carga bacteriana (6,40 ± 0,05 UFC/mL) que os outros tratamentos ($p<0,05$) Para formação de biomassa, a serina diferiu de todos os outros tratamentos, bem como do controle ($p<0,05$) (Tabela 1).

Entre os tratamentos para as variáveis de Ca^{2+} e PO_4^{3-} acumulados houve diferenças estatisticamente significantes. A serina e a glutamina apresentaram os menores valores de liberação de Ca^{2+} ($p<0,05$), não diferindo entre si ($p>0,05$). A arginina não diferiu da salina e da sacarose($p>0,05$) para liberação de Ca^{2+}. A serina e a arginina apresentaram os menores valores de liberação de PO_4^{3-} ($p<0,05$), não diferindo entre si ($p>0,05$), não havendo diferença entre glutamina e sacarose, porém a salina apresentou a maior liberação de PO_4^{3-}, diferindo de todos os outros tratamentos ($p<0,05$) para a liberação de PO_4^{3-} (Tabela 1).

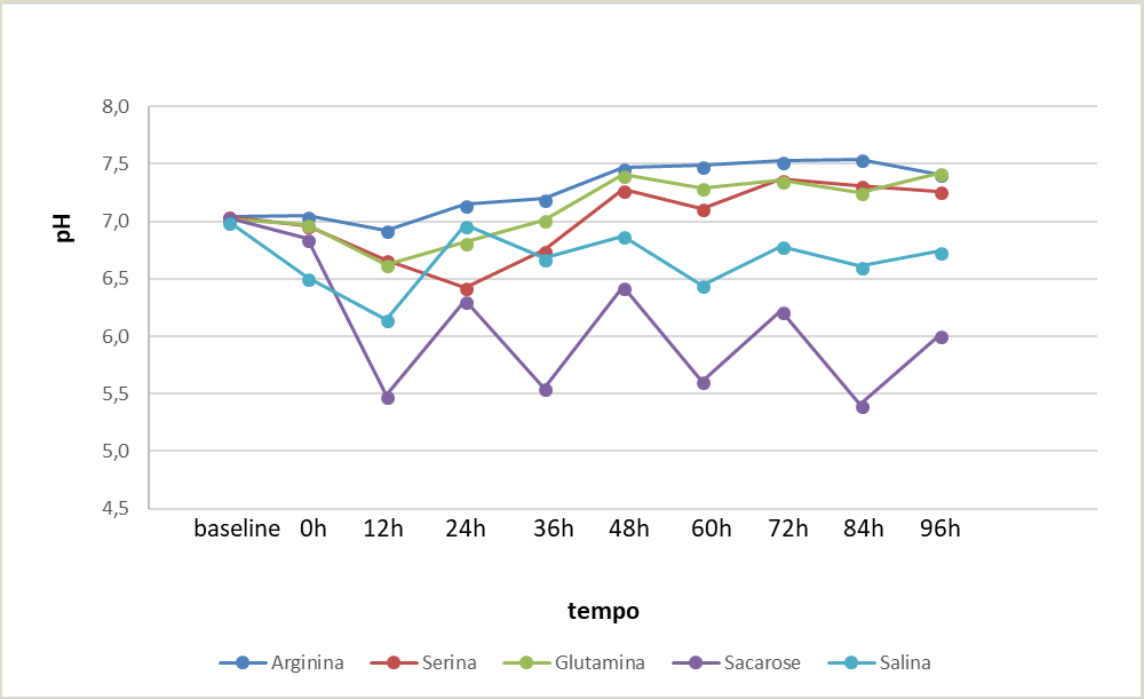


Figura 2: variação de pH no meio de cultura para cada tratamento no decorrer do experimento.

Os valores de pH mais baixos foram observados no meio que recebeu o banho com sacarose, desde as primeiras 12 horas de cultivo, permanecendo abaixo de 6,5 ao longo de todo o experimento, enquanto para todos os aminoácidos observou-se ligeira queda nos momentos iniciais do experimento (até 12 horas), com subsequente aumento ao longo do tempo de cultivo, para valores iguais ou maiores que 7,0 ao longo do tempo do experimento. A salina não apresentou alterações significativas de pH durante o experimento (Figura 2) A concentração de Ca^{2+} no meio de cultura durante o desenvolvimento do biofilme foi mais alta para o grupo da sacarose e para a glutamina (Figura 3). A concentração acumulada de Ca^{2+} liberada ao longo do experimento também foi maior para o grupo que recebeu o banho com a solução de sacarose (Figura 3). A liberação de PO_4^{3-} ao longo do experimento apresentou valores instáveis para todos os tratamentos (Figura 4)

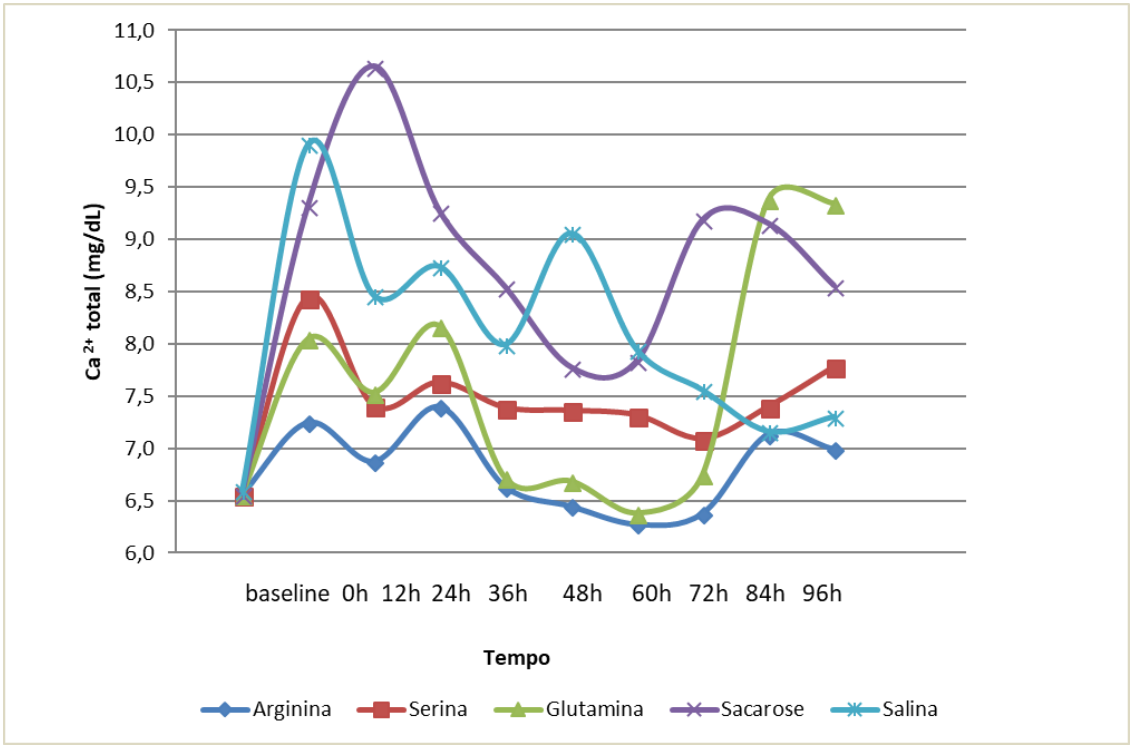


Figura 3: Concentração acumulada de Ca no meio de cultura para cada tratamento no decorrer do experimento, a partir da concentração inicial.



Figura 4: Concentração de fósforo no meio de cultura para cada tratamento no decorrer do experimento, a partir da concentração inicial do meio.

Houve correlação negativa de Pearson (r= -0,773, p<0,001) entre perda de dureza e pH no final do experimento (96 horas).

A análise de correlação de Pearson entre as variáveis analisadas, independente de tratamentos, revelou correlação estatisticamente significante positiva moderada entre %SHL e liberação total de Ca^{2+} , e %SHL e biomassa, e positiva fraca entre biomassa e liberação total de Ca^{2+} e PO_4^{3-} , %SHL e liberação total de PO_4^{3-} , e liberação total de Ca^{2+} e PO_4^{3-} , e correlação significante negativa moderada entre UFC/mL e liberação total de PO_4^{3-} (p<0,05) (Tabela 2).

Nas análises individuais apenas a glutamina apresentou correlação positiva de Pearson (r=0,735, p 0,006) e de Spearman (ρ=0,818, ρ=0,001) entre perda de dureza e concentração de Ca^{2+} acumulado, e negativa de Spearman entre perda de dureza e concentração de PO_4^{3-} acumulada (ρ= -0,587, p=0,045).

Estes achados de correlação demonstram que as variáveis dependentes analisadas se relacionam e podem conjuntamente rejeitar a hipótese científica central de nulidade proposta no estudo (Tabela 2).

Tabela 2: Correlação de Pearson (*r*)

		Biomassa (µg)	%SHL	UFC(log10)	Ca total
%SHL	Correlação de Pearson	,371			
	Valor *p*	0,004			
UFC (log10)	Correlação de Pearson	-0,060	0,154		
	Valor *p*	0,651	0,239		
Ca^{2+} total	Correlação de Pearson	,415	,**5**91	-0,030	
	Valor *p*	0,001	0,000	0,821	
PO_4^{3-} total	Correlação de Pearson	,321	,390	-,496	,337
	Valor *p*	0,012	0,002	0,000	0,008

Discussão

As hipóteses nulas formuladas para este estudo foram rejeitadas, uma vez que houve diferença nos valores de dureza do esmalte exposto aos aminoácidos em comparação com a sacarose e a solução salina, na concentração de Ca^{2+} e PO_4^{3-} liberada no meio de cultura e também para a formação de biomassa.

Este estudo utilizou um modelo *in vitro* para avaliar a perda mineral do esmalte, reproduzindo o processo de desenvolvimento da cárie e permitindo analisar o efeito inibitório dos aminoácidos nessa doença [Ccahuana-Vásquez, and Cury, 2010; Fernández et al., 2016]. Um modelo monoespécie de um sorotipo conhecido de *S. mutans* foi empregado para a formação de biofilme e desmineralização do esmalte, o qual criou uma condição capaz de produzir lesão semelhante à cárie em esmalte, devido ao favorecimento da formação de biofilme [Sonia et al., 2015]. Devido à complexidade dos biofilmes dentais, o estudo de mecanismos é melhor conduzido em biofilmes mono espécies, dos quais se pode

deduzir conclusões relevantes para mecanismos mais complexos [Huang et al., 2017], e modelos *in vitro* são apropriados quando o objetivo é testar um processo isolado , onde uma situação complexa com muitas variáveis pode confundir os dados [Moron et al., 2013]. Os espécimes foram expostos aos tratamentos durante o dia, enquanto à noite, os biofilmes foram mantidos no mesmo meio até a manhã seguinte. A diferença de dureza no início e no final do experimento refletiu o ganho (remineralização) ou perda (desmineralização) de mineral da estrutura dental, uma vez que há uma correlação significativa entre dureza Knoop percentual de perda mineral [Sim et al., 2016].

A identificação de aminoácidos presentes na saliva de indivíduos sem cáries poderia determinar fatores responsáveis pela imunidade baseada na produção de quantidades de amônia [Bijle et al., 2018; Nagata et al., 2006]. Indivíduos livres de cáries possuem sistemas enzimáticos capazes de converter pelo menos 6 aminoácidos em amônia, de forma continua, como a arginina, alanina, ácido aspártico, asparagina, ácido glutâmico, isoleucina e serina [Kesel et al., 1945; Vranić et al., 1991; Masoudi Rad et al., 2014]**.** Apesar dos estudos, os pesquisadores não chegaram a uma conclusão definitiva sobre quais aminoácidos estão ligados à experiência de cárie [Bijle et al., 2018; Wang et al., 2017]. Além disso, não existe correlação com a sua quantidade na saliva, com saliva estimulada e não estimulada, ou com suas propriedades físicas ou cadeias laterais [Masoudi Rad et al., 2014; Vranić et al., 1991; Nagata et al., 2006; Hyatt, and Hayes, 1975].

O papel da arginina no biofilme oral está bem documentado [Kolderman et al., 2015; Reyes et al., 2014; Huang et al., 2012; Li et al., 2015; He et al., 2016; Huang et al., 2017], mas existem poucos dados acerca do papel de outros aminoácidos sobre a placa dental. Os resultados deste estudo *in vitro* coincidem com os resultados de outras pesquisas que verificaram efeito inibitório de alguns aminoácidos sobre a cárie, especificamente a glicina, prolina, glutamina, taurina, serina e fenilalanina [Masoudi Rad et al., 2014; Vranić et al., 1991].

No presente estudo, os blocos foram colocados em um meio com pH neutro, e durante as primeiras horas do experimento, o metabolismo de carboidratos acidificou o meio, gerando uma queda de pH. A cada 12 h o meio foi

substituído por um meio fresco, com pH neutro. A medida que o biofilme amadurece, durante o experimento, observa-se que a queda de pH produzida pela sacarose e pela solução salina é mais acentuada, enquanto que para os aminoácidos, o pH tende a subir ao longo do experimento. A queda de pH observada para a sacarose condiz com os dados encontrados sobre perda de dureza nos blocos de esmalte cultivados com o tratamento com sacarose, bem como a menor alteração de dureza observada para a serina e para a arginina é compatível com a menor alteração de pH observada ao longo do experimento. Diversos estudos relatam que a alteração de pH promovida pelo metabolismo da microbiota oral leva à desmineralização do esmalte [Díaz-Garrido et al., 2016]. A exposição frequente a condições de baixo pH rompe a homeostasia e leva ao crescimento de espécies acidogênicas e acidúricas, predispondo as superfícies dentais às cáries [Marsh, 2003; Zheng et al., 2015; Fernández et al., 2016; Ccahuana-Vásquez, and Cury, 2010; Marsh et al., 2015]. A produção de um pH básico a partir da amônia tem sido relatada com uma das formas de controlar o pH do biofilme e reduzir o potencial desmineralizante [Kesel et al., 1946; Huang et al., 2012; Burne, and Marquis, 2000; Chakraborty, and Burne, 2017]. A arginina tem sido bem documentada como importante auxílio à regulação de pH no biofilme dental [Huang et al., 2012; Zheng et al., 2015; Huang et al., 2017; Li et al., 2015], o que se repetiu nesse estudo. Outros aminoácidos foram relacionados positivamente com ausência de cáries [Fonteles et al., 2009; Masoudi Rad et al., 2014; Nagata et al., 2006; Vranić et al., 1991], em estudos relacionando indivíduos livres de cárie e a presença de aminoácidos na saliva [Bijle et al., 2018; Masoudi Rad et al., 2014; Fonteles et al., 2009]. Os resultados do presente estudo mostram que o biofilme formado sob exposição frequente aos aminoácidos arginina e serina produz queda de pH menos acentuada, com aumento deste conforme o biofilme amadurece, diferentemente do biofilme formado na presença de sacarose. A sacarose apresentou o maior percentual de perda de dureza do esmalte, seguido da glutamina e da serina e arginina, com menor perda percentual, que não diferiram entre si. Estudos anteriores já haviam demonstrado que a arginina pode promover menor desmineralização em estudos *in vitro* e *in situ* [Yamashita et al., 2013; Souza et al., 2013].

Este estudo encontrou correlação positiva entre a perda de dureza e a liberação de Ca^{2+} no meio. Como discutido anteriormente em outros estudos *in vitro,* a cinética do Ca^{2+} é inversa à dinâmica do pH [Fernández et al., 2016; Costa Oliveira et al., 2017]. Maior produção ácida causa maior desmineralização do esmalte, liberando mais Ca^{2+} para o meio de cultura. O cálcio é continuamente liberado do esmalte para o meio, sendo um indicador químico da desmineralização do esmalte [Fernández et al., 2016], A concentração de Ca^{2+} no meio de cultura durante o desenvolvimento do biofilme foi mais alta para o grupo da sacarose e para a glutamina, o que é compatível com as alterações de pH observadas ao longo do experimento e com a perda de dureza verificada nos blocos de esmalte cultivados recebendo os tratamentos sacarose e glutamina. Este achado coincide com a perda de dureza observada para a sacarose em estudo anteriores [Tenuta, LMA; Del bel Cury, AA; Bortolin, MC, Vogel, GL; Cury, 2006; Aires et al., 2008; Leitão et al., 2012], enquanto que para os aminoácidos arginina e serina, a perda de Ca^{2+} acumulada observada ao longo do experimento é menor, bem como a alteração de pH. Mesmo com pequenas alterações de pH como as observadas para a solução salina, verifica-se aumento do Ca^{2+} no meio similar ou maior ao encontrado para os outros tratamentos, o que já foi também observado em outros estudos [Tenuta, LMA; Del bel Cury, AA; Bortolin, MC, Vogel, GL; Cury, 2006]. Quando o biofilme permanece imerso em meio sem receber tratamento, a diferença entre os grupos diminui, mas a tendência para arginina e serina é mantida. Aminoácidos básicos como a arginina melhoram a absorção do cálcio pela formação de complexos solúveis que mantém o cálcio em uma forma absorvível [Jenkins, 1972]. Devido ao pH neutro do meio na concentração inicial, a remineralização pode ocorrer durante o período de incubação noturno, o que já foi discutido em estudos que utilizaram este modelo de biofilme [Fernández et al., 2016; Costa Oliveira et al., 2017], embora as pesquisas sugiram que as concentrações de Ca^{2+} e PO_4^{3-} podem estar relacionadas à alterações na estrutura do biofilme, onde estes íons não conseguem ser disponibilizados imediatamente após alterações de pH [Cury et al., 2003]. Diversos estudos observaram queda na concentração de PO_4^{3-} [Correia et al., 2012; Tenuta, LMA; Del bel Cury, AA; Bortolin, MC, Vogel, GL;

Cury, 2006] e esta pode ser devida à receptação do PO_4^{3-} pela bactéria, porque este pode ser utilizado no metabolismo bacteriano [Cury et al., 2003; Rankine et al., 1985; Tenuta, LMA; Del bel Cury, AA; Bortolin, MC, Vogel, GL; Cury, 2006]. A sacarose apresentou a maior liberação acumulada de Ca^{2+} e a serina e a glutamina apresentaram os menores valores, o que está relacionado com a queda de pH observada no decorrer do experimento para a sacarose, e é compatível com estudos anteriores [Costa Oliveira et al., 2017; Cury et al., 2003; Cury et al., 2000].

Houve diferença na contagem de bactérias para os tratamentos com aminoácidos e sacarose em relação ao controle. Isto é compatível com outros estudos que sugerem que os aminoácidos são metabolizados pelos microrganismos, e podem exercer ação sobre seu crescimento [He et al., 2016; Hyatt, and Hayes, 1975], embora a arginina tenha atuado em alguns estudos como redutora da carga de bactérias, devido ao aumento do pH [Zheng et al., 2015; Nascimento et al., 2009; Huang et al., 2017; Chakraborty, and Burne, 2017]. No entanto, a serina provocou a menor formação de biomassa, o que sugere menor formação de polissacarídeos extracelulares e consequentemente menor capacidade de adesão, enquanto a sacarose está relacionada ao aumento da adesão e ao aumento da formação de polissacarídeos extracelulares [Koo et al., 2010; Koo et al., 2003]. Diferentes concentrações de arginina parecem alterar a quantidade de biomassa formada e a arquitetura do biofilme [He et al., 2016; Kolderman et al., 2015; Srisilapanan et al., 2013; Cugini et al., 2013]. A presença da arginina é regulatória, modulando processos essenciais incluindo o crescimento de bactérias e a formação de biofilme [Jakubovics et al., 2015], e pode ser que isso ocorra para outros aminoácidos.

Arginina e serina foram superiores à glutamina em inibir formação de biofilme e desmineralização de esmalte humano, portanto, os resultados deste estudo sugerem que outros aminoácidos podem ser testados como métodos de controle das cáries, embora diferentes concentrações ainda possam ser testadas, e para o uso em formulações comercias ainda sejam necessários outros experimentos relativos à estabilidade dos aminoácidos em solução, e à permanência em ação no meio ambiente oral.

Uma abordagem que atue sobre o biofilme e não sobre os tecidos dentais pode ser promissora [Cummins, 2013]. Os aminoácidos são fonte de substrato para os microrganismos e podem causar diferentes efeitos na placa, podendo ser utilizados para aumentar a resistência à cárie [Masoudi Rad et al., 2014]. Os achados sugerem que outros aminoácidos além da arginina podem exercer efeitos sobre a formação de biofilme e consequentemente sobre a perda de dureza do esmalte quando em meio de cultura. Mais estudos se fazem necessários para verificar a natureza desse efeito sobre o crescimento do biofilme e sobre a desmineralização do esmalte, incluindo a formação de biofilmes multiespécies e a ação concomitante do flúor sob condições de desafio cariogênico, bem como verificar sua aplicação em fórmulas comerciais com efeito anticariogênico.

Referências

Bijle MNA, Yiu CKY, Ekambaram M: Can oral ADS activity or arginine levels be a caries risk indicator? A systematic review and meta-analysis. Clin Oral Investig 2018;22:583–596.

Bowen WH: The Stephan Curve revisited. Odontology 2013;101:2–8.

Burne RA, Marquis RE: Alkali production by oral bacteria and protection against dental caries. FEMS Microbiol Lett 2000;193:1–6.

Ccahuana-Vásquez RA, Cury JA: S. mutans biofilm model to evaluate antimicrobial substances and enamel demineralization. Braz Oral Res 2010;24:135–141.

Chakraborty B, Burne RA: Effects of Arginine on Streptococcus mutans Growth, Virulence Gene Expression, and Stress Tolerance. Appl Environ Microbiol 2017;83:e00496-17.

Correia MF, Tenuta LMA, Del Bel Cury AA, Cury JA: Mineral ions in the fluid of biofilms formed on enamel and dentine shortly after sugar challenge. Caries Res 2012;46:408–412.

Costa Oliveira BE, Cury JA, Ricomini Filho AP: Biofilm extracellular polysaccharides degradation during starvation and enamel demineralization.

PLoS One 2017;12:e0181168.

Cugini C, Stephens DN, Nguyen D, Kantarci A, Davey ME: Arginine deiminase inhibits porphyromonas gingivalis surface attachment. Microbiol (United Kingdom) 2013;159:275–285.

Cummins D: Desarrollo y validación de una nueva tecnología, basada en arginina al 1.5%, un compuesto de calcio insoluble y fluoruro, para el uso diario en la prevención y tratamiento de la caries dental. J Dent 2013;1–12.

Cury JA, Marques AS, Tabchoury CPM, Del Bel Cury AA: Composition of dental plaque formed in the presence of sucrose and after its interruption. Braz Dent J 2003;14:147–152.

Cury JA, Rebelo MAB, Del Bel Cury AA, Derbyshire MTVC, Tabchoury CPM: Biochemical Composition and Cariogenicity of Dental Plaque Formed in the Presence of Sucrose or Glucose and Fructose. Caries Res 2000;34:491–497.

Díaz-Garrido N, Lozano C, Giacaman RA: Frequency of sucrose exposure on the cariogenicity of a biofilm-caries model. Eur J Dent 2016;10:345–350.

Fernández CE, Tenuta LMA, Cury JA: Validation of a cariogenic biofilm model to evaluate the effect of fluoride on enamel and root dentine demineralization. PLoS One 2016;11. DOI: 10.1371/journal.pone.0146478

Fonteles CSR, Guerra MH, Ribeiro TR, Mendonça DN, de Carvalho CBM, Monteiro AJ, et al.: Association of free amino acids with caries experience and mutans streptococci levels in whole saliva of children with early childhood caries. Arch Oral Biol 2009;54:80–85.

He J, Hwang G, Liu Y, Gao L, Kilpatrick-Liverman LT, Santarpi P, et al.: L-arginine modifies the exopolysaccharide matrix and thwarts Streptococcus mutans outgrowth within mixed-species oral biofilms. J Bacteriol 2016;198:2651–2661.

Huang X, Exterkate RAM, Ten Cate JM: Factors associated with alkali production from arginine in dental biofilms. J Dent Res 2012;91:1130–1134.

Huang X, Zhang K, Deng M, Exterkate RAM, Liu C, Zhou X, et al.: Effect of arginine on the growth and biofilm formation of oral bacteria. Arch Oral Biol 2017;82:256–262.

Hyatt AT, Hayes ML: Free amino acids and amines in human dental plaque. Arch

Oral Biol 1975;20:203–209.

Jakubovics NS, Robinson JC, Samarian DS, Kolderman E, Yassin SA, Bettampadi D, et al.: Critical roles of arginine in growth and biofilm development by Streptococcus gordonii. Mol Microbiol 2015;97:281–300.

Jenkins GN: Current concepts concerning the development of dental caries. Int Dent J 1972;Sep;22:350–61.

Kesel R, O'Donnell, JF., Kirch E: Deamination of amino acids by the human oral flora: its role in dental caries immunity. Science (80-) 1945;101:230–231.

Kesel RG, O'Donnell JF, Kirch ER, Wach EC: The Biological Production and Therapeutic Use of Ammonia in the Oral Cavity in Relation to Dental Caries Prevention. J Am Dent Assoc 1946;33:695–714.

Kleinberg I, Jenkins GN, Chatterjee R, Wijeyeweera L: The Antimony pH Electrode and its Role in the Assessment and Interpretation of Dental Plaque pH. J Dent Res 1982;61:1139–1147.

Kolderman E, Bettampadi D, Samarian D, Dowd SE, Foxman B, Jakubovics NS, et al.: L-Arginine Destabilizes Oral Multi-Species Biofilm Communities Developed in Human Saliva. PLoS One 2015;10:e0121835.

Koo H, Hayacibara MF, Schobel BD, Cury JA, Rosalen PL, Park YK, et al.: Inhibition of Streptococcus mutans biofilm accumulation and polysaccharide production by apigenin and tt-farnesol. J Antimicrob Chemother 2003;52:782–789.

Koo H, Xiao J, Klein MI, Jeon JG: Exopolysaccharides produced by Streptococcus mutans glucosyltransferases modulate the establishment of microcolonies within multispecies biofilms. J Bacteriol 2010;192:3024–32.

Koopman JE, Hoogenkamp MA, Buijs MJ, Brandt BW, Keijser BJF, Crielaard W, et al.: Changes in the oral ecosystem induced by the use of 8% arginine toothpaste. Arch Oral Biol 2017;73:79–87.

Li J, Huang Z, Mei L, Li G, Li H: Anti-Caries Effect of Arginine-Containing Formulations in vivo: A Systematic Review and Meta-Analysis. Caries Res 2015;49:606–617.

Liu SQ, Holland R, McJarrow P, Crow VL: Serine metabolism in Lactobacillus plantarum. Int J Food Microbiol 2003;89:265–273.

Lu P, Ma D, Chen Y, Guo Y, Chen G-Q, Deng H, et al.: L-glutamine provides acid resistance for Escherichia coli through enzymatic release of ammonia. Nat Publ Gr 2013;23. DOI: 10.1038/cr.2013.13

Marquis E: Role of the Arginine Deiminase System in Protecting Oral Bacteria and. Microbiology 1988;54:1318–1324.

Marsh PD: Are dental diseases examples of ecological catastrophes? Microbiology 2003;149:279–294.

Marsh PD, Head DA, Devine DA: Dental plaque as a biofilm and a microbial community - Implications for treatment. J Oral Biosci 2015;57:185–191.

Masoudi Rad H, Rabiei M, Sobhani A, Sadegh Khanjani M, Rahbar Taramsar M, Kazemnezhad Leili E: Free amino acids in stimulated and unstimulated whole saliva: Advantages or disadvantages. J Oral Rehabil 2014;41:759–767.

Moron BM, Comar LP, Wiegand A, Buchalla W, Yu H, Buzalaf MAR, et al.: Different protocols to produce artificial dentine carious lesions in vitro and in situ: Hardness and mineral content correlation. Caries Res 2013; DOI: 10.1159/000345362

Nagata Y, Higashi M, Ishii Y, Sano H, Tanigawa M, Nagata K, et al.: The presence of high concentrations of free d-amino acids in human saliva. Life Sci 2006;78:1677–1681.

Nascimento MM, Gordan V V., Garvan CW, Browngardt CM, Burne RA: Correlations of oral bacterial arginine and urea catabolism with caries experience. Oral Microbiol Immunol 2009;24:89–95.

Nascimento MM, Liu Y, Kalra R, Perry S, Adewumi A, Xu X, et al.: Oral Arginine Metabolism May Decrease the Risk for Dental Caries in Children. J Dent Res 2013;92:604–608.

Rankine CAN, Moreno EC, Vogel GL, Margolis HC: Micro-analytical Determination of pH, Calcium, and Phosphate in Plaque Fluid. J Dent Res 1985;64:1275–1280.

Reyes E, Martin J, Moncada G, Neira M, Palma P, Gordan V, et al.: Caries-free subjects have high levels of urease and arginine deiminase activity. J Appl Oral Sci 2014;22:235–240.

Sheng J, Baldeck JD, Nguyen PTM, Quivey RG, Marquis RE: Alkali production

associated with malolactic fermentation by oral streptococci and protection against acid, oxidative, or starvation damage. Can J Microbiol 2010;56:539–547.

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

Sonia LP, Savio B de L, Andre LD, Alexandra RC, Manuel TBR, Rafael GL: Comparison of growth of viable oral bacteria and Streptococcus mutans in biofilm models using three different culture media. African J Microbiol Res 2015;9:388–393.

Souza MLR, Cury JA, Tenuta LMA, Zhang YP, Mateo LR, Cummins D, et al.: Comparing the efficacy of a dentifrice containing 1.5% arginine and 1450 ppm fluoride to a dentifrice containing 1450 ppm fluoride alone in the management of primary root caries. J Dent 2013;41:S29–S34.

Srisilapanan P, Korwanich N, Yin W, Chuensuwonkul C, Mateo LR, Zhang YP, et al.: Comparación mediante Fluorescencia Cuantitativa Inducida por Luz de la Eficacia de un Dentífrico con Arginina al 1.5% y 1450ppm de Fluoruro con un Dentífrico que Contiene 1450ppm de Fluoruro Solamente en el Manejo de Lesiones de Caries en Estadio Temprano. J Dent 2013; DOI: 10.1016/j.jdent.2013.10.014

Tenuta, LMA; Del bel Cury, AA; Bortolin, MC, Vogel, GL; Cury J: Ca, Pi, and F in the Fluid of Biofilm Formed under Sucrose. J Dent Res 2006;85:834–838.

Thomas RZ, Ruben JL, ten Bosch JJ, Huysmans MCDNJM: Effect of ethylene oxide sterilization on enamel and dentin demineralization in vitro. J Dent 2007;35:547–551.

Viana PS, Orlandi MO, Pavarina AC, Machado AL, Vergani CE: Chemical composition and morphology study of bovine enamel submitted to different sterilization methods. Clin Oral Investig 2017; DOI: 10.1007/s00784-017-2148-5

Vranić L, Granić P, Rajić Z: Basic amino acid in the pathogenesis of caries. Acta Stomatol Croat 1991;25:71–76.

Wang Y, Li J, Sun W, Li H, Cannon RD, Mei L: Effect of non-fluoride agents on the prevention of dental caries in primary dentition: A systematic review.

Sompop Bencharit 2017;12:1–17.

Watford M: Glutamine and glutamate: Nonessential or essential amino acids? Anim Nutr 2015;1:119–122.

Wijeyeweera RL, Kleinberg I: Acid-base pH curves in vitro with mixtures of pure cultures of human oral microorganisms. Arch Oral Biol 1989;34:55–64.

Yamashita JM, Torres NM, Moura-Grec PG, Marsicano JA, Sales-Peres A, Sales-Peres SHC: Role of arginine and fluoride in the prevention of eroded enamel: An in vitro model. Aust Dent J 2013;58:478–482.

Zheng X, Cheng X, Wang L, Qiu W, Wang S, Zhou Y, et al.: Combinatorial effects of arginine and fluoride on oral bacteria. J Dent Res 2015;94:344–353.

ARTIGO EM INGLÊS

Title page

Inhibitory effect of arginine, serine and glutamine on biofilm formation and human enamel demineralization

Short title

Enamel microhardness and biofilm formation in the presence of amino acids

Sheila Regina Bernini Polaquini

PHD student, Graduate Program in Dentistry, School of Health and Lifesciences, Pontifical Catholic University of Parana, Curitiba, PR, Brazil. .
R. Ingá, 60, Maringá – PR Brazil,
87060-300
Tel: 55 (44) 3028-3555
E-mail: srbernini@gmail.com

Corresponding author:

Rodrigo Nunes Rached

Full Professor, Graduate Programa in Dentistry, School of Health and Lifesciences, Pontifical Catholic University of Parana, Curitiba, PR, Brazil.

Address
PUCPR-PPGO
R. Imaculada Conceição, 1155, Curitiba – PR, Brazil
80215-901
Tel: 55 (41) 3271-2161
Fax: 55 (41) 3271-1405
E-mail: r.rached@pucpr.br

Abstract

The aim of this study was to evaluate the *in vitro* inhibitory effect of the amino acids arginine, serine and glutamine on the formation of biofilm, release of Ca^{2+} and PO_4^{3}, and surface hardness of human enamel. *S. mutans* biofilms were grown on 60 saliva coated enamel slabs obtained from 60 human third molars and subsequently exposed (8x a day) to amino acid solutions (8% arginine, serine or glutamine), sucrose 10% (control -) or 0.9% saline (control +). The culture medium was replaced every 12 hours, before the first and after the eighth exposure to the solutions, during 96 hours of incubation. Ca^{2+} and PO_4^{3-} release were analyzed and pH were measured at each medium replacement. After 96 hours, the final surface hardness of the enamel slabs was measured and the formed biofilm was collected for biomass quantification and viable cell counting. The results revealed that arginine and serine induced lower surface hardness loss compared to glutamine, sucrose and control ($p < 0.05$). Sucrose presented the lowest pH values. All groups subjected to amino acids showed pH above 6.5 throughout the experiment. The serine presented the lowest release of Ca^{2+} and PO_4^{3-}, and the lowest biomass formation between the groups ($p < 0.05$). Arginine and serine presented higher viable cell count than saline and lower than sucrose ($p < 0.05$), while there was no difference between glutamine and sucrose. This study concluded that arginine and serine were superior to glutamine in inhibiting formation of biofilm and demineralization of human enamel.

Key words: *Streptococcus mutans*; Biofilm; Arginine, Serine, Glutamine; Dental caries, Dental enamel

Introduction

In the 1960s, acid production as a determinant for caries was the dominant concept [Bowen, 2013; Wijeyeweera, and Kleinberg, 1989]. In the late 1970s and early 1980s [Marquis, 1988; Kleinberg et al., 1982], some studies have shown that base production through salivary substrates, especially arginine and urea, could play a greater role in plaque pH homeostasis and caries inhibition [Hyatt, and Hayes, 1975]. Thus, the ability of biofilms to produce bases that can neutralize and prevent the onset of cariogenic microbiota is a critical factor in preventing or inhibiting the progression of carious lesions (Marsh, 2003; Burne, and Marquis, 2000; Huang et al., 2012; Sheng et al., 2010].Arginine is an example of substrate for base generation in oral biofilms. Arginine in free form is secreted in saliva at concentrations close to 50 mM [Li et al., 2015], and is also abundant in salivary peptides and proteins [Vranić et al., 1991]]. Arginine is primarily catabolized in ornithine, ammonia and CO_2 by some species of streptococci, lactobacilli and spirochetes. A strong correlation between high levels of free arginine in saliva and resistance to caries has been observed [Reyes et al., 2014; Bijle et al., 2018; Fonteles et al., 2009]. Furthermore, dental plaques of caries-resistant individuals appear to have a higher pH when compared to susceptible individuals, and this higher pH has been related to high levels of ammonia [Kesel et al., 1946; Burne, and Marquis, 2000; Nascimento et al., 2009].

Glutamine is the most abundant free amino acid in plasma and muscle tissue [Watford, 2015], and is involved in the synthesis of nucleic acids, nucleotides and proteins, being the largest donor of nitrogen, which is hydrolyzed by glutaminase in NH_4, precursor of ammonia [Lu et al., 2013;Masoudi Rad et al., 2014]. Amino acids with effect on caries need to increase the amount of NH4 and the amino groups of the serine can be directly converted into NH_4 [Liu et al., 2003; Nagata et al., 2006]. Serine is a precursor of glycine, and serine and glutamine have a positive correlation with low prevalence of caries children [Masoudi Rad et al., 2014].The use of amino acids in the control of caries directly increases plaque pH, which takes the balance in favor of remineralization and away from demineralization, and favors the survival of bacteria associated with health, while discouraging the growth of cariogenic bacteria that depend on low

pH to ensure ecological advantages such as *S. mutans* [Marquis, 1988; Nascimento et al., 2013; Huang et al., 2015b].

Considering all above, more studies are needed to confirm if the presence of amino acids precursors of ammonia in plaque is indeed effective against caries. Thus, the objective of this work was to evaluate the potential of reducing the demineralization of human dental enamel exposed to *S. mutans* biofilm in the presence of the amino acids arginine, serine and glutamine i*n vitro*, and to compare the biomass production and the release of Ca^{2+} and PO_4^{3-} in the culture medium, in the presence of these amino acids.

The hypotheses tested were that there is no different effect of the amino acids arginine, serine and glutamine on the properties surface hardness loss, Ca^{2+} and PO_4^{3-} release- and biofilm biomass of *S. mutans.*

Material and Methods

The present *in vitro* study was approved by the Research Ethics Committee of the local institution (1,672,860) and conducted using a cariogenic biofilm model proposed by Ccahuana-Vásquez [Ccahuana-Vásquez, and Cury, 2010].

The study factor was the activity of arginine, serine and glutamine on the biofilm of *Streptococcus mutans* strain ATCC® 25175 ™. The strain was kept under freezing (freezer -20 ° C) in 5.0 ML aliquots in BHI (Brain Heart Infusion, Kasvi, Liofilchem, Italy), added with 10% glycerol, and spiked 24 h before each experiment in BHI at 37 ° C and CO_2 10%.

The *S. mutans* biofilms were grown on saliva coated slabs of human enamel with previously surface hardness previously determined, assembled vertically with metallic holders in filtered tryptone (Biobras Ltda, Montes Claros, Minas Gerais, Brazil) yeast extract broth (Acumedia Co, Lansing, MI) (TYEB) [Koo et al., 2003; Sonia et al., 2015] at 37 ° C and CO_2 10% for 96 h (Ccahuana-Vásquez, and Cury, 2010), in the same well of a 24-well culture plate. The slabs were exposed for 1 min, eight times daily to 10% D sucrose solutions (Dinamica Ltda, São Paulo, Brazil) NaCl 0.9% (control) and L-arginine 8% (Inlab Ltda, Brazil)

L serine 8% (Inlab Ltda, Brazil) and L glutamine 8% (Inlab Ltda, Brazil) [Koopman et al., 2017]. After 96 h of biofilm growth, the biomass, the viable bacteria count and Ca^{2+} and PO_4^{3-} accumulated release in the culture medium were determined and the mineral loss of the enamel was analyzed. The pH and concentrations of Ca^{2+} and PO_4^{3-} in the culture medium were analyzed daily, at each exchange of the medium (Figure 1).

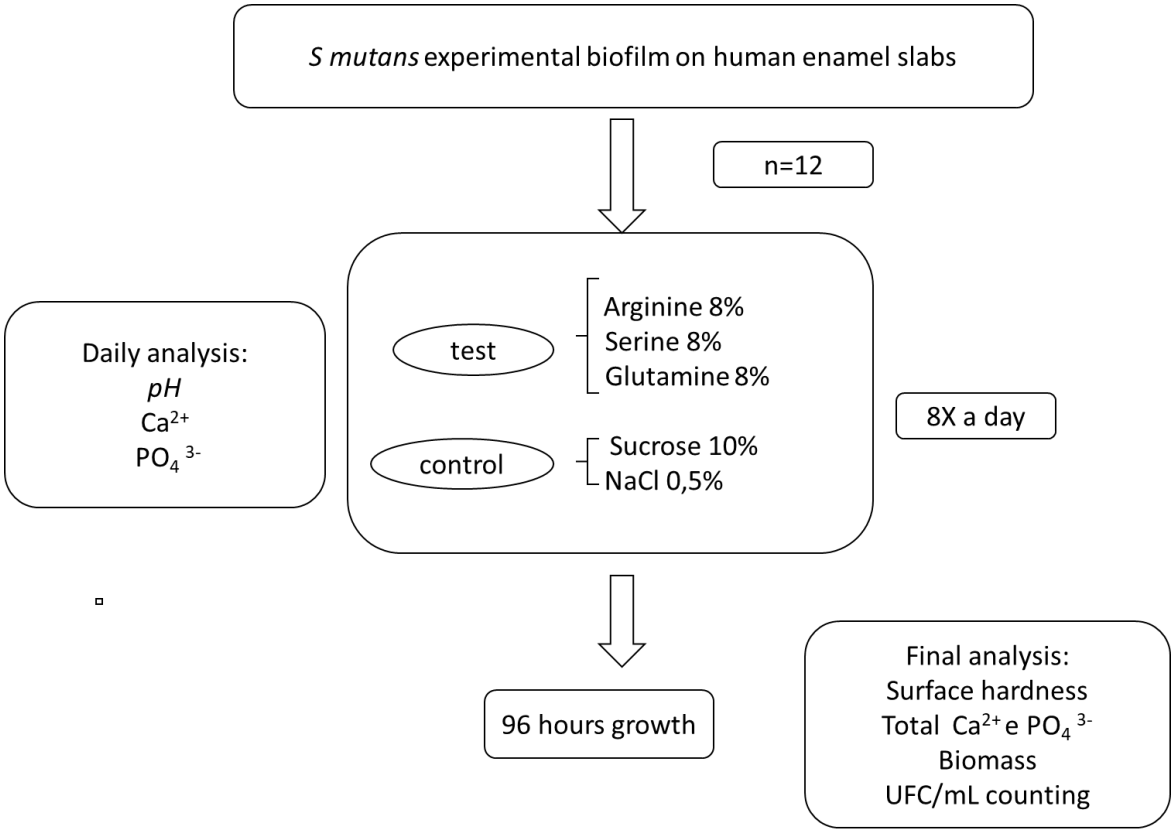


Figure 1: Outline of the experiment

Enamel slabs preparation

Sixty extracted third human molars, free of apparent enamel defects, macroscopic cracks and spots verified by visual examination, obtained at the teeth bank of the local institution, were used for this in vitro study. The teeth were kept in 0.5% chloramine solution (Dinamica Ltda, São Paulo, Brazil) at 4 ° C for a maximum of six months. 60 enamel slabs (4mm X 4mm X 2mm), obtained from the central part of the dental crown, were cut with water-cooled diamond disc in a precision IsoMetTM Low Speed cutter (Precision Cutter, Buehler, Lake Bluff, IL). The surfaces to be treated were sanded with 600 #, 800 #, 1200 #, 1500 #, 2000

and 3000 # (3M from Brazil, Sumaré, SP, Brazil) papers and polishing cloths (Arotec Ind and Com, Cotia, SP, Brazil) of 1μm and ¼μm in automatic grinding machine Aropol® 2v (Arotec Ind and Com, Cotia, SP, Brazil) in sequence for 30 seconds each. The final dimensions of the slabs were verified with CD-15CX digital caliper (Mitutoyo Co, Tokyo, Japan). The initial surface hardness was measured using an HMV-2T microdurometer (Shimadzu Co, Tokyo, Japan) with three indentations with 100 μm apart, using a Knoop diamond indenter applied with a load of 25g for 5 seconds [Ccahuana-Vásquez, and Cury, 2010]. Slabs with a mean hardness of 355 ± 9.8 KHN were selected and randomly assigned to 5 groups of 12 specimens. The blocks were plated in 24-well cell culture plates with Costar ™ flat bottom (Corning Inc, NY), upright using a hanging device made with 0.8 orthodontic wire and subjected to ethylene oxide sterilization [Thomas et al., 2007; Viana et al., 2017].

Biofilm model

The biofilm model initially proposed by Ccahuana Vásquez [Ccahuana-Vásquez, and Cury, 2010] was applied with modifications [Fernández et al., 2016; Costa Oliveira et al., 2017]. To prepare the inoculum the colonies were transferred to filtered Tryptone-yeast extract broth (TYEB, 2.5% tryptone and 1.5% yeast extract) supplemented with 1% glucose [Ccahuana-Vásquez, and Cury, 2010; Fernández et al., 2016; Costa Oliveira et al., 2017) and grown for 12 hours at 37 ° C and CO_2 10%. The cells were then centrifuged at 4.000 *g,* washed twice with saline solution and resuspended in fresh TYEB. The inoculum was standardized in a spectrophotometer in OD_{600} at 1.6 ± 0.5 [Ccahuana-Vásquez, and Cury, 2010]. Before bacterial adhesion the slabs were immersed in saliva at 37 ° C for 30 min [Fernández et al., 2016] to form acquired pellicle. Fresh human saliva was previously collected from two healthy donors. Salivary stimulation was done by chewing a paraffin block and the saliva was collected in 50 ml polypropylene tubes on ice for 30 minutes. The saliva was centrifuged (4.000 *g*, 4 ° C) and filtered through a 0.22 μm diameter membrane. The saliva coated enamel slabs were transferred to 24-well culture plate containing 2 mL of fresh buffered TYEB medium and the bacterial inoculum (1: 500v / v) and incubated at 37 ° C and CO_2

10% with stirring for 8 h to promote initial adhesion. After this period, the slabs were transferred to fresh TYEB medium supplemented with 1mM glucose and grown for 16 h at 37 ° C and CO_2 10%. Then, the slabs were transferred to a fresh medium and exposed eight times a day for 1 minute to 8% amino acid solutions (arginine, serine and glutamine in individual groups), 10% sucrose solution as negative control and saline solution 0.9% as positive control. This procedure was repeated for 84h. After exposure to the solutions the specimens were rinsed 3 times with 0.9% sterile saline. The pH of the culture medium was determined twice a day, before the first exposure and before the last exposure to the amino acids. At each replacement, the culture medium was stored in 2 mL microtubes (Axygen, Union City, CA) and frozen at -20 ° C, for further analysis (Figure 1).

Analysis of the culture medium

The pH of the culture medium collected twice a day was analyzed, and the Ca^{2+} and PO_4^{3-}, concentration were subsequently verified. Ca^{2+} and PO_4^{3-} , of the freeze-stored media were analyzed by colorimetric assay using Arsenazo III and ammonium molybdate [Rankine et al., 1985; Tenuta, LMA; Del bel Cury, AA; Bortolin, MC, Vogel, GL; Cury, 2006], and the absorbance read at 650 nm in 96-well microplates (Greiner Bio-one, Americana, Sao Paulo, Brazil / TP-Reader®, Thermo Plate, China).

The concentration of Ca^{2+} and PO_4^{3-}, released in the culture medium was performed in relation to the initial concentration of Ca^{2+} and PO_4^{3-}, in the medium, and the measurement was performed at each medium exchange (12 h).

At the end of the 96h of incubation, the slabs were removed from the culture medium and washed with 0.9% saline and placed into 2 mL pre-weighed microtubes containing 1 mL of saline. Biofilms of the slabs were removed by shaking AP56 tubes (Phoenix, Araraquara, SP, Brazil) for 30 seconds at 3800 rpm, and the enamel blocks stored for the demineralization assay. The biofilm suspension was centrifuged at 10,000 *g* for 5 minutes, the supernatant removed carefully, and the pellet weighed to obtain the biomass.

Bacterial Viability

A 100 µl aliquot of the suspension was serially diluted in 0.9% saline solution to 10-4 CFU / mL [Koo et al., 2003] and two drops of 20 µl of each dilution were inoculated into BHI agar (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany) to determine the number of viable cells. The plates were incubated for 48 h at 37 ° C and CO_2 10%, and counting of colony forming units (CFU) was performed with an electronic colony counter [Ccahuana-Vásquez, and Cury, 2010].

Determination of demineralization

Surface hardness was used as an indicator of enamel demineralization. Three indentations, 100 µm apart, were made in the slabs before and after the experiment, using a microdurometer. The percentage of Knoop surface hardness loss (% SHL) was expressed as the percentage of hardness loss, calculated by the equation [Fernández et al., 2016]:

$$\%SHL = \frac{(Dureza\ \ inicial - Dureza\ \ final)}{Dureza\ \ inicial}\ X\ 100$$

Data analysis

Data were initially assessed for normality using the Kolmogorov-Smirnov and Shapiro-Wilk tests.

The analysis of the effect of the treatments for dependent variables, pH enamel hardness, biomass and viable cell counts was determined by Kruskall-Wallis non-parametric test for independent samples.

Ca^{2+} and PO_4^{3-} release in the medium and pH variation was measured daily and analyzed by descriptive statistics. The multiple comparisons between the treatments for the Ca^{2+} and PO_4^{3-} release variables, pH variation and surface hardness loss were determined using the non-parametric Dunn test.

The correlation analysis of Pearson (r) verified the correlation between the different variables evaluated was performed.

All statistical tests were conducted in SPSS 23.0 software (IBM, Chicago, IL), with a significance level of 5%.

Results

Table 1 shows the comparisons between the groups for each dependent variable analyzed.

Table 1. Means and standard deviations of the variables analyzed for each treatment

	%SHL	Biomass (µg)	UFCxmL (log10)	Total Ca^{2+}	Total PO_4^{3-}
Arginine	16,59 (16,21) [a]	9,82 (6,64) [a]	6,58 (0,08) [a]	2,32 (1,53) [ab]	0,70 (2,05) [a]
Serine	22,34 (14,70) [a]	4,99 (1,47) [b]	6,59 (0,08) [a]	0,32 (1,94) [ca]	-0,86 (2,92) [a]
Glutamine	54,00 (13,49) [b]	9,55 (5,38) [a]	6,65 (0,09) [b]	-0,18 (1,62) [c]	15,60 (2,87) [b]
Saline	55,85 (9,65) [b]	13,28(5,56) [ac]	6,40 (0,05) [c]	7,80(5,53) [bd]	57,84(14,24) [c]
Sucrose	78,86 (8,21) [c]	13,42 (3,66) [c]	6,69 (0,22) [b]	11,13 (3,36) [d]	12,46 (3,03) [b]

Different letters in the columns unite treatments that significantly differ from each other ($p < 0.05$)

There were statistically significant differences between treatments for the loss of enamel surface hardness (% SHL). Arginine and serine did not differ among themselves ($p > 0.05$), but presented lower hardness loss compared to glutamine, saline and sucrose ($p < 0.05$). Glutamine and saline differed from sucrose ($p < 0.05$), and this showed the greatest loss of surface hardness. The treatment with saline allowed to obtain a lower bacterial load (6.40 ± 0.05 CFU / mL) than the other treatments ($p<0.05$), and arginine and serine did not differ among themselves, but were different from glutamine and sucrose. For biomass formation, the serine differed from all other treatments, as well as from the control (p0.05) (Table 1). There were statistically significant differences between the treatments for the accumulated Ca^{2+} and PO_4^{3-} variables. Serine and glutamine presented the lowest values of Ca^{2+} and PO_4^{3-} release ($p < 0.05$), not differing from each other ($p > 0.05$). Arginine did not differ from saline and sucrose (p0.05) for the release of Ca^{2+}. Serine and arginine presented the lowest values of PO_4^{3-} ($p < 0.05$), not differing between them ($p > 0.05$), with no difference between glutamine and sucrose, but saline presented the highest release of PO_4^{3-}, differing from all other treatments ($p < 0.05$) for PO_4^{3-} release (Table 1).

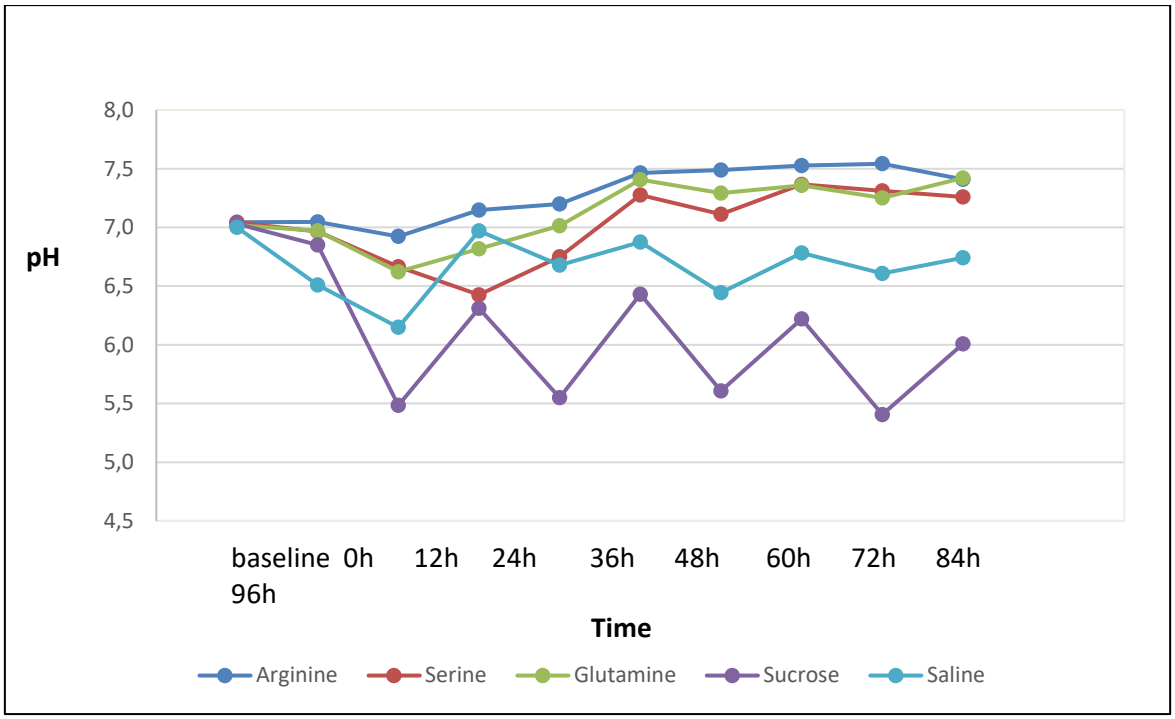


Figure 2: pH variation in the culture medium for each treatment during the experiment.

The lowest pH values were observed in the medium that received the sucrose bath from the first 12 hours of cultivation, remaining below 6.5 throughout the experiment, while for all amino acids a slight decrease in the moments (up to 12 hours), with subsequent increase over the growing time, to values equal to or greater than 7.0 over the time of the experiment. The concentration of Ca^{2+} in the culture medium during the development of the biofilm was higher for the sucrose group and for glutamine (Figure 3). The accumulated concentration of Ca^{2+} released throughout the experiment was also higher for the group that received the sucrose solution bath (Figure 3). The release PO_4^{3-} throughout the experiment

showed unstable values for all treatments (Figure 4)

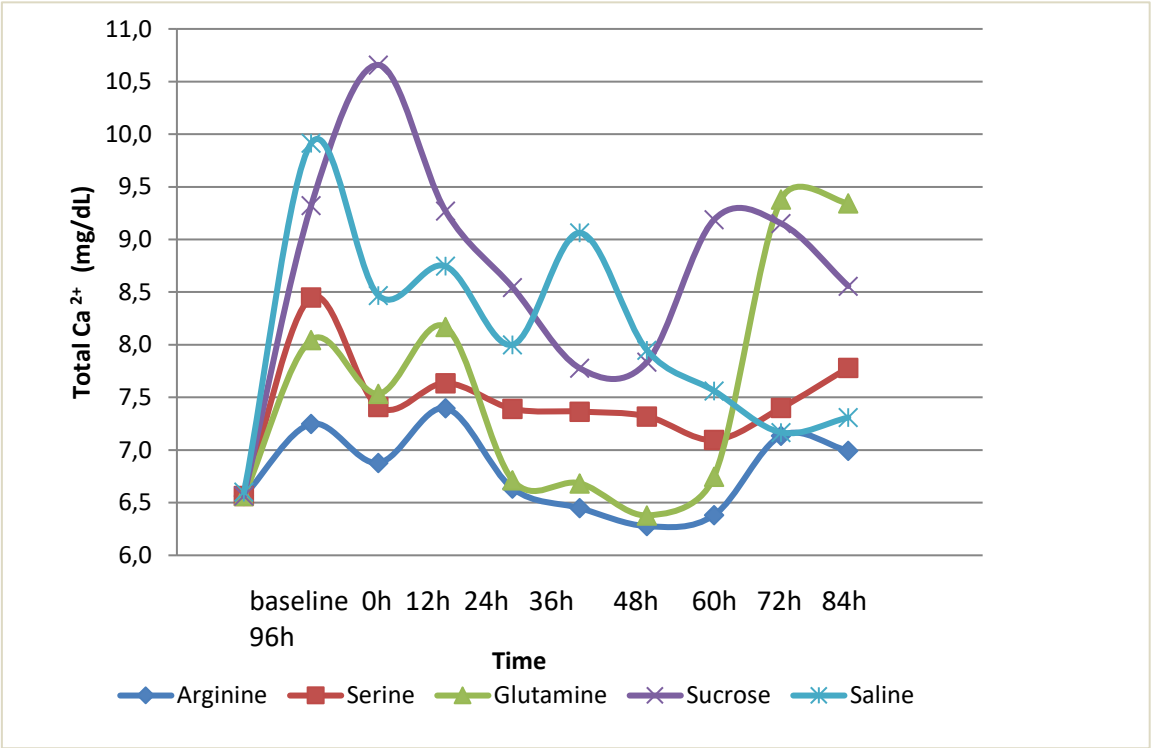


Figure 3: Accumulated concentration of Ca^{2+} in the culture medium for each treatment during the experiment, from the initial concentration.

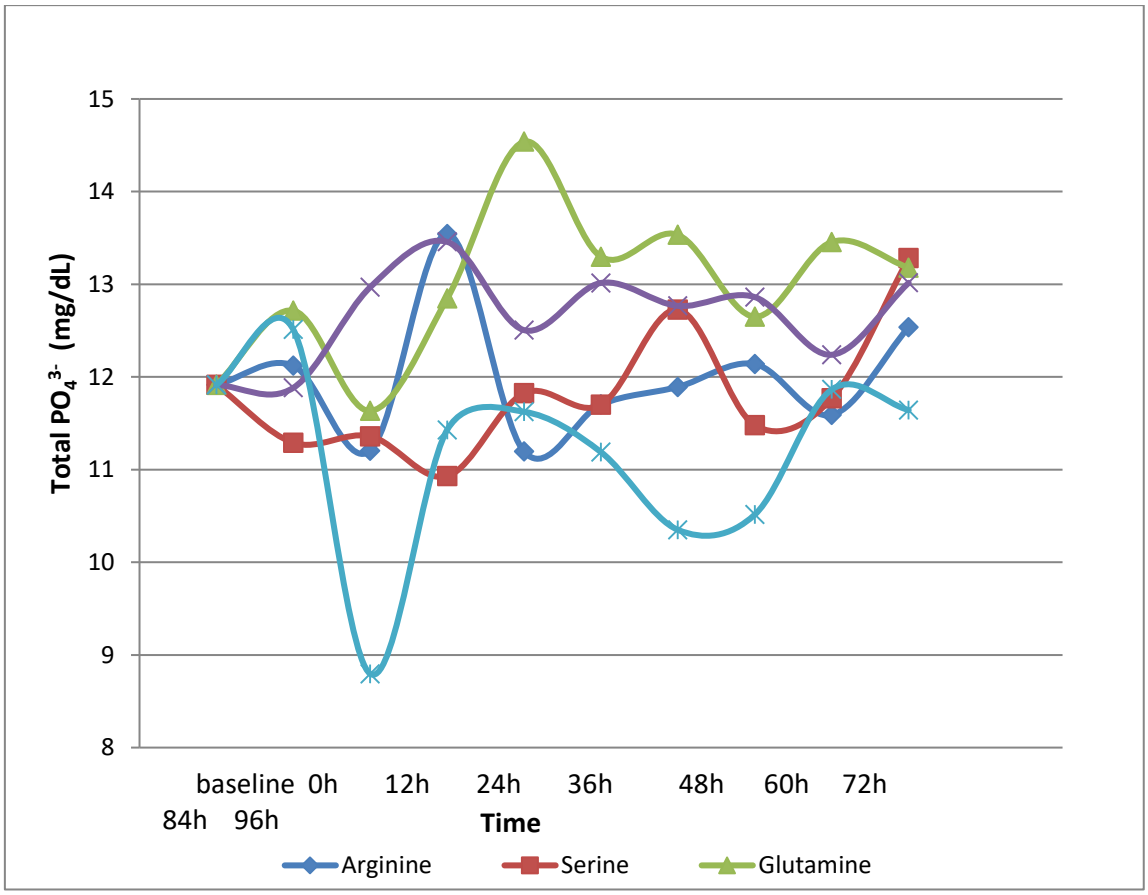


Figure 4: Concentration of phosphorus in the culture medium for each treatment during the experiment, from the initial concentration of the medium.

There was a negative correlation of Pearson (r = -0.773, p0.001) between hardness loss and pH at the end of the experiment (96 hours).

The Pearson correlation analysis between the analyzed variables, independent of treatments, showed statistically significant moderate positive correlation between% SHL and total release of Ca^{2+}, and between positive between% SHL and biomass. There was a weak positive correlation between, Biomass and total release of Ca^{2+} and PO_4^{3-},% SHL and total release of PO_4^{3-}, and total release of Ca^{2+} and PO_4^{3-}, and a moderate negative significant correlation between CFU / mL and total release of PO_4^{3-} ($p < 0.05$) (Table 2).

In the individual analyzes, only glutamine presented a positive Pearson and Spearman correlation (r = 0.735, p 0.006 and ρ = 0.818, ρ = 0.001 respectively) between hardness loss and accumulated Ca^{2+} concentration, and negative Spearman correlation between hardness loss and accumulated PO_4^{3-} concentration (ρ = -0.587, p = 0.045).

These correlation findings demonstrate that the dependent variables analyzed are related and may jointly reject the central scientific hypothesis of nullity proposed in the study (Table 2).

Table 2: Pearson's correlation

		Biomass (µg)	%SHL	UFC(log10)	Total Ca^{2+}
%SHL	Pearson correlation	,371			
	p	0,004			
UFC (log10)	Pearson correlation	-0,060	0,154		
	p	0,651	0,239		
Total Ca^{2+}	Pearson correlation	,415	,**5**91	-0,030	
	p	0,001	0,000	0,821	
Total PO_4^{3-}	Pearson correlation	,321	,390	-,496	,337
	p	0,012	0,002	0,000	0,008

Discussion

The null hypotheses formulated for this study were rejected, since there was a difference in the hardness values of the enamel exposed to the amino acids compared to the sucrose and the saline solution, in the concentration of Ca^{2+} and PO_4^{3-} released in the culture medium and also for the biomass formation.

In the present study, an in vitro model was used to evaluate the enamel mineral loss, reproducing the caries development process and allowing the analysis of the inhibitory effect of amino acids on this disease [Ccahuana-Vásquez, and Cury, 2010; Fernández et al., 2016]. A monospecific model of a known serotype of S. mutans was used for the formation of biofilm and demineralization of enamel, which created a condition capable of producing caries similar lesions in enamel due to the favoring of biofilm formation [Sonia et al., 2015]. Due to the complexity of dental biofilms, the study of mechanisms is best conducted in mono species biofilms, from which relevant conclusions can be deduced for more complex mechanisms [Huang et al., 2017], and *in vitro* models

are appropriate when the objective is to test an isolated process, where a complex situation with many variables may confuse the data [Moron et al., 2013]. The specimens were exposed to treatments during the day, while at night the biofilms were kept in the same medium until the following morning. The difference in hardness at the beginning and at the end of the experiment reflected the gain (remineralization) or loss (demineralization) of mineral from the dental structure, since there is a significant correlation between percentage Knoop hardness of mineral loss [Sim et al., 2016].

The identification of amino acids present in the saliva of individuals without caries could determine factors responsible for the immunity based on the production of amounts of ammonia [Bijle et al., 2018; Nagata et al., 2006]. Caries-free individuals have enzymatic systems capable of converting at least 6 amino acids into ammonia continuously, such as arginine, alanine, aspartic acid, asparagine, glutamic acid, isoleucine and serine [Kesel et al., 1945; Vranić et al., 1991; Masoudi Rad et al., 2014].

Despite the studies, researchers haven't reached a definitive conclusion on which amino acids are connected to caries experience [Bijle et al., 2018; Wang et al., 2017]. In addition, there is no correlation with amino acids amount in saliva, with stimulated and unstimulated saliva, or with their physical properties or side chains [Masoudi Rad et al., 2014; Vranić et al., 1991; Nagata et al., 2006; Hyatt, and Hayes, 1975]. The role of arginine in oral biofilm is well documented [Kolderman et al., 2015; Reyes et al., 2014; Huang et al., 2012; Li et al., 2015; He et al., 2016; Huang et al., 2017], but there is little data on the role of other amino acids on dental plaque. The results of this *in vitro* study agree with the results of other ones that verified the inhibitory effect of some amino acids on caries, specifically glycine, proline, glutamine, taurine, serine and phenylalanine [Masoudi Rad et al., 2014; Vranić et al., 1991]. In the present study, the slabs were placed in a medium with neutral pH, and during the first hours of the experiment, carbohydrate metabolism acidified the medium, generating a pH drop. At every 12 h the medium was replaced with a fresh, neutral pH medium. As the biofilm matures during the experiment, it is observed that the pH drop produced by the sucrose and the saline solution is more pronounced, whereas for the amino acids,

the pH tends to rise throughout the experiment. The observed pH drop for sucrose matches the data on hardness loss in the enamel blocks cultured with the sucrose treatment, as well as the lower hardness change observed for serine and arginine is compatible with the lower pH observed throughout the experiment. Several studies have reported that pH alteration promoted by oral microbiota metabolism leads to enamel demineralization [Díaz-Garrido et al., 2016]. Frequent exposure to low pH conditions breaks homeostasis and leads to the growth of acidogenic and acidic species, predisposing dental surfaces to caries [Marsh, 2003; Zheng et al., 2015; Fernández et al., 2016; Ccahuana-Vásquez, and Cury, 2010; Marsh et al., 2015]. The production of a basic pH from ammonia has been reported as one way of controlling the pH of the biofilm and reducing the demineralizing potential [Kesel et al., 1946; Huang et al., 2012; Burne, and Marquis, 2000; Chakraborty, and Burne, 2017].

Arginine has been well documented as an important aid to pH regulation in the dental biofilm [Huang et al., 2012; Zheng et al., 2015; Huang et al., 2017; Li et al., 2015], which was repeated in this study. Other amino acids were positively related to absence of caries [Fonteles et al., 2009; Masoudi Rad et al., 2014; Nagata et al., 2006; Vranić et al., 1991], in studies relating caries-free individuals and the presence of amino acids in saliva [Bijle et al., 2018; Masoudi Rad et al., 2014; Fonteles et al., 2009]. The results of the present study show that the biofilm formed under frequent exposure to the amino acids arginine and serine produces less pronounced pH drop, with an increase of this as the biofilm matures, unlike the biofilm formed in the presence of sucrose. Sucrose had the highest percentage of loss of enamel hardness, followed by glutamine and serine and arginine, with lower percentage loss, which did not differ from each other. Previous studies have previously shown that arginine may promote less demineralization in in vitro and in situ studies [Yamashita et al., 2013; Souza et al., 2013].

This study found a positive correlation between surface hardness loss and the release of Ca^{2+} in the medium. As previously discussed in other *in vitro* studies, Ca^{2+} kinetics is inversely related to pH dynamics [Fernández et al., 2016; Costa Oliveira et al., 2017]. Higher acid production causes greater enamel

demineralization, releasing more Ca^{2+} to the culture medium. Calcium is continuously released from the enamel into the medium and is a chemical indicator of enamel demineralization [Fernández et al., 2016]. The concentration of Ca^{2+} in the culture medium during the development of the biofilm was higher for the sucrose group and for the glutamine, which is compatible with the pH changes observed during the experiment and with the loss of hardness observed in the enamel blocks cultured receiving sucrose and glutamine treatments. This finding coincides with the loss of hardness observed for sucrose in previous studies [Tenuta, AML; Del bel Cury, AA; Bortolin, MC, Vogel, GL; Cury, 2006], whereas for the arginine and serine amino acids, the accumulated Ca^{2+} loss observed during the experiment is lower as well as the pH change. Even with small pH changes such as those observed for saline, Ca^{2+} increases in the medium like or greater than that found for other treatments, which has also been observed in other studies [Tenuta, LMA; Del bel Cury, AA; Bortolin, MC, Vogel, GL; Cury, 2006]. When the biofilm remains immersed in medium without receiving treatment, the difference between the groups decreases, but the tendency for arginine and serine is maintained. Basic amino acids such as arginine improve calcium absorption by forming soluble complexes that hold calcium in an absorbable form [Jenkins, 1972]. Due to the neutral pH of the medium at the initial concentration, remineralization may occur during the nocturnal incubation period, which has already been discussed in studies that used this biofilm model [Fernández et al., 2016; However, it is important to note that the concentration of Ca^{2+} and PO_4^{3-} can be related to changes in the structure of the biofilm, where these ions cannot be made available immediately after pH changes [Cury et al., 2003].

Several studies have observed a decrease in the concentration of PO_4^{3-} [Correia et al., 2012; Tenuta, LMA; Del bel Cury, AA; Bortolin, MC, Vogel, GL; Cury et al., 2006) and this may be due to the recepta- tion of PO_4^{3-} by the bacterium, because it can be used in bacterial metabolism [Cury et al., 2003; Rankine et al., 1985; Tenuta, LMA; Del bel Cury, AA; Bortolin, MC, Vogel, GL; Cury, 2006]. Sucrose presented the highest cumulative release of Ca^{2+} and serine and glutamine presented the lowest values, which is related to the pH drop observed during the

experiment for sucrose, and is compatible with previous studies [Costa Oliveira et al., 2017; Cury et al., 2003; Cury et al., 2000]. There was a difference in the counts of bacteria for the treatments with amino acids and sucrose in relation to the control. This is consistent with other studies that suggest that amino acids are metabolized by microorganisms, and may exert their growth action [He et al., 2016; Hyatt, and Hayes, 1975], although arginine has appeared in some studies as reducing the burden of bacteria due to increased pH [Zheng et al., 2015; Nascimento et al., 2009; Huang et al., 2017; Chakraborty, and Burne, 2017]. However, serine has caused less biomass formation, which suggests less formation of extracellular polysaccharides and consequently lower adhesion capacity, while sucrose is related to increased adhesion and increased formation of extracellular polysaccharides [Koo et al. 2010; Koo et al., 2003]. Different concentrations of arginine appear to alter the amount of biomass formed and the biofilm architecture [He et al., 2016; Kolderman et al., 2015; Srisilapanan et al., 2013; Cugini et al., 2013]. The presence of arginine is regulatory, modulating essential processes including bacterial growth and biofilm formation [Jakubovics et al., 2015], and this may occur for other amino acids. Arginine and serine were superior to glutamine in inhibiting biofilm formation and demineralization of human enamel, so the results of this study suggest that other amino acids can be tested as caries control methods An approach that addresses biofilm rather than dental tissue may be promising [Cummins, 2013]. Amino acids are a source of substrate for microorganisms and can cause different plaque effects and can be used to increase caries resistance [Masoudi Rad et al., 2014].
The findings suggest that other amino acids besides arginine may exert effects on biofilm formation and consequently on the loss of enamel hardness when in culture medium. More studies are needed to verify the nature of this effect on biofilm growth and enamel demineralization, including the formation of multispecies biofilms and the concomitant action of fluoride under conditions of cariogenic challenge, as well as verifying its application in commercial formulas with anticariogenic effect.

References

Bijle MNA, Yiu CKY, Ekambaram M: Can oral ADS activity or arginine levels be a caries risk indicator? A systematic review and meta-analysis. Clin Oral Investig 2018;22:583–596.

Bowen WH: The Stephan Curve revisited. Odontology 2013;101:2–8.

Burne RA, Marquis RE: Alkali production by oral bacteria and protection against dental caries. FEMS Microbiol Lett 2000;193:1–6.

Ccahuana-Vásquez RA, Cury JA: S. mutans biofilm model to evaluate antimicrobial substances and enamel demineralization. Braz Oral Res 2010;24:135–141.

Chakraborty B, Burne RA: Effects of Arginine on Streptococcus mutans Growth, Virulence Gene Expression, and Stress Tolerance. Appl Environ Microbiol 2017;83:e00496-17.

Correia MF, Tenuta LMA, Del Bel Cury AA, Cury JA: Mineral ions in the fluid of biofilms formed on enamel and dentine shortly after sugar challenge. Caries Res 2012;46:408–412.

Costa Oliveira BE, Cury JA, Ricomini Filho AP: Biofilm extracellular polysaccharides degradation during starvation and enamel demineralization. PLoS One 2017;12:e0181168.

Cugini C, Stephens DN, Nguyen D, Kantarci A, Davey ME: Arginine deiminase inhibits porphyromonas gingivalis surface attachment. Microbiol (United Kingdom) 2013;159:275–285.

Cummins D: Desarrollo y validación de una nueva tecnología, basada en arginina al 1.5%, un compuesto de calcio insoluble y fluoruro, para el uso diario en la prevención y tratamiento de la caries dental. J Dent 2013;1–12.

Cury JA, Marques AS, Tabchoury CPM, Del Bel Cury AA: Composition of dental plaque formed in the presence of sucrose and after its interruption. Braz Dent J 2003;14:147–152.

Cury JA, Rebelo MAB, Del Bel Cury AA, Derbyshire MTVC, Tabchoury CPM: Biochemical Composition and Cariogenicity of Dental Plaque Formed in the Presence of Sucrose or Glucose and Fructose. Caries Res 2000;34:491–497.

Díaz-Garrido N, Lozano C, Giacaman RA: Frequency of sucrose exposure on the

cariogenicity of a biofilm-caries model. Eur J Dent 2016;10:345–350.

Fernández CE, Tenuta LMA, Cury JA: Validation of a cariogenic biofilm model to evaluate the effect of fluoride on enamel and root dentine demineralization. PLoS One 2016;11. DOI: 10.1371/journal.pone.0146478

Fonteles CSR, Guerra MH, Ribeiro TR, Mendonça DN, de Carvalho CBM, Monteiro AJ, et al.: Association of free amino acids with caries experience and mutans streptococci levels in whole saliva of children with early childhood caries. Arch Oral Biol 2009;54:80–85.

He J, Hwang G, Liu Y, Gao L, Kilpatrick-Liverman LT, Santarpi P, et al.: L-arginine modifies the exopolysaccharide matrix and thwarts Streptococcus mutans outgrowth within mixed-species oral biofilms. J Bacteriol 2016;198:2651–2661.

Huang X, Exterkate RAM, Ten Cate JM: Factors associated with alkali production from arginine in dental biofilms. J Dent Res 2012;91:1130–1134.

Huang X, Zhang K, Deng M, Exterkate RAM, Liu C, Zhou X, et al.: Effect of arginine on the growth and biofilm formation of oral bacteria. Arch Oral Biol 2017;82:256–262.

Hyatt AT, Hayes ML: Free amino acids and amines in human dental plaque. Arch Oral Biol 1975;20:203–209.

Jakubovics NS, Robinson JC, Samarian DS, Kolderman E, Yassin SA, Bettampadi D, et al.: Critical roles of arginine in growth and biofilm development by Streptococcus gordonii. Mol Microbiol 2015;97:281–300.

Jenkins GN: Current concepts concerning the development of dental caries. Int Dent J 1972;Sep;22:350–61.

Kesel R, O'Donnell, JF., Kirch E: Deamination of amino acids by the human oral flora: its role in dental caries immunity. Science (80-) 1945;101:230–231.

Kesel RG, O'Donnell JF, Kirch ER, Wach EC: The Biological Production and Therapeutic Use of Ammonia in the Oral Cavity in Relation to Dental Caries Prevention. J Am Dent Assoc 1946;33:695–714.

Kleinberg I, Jenkins GN, Chatterjee R, Wijeyeweera L: The Antimony pH Electrode and its Role in the Assessment and Interpretation of Dental Plaque pH. J Dent Res 1982;61:1139–1147.

Kolderman E, Bettampadi D, Samarian D, Dowd SE, Foxman B, Jakubovics NS, et al.: L-Arginine Destabilizes Oral Multi-Species Biofilm Communities Developed in Human Saliva. PLoS One 2015;10:e0121835.

Koo H, Hayacibara MF, Schobel BD, Cury JA, Rosalen PL, Park YK, et al.: Inhibition of Streptococcus mutans biofilm accumulation and polysaccharide production by apigenin and tt-farnesol. J Antimicrob Chemother 2003;52:782–789.

Koo H, Xiao J, Klein MI, Jeon JG: Exopolysaccharides produced by Streptococcus mutans glucosyltransferases modulate the establishment of microcolonies within multispecies biofilms. J Bacteriol 2010;192:3024–32.

Koopman JE, Hoogenkamp MA, Buijs MJ, Brandt BW, Keijser BJF, Crielaard W, et al.: Changes in the oral ecosystem induced by the use of 8% arginine toothpaste. Arch Oral Biol 2017;73:79–87.

Li J, Huang Z, Mei L, Li G, Li H: Anti-Caries Effect of Arginine-Containing Formulations in vivo: A Systematic Review and Meta-Analysis. Caries Res 2015;49:606–617.

Liu SQ, Holland R, McJarrow P, Crow VL: Serine metabolism in Lactobacillus plantarum. Int J Food Microbiol 2003;89:265–273.

Lu P, Ma D, Chen Y, Guo Y, Chen G-Q, Deng H, et al.: L-glutamine provides acid resistance for Escherichia coli through enzymatic release of ammonia. Nat Publ Gr 2013;23. DOI: 10.1038/cr.2013.13

Marquis E: Role of the Arginine Deiminase System in Protecting Oral Bacteria and. Microbiology 1988;54:1318–1324.

Marsh PD: Are dental diseases examples of ecological catastrophes? Microbiology 2003;149:279–294.

Marsh PD, Head DA, Devine DA: Dental plaque as a biofilm and a microbial community - Implications for treatment. J Oral Biosci 2015;57:185–191.

Masoudi Rad H, Rabiei M, Sobhani A, Sadegh Khanjani M, Rahbar Taramsar M, Kazemnezhad Leili E: Free amino acids in stimulated and unstimulated whole saliva: Advantages or disadvantages. J Oral Rehabil 2014;41:759–767.

Moron BM, Comar LP, Wiegand A, Buchalla W, Yu H, Buzalaf MAR, et al.: Different protocols to produce artificial dentine carious lesions in vitro and in

situ: Hardness and mineral content correlation. Caries Res 2013; DOI: 10.1159/000345362

Nagata Y, Higashi M, Ishii Y, Sano H, Tanigawa M, Nagata K, et al.: The presence of high concentrations of free d-amino acids in human saliva. Life Sci 2006;78:1677–1681.

Nascimento MM, Gordan V V., Garvan CW, Browngardt CM, Burne RA: Correlations of oral bacterial arginine and urea catabolism with caries experience. Oral Microbiol Immunol 2009;24:89–95.

Nascimento MM, Liu Y, Kalra R, Perry S, Adewumi A, Xu X, et al.: Oral Arginine Metabolism May Decrease the Risk for Dental Caries in Children. J Dent Res 2013;92:604–608.

Rankine CAN, Moreno EC, Vogel GL, Margolis HC: Micro-analytical Determination of pH, Calcium, and Phosphate in Plaque Fluid. J Dent Res 1985;64:1275–1280.

Reyes E, Martin J, Moncada G, Neira M, Palma P, Gordan V, et al.: Caries-free subjects have high levels of urease and arginine deiminase activity. J Appl Oral Sci 2014;22:235–240.

Sheng J, Baldeck JD, Nguyen PTM, Quivey RG, Marquis RE: Alkali production associated with malolactic fermentation by oral streptococci and protection against acid, oxidative, or starvation damage. Can J Microbiol 2010;56:539–547.

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

Sonia LP, Savio B de L, Andre LD, Alexandra RC, Manuel TBR, Rafael GL: Comparison of growth of viable oral bacteria and Streptococcus mutans in biofilm models using three different culture media. African J Microbiol Res 2015;9:388–393.

Souza MLR, Cury JA, Tenuta LMA, Zhang YP, Mateo LR, Cummins D, et al.: Comparing the efficacy of a dentifrice containing 1.5% arginine and 1450 ppm fluoride to a dentifrice containing 1450 ppm fluoride alone in the management of primary root caries. J Dent 2013;41:S29–S34.

Srisilapanan P, Korwanich N, Yin W, Chuensuwonkul C, Mateo LR, Zhang YP, et

al.: Comparación mediante Fluorescencia Cuantitativa Inducida por Luz de la Eficacia de un Dentífrico con Arginina al 1.5% y 1450ppm de Fluoruro con un Dentífrico que Contiene 1450ppm de Fluoruro Solamente en el Manejo de Lesiones de Caries en Estadio Temprano. J Dent 2013; DOI: 10.1016/j.jdent.2013.10.014

Tenuta, LMA; Del bel Cury, AA; Bortolin, MC, Vogel, GL; Cury J: Ca, Pi, and F in the Fluid of Biofilm Formed under Sucrose. J Dent Res 2006;85:834–838.

Thomas RZ, Ruben JL, ten Bosch JJ, Huysmans MCDNJM: Effect of ethylene oxide sterilization on enamel and dentin demineralization in vitro. J Dent 2007;35:547–551.

Viana PS, Orlandi MO, Pavarina AC, Machado AL, Vergani CE: Chemical composition and morphology study of bovine enamel submitted to different sterilization methods. Clin Oral Investig 2017; DOI: 10.1007/s00784-017-2148-5

Vranić L, Granić P, Rajić Z: Basic amino acid in the pathogenesis of caries. Acta Stomatol Croat 1991;25:71–76.

Wang Y, Li J, Sun W, Li H, Cannon RD, Mei L: Effect of non-fluoride agents on the prevention of dental caries in primary dentition: A systematic review. Sompop Bencharit 2017;12:1–17.

Watford M: Glutamine and glutamate: Nonessential or essential amino acids? Anim Nutr 2015;1:119–122.

Wijeyeweera RL, Kleinberg I: Acid-base pH curves in vitro with mixtures of pure cultures of human oral microorganisms. Arch Oral Biol 1989;34:55–64.

Yamashita JM, Torres NM, Moura-Grec PG, Marsicano JA, Sales-Peres A, Sales-Peres SHC: Role of arginine and fluoride in the prevention of eroded enamel: An in vitro model. Aust Dent J 2013;58:478–482.

Zheng X, Cheng X, Wang L, Qiu W, Wang S, Zhou Y, et al.: Combinatorial effects of arginine and fluoride on oral bacteria. J Dent Res 2015;94:344–353.

ANEXO

Carta resposta aos membros da banca de qualificação

CARTA RESPOSTA AOS MEMBROS DA BANCA DE QUALIFICAÇÃO

Curitiba, 22/06/2018

Prezados senhores

Em resposta às sugestões de alteração recomendadas no exame de qualificação realizado em 29/05/2018, e em conformidade com o regimento do programa de Pós-graduação em Odontologia da PUCPR,

seguem as seguintes considerações:

-O Periódico de escolha para a submissão do artigo é a revista “Caries Research”, desta forma, ressalvadas as alterações sugeridas que seriam incompatíveis às normas de publicação do periódico, as demais sugestões foram consideradas e acatadas.

- O Resumo foi reformulado para se enquadrar nas normas da revista, já contemplando as alterações sugeridas relativas à conclusão.

- A Introdução foi reescrita incluindo a formulação das hipóteses apresentadas na aula da qualificação.

- Na seção de Materiais e Métodos todas as sugestões relativas à grafia e normas de apresentação de fórmulas e unidades de medidas foi alterada, sendo incluído um fluxograma para esclarecer a metodologia.

- Nos resultados, a análise estatística foi revisada.

- A Discussão foi reformulada seguindo as sugestões, e a conclusão foi incluída como parte da discussão, como nas normas da revista.

Assim, permanecemos inteiramente à disposição caso existam quaisquer dúvidas ou questões adicionais que nos queiram colocar.

Cordialmente,

Sheila Regina Bernini Polaquini

CENTRO UNIVERSITÁRIO DE MARINGÁ - CESUMAR

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: CARACTERIZAÇÃO DO BIOFILME ORAL EM INDIVÍDUOS ADULTOS NA PRESENÇA DE AMINOÁCIDOS ARGININA, SERINA E GLUTAMINA

Pesquisador: Sheila Regina Bernini Polaquini

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 57289416.6.0000.5539

Instituição Proponente: Centro Universitário de Maringá - CESUMAR

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.672.860

Apresentação do Projeto:

O objetivo deste Projeto será avaliar o potencial anticariogênico dos aminoácidos Arginina, Serina e Glutamina e o impacto dos mesmos sobre fatores
de virulência de S mutans. Será realizado um estudo duplo cego randomizado in situ através da utilização por voluntários de um dispositivo palatal
com blocos de esmalte/dentina, onde será comparada a microdureza inicial e final após o estudo de duas semanas com gotejamento de sacarose na
presença dos aminoácidos. O biofilme formado nestes blocos será utilizado para testes laboratoriais in vitro para a medida da virulência dos
microorganismos, através de testes de crescimento, fermentação e adesão. Os dados obtidos serão tabulados e analisados através de estatística
descritiva e análise gráfica; sendo aplicado teste de normalidade e homogeneidade de variância

Endereço: Avenida Guedner, 1610 - Bloco 11 - 5° piso
Bairro: Jardim Aclimação **CEP:** 87.050-390
UF: PR **Município:** MARINGA
Telefone: (44)3027-6360 **E-mail:** cep@unicesumar.edu.br

para o
percentual de perda de dureza em esmalte e
dentina, fermentação e adesão; teste de comparações múltiplas apropriado verificando a correlação entre fermentação, adesão e alteração
percentual de dureza.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:
Avaliar o potencial anticariogênico dos aminoácidos Arginina, Serina e Glutamina e o impacto dos mesmos sobre fatores de virulência de S mutans.

Objetivo Secundário:
Avaliar o efeito dos aminoácidos Arginina, Glutamina e Serina na desmineralização in situ de esmalte e dentina; Quantificar e comparar a
formação de biofilme multiespécies na presença destes aminoácidos; Analisar os fatores de virulência de S mutans (crescimento, adesão e
produção de ácidos) na presença destes aminoácidos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:
Uma discreta halitose poderá ser observada durante o período experimental, sendo prontamente eliminada por uma higiene bucal adequada. O uso
das soluções de sacarose a 20% e de aminoácidos será apenas em gotas sobre os blocos de esmalte, não implicando em qualquer risco de
aumento de cárie dental. O dispositivo intrabucal pode causar um leve desconforto, que é, entretanto, semelhante ao desconforto causado por um
aparelho ortodôntico móvel. Durante todo o período da pesquisa, acompanhamentos semanais serão realizados, para verificar as condições do

aparelho e da saúde bucal dos voluntários.
Os pesquisadores envolvidos na pesquisa estarão à disposição dos voluntários para ajuste no aparelho intrabucal a fim de minimizar qualquer
desconforto, bem como para sanar quaisquer dúvidas. O voluntário receberá resposta ou esclarecimento de qualquer dúvida quanto aos procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados à pesquisa. Além disso, os pesquisadores
assumem o compromisso de
proporcionar informação atualizada obtida durante o estudo, ainda que esta possa afetar a vontade do indivíduo em continuar participando. Qualquer
dúvida ou problema com o dispositivo intrabucal, o voluntário deverá comunicar aos pesquisadores responsáveis com a maior brevidade possível.
Os blocos de esmalte e dentina utilizados no presente trabalho serão devidamente preparados e esterilizados, antes de qualquer procedimento experimental.
Não há danos previsíveis decorrentes desta pesquisa. Entretanto, eventuais danos resultantes da participação na pesquisa são passíveis de
reparação, mesmo que não previstos.
Benefícios:
Considerando a prevalência de cárie ainda observada atualmente, justifica-se a realização de mais estudos para que efeitos ainda não conhecidos
que interferem nesse processo possam ser investigados, buscando uma solução para a doença.O benefício que o voluntário terá será um auxílio
indireto, contribuindo para a realização deste projeto e para aquisição de conhecimento sobre a ação dos aminoácidos sobre o biofilme bucal. Este
conhecimento poderá ser utilizado futuramente em prol da população para manutenção da saúde geral e oral. Este trabalho trará resultados inéditos

com relação à microbiologia e físico-química de formação da cárie, particularmente no estudo do biofilme dental formado na presença de
aminoácidos. Assim, os benefícios advindos da pesquisa estão intimamente relacionados à busca de conhecimentos para entender melhor o
processo de carie e sua evolução e prevenção.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de uma pesquisa relevante para área da odontologia. Os estudo apresetna como hipótese que os aminoácidos Arginina, Serina e Glutamina não exercem efeito sobre a desmineralização do esmalte e dentina em condições de desafio criogênico.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos necessários para análise e parecer do Protocolo de pesquisa foram apresentados, conforme determina a Resolução 466/12 do CNS, no entanto, o cronograma não informa as atividades da pesquisa com seus respectivos períodos. (Ex. recrutamento dos sujeitos, avaliação , intervenção, reavaliação, tabulação dos dados, análise dos resultados etc.)

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Somos de parecer favorável à aprovação do Projeto.

Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto aprovado.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_609454.pdf	07/07/2016 00:06:09		Aceito
Cronograma	cronograma_novo.pdf	06/07/2016 23:38:23	Sheila Regina Bernini Polaquini	Aceito

Folha de Rosto	folha_de_rosto.pdf	14/06/2016 22:59:03	Sheila Regina Bernini Polaquini	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	autorizacao_local.pdf	01/06/2016 23:46:07	Sheila Regina Bernini Polaquini	Aceito
Outros	oficio_CEP_2016.pdf	01/06/2016 23:15:06	Sheila Regina Bernini Polaquini	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_parte_3.pdf	01/06/2016 23:14:34	Sheila Regina Bernini Polaquini	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_parte_2.pdf	01/06/2016 23:14:18	Sheila Regina Bernini Polaquini	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_parte_1.pdf	01/06/2016 23:14:03	Sheila Regina Bernini Polaquini	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_Sheila_bernini_argininadoc.doc	01/06/2016 23:05:23	Sheila Regina Bernini Polaquini	Aceito

Situação do Parecer:
Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

MARINGA, 04 de Agosto de 2016

Assinado por:
Ludhiana Ethel Kendrick Silva
(Coordenador)

Caries Research

Caries Research

Guidelines for Authors

www.karger.com/cre_guidelines

- Aims and Scope
- Submission
- Plagiarism Policy
- Conditions
- Types of Papers
- Preparation of Manuscripts
- Color Illustrations
- References
- Color Illustrations
- Supplementary Material
- Digital Object Identi er (DOI)
- Self-Archiving/Green Open Access, *Author's Choice*™, Funding Organizations (NIH etc.)
- Page Charges
- Proofs
- Reprints

CAPÍTULO 2 AIMS AND SCOPE

'Caries Research' is an international journal, the aim of which is to promote research in dental caries and related elds through publication of original research and critical evaluation of research ndings. The journal will publish papers on the aetiology, pathogenesis, prevention and clinical control or management of dental caries. Papers on health outcomes related to dental caries are also of interest, as are papers on other disorders of dental hard tissues, such as dental erosion. Aspects of caries beyond the stage where the pulp ceases to be vital are outside the scope of the journal. The journal reviews papers dealing with natural products and other bacterial inhibitors against speci c criteria, details of which are available from the Editor.

CAPÍTULO 3 SUBMISSION

Manuscripts written in English should be submitted online.
Should you experience problems with your submission, please contact

Prof. David Beighton
(Editor-in-Chef, Caries Research)
Department of Microbiology
The Henry Wellcome Laboratories for Microbiology and Salivary
Research KCL Dental Institute, Floor 17, Guys Tower
London Bridge SE1
9RT (UK) Tel. +44
2071887465
Fax +44 2071887466
cre@karger.com

During the online submission you will be asked to list complete mailing addresses, including e- mail addresses of three potential reviewers for your manuscript.

Copies of any 'in press' papers cited in the manuscript must accompany the submission. Manuscripts reporting on clinical trials must be accompanied by the CONSORT checklist (see below).

CAPÍTULO 4 PLAGIARISM POLICY

Whether intentional or not, plagiarism is a serious violation. We de ne plagiarism as a case in which a paper reproduces another work with at least 25% similarity and without citation.
If evidence of plagiarism is found before/after acceptance or after publication of the paper, the author will be o ered a chance for rebuttal. If the arguments are not found to be satisfactory, the manuscript will be retracted and the author sanctioned from publishing papers for a period to be determined by the responsible Editor(s).

CAPÍTULO 5 CONDITIONS

All manuscripts are subject to editorial review. Manuscripts are received with the explicit understanding that the data they contain have not previously been published (in any language) and that they are not under simultaneous consideration by any other publication.

Submission of an article for publication implies the transfer of the copyright from the

author to the publisher upon acceptance. Accepted papers become the property of Caries Research and may not be reproduced by any means, in whole or in part, without the written consent of the publisher.

For legal reasons, we must receive your **'Submission Statement'** with your original (hand- written) signature. Please download, print, sign and either fax or scan it to make it legally binding.

It is the author's responsibility to obtain permission to reproduce illustrations, tables, etc., from other publications. Authors of papers describing research on human subjects are required to state that they have adhered to the Declaration of Helsinki.

CAPÍTULO 6 TYPES OF PAPERS

-
- *Original papers or Short Communications* are reports of original work (including systematic reviews and meta-analyses). Both have the structure outlined below but for Short Communications the abstract should be less than 100 words and the manuscript should not exceed 3 printed pages, equivalent to about 9 manuscript pages (including tables, illustrations and references).
-
-
-

Reviews can have a freer format but should nevertheless commence with a Title page, an Abstract and an Introduction de ning the scope. Reviews are not subject to page charges.

Current topics are concise articles that present critical discussion of a topic of current interest, or a fresh look at a problem, and should aim to stimulate discussion.

Letters to the Editor, commenting on recent papers in the journal, are published occasionally, together with a response from the authors of the paper concerned.

CAPÍTULO 7 PREPARATION OF MANUSCRIPTS

Text should be one-and-a-half-spaced, with wide margins. All pages and all lines must be numbered, starting from the title page. A conventional font, such as Times New Roman or Arial, should be used, with a font size of 11 or 12. Avoid using italics except for Linnaean names of organisms and names of genes.
Manuscripts should be prepared as a text le plus separate les for illustrations. The text le should contain the following sequence of sections: Title page; Declaration of interests; Abstract; Introduction; Materials and Methods; Results; Discussion; Acknowledgements; References; Legends; Tables. Each section should start on a

new page, except for the body of the paper (Introduction to Acknowledgements), which should be continuous. Lines in the manuscript must be numbered consecutively from the title page until the last page.
Submissions which do not conform to these simple guidelines will be returned to the author.

Title page: The first page of each manuscript should show,
in order: the title, which should be informative but concise;
the authors' names and initials, without degrees or professional status, followed by their institutes;
a short title, maximum length 60 characters and spaces, for use as a running head; a list of 3-10 key words;
the name of the corresponding author and full contact details (postal address, telephone and fax numbers, and e-mail address).

Declaration of Interests: Potential conflicts of interest should be identified for each author or, if there are no such conflicts, this should be stated explicitly. Conflict of interest exists where an author has a personal or financial relationship that might introduce bias or affect their judgement. Examples of situations where conflicts of interest might arise are restrictive conditions in the funding of the research, or if an author or their employer holds patent(s) on a product used in the study, or payment to an investigator from organisations with an interest in the study (including employment, consultancies, honoraria, ownership of shares, travel grant). Investigators should disclose potential conflicts to study participants and should state whether they have done so.

The possible existence of a conflict of interest does not preclude consideration of a manuscript for publication, but the Editor might consider it appropriate to publish the disclosed information along with the paper.

Abstract: The abstract should summarise the contents of the paper in a single paragraph of no more than 250 words (to ensure that the abstract is published in full by on-line services such as PubMed). No attempt should be made to give numerical results in detail. References are not allowed in the abstract.

Introduction: This section should provide a concise summary of the background to the relevant field of research, introduce the specific problem addressed by the study and state the hypotheses to be tested.

Materials and Methods (or Subjects and Methods): All relevant attributes of the material (e.g. tissue, patients or population sample) forming the subject of the research should be provided. Experimental, analytical and statistical methods should be described concisely but in enough detail that others can repeat the work. The name and brief address of the manufacturer or supplier of major equipment should be given.

Statistical methods should be described with enough detail to enable a knowledgeable reader with access to the original data to verify the reported results. When possible, findings should be quantified and appropriate measures of error or uncertainty (such as confidence intervals) given. Sole reliance on statistical hypothesis testing, such as the use of P values, should be avoided. Details about eligibility criteria for subjects,

randomization and the number of observations should be included. The computer software and the statistical methods used should be speci ed. See Altman et al.: Statistical guidelines for contributors to medical journals [Br Med J 1983;286:1489–93] for further information.

Manuscripts reporting studies on human subjects should include evidence that the research was ethically conducted in accordance with the Declaration of Helsinki (World Medical Association).In particular, there must be a statement in Materials and Methods that the consent of an appropriate ethical committee was obtained prior to the start of the study, and that subjects were volunteers who had given informed, written consent.

Information detailing the power and sample size calculations must be included in the manuscript.

Randomized clinical trials should be reported according to the standardised protocol of the CONSORT Statement. The CONSORT checklist must be submitted together with papers reporting clinical trials.

Randomized clinical trials must be registered at clinicaltrials.gov or similar national authority and the trial number included in the manuscript.

Trials beginning after 1 July 2012 must be registered before recruitment of the rst patient. Caries Research will accept 'retrospective registration' of trials that began before 1 July 2012 (retrospective meaning registration occurs after patient enrolment begins). When submitting a paper on a clinical trial, the trial registration number should be stated at the end of the abstract in the following format: Trial registration: [name of the trial registry, the registry URL and the trial registration number].

In studies on laboratory animals, the experimental procedures should conform to the principles laid down in the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scienti c Purposes and/or the National Research Council Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.

Unless the purpose of a paper is to compare speci c systems or products, commercial names of clinical and scienti c equipment or techniques should only be cited, as appropriate, in the 'Materials and Methods' or 'Acknowledgements' sections. Elsewhere in the manuscript generic terms should be used.

In any manuscript involving microradiography, the following information must be included: the radiation source and lters used and the kV used (this determines the wavelength of radiation and hence the validity of using Angmar's equation).

Manuscripts on experimental enamel caries should show that the lesions retain a relatively well-preserved surface layer, i.e. are not surfacesoftened lesions. Proof of surface integrity can be provided either as illustrations in the paper or as supplementary material for the reviewers.
Transverse microradiography, polarized light microscopy of a section immersed in

water or backscattered scanning electron microscopy of a polished cross-section can be used to provide the necessary proof. To allow the nature of experimental changes to be assessed, microradiographs or micrographs should be provided to show part of the experimental lesion and the adjacent control (e.g. gure 2 of Zaura et al.: Caries Res 2007;41:489–492). Again, these images can be provided as part of the paper or as supplementary material for review
purposes.

Results: Results should be presented without interpretation. The same data should not be presented in both tables and gures. The text should not repeat numerical data provided in tables or gures but should indicate the most important results and describe relevant trends and patterns.

Discussion: This section has the functions of describing any limitations of material or methods, of interpreting the data and of drawing inferences about the contribution of the study to the wider eld of research. There should be no repetition of preceding sections, e.g. reiteration of results or the aim of the research. The discussion should end with a few sentences summarising the conclusions of the study. However, there should not be a separate 'Conclusions' section.

Acknowledgements: Acknowledge the contribution of colleagues (for technical assistance, statistical advice, critical comment etc.) and provide the position(s) of author(s) employed by commercial rms. This section should describe the source(s) of funding that have supported the work inlcuding relevant grant numbers. Please also include this sentence: "The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript." If this statement is not correct, you must describe the role of any sponsors or funders, and amend the sentence as needed. Additionally, the roles of all authors must be described (For example: Conceived and designed the experiments: AA, BB. Performed the clinical examination: AA, CC. Performed the experiments: DD, FF. Analyzed the data: BB, FF.
- Wrote the paper: AA, CC, FF, EE).

Legends: The table headings should be listed rst, followed by the legends for the
- illustrations.

- **Tables:** Tables should be numbered in Arabic numerals. Each table should be placed
- on a separate page. Tables should not be constructed using tabs but by utilising the table facilities of the word-processing software.

Illustrations:

Illustrations should be numbered in Arabic numerals in the sequence of citation. Figure numbers must be clearly indicated on the gures themselves, outside the image area.
Black and white half-tone illustrations must have a nal resolution of 300 dpi after scaling, line drawings one of 800-1200 dpi.
Figures with a screen background should not be submitted.
When possible, group several illustrations in one block for reproduction (max. size 180 x 223 mm).

CAPÍTULO 8 COLOR ILLUSTRATIONS

Online edition: Color illustrations are reproduced free of charge. In the print version, the illustrations are reproduced in black and white. Please avoid referring to the colors in the text and gure legends.

Print edition: Up to 6 color illustrations per page can be integrated within the text at CHF 960.00 per page.

CAPÍTULO 9 REFERENCES

Reference to other publications should give due acknowledgement to previous work; provide the reader with accurate and up-to-date guidance on the eld of research under discussion; and provide evidence to support lines of argument. Authors should select references carefully to ful l these aims without attempting to be comprehensive.

Cited work should already be published or o cially accepted for publication. Material submitted for publication but not yet accepted should be cited as 'unpublished results', while unpublished observations communicated to the authors by another should be cited as 'personal communication', with credit in both cases being given to the source of the information. Neither unpublished nor personally communicated material should be included in the list of references. Abstracts more than 2 years old and theses should not be cited without a good reason, which should be explained in the covering letter accompanying the paper.

References should be cited by naming the author(s) and year. Where references are cited in parenthesis, both names and date are enclosed in square brackets. Where the author is the subject or object of the sentence, only the year is enclosed in brackets.

One author: [Frostell, 1984] or Frostell [1984].
Two authors: [Dawes and ten Cate, 1990] or Dawes and ten Cate [1990]. More than two authors: [Trahan et al., 1985] or Trahan et al. [1985].

Several references cited in parenthesis should be in date order and separated by semi-colons: [Frostell, 1984; Trahan et al., 1985; Dawes and ten Cate, 1990].

Material published on the World Wide Web should be cited like a reference to a print publication, and the URL included in the reference list (not in the text), together with the year when it was accessed.

The reference list should include all the publications cited in the text, and only those publications. References, formatted as in the examples below, should be arranged in strict alphabetical order. All authors should be listed. For papers by the same authors, references should be listed according to year. Papers published by the same authors in the same year should be distinguished by the letters a, b, c, ... immediately following the year, in both the text citation and the reference list. For abbreviation of journal names, use the Index Medicus system. For journals, provide only the year, volume number and inclusive page numbers.

Examples

(a)Papers published in periodicals: Lussi A, Longbottom C, Gygax M, Braig F: In uence of professional cleaning and drying of occlusal surfaces on laser uorescence in vivo. Caries Res 2005;39:284-286.

(b)Papers published only with DOI numbers: Theoharides TC, Boucher W, Spear K: Serum interleukin-6 re ects disease severity and osteoporosis in mastocytosis patients. Int Arch Allergy Immunol DOI: 10.1159/000063858.

(c)Monographs: Matthews DE, Farewell VT: Using and Understanding Medical Statistics. Basel, Karger, 1985.

(d)Edited books: DuBois RN: Cyclooxygenase-2 and colorectal cancer; in Dannenberg AJ, DuBois RN (eds): COX-2. Prog Exp Tum Res. Basel, Karger, 2003, vol 37, pp 124-137.

(e)Patents: Diggens AA, Ross JW: Determining ionic species electrochemically. UK Patent Application GB 2 064 131 A, 1980.

(f)World Wide Web: Chaplin M: Water structure and behavior. www.lsbu.ac.uk/water, 2004.

CAPÍTULO 10 SUPPLEMENTARY MATERIAL

Multimedia les and other supplementary les, directly relevant but not essential to the conclusions of a paper, enhance the online version of a publication and increase its visibility on the web. These les will undergo editorial review. The Editors reserve the right to limit the scope and length of the supplementary material. Multimedia and supplementary material should meet production quality standards for publication without the need for any

- modi cation or editing. Files should not exceed 10 MB in size. Figures and tables need to have titles and legends, and all les should be supplied separately and labeled clearly. All supplementary material should be referred to in the main text. A DOI number will be assigned to supplementary material and it will be hosted online at https://karger. gshare.com under a CC BY license. Authors will be charged a processing fee of CHF 250.00 for supplementary material.

CAPÍTULO 11 DIGITAL OBJECT IDENTI ER (DOI)

S. Karger Publishers supports DOIs as unique identi ers for articles. A DOI number will be printed on the title page of each article. DOIs can be useful in the future for identifying and citing articles published online without volume or issue information. More information can be found at www.doi.org

CAPÍTULO 12 SELF-ARCHIVING/GREEN OPEN ACCESS

Karger permits authors to archive their pre-prints (i.e. pre-peer review) or post-prints (i.e. accepted manuscript after peer review but before production) on their personal or their institution's internal website. In addition, authors may post their accepted manuscripts in public Open Access repositories and scienti c networks (e.g. ResearchGate or Mendeley) no earlier than 12 months following publication of the nal version of their article. For all self- archiving, the posted manuscripts must:

- Be used for noncommercial purposes only
- Be linked to the nal version on www.karger.com Include the following statement:

'This is the peer-reviewed but unedited manuscript version of the following article: [insert full citation, e.g. Cytogenet Genome Res 2014;142:227–238 (DOI: 10.1159/000361001)]. The nal, published version is available at http://www.karger.com/?doi=[insert DOI number].'

It is the author's responsibility to ful ll these requirements.

For papers published online rst with a DOI number only, full citation details must be added as soon as the paper is published in its nal version. This is important to ensure that citations can be credited to the article.

Manuscripts to be archived in PubMed Central due to funding requirements will be submitted by Karger on the author's behalf [see Funding Organizations (NIH etc.)].

For self-archiving Author's Choice™ (Gold Open Access) articles, see Author's Choice™.

Author's Choice™

Karger's Author's Choice™ service broadens the reach of your article and gives all users worldwide free and full access for reading, downloading and printing at www.karger.com. The option is available for a one-time fee of CHF 3,000.00, which is a permissible cost in grant allocation. More information can be found at www.karger.com/authors_choice.
The nal, published version of the article may be posted at any time and in any repository or on other websites, in accordance with the relevant Creative Commons license. Reposted Open Access articles must:

Follow the terms of the relevant Creative Commons license Be linked to the nal version on www.karger.com
Include the following statement:

'The nal, published version of this article is available at http://www.karger.com/?doi=[insert DOI number].'

It is the author's responsibility to ful ll these requirements.

For papers published online rst with a DOI number only, full citation details must be added as soon as the paper is published in its nal version. This is important to ensure that citations can be credited to the article.

CAPÍTULO 13 FUNDING ORGANIZATIONS (NIH ETC.)

The U.S. National Institutes of Health (NIH) Public Access Policy mandates that accepted, peer- reviewed manuscripts are archived in its digital database, PubMed Central (PMC), within 12 months of the o cial publication date. As a service to authors, Karger submits NIH-funded articles to PMC on behalf of the authors immediately upon publication. The NIH assigns a

PMCID within approximately 1 month and the manuscript will appear in PMC after a 12-month embargo. For authors making their paper Open Access through Author's Choice™, the

embargo will be overridden, thereby accelerating the accessibility of the article. Karger also complies with other funders' requirements (including Wellcome Trust and RCUK) for submission to PMC.
Authors should include information on their grant in the Acknowledgements section of their papers.

CAPÍTULO 14 PAGE CHARGES

There are no page charges for papers of six or fewer printed pages (including tables, illustrations and references). A charge of CHF 650.00 will be levied for each page in excess of the allotted six printed pages. The allotted size of a paper is equal to approximately 18 double- spaced typescript pages (including tables, illustrations and references).

CAPÍTULO 15 PROOFS

Unless indicated otherwise, proofs are sent to the rst-named author and should be returned with the least possible delay. Alterations other than the correction of printer's errors are charged to the author. No page proofs are supplied to the author.

CAPÍTULO 16 REPRINTS

Order forms and a price list are sent with the proofs. Orders submitted after this issue is printed are subject to considerably higher prices.