

EDISON ANDRÉS CRUZ OLIVO

**EFEITO ANTIMICROBIANO DO PEPTÍDEO LyeTx-I ASSOCIADO À
β-CICLODEXTRINA EM BIOFILMES DE BACTERIAS PATÓGENAS
PERIODONTAIS: ESTUDO *IN VITRO***

Faculdade de Odontologia

Universidade Federal de Minas Gerais

BELO HORIZONTE

2016

EDISON ANDRÉS CRUZ OLIVO

**EFEITO ANTIMICROBIANO DO PEPTÍDEO LyeTx-I ASSOCIADO À
β-CICLODEXTRINA EM BIOFILMES DE BACTERIAS PATÓGENAS
PERIODONTAIS: ESTUDO *IN VITRO***

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-graduação da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Odontologia – área de concentração em Periodontia

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Maria Esperanza Cortés

Co-Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Maria Elena de Lima Perez Garcia

Faculdade de Odontologia

Universidade Federal de Minas Gerais

BELO HORIZONTE

2016

FICHA CATALOGRÁFICA

O49e
2016
T
Olivo, Edison Andrés Cruz.
Efeito antimicrobiano do peptídeo LYETX-I associado à
β-ciclodextrina em biofilmes de bactérias patogênicas periodontais:
estudo in vitro / Andrés Cruz Olivo. – 2016.

74 f. : il.

Orientadora: Maria Esperanza Cortés.
Co-orientadora: Maria Elena de Lima .

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Gerais,
Faculdade de Odontologia.

1. Peptídeos catiônicos antimicrobianos. 2. beta-Ciclotextrinas.
3. Periodontite. I. Cortés, Maria Esperanza. II. Garcia, Maria
Elena de Lima Perez. III. Universidade Federal de Minas
Gerais. Faculdade de Odontologia. IV Título.

BLACK – D047



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA



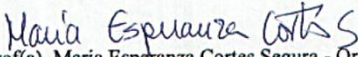
FOLHA DE APROVAÇÃO

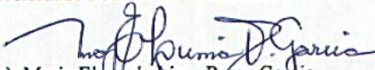
Efeito antimicrobiano do peptídeo LyeTx I associado à β -ciclodextrina em biofilmes de bactérias patogênicas periodontais

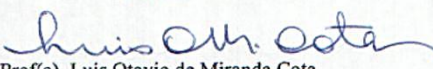
EDISON ANDRES CRUZ OLIVO

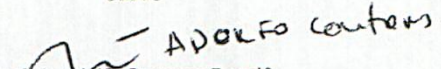
Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Odontologia, área de concentração Periodontia.

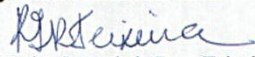
Aprovada em 27 de junho de 2016, pela banca constituída pelos membros:


Prof(a). Maria Esperanza Cortes Segura - Orientador
Universidade Federal de Minas Gerais


Prof(a). Maria Elena de Lima Perez Garcia
UFMG


Prof(a). Luis Otavio de Miranda Cota
UFMG


Prof(a). Adolfo Contreras Rengifo
Universidad del Valle


Prof(a). Karina Imaculada Rosa Teixeira
FEAD

Belo Horizonte, 27 de junho de 2016.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA



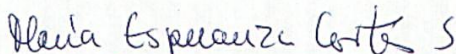
ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DO ALUNO EDISON ANDRES CRUZ OLIVO


Aos 27 dias de junho de 2016, às 14:00 horas, na sala 3403 da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais, reuniu-se a Comissão Examinadora composta pelos professores Maria Esperanza Cortes Segura (Orientadora) – FO/UFMG, Maria Elena de Lima Perez Garcia (Coorientadora) – ICB/UFMG, Luis Otavio de Miranda Cota – UFMG, Karina Imaculada Rosa Teixeira - FEAD e Adolfo Contreras Rengifo – Universidad del Valle, que participou da defesa por videoconferência, para julgamento da dissertação intitulada **Efeito antimicrobiano do peptídeo LyeTx I associado à β -ciclodextrina em biofilmes de bactérias patogênicas periodontais**. O Presidente da Banca, abriu os trabalhos e apresentou a Comissão Examinadora. Após a exposição oral do trabalho pelo aluno e arguição pelos membros da banca, a Comissão Examinadora considerou a dissertação:


Aprovado

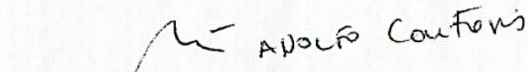
Reprovado

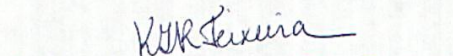
Finalizados os trabalhos, lavrou-se a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos demais membros da Comissão. Belo Horizonte, 27 de junho de 2016.


Prof(a). Maria Esperanza Cortes Segura


Prof(a). Maria Elena de Lima Perez Garcia


Prof(a). Luis Otavio de Miranda Cota


Prof(a). Adolfo Contreras Rengifo


Prof(a). Karina Imaculada Rosa Teixeira

DEDICATORIA

Dedico a Deus, porque me levou da sua Mão ao longo do caminho. Dedico especialmente a meu pai Edison Cruz Triviño, a minha mãe Ana Rosa Olivo Jaramillo, pelo infinito amor, apoio, orientação. Mãe, muito obrigado pelo amor, pelo apoio nos momentos difíceis, sem sua ajuda não tivesse conseguido meu objetivo, te amo. Dedico a meu Avô Carlos Olivo Mera e a minha tia Gloria Olivo Jaramillo. Dedico a minha família e amigos. Dedico ao povo brasileiro por ter me acolhido como mais um filho, um irmão, um amigo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela orientação, pelo amor, pela força que me ajudou a atingir todos meus objetivos e sonhos ao longo do mestrado.

Agradeço ao Colegiado de Pós-Graduação pela oportunidade de pertencer à Faculdade de Odontologia da UFMG, por ter me compartilhado com amor e generosidade todo seu saber e conhecimento na pesquisa. Agradeço à Professora Isabela Pordeus pelo carinho, orientação, e acolhida ao longo do mestrado.

Agradeço especialmente a minha orientadora Professora Maria Esperanza Cortés, pois graças a você hoje em dia me formei como pesquisador. Muito obrigado pela oportunidade de vir ao Brasil para fazer o mestrado em Odontologia. Obrigado pela paciência, pela orientação, pelos conselhos, pelas chamadas de atenção. Muito obrigado por me apresentar o mundo da pesquisa e me ensinar a acreditar, que tudo é possível com trabalho e dedicação. Levo de você o melhor e sempre terei eterna gratidão e respeito.

Agradeço imensamente à minha Co-Orientadora Professora Maria Elena de Lima Perez Garcia pelo apoio ao longo do projeto, por confiar em mim para desenvolver a pesquisa. Muito obrigado pela paciência nesta minha primeira experiência com desenhos experimentais e peptídeos antimicrobianos. Esta oportunidade me abriu as portas a um mundo novo com muitos caminhos a explorar. Muito obrigado também pelo apoio financeiro por meio do projeto “Toxinas de peçonhas animais com potencial biotecnológico e terapêutico”. Sem sua ajuda, não teria conseguido ficar no Brasil para poder concretizar meu sonho. Também gostaria de agradecer aos seus alunos de doutorado Pablo Victor Mendes dos Reis e ao Joaquim Teixeira de Avelar Junior, pela parceria para fornecer o peptídeo LyeTxI, pelas orientações e considerações para trabalhar com o peptídeo. Muito obrigado a vocês, desejo-lhes muito sucesso como pesquisadores.

Agradeço especialmente aos meus Professores da Periodontia José Eustáquio Costa, Fernando Oliveira Costa, Luís Otávio Miranda Cota. Sou muito grato a vocês pelo carinho, pelo acolhimento, e por abrirem as portas da periodontia para mim. Aprendi

muito ao longo do mestrado e levo comigo o melhor de cada um de vocês: o amor pela pesquisa na periodontia.

Agradeço aos professores da Pós-Graduação Saul Paiva, Mauro Henrique Nogueira Guimarães de Abreu, Vagner Santos, Tarcília Silva, Lucas Guimarães Abreu, Carolina Martins, Raquel Conceição Ferreira, Cristiane Bendo, Ana Cristina Oliveira pela generosidade de compartilhar seu conhecimento, um bom papo e conselhos ao longo das aulas.

Agradeço ao Professor Adolfo Contreras, pelo apoio, orientação, e por ter me ajudado a conseguir a oportunidade de continuar com meus estudos no Brasil. Você é um exemplo para mim, um excelente pesquisador, amigo e pessoa que admiro. Muito obrigado.

Especialmente gostaria de agradecer ao Professor Jorge Enrique Soto, quem tem me orientado desde a graduação, você tem sido meu modelo a seguir, meu apoio, você é um mestre da vida para mim, muito obrigado por tudo seu apoio e carinho.

Agradeço aos meus professores da Especialização em Periodontia da Universidad del Valle, Pablo Molano, Tomas Villaquirán, Olga Pacheco, Adriana Kabalan, Paula Colmenares, Bibiana Yepes, Maritza Puerto, Diego Lopez, Judy Villavicencio, Jesús Hernández, Carlos Calero, Carlos Valencia, Roger Arce, Hector Fabio Rios, vocês contribuíram para meu crescimento profissional, acadêmico e laboral na área da Periodontia.

Especial agradecimento para o Professor Rubén Sinisterra pela ajuda, apoio e colaboração para desenvolver parte da minha pesquisa no seu laboratório LEMB. Muito obrigado também por abrir as portas para minha aprendizagem na área da Química. Agradeço ao grupo LEMB pela ajuda, apoio, parceria e parte importante da minha pesquisa, e gostaria de agradecer especialmente ao Diego Suarez, mais que um colega, um amigo, um irmão, um grande pesquisador, tudo de bom para você na sua vida. Com você aprendi que o trabalho em equipe é fundamental para atingir todos os nossos objetivos, tanto na vida acadêmica quanto profissional e pessoal. Muito obrigado Diego, você é um exemplo de dedicação e amor pela pesquisa. Também gostaria de agradecer especialmente à Ana Pinzón, pelo apoio e paciência para me explicar os conceitos de química. Você tem muitas qualidades para ser ótima professora! Tudo de bom para ti, Deus te abençoe e terei eterna gratidão por tudo que

você me ajudou. Agradeço também à Ana Paula Figueredo pelo carinho, apoio, ajuda e parceria na pesquisa com peptídeos antimicrobianos. Agradeço ao Alfonso Galagarcia e a Karina Imaculada Rosa Teixeira pelos bons conselhos, orientação embora o pouco tempo compartilhado.

Agradeço à Professora Doutora Vera Lúcia dos Santos pela parceria para desenvolver parte da minha pesquisa no seu laboratório. Seu apoio foi fundamental para conseguir meus objetivos, muito obrigado.

Agradeço aos meus colegas e amigos da turma da Periodontia, Marcela de Faria Moura, Rafael Storino, Sergio Antonucci, DhelfesonDuglas de Oliveira, Frederico Lages, Leonardo Lanza, Alex Martin, Renata Magalhães, Thais Ribeiral, Bárbara Albuquerque, Glayson Vitor, Luiz Rocha, Andrea Azevedo, Bernardo Dutra, Juliana Oliveira, Patrícia Vieira. Todos vocês fizeram mais fácil minha adaptação e são culpados do meu amor pelo Brasil. Um abraço muito grande para os Muchachos e tudo de bom para vocês.

Agradeço às secretarias do Colegiado do Programa de Pós-Graduação pela colaboração ao longo do meu mestrado.

Agradeço aos estudantes de iniciação científica Natalia Neves e Matheus de Paula Martins, porque por serem parte da minha motivação em repassar o meu melhor como professor. Muito obrigado pela ajuda ao longo da pesquisa, desejo tudo de bom para suas vidas profissional e acadêmica, sempre podem contar comigo para o que precisar. Lembrem de fazer tudo com amor e por amor à Odontologia e aos pacientes.

Agradeço à Debora Spila e à Faculdade de Veterinária da UFMG, pela colaboração na obtenção do soro de cavalo. Sem esta ajuda não teria conseguido desenvolver meus experimentos com as bactérias. Desejo muitos sucessos na sua vida profissional.

Agradeço em especial à amiga, irmã e companheira de vida EufemiaPelaez. Você foi uma força, um apoio fundamental para mim ao longo do mestrado. Você foi a família que tive ao longo deste tempo. Aprendi a conhecê-la, e hoje a tenho como irmã e amiga. Desejo-lhe tudo de bom, muito obrigado por tudo que foi compartilhado, por todos os momentos bons e ruins, sempre levarei comigo seu carinho e amor.

Agradeço em especial à amiga, irmã e vizinha LenkaTamayo, porque com você compartilhei momentos inesquecíveis, aprendi da vida, aprendi da química, e tive companhia nos momentos tristes e alegres. Conte comigo sempre. Muito obrigado e te desejo tudo de bom.

Agradeço aos meus amigos Janine Silva, Fernanda Gonçalves de Moraes, JesikaConsuegra, Carina Montalvany, Paula Ribeiro, Carolina Vilorio, Karla Iriarte, Luis Pedraza, Juan Felipe Delgado, Carlos Florez, David Urbina, Ricardo Ramirez, Jesús Nuncira, Camilo, porque vocês são minha família em Belo Horizonte, obrigado pelo apoio, pela companhia, pelos momentos inesquecíveis. Vocês são a força que precisei nos momentos difíceis, vocês são a alegria que compartilhei nos momentos tristes, vocês são o melhor que o Brasil me deu. Muito obrigado, e desejo-lhes tudo de bom para suas vidas. Podem contar comigo sempre, e levo a todos vocês no meu coração.

Agradeço aos meus amigos e irmãos que a vida me deu, Fai Chen Chen e Ximena Cortés, Juan José Oliveros, Reynel Gonzalez, David Alejandro Aguirre, Julian David Velez, Jemil Garcia, Sara Aramburo, Santiago Aramburo, Laura Kure, pelo apoio e amor, fundamental para obter forças e atingir meus sonhos.

Agradeço a todos vocês e aqueles que de alguma forma fizeram parte desta caminhada, minha eterna gratidão.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Agradeço à Coordenação de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro a este trabalho. Agradeço ao projeto “Toxinas de peçonhas animais com potencial biotecnológico e terapêutico”63/2010.

***“Research is to see what everybody else has seen,
but to think what nobody else has thought”***

Albert Szent-Gyorgyi (1893-1986)

Physiologist and Nobel Prize recipient

RESUMO

Biofilmes bacterianos estão associados como fator etiológico da doença periodontal, uma vez que são difíceis de controlar por meio da terapia mecânica e antibiótica convencional. As células bacterianas dos biofilmes possuem mecanismos de resistência bacteriana tornando-as difíceis de neutralizar tanto pela resposta imune do hospedeiro quanto à ação dos antibacterianos. Uma alternativa para o controle dos biofilmes bacterianos, é o uso de peptídeos antimicrobianos, uma vez que tem amplo espectro e baixa incidência de resistência bacteriana. O presente estudo investigou a atividade antibacteriana do peptídeo sintético denominado LyeTx I, originário do veneno de uma aranha (*Lycosaerithognata*), em sua forma livre ou associado em β -ciclodextrina (β CD) contra bactérias periodontopatógenas colonizadoras iniciais e tardias tanto em estado planctônico quanto em biofilme. A mistura entre LyeTx I e a β CD foi caracterizada por espectroscopia de infravermelho. Para conhecer a cinética das bactérias testadas, foram feitas curvas de crescimento bacteriano tanto em estado planctônico quanto em biofilmes formados sobre pinos de polietileno no dispositivo de biofilme da Universidade de *Calgary*. Para confirmar a formação e estrutura dos biofilmes, os pinos foram examinados por microscopia eletrônica de varredura em diferentes tempos (2, 5, 10 dias). Em seguida, foram determinadas as concentrações inibitória mínima (CIM) e bactericida mínima (CBM) dos *S. mutans*, *S. oralis*, *S. sanguinis*, *E. corrodens*, *L. acidophilus*, *L. casei*, *F. nucleatum* e *P. intermedia*. Inicialmente, o efeito da cinética do LyeTxI nas bactérias foi determinado por meio do ensaio de curva de morte usando as CIMs. Adicionalmente, foram determinadas a concentração mínima de erradicação do biofilme (CMEB) e a porcentagem de redução da atividade metabólica tanto em biofilme jovem (2 dias) quanto para biofilme maturo (4 dias). As CIMs tanto do LyeTxI quanto do LyeTx I/ β CD foram entre 7,81- 62,5 μ g/mL em estado planctônico sendo que o *S. mutans*, *S. oralis*, *S. sanguinis* e *E. corrodens* foram as mais sensíveis ao LyeTx I e ao LyeTx I/ β CD. O efeito antibacteriano do LyeTx I começou dentro dos primeiros 15 minutos e se manteve durante 10 horas de acordo com os resultados obtidos nas curvas de morte das bactérias testadas. A porcentagem de redução da atividade metabólica das células do biofilme foi determinada usando resazurina e leitura da fluorescência (λ_{ex} 570 nm/ λ_{em} 590 nm). Os resultados mostraram que tanto o LyeTx I quanto o LyeTx I/ β CD quando comparados à clorexidina (controle), apresentaram uma redução da atividade metabólica das células

dos biofilmes de 2 dias na maior concentração (250 µg/mL), porém não houve diferença estatisticamente significativa após análise da variância e o teste Tukey de multiplex comparações entre os tratamentos testados ($p > 0,05$). Contudo, dentre os agentes testados nenhum foi capaz de reduzir a atividade metabólica das células do biofilme de 4 dias, sendo que a clorexidina diminuiu levemente a atividade metabólica do biofilme maturo ($p < 0,05$). Os resultados do presente trabalho sugerem que, o peptídeo LyeTx I e o composto de inclusão LyeTx I/βCD possuem efeito antibacteriano contra bactérias patogênicas periodontais, agindo de forma bacteriostática por um período de até 10 horas. LyeTx I e LyeTx I/βCD possuem efeito antibacteriano em biofilmes jovens (2 dias), indicando o potencial uso destes como coadjuvantes na terapia mecânica periodontal.

Palavras - Chave: LyeTx I, peptídeos catiônicos antimicrobianos, periodontopatógenos, periodontite, ciclodextrina.

ABSTRACT

Biofilms are involved as etiology of bacterial infections such as periodontal disease, once they difficult to control with conventional mechanic and antibiotic therapy. Biofilms cells display mechanism of resistance making them tolerant against immune response and antibiotics. Antimicrobial peptides (AMPs) are an alternative to control bacterial biofilms because their wide spectrum and low rate of bacterial resistance. Therefore, the aim of this study was to evaluate the antibacterial activity of the synthetic peptide LyeTx I (originary of the poison of a spider *Lycosaerithognata*), free and associated with beta-cyclodextrin (β CD) against both, first and late colonizer bacteria in planktonic state and in biofilms. The mixture of LyeTx I and β CD was characterized by infrared absorption spectroscopy. Planktonic and biofilm growth curves were done to identify the kinetics of tested bacteria. Biofilms were formed on polyethylene pegs using the calgary biofilm device (CBD) of the University of Calgary. To determine whether differences in biofilm architecture and composition exist between immature biofilms to mature biofilms formed on pegs, we examined biofilms by scanning electron microscopy at 2, 5 and 10 days. Then, the minimal inhibitory concentrations (MIC) and minimal bactericidal concentration (MBC) were determined for *S. mutans*, *S. oralis*, *S. sanguinis*, *E. corrodens*, *L. acidophilus*, *L. casei*, *F. nucleatum* and *P. intermedia*. Killing kinetics assays were performed for each species at MICs to determine the kinetic of LyeTx I. Additionally, the minimal biofilm eradication concentration (MBEC) and the percent of reduction in metabolic activity were determined for young (2-day) and mature (4-day) multispecies biofilms. The band detected between 1200-1700 cm^{-1} regions shows a decrease of functional group C-H aliphatic stretching vibrations that may be attributed to the formation of van der Waals interactions between β CD and LyeTx I, thus confirming the presence of the association compound LyeTx I/ β CD. The MICs of the LyeTx I and the LyeTx I / β CD were found between 62.5 - 7.81 $\mu\text{g} / \text{mL}$ in planktonic state. *S. mutans*, *S. oralis*, *S. sanguinis* and *E. corrodens* were the most sensitive to LyeTx I and LyeTx I / β CD. The antibacterial effect of LyeTx I started within the first 15 minutes and continued for 10 hours according to results of death curves on tested bacteria. The percentage reduction of metabolic activity of biofilm cells was determined using resazurin and fluorometry (λ_{ex} 570 nm / λ_{of} 590 nm). LyeTx I, LyeTx I/ β CD and chlorhexidine (control) decreased the metabolic activity of 2-day biofilm cells at 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and there were no statistically significant difference between the

treatments ($p > 0.05$). In contrast, any of the tested agents decreased metabolic activity of 4-day biofilm cells. Chlorhexidine was able to slightly reduce metabolic activity of mature biofilm ($p < 0.05$). In conclusion, the LyeTx I peptide free or associated with β CD possesses antibacterial effect against planktonic periodontal pathogenic bacteria and reduce the metabolic activity in young biofilm cells acting as a bacteriostatic agent for a period of 10 hours. Therefore, this study suggests that LyeTx I and LyeTx I/ β CD are promising antibacterial agents for the control of 2-day biofilms, which suggest their use as adjuvant in periodontal mechanical therapy.

KEYWORDS: LyeTx-I, cationic antimicrobial peptides, periodontal bacteria, periodontitis cyclodextrin.

LISTA DE FIGURAS

Revisão da literatura

FIGURA 1. Representação esquemática da estrutura molecular do peptídeo LyeTx I.....	8
FIGURA 2. Representação esquemática da conformação espacial de uma molécula de ciclodextrina.....	9
FIGURA 3 – Esquema representando as fases da formação do biofilme.....	12
FIGURA 4 – Representação esquemática da susecao de bactérias colonizando a superfície do dente para formar o biofilme.....	14
FIGURA 5 – Esquema representando o reator de biofilme sobre pinos usando o dispositivo Calgary BiofilmDevice ou CMEB (Concentração Mínima de Erradicação do Biofilme).....	16

Artigo

FIGURA 1 – Methodology used for biofilm growth on the Calgary Biofilm Device	33
FIGURA 2 – FTIR spectra of the stretching region (1000-4000 cm^{-1}) in KBr pellet of LyeTx I/ β CD inclusion compound.....	35
FIGURA 3–Bacterial growth curve of all strains cultured in Brain Hearth Infusion broth.....	36
FIGURA 4– Mono-species biofilm growth curve incubated in the Calgary Biofilm Device.....	37
FIGURA 5 – Scanning electron photomicrographs of multispecies biofilm formed on pegs from the Calgary Biofilm Device after 2 days of incubation in Brain Hearth Infusion broth.....	38
FIGURA 6– Scanning electron photomicrographs of multispecies biofilm formed on pegs from the Calgary Biofilm Device after 5 days of incubation in Brain Hearth Infusion broth.....	39
FIGURA 7– Scanning electron photomicrographs of multispecies biofilm formed on pegs from the Calgary Biofilm Device after 10 days of incubation in Brain Hearth Infusion broth.....	40
FIGURA 8 –Percent of inhibition of metabolic activity of LyeTxI and the inclusion compound LyeTxI/ β CD at MIC values.....	42

FIGURA 9– Time-killing kinetics (0-60 min) of peptide LyeTx I.....	44
FIGURA 9.1– Time-killing kinetics (0-12 h) of peptide LyeTx I.....	45
FIGURA 10 – Reduction of metabolic activity of 2-day and 4-day multispecies biofilms after exposition to LyeTxI and LyeTxI/βCD at the highest concentration.....	47
FIGURA 11– Reduction of metabolic activity of planktonic cells shed from 2- day and 4-day biofilms after exposition to LyeTxI and LyeTxI/βCD at the highest concentration.....	49
FIGURA 12– Scanning electron micrographs of biofilms formed on pegs obtain from the Calgary Biofilm Device after exposition to LyeTx I at higher concentration.....	50

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Biofilm growth curve expressed in terms of Log ₁₀ CFU/peg ⁻¹	37
TABELA 2 – Periodontal pathogenic bacterial susceptibility to LyeTxI and LyeTxI/βCD	41
TABELA 3 –Reduction of metabolic activity of planktonic cells after exposure to LyeTxI and LyeTxI/βCD at MIC values.....	43
TABELA 4 – Comparative susceptibility of bacterial biofilms to LyeTxI, LyeTxI/βCD and Chlorhexidine after 24 hours of exposure.....	46
TABELA 5 – Reduction of metabolic activity of 2-day and 4-day biofilms after exposure to LyeTxI and LyeTxI/βCD at the highest concentration	47
TABELA 6 – Reduction of metabolic activity of planktonic cells from 2-day and 4-day biofilms after exposure to LyeTxI and LyeTxI/βCD at the highest concentration.....	48

ANEXO

ANEXO 1 – Figure 1. Minimal Biofilm Eradication Concentration assay.....	64
ANEXO 2 – Table 1. FTIR bands of the stretching region (400-4000 cm ⁻¹) in KBr pellet of LyeTx I/βCD inclusion compound and β-cyclodextrin	65
ANEXO 3 – Table 1. Results of the evaluation of LyeTxI and LyeTx I/βCD with Chlorhexidine (control) in reducing the metabolic activity of planktonic periodontal pathogens at MIC values by ANOVA test.....	66
Table 2. Results of Dunnett's multiple comparisons test between LyeTxI and LyeTxI/βCD at MIC values compared with Chlorhexidine.....	66
Table 3. Results of the ANOVA test comparing the reduction of metabolic activity at MIC values between LyeTxI and LyeTxI/βCD	67
Table 4. Results of Tukey's multiple comparisons test of reduction of metabolic activity at MIC values between LyeTxI and LyeTxI/βCD.....	67
Table 5. Results of the ANOVA test comparing the reduction of metabolic activity of 2-day biofilm cells between LyeTxI and LyeTxI/βCD at the highest concentration.....	68
Table 6. Results of Tukey's multiple comparisons test of reduction of metabolic activity of 2-day biofilm cells between LyeTxI and LyeTxI/βCD at the highest concentration.....	68
Table 7. Results of the ANOVA test comparing the reduction of metabolic activity of 4-day biofilm cells between LyeTxI and LyeTxI/βCD at the highest concentration.....	69
Table 8. Results of Tukey's multiple comparisons test of reduction of metabolic activity of 4-day biofilm cells between LyeTxI and LyeTxI/βCD at the highest concentration.....	69
Table 9. Results of the ANOVA test comparing the reduction of metabolic activity of cells shed from 2-day biofilm (planktonic) between LyeTxI and LyeTxI/βCD at the highest concentration.....	70
Table 10. Results of Tukey's multiple comparisons test of the reduction of metabolic activity of cells shed from 2-day biofilm	

(planktonic) between LyeTxI and LyeTxI/ β CD at the highest concentration.....	70
Table 11.Results of the ANOVA test comparing the reduction of metabolic activity of cells shed from 4-day biofilm (planktonic) between LyeTxI and LyeTxI/ β CD at the highest concentration.....	71
Table 12.Results of Tukey's multiple comparisons test of the reduction of metabolic activity of cells shed from 4-day biofilm (planktonic) between LyeTxI and LyeTxI/ β CD at the highest concentration.....	71

LISTA DE ABREVIATURAS

<i>A.a</i>	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i>
<i>A.n</i>	<i>Actinomyces naeslundii</i>
PAMs	Peptídeos antimicrobianos
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CBD	<i>Calgary Biofilm Device</i>
CBM	Concentração bactericida mínima
CI	<i>Confidence interval</i>
CIM	Concentração inibitória mínima
CMEB	Concentração mínima de erradicação do biofilme
CD	Ciclodextrina
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CHX	Clorexidina
DO	Densidade ótica
α -CD	alfa ciclodextrina
β -CD	β ciclodextrina
γ -CD	gama ciclodextrina
<i>Ec</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Ek</i>	<i>Eikenella corrodens</i>
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
<i>Fn</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i>
hCAP18/LL37	<i>human Cationic Antimicrobial Protein/Catelicidina</i>
HPCL	<i>High performance chromatography liquid</i>
<i>La</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
<i>Lc</i>	<i>Lactobacillus casei</i>
LyeTxI/ β CD	<i>LyeTx I associado à β-ciclodextrina</i>
MBEC	<i>Minimal Biofilm Eradication Concentration</i>
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MIC	<i>Minimal Inhibition Concentration</i>

MVCC	<i>Meanviablecellcounts</i>
PBS	Salina tamponada com fosfato 1%
<i>Pg</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
<i>Sa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Sg</i>	<i>Streptococcusgordonii</i>
<i>Si</i>	<i>Streptococcusintermedius</i>
<i>Sm</i>	<i>Streptococcus mutans</i>
<i>So</i>	<i>Streptococcus oralis</i>
<i>Ss</i>	<i>Streptococcussanguis</i>
SDS	Dimetilsulfóxido
<i>Td</i>	<i>Tannarelladenticola</i>
<i>Tf</i>	<i>Tannarellaforsythia</i>
TFV	1,3,5-trifenilformazam vermelho
UFC	Unidades formadoras de colônias
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
VCC	<i>Viablecellcounts</i>

SUMARIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVO GERAL.....	3
2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	3
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	4
3.1 Peptídeos antimicrobianos.....	5
3.2. Peptídeo LyeTx I.....	7
3.3. Complexo de inclusão com ciclodextrina.....	9
3.3.1. Caraterísticas biológicas da ciclodextrina.....	9
3.3.2. Liberação sustentada com ciclodextrina.....	10
3.3.3. Interação da ciclodextrina com peptídeos.....	10
3.4. Biofilmes.....	11
3.4.1 Formação do biofilme.....	11
3.4.2. Composição dos biofilmes na doença periodontal.....	13
3.4.3. Dispositivo de crescimento do Biofilme da Universidade de Calgary.....	14
3.5 REFERENCIAS GERAIS.....	17
4. ARTIGO.....	24
Title page.....	25
Abstract.....	26
Introduction.....	27
Materials and Methods.....	29
Results.....	34
Discussion.....	51
Conclusion.....	55
Acknowledgments.....	55
References.....	56
5. CONCLUSÃO.....	62
SUPLEMENTARY MATERIAL.....	63
6. PRODUÇÃO CIENTÍFICA DURANTE O MESTRADO.....	72

1. INTRODUÇÃO

O uso indiscriminado dos antimicrobianos, a aglomeração de pessoas, a transmissão de microrganismos no ambiente hospitalar e a automedicação são fatores que favorecem a disseminação e aparecimento da resistência bacteriana aos antibióticos, provocando o agravamento de infecções e levando a altos gastos para o Sistema de Saúde (1).

Inúmeras pesquisas nas últimas décadas demonstraram que diversos peptídeos exibem atividade antimicrobiana e podem ser usados como terapêuticos alternativos contra bactérias resistentes (2). Muitos peptídeos fazem parte e complementam o sistema imunológico dos seres humanos. Os peptídeos são constituídos de aminoácidos e podem ser catiônicos e ter conformação em hélice, com caráter anfipático, fundamental para interagir com membranas celulares de carga negativas das bactérias (3). Entre os diversos tipos de peptídeos antimicrobianos, alguns possuem atividade de amplo espectro contra bactérias Gram positivas, Gram negativas, fungos e vírus (4-6). O mecanismo de ação antimicrobiano dos peptídeos é em geral, dirigido por uma interação eletrostática da carga positiva do peptídeo com a carga negativa dos lipopolissacarídeos da membrana celular bacteriana, seguido pelo deslocamento dos lipídeos, alteração e permeabilização da membrana, criação de poros, e ativação de hidrolases que degradam a membrana celular até produzir a morte celular bacteriana (3, 5, 7-9).

Peptídeos com atividade antimicrobiana têm sido isolados a partir de venenos de artrópodes. O LyeTx-I foi isolado do veneno da aranha *Lycosa erythognatha*, no Laboratório de Venenos e Toxinas Animais do Departamento de Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais por Santos e colaboradores no ano 2010. O LyeTx-I apresentou atividade antibacteriana contra microrganismos como *Escherichia coli* (*E. coli*) e *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) (5, 10). Em estudos prévios de nosso grupo de pesquisa, o LyeTx-I foi associado à β -ciclodextrina (β CD) visando-se diminuir sua citotoxicidade e aumentar a biodisponibilidade. Nestes estudos, o composto de associação LyeTx-I: β -ciclodextrina apresentou maior atividade antibacteriana contra *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, *F. nucleatum* do que o peptídeo livre (11).

O estudo de Rams e cols., (2014) sugere que as bactérias patógenas periodontais são resistentes aos antimicrobianos comumente usados como coadjuvantes da terapia periodontal (12), uma vez que estas bactérias estão embebidas na matriz de exopolissacarídeos do biofilme. O biofilme, consiste em uma forma mecânica de resistência atuando das seguintes formas: 1) impedindo a difusão do antibiótico; 2) alterando a composição química do microambiente dentro do biofilme pela acumulação de produtos metabólicos que antagoniza a ação do antibiótico; e 3) desenvolvimento de um estado fenotípico de resistência bacteriana maior do que no estado planctônico bacteriano (13).

Contudo, pouco se sabe da atividade antibacteriana desses peptídeos em biofilmes de bactérias patógenas periodontais. Ainda para a potencial aplicação clínica do peptídeo LyeTx-I associado à β -ciclodextrina, é necessário conhecer sua atividade antimicrobiana frente a bactérias em estado planctônico e em biofilme, *in vitro*.

2. OBJETIVO GERAL

Avaliar, *in vitro*, o efeito antimicrobiano do peptídeo LyeTx-I e do composto de associação LyeTx-I à β -ciclodextrina, em biofilmes mistos de bactérias periodontopatógenas *S. mutans*, *S. oralis*, *S. sanguinis*, *L. acidophilus*, *L. casei*, *E. corrodens*, *P. intermedia*, *F. nucleatum*, *P. gingivalis* e *A. actinomycetemcomitans*.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a concentração mínima inibitória e a concentração mínima bactericida, do LyeTx-I e do composto de associação LyeTx-I/ β -CD para as bactérias patógenas periodontais em estado planctônico;
- Determinar a cinética da curva de morte das células planctônicas, a partir da concentração inibitória mínima na influência do peptídeo LyeTx-I pela
- Determinar a concentração mínima do peptídeo LyeTx-I e do composto de associação LyeTx-I/ β -CD para a erradicação do biofilme multiespécies;
- Avaliar a porcentagem de redução da atividade metabólica das células bacterianas do biofilmes multiespécies do peptídeo LyeTx-I e do composto LyeTx-I/ β -CD;
- Verificar qualitativamente a estrutura da biomassa do biofilme multiespécies antes e após exposição ao LyeTx-I e do composto de associação LyeTx-I/ β -CD.

REVISÃO DA LITERATURA

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Peptídeos Antimicrobianos

Peptídeos são substâncias naturais de diversas origens que podem estar presentes em plantas, aracnídeos, répteis, humanos e sintéticos. Nos humanos, os peptídeos fazem parte do sistema imunológico agindo rapidamente em uma infecção microbiana, neutralizando uma ampla variedade de micróbios. Nos organismos multicelulares, os peptídeos antimicrobianos (PAMs) são produzidos principalmente nas camadas das células epiteliais e pelos fagócitos. Além disso, eles são armazenados facilmente e então prontamente disponíveis após uma infecção (3).

Os PAMs apresentam diferentes tamanhos segundo a cadeia de aminoácidos que pode variar entre 9 até 100 aminoácidos. Além disso, possuem carga elétrica positiva e domínios hidrofóbicos e hidrofílicos. Assim, os PAMs que possuem aminoácidos em conformação anfipática, têm a capacidade de interagir em meios aquosos e lipídicos, tais como, as membranas celulares (3). Adicionalmente, de acordo com a conformação, alguns peptídeos podem formar estruturas de folha- β onde suas unidades associam-se por meio de ligações de hidrogênio resultando em uma estrutura achatada e rígida, estabilizadas por pontes de dissulfeto. Por sua vez, após interagir com as membranas celulares, os peptídeos podem adotar estruturas tanto lineares como α -helicoidal (14). Essas diferenças na conformação podem determinar sua seletividade, atividade antibacteriana e citotóxica. Desta forma, alguns peptídeos são tóxicos para microrganismos mas não para células dos mamíferos, enquanto outros são tóxicos tanto para microrganismos quanto para células eucariotas (3).

Peptídeos antimicrobianos apresentam vários mecanismos de ação os quais estão determinados por diferentes fatores, tais como: a carga elétrica positiva, conformação, hidrofobicidade, anfipaticidade e o ângulo de polaridade. A carga positiva dos peptídeos é importante para estabelecer uma atração eletrostática com as membranas elétricas negativas bacterianas. A conformação do peptídeo determina a seletividade com as membranas celulares. A hidrofobicidade, anfipaticidade e

ângulo de polaridade, determinam a capacidade do peptídeo de permeabilizar a membrana celular bacteriana (19).

Todos estes fatores induzem uma despolarização (15, 16), permeabilização (5, 7) e formação de poros na membrana celular bacteriana, causando perda de íons e metabólitos, perda da síntese de biopolímeros da membrana e a morte celular (8). Além disso, quando os peptídeos penetram na célula bacteriana, podem ativar hidrolases que degradam a parede celular (9) e causam danos em locais específicos intracelulares (17, 18).

Embora alguns peptídeos precisam de receptores de membrana para exercer o mecanismo de ação, existem outros que não são dependentes de receptores de membrana celular. Os PAMs que não precisam de receptores da membrana geralmente possuem amplo espectro de aminoácidos, maior tamanho e estrutura, e possuem como alvo de ação a membrana celular, sem precisar de um receptor específico para ligar-se nela. Assim, os PAMs são atraídos às membranas celulares pela atração eletrostática entre a carga negativa da membrana celular das bactérias Gram-negativas que possuem lipopolissacarídeos e bactérias Gram-positivas que possuem ácidos polissacarídicos (19).

Em seguida, os peptídeos podem se auto associar com as membranas após se ligar nelas por meio de interações peptídeo-peptídeo e peptídeo-lipídeo. Por exemplo, peptídeos com domínios hidrofóbicos e hidrofílicos bem definidos podem orientá-los eficientemente para os respectivos lipídios da membrana. Após de se estabelecer a ligação do peptídeo com a membrana celular, os peptídeos entram em uma segunda fase conhecida como nível de concentração. Nesta fase, os peptídeos começam a penetrar a membrana de lipídeos estendendo seus mecanismos de ação dentro da célula bacteriana (19).

Um dos mecanismos pelos quais o peptídeo consegue atravessar a membrana celular é conhecido como o mecanismo de barril. Neste mecanismo vários canais de forma de barril são formados após estabelecimento de complexos entre os domínios hidrófobos dos peptídeos com as cabeças polares dos fosfolipídeos da membrana celular, induzindo um engrossamento da membrana local. Posteriormente, a porção hidrófoba do peptídeo é inserida dentro da membrana enquanto os domínios hidrofílicos formam o revestimento do poro (19).

Um segundo mecanismo para formar canais de transmembrana é o poro toroidal. Neste modelo os lipídeos da membrana estão intercalados com o peptídeo dentro do canal de transmembrana. Portanto, este modelo é conhecido como um complexo supramolecular e representa um poro que atravessa a membrana revestida tanto com as superfícies polares do peptídeo quanto com as cabeças polares dos fosfolipídeos da membrana (19).

Adicionalmente, os peptídeos podem permeabilizar as membranas dos microrganismos de forma difusa. Este modelo é conhecido como mecanismo de tapete. Neste modelo, os peptídeos se acumulam sobre a superfície da membrana bacteriana, e o deslocamento dos fosfolipídeos muda a fluidez da membrana como se for um detergente (19).

Por outro lado, os PAMs que precisam de um receptor específico na membrana celular são produzidos principalmente pelas bactérias para agir contra outras bactérias específicas. Estes PAMs possuem um domínio de ligação ao receptor e um domínio de formação de poros. O domínio de formação de poros dos PAMs lhes permite ligar-se à membrana celular, e inserir-se dentro dos lipídeos da mesma sem danificá-la. Dentro da célula os PAMs inibem a síntese da enzima ATP-sintase, necessária para gerar ATP nas células (20), portanto esta inibição induz a morte da célula bacteriana (17, 18).

3.2. Peptídeo LyeTx I

Os peptídeos antimicrobianos têm sido encontrados nos venenos de artrópodes, como por exemplo, aranhas e escorpiões. LyeTx I é um peptídeo isolado do veneno da aranha *Lycosa erythognatha*, o qual foi sintetizado e caracterizado físico-quimicamente no Laboratório de Venenos e Toxinas Animais do Departamento de Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais (5). O veneno da aranha foi extraído e posteriormente fracionado por meio de cromatografia de troca catiônica. Assim, após purificação, a massa do peptídeo purificado foi determinada e foi igual a 2831.1 *m/z*. O peptídeo tem a seguinte sequência de aminoácidos: H-IWLTALKFLGKNLKGKHLAKQQLAKL sendo nomeado LyeTx I (5).

A estrutura primária e secundária do LyeTx I foi determinada por degradação automatizada de Edman e por espectroscopia de ressonância magnética nuclear, respectivamente. Estas técnicas revelaram um terminal em α -hélice helicoidal levemente inclinado e uma pequena região espiral localizada na região N-terminal (Figura 1). O N-terminal corresponde ao extremo de um peptídeo que finaliza com um aminoácido e possui um grupo amina livre, que permite ser reconhecido e se ligar com outras moléculas.

O LyeTx I pode se ancorar dentro da camada de fosfolípídeos e interagir com membranas celulares já que possui um triptofano na porção N-Terminal, e uma estrutura anfipática na porção do C-terminal, conhecida também como o extremo do grupo carboxila, onde pode ligar-se ao grupo amino de outra molécula (5).

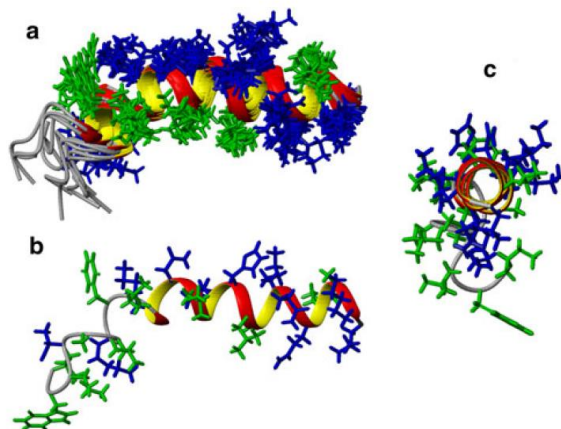


Figura 1. Representação esquemática da estrutura molecular do peptídeo LyeTx I. a) Estrutura molecular obtida por ressonância magnética nuclear do LyeTx I em micelas de 400mM DPC_{d38} e solução buffer, pH 7.0, apresenta os resíduos hidrofóbicos em cor azul e hidrofílicos com carga elétrica, em verde; b) apresenta uma vista lateral do peptídeo LyeTx I; c) apresenta uma vista ao longo do eixo helicoidal. Fonte:(5).

Dentro das propriedades biológicas, estudos tem mostrado que o LyeTx I possui atividade antimicrobiana tanto contra bactérias Gram positivas (*S. aureus*) quanto para bactérias Gram negativas (*E. coli*) (5). Além disso, Consuegra e colaboradores reportaram a atividade do LyeTx I contra bactérias patogênicas periodontais como o *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *F. nucleatum*, a uma concentração de 30.8

$\mu\text{g/mL}$ (11). No entanto, quando o LyeTx I foi associado à β -ciclodextrina atingiu uma melhor inibição do crescimento bacteriano para *A. actinomycescomitans* ($<0.03 \mu\text{g/mL}$), *P. gingivalis* e *F. nucleatum* ($15.20 \mu\text{g/mL}$) (11). Por sua vez, além de apresentar atividade antimicrobiana, o LyeTx I também apresentou atividade antifúngica contra *Candida krusei* e *Cryptococcus neoformans* (5).

3.3. Complexo de inclusão com ciclodextrina

A Ciclodextrina (CD) é um oligossacarídeo cíclico composto por unidades de glicose. A CD tem a capacidade de alterar as propriedades biológicas, químicas e físicas das moléculas hospedeiras por meio da formação de compostos de inclusão e associação (Figura 2). Entre as CDs naturais encontram-se as alfa-ciclodextrinas (α -CD), beta-ciclodextrinas (β -CD) e as gama-ciclodextrinas (γ -CD) as quais são formadas por seis, sete e oito moléculas de D-glucopiranosose respectivamente, ligadas entre si por ligações α -1,4 glicosídicas em um macrociclo. Uma propriedade importante da CD é sua capacidade de formar complexos de associação com compostos orgânicos e inorgânicos, compostos de natureza neutra ou iônica (21).

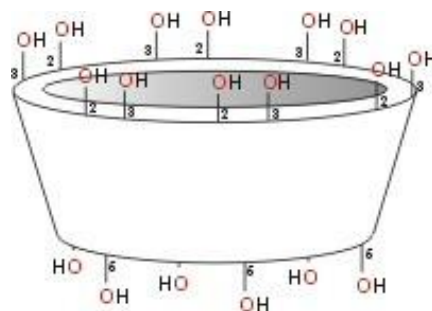


Figura 2. Esquema representando a conformação espacial de uma molécula de ciclodextrina. Fonte: Uekama e cols., 1998 (21).

3.3.1. Características da ciclodextrina

Uma característica importante da CD é a capacidade de formar compostos de inclusão ou de associação em estado sólido ou em solução, no qual cada molécula hospedeira é rodeada pela cavidade hidrofóbica da CD. Desta forma, a CD altera as

propriedades biológicas, químicas e físicas das moléculas do fármaco hospedeiro uma vez que a molécula do fármaco, que é solúvel em água, é protegida pela CD aumentando-se desta forma a sua solubilidade e estabilidade em meio aquoso (21-23).

A solubilidade da CD pode ser aumentada por meio da adição de co-solventes como álcool, acetonitrilo, sulfóxido de dimetilo, entre outros, o que permite a preparação de compostos sólidos de 2-hidroxipropil CDs com fármacos instáveis como esteroides, peptídeos e antibióticos, por meio de métodos de evaporação e liofilização (21).

A CD tem capacidade de acelerar ou desacelerar vários tipos de reações. Por exemplo, pode catalisar a formação, a inibição competitiva e a saturação de um composto. Quando um grupo éster de uma molécula é enlaçado ao grupo hidroxilo da CD, ele sofre uma hidrólise acelerada; por outro lado, a hidrólise é desacelerada quando o grupo éster da molécula é incluído dentro da cavidade da CD, uma vez que a molécula foi transferida de um meio polar para o ambiente apolar da cavidade da CD (21).

3.3.2. Liberação sustentada com ciclodextrina

A liberação do fármaco nos tecidos alvos deveria ser controlada segundo o propósito terapêutico e as propriedades farmacológicas da molécula ativa. A liberação de um fármaco pode ser: de liberação imediata, liberação prolongada, liberação modificada ou sustentada. Para isto, vários tipos de CD tem sido usados para preparações orais. Por exemplo, as CDs hidrofílicas são usadas para atingir uma liberação imediata do fármaco enquanto as CDs hidrofóbicas para uma liberação prolongada; e para liberação retardada usa-se as 6-O-(carboximetil)-O-etil- β -ciclodextrinas (21, 24).

3.3.3. Interação da ciclodextrina com peptídeos

A maioria das moléculas de peptídeos são muito hidrofílicas e volumosas para serem totalmente incluídas dentro da cavidade da ciclodextrina. Além disso, as restrições topológicas da cadeia principal dos peptídeos podem reduzir a formação de

compostos de inclusão, portanto, sua interação com as CDs pode ser somente local. Sendo assim, somente as cadeias hidrofóbicas laterais dos peptídeos podem ser incluídas e formar o composto de associação com a CDs, tornando possível que as CDs afetem a estrutura tridimensional dos peptídeos ou inibam a sua associação intermolecular, modificando suas propriedades químicas e biológicas (21, 24, 25).

3.4 Biofilmes

Um biofilme bacteriano é uma comunidade de bactérias, organizada dentro de uma matriz polimérica de glicocálix, que está aderida a uma superfície sólida viva ou inerte (13). A matriz polimérica do biofilme representa 80% do volume total e está composta principalmente por exopolissacarídeos, proteínas, sais e material celular. Os lipopolissacarídeos representam o maior componente (50 - 95 %) do biofilme, e sua função principal, é manter a integridade do biofilme e fornecer o ambiente apropriado para o crescimento das bactérias (26, 27).

Os biofilmes permitem o crescimento bacteriano uma vez que protegem as bactérias do ambiente hostil induzido pela ação de peptídeos endógenos, anticorpos e outros agentes antimicrobianos. Assim, por ação de forças de cisalhamento produzidas pelo fluxo de água através do biofilme, vão se formando micro colônias as quais tomam diferentes formas dependendo se as forças de cisalhamento são baixas ou altas (28). Além disso, os biofilmes formam estruturas que contêm canais de água pelos quais os nutrientes e substâncias químicas são transferidas entre as células. Por sua vez, as bactérias dos biofilmes imaturos podem-se desprender deles e voltar para um estado planctônico, multiplicando-se, espalhando-se e colonizando rapidamente os tecidos adjacentes (29). Por isso, as infecções bacterianas crônicas estão associadas à presença de biofilmes nos quais a terapia antibiótica convencional não pode erradicar (13).

3.4.1. Formação do biofilme

O padrão de crescimento dos biofilmes envolve a adesão inicial sobre uma superfície sólida, coagregação e coadesão, comunicação, e a formação e a diferenciação das micro colônias dentro da matriz de exopolissacarídeos até se tornar

em um biofilme maduro (26, 30). A fase da adesão é mediada pela presença de adesinas (lectinas) na superfície da bactéria as quais interagem com receptores complementares dos carboidratos da biopelícula salival. A coagregação resulta da interação entre duas células planctônicas geneticamente diferentes. Esta interação entre as células planctônicas e as células aderidas à superfície é nomeada como coadesão. Durante a adesão e a formação de micro colônias, é iniciada a síntese de exopolissacarídeos da matriz extracelular na qual as bactérias estarão embebidas. Para o crescimento e amadurecimento do biofilme as bactérias interagem e se comunicam entre elas por meio da troca de sinais moleculares (*quorum sensing*) (31), e por meio da troca de informação genética. Assim, o amadurecimento do biofilme ocorre sob a influência do *quorum sensing* o qual, após atingir uma densidade celular crítica, induz a liberação de genes que estimulam a diferenciação das micro colônias em comunidades mais estruturadas que são resistentes aos anticorpos e antibióticos (13, 32). Uma estratégia do biofilme para sobreviver, é a colonização de diferentes locais, portanto, algumas células bacterianas soltam-se do biofilme voltando para o estado planctônico, e posteriormente migram e colonizam locais adjacentes ao biofilme (Figura 3).

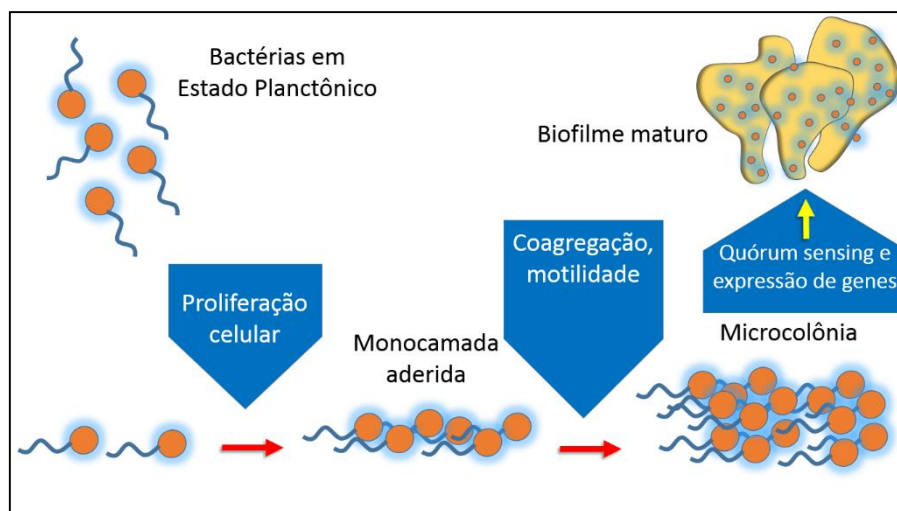


Figura 3. Representação esquemática das fases da formação do biofilme. As bactérias planctônicas colonizam a superfície sólida, se aderem formando uma monocamada até formar micro colônias. As micro colônias sob estímulo de genes, originam a diferenciação (13).

3.4.2. Composição dos biofilmes na doença periodontal

As doenças periodontais são infecções induzidas por bactérias patogênicas que vivem dentro de biofilmes como comunidades organizadas com mecanismos moleculares sofisticados de comunicação os quais, permitem seu crescimento e desenvolvimento. Os biofilmes dentais são caracterizados pela sua capacidade tampão, e por terem micro ambientes heterogêneos dentro da sua estrutura determinados pelos nutrientes, oxigênio e subprodutos metabólicos, os quais regulam as condições de pH, produção de enzimas, e fornecem as condições apropriadas para o crescimento de diferentes espécies bacterianas (33).

Na doença periodontal os biofilmes seguem uma sucessão, a formação do biofilme supra gengival ocorre pelos mecanismos de adesão dos primeiros colonizadores bacterianos da saliva que lhes fornece uma especificidade na ligação à superfície do dente (34). Assim, as bactérias colonizadoras iniciais, como *S. intermedius*, *S. oralis*, *S. mitis* aumentam seu número e proporções em poucas horas após da remoção da placa bacteriana (34). Em seguida, as espécies *Veillonellae* e *Actinomyces* como *A. naeslundii*, *S. gordonii*, *E. corrodens*, *N. mucosa*, *T. forsythia*, *P. gingivalis*, *T. denticola*, e *A. actinomycetemcomitans* colonizam a monocamada e se aderem entre si aos colonizadores primários formando uma micro colônia, e se comportam como pontes para a colonização de outras bactérias (26, 35).

Por sua vez, o biofilme sub gengival composto por bactérias colonizadoras tardias tanto do complexo roxo, tais como *P. gingivalis*, *B. forsythus*, *T. denticola* quanto do complexo verde, como *Capnocytophaga spp*, *E. corrodens*, *A. actinomycetemcomitans*, apresenta um crescimento bacteriano acelerado entre os primeiros dois dias, seguido por um período de latência entre o terceiro e quarto dia e, apresenta um pico de crescimento entre o quarto e sétimo dia. Finalmente, os últimos colonizadores do biofilme subgengival maturo, são bactérias do complexo verde e laranja como *C. gingivalis*, *E. corrodens*, *Fusobacterium* subespécies, *P. gingivalis* e *P. intermedia* (36-38).

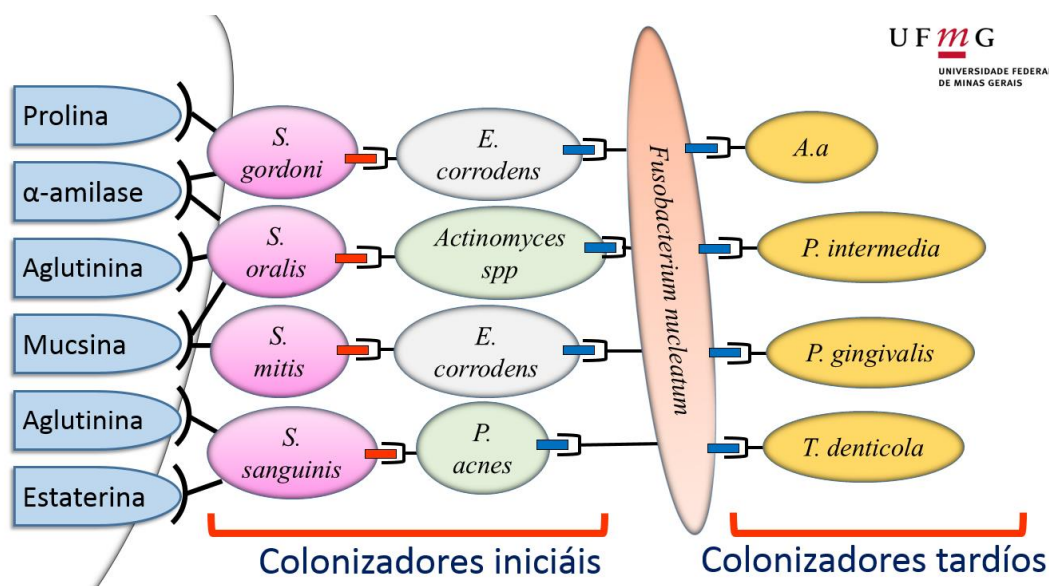


Figura 4. Representação esquemática da sucessão de bactérias colonizando a superfície do dente para formar o biofilme. Os colonizadores iniciais reconhecem os receptores da película salivar (prolina, α-amilase, aglutinina, mucina, estaterina) e se associam com eles. Posteriormente, acontece uma coagregação entre as bactérias colonizadoras iniciais com o *fusobacterium* e com as bactérias colonizadoras tardias. Assim, o *fusobacterium* possui um papel chave na formação do biofilme (27).

Um biofilme maduro pode resistir à atividade de antibióticos e inibir o efeito deles uma vez que as células bacterianas podem produzir enzimas como a β-lactamase, ou enzimas como superóxido dismutase que agem contra os íons livres liberados pelos fagócitos (39, 40). Embora os peptídeos antimicrobianos tenham mostrado atividade sobre bactérias periodontopatógenas, é necessário determinar com precisão suas concentrações ativas bactericidas e inibitórias mínimas, a influência do tempo desses efeitos e conhecer de forma qualitativa a viabilidade/citotoxicidade do peptídeo de forma livre ou associada à ciclodextrina.

3.4.3. Dispositivo de crescimento do Biofilme da Universidade de Calgary

Muitos sistemas *in vitro* tem sido desenvolvidos para a formação, crescimento e avaliação antimicrobiana dos biofilmes. Entre os sistemas amplamente usados para formar biofilmes no laboratório encontram-se: sistemas de banho estacionário (41); sistemas de banho com forças de cisalhamento introduzido (42, 43); fermentadores

de biofilme perfundidos (44); reator anular (45); reator de fluxo por gotejamento (46); reatores de disco rotativo (47); e reatores de tubo para formação do biofilme (48).

Estes modelos possuem vantagens em comum tais como: crescimento do biofilme em altas densidades, maior biomassa do biofilme, e condições de cultura dinâmicas e controladas. No entanto, estes sistemas apresentam dificuldades como: incapacidade de produzir mais de um biofilme por vez sob as mesmas condições; além disso, estes reatores dependem de um fluxo contínuo de grandes volumes de meio de cultura para funcionar e por isso, são mais susceptíveis à contaminação.

Para evitar essas desvantagens, foi desenvolvido o dispositivo de crescimento do biofilme pela Universidade de Calgary que usa o método de crescimento de biofilme sobre pinos, conhecido como o sistema CMEB (Concentração Mínima de Erradicação do Biofilme). Este sistema consiste em um dispositivo formado por uma placa convencional de 96 poços e uma tampa que suporta pinos de poliestireno organizados para encaixar perfeitamente dentro dos poços de qualquer micro placa de 96 poços padrão. A superfície dos pinos está desenhada para permitir a formação e crescimento dos biofilmes na sua superfície sob as mesmas condições, assim, a tampa permite formar 96 biofilmes equivalentes (Figura 5). Por sua vez, os pinos são formados permitindo sua remoção da tampa sem comprometer a esterilidade da placa (42, 49).

Quando comparado o sistema CMEB com os sistemas de crescimento do biofilme diretamente sobre o poço (41), o crescimento dos biofilmes sobre os pinos apresentam vantagens como: facilidade de crescer biofilmes de várias espécies bacterianas (50) e de fungos; facilidade de criar vários biofilmes sob as mesmas condições para facilitar a sua comparação e análise estatística (51); precisa de menor volume de meio; os pinos podem se soltar para serem analisados com microscopia (52), e para fazer contagem da densidade celular do biofilme em cada pino; existe menor probabilidade de contaminação cruzada dentro da placa já que é manipulada dentro de uma capela de fluxo laminar (53).

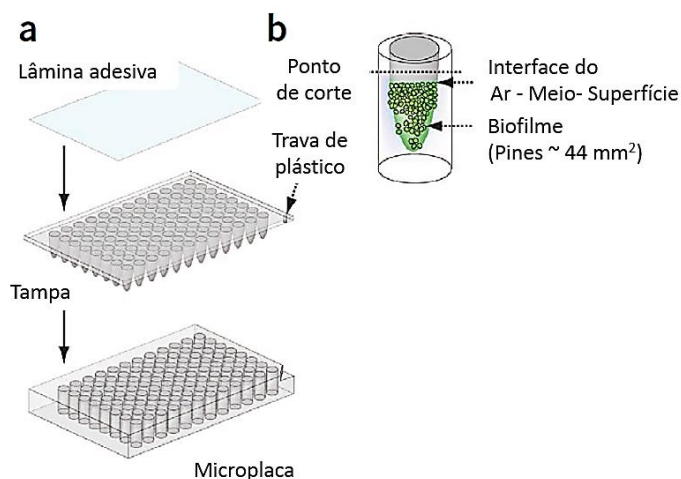


Figura 5. Esquema representando o reator de biofilme sobre pinos usando o dispositivo da Universidade de Calgary ou CMEB (Concentração Mínima de Erradicação do Biofilme). Cada pino possui uma área total de 109 mm^2 e o biofilme que irá se formar sobre ele cobrirá uma superfície de 44 mm^2 . Cada pino foi desenhado com um ponto (break point) onde pode ser assegurado e removido usando um alicate de ponta de agulha.

Adicionalmente, o método CMEB permite testar a susceptibilidade das bactérias tanto em estado planctônico quanto em biofilme, fornecendo medições comparativas em um experimento só: O cálculo da média do número de células bacterianas em cada biofilme formado sobre os pinos da placa com significância estatística; a concentração mínima inibitória (MIC); a concentração bactericida mínima (CBM); e a concentração mínima de erradicação do biofilme (CMEB) (53).

O sistema CMEB fornece outras vantagens para o desenvolvimento de vários testes tais como: permite a avaliação da biomassa do biofilme por meio do tingimento com Cristal Violeta; o estudo da estrutura do biofilme por meio de técnicas de microscopia; mensurar a expressão de genes nos biofilmes por meio de RT-PCR; avaliar a viabilidade celular usando Quantitative PCR e sais de tetrazolium; e avaliar a atividade anti-biofilme de diferentes antimicrobianos (49).

REFERENCIAS GERAIS

3.5 REFERENCIAS GERAIS

1. Bonelli RR, Moreira BM, Picao RC. Antimicrobial resistance among Enterobacteriaceae in South America: History, current dissemination status and associated socioeconomic factors. *Drug Resistance Updates*. 2014;17(1-2):24-36.
2. Fernandez-Lopez S, Kim HS, Choi EC, Delgado M, Granja JR, Khasanov A, et al. Antibacterial agents based on the cyclic D,L-alpha-peptide architecture. *Nature*. 2001;412(6845):452-5.
3. Zasloff M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*. 2002;415(6870):389-95.
4. Tossi A, Sandri L, Giangaspero A. Amphipathic, alpha-helical antimicrobial peptides. *Biopolymers*. 2000;55(1):4-30.
5. Santos DM, Verly RM, Pilo-Veloso D, de Maria M, de Carvalho MAR, Cisalpino PS, et al. LyeTx I, a potent antimicrobial peptide from the venom of the spider *Lycosa erythrognatha*. *Amino Acids*. 2010;39(1):135-44.
6. Murakami T, Niwa M, Tokunaga F, Miyata T, Iwanaga S. Direct virus inactivation of tachyplesin-i and its isopeptides from horseshoe-crab hemocytes. *Chemotherapy*. 1991;37(5):327-34.
7. Bechinger B. Structure and function of membrane-lytic peptides. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 2004;23(3):271-92.
8. Yang L, Weiss TM, Lehrer RI, Huang HW. Crystallization of antimicrobial pores in membranes: Magainin and protegrin. *Biophysical Journal*. 2001;80(2):1029-39.
9. Matsuzaki K. Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes*. 1999;1462(1-2):1-10.

10. Ong PY, Ohtake T, Brandt C, Strickland I, Boguniewicz M, Ganz T, et al. Endogenous antimicrobial peptides and skin infections in atopic dermatitis. *New England Journal of Medicine*. 2002;347(15):1151-60.
11. Consuegra Jessika, de Lima ME, Santos Daniel, Sinisterra Rubén Dario, Cortés Maria Esperanza. Peptides:Beta-ciclodextrin inclusion compounds as highly effective antimicrobial and anti-epithelial proliferation agents. *Journal of Periodontology: Journal of Periodontology*; 2013. p. 1858-68.
12. Rams TE, Degener JE, van Winkelhoff AJ. Antibiotic Resistance in Human Chronic Periodontitis Microbiota. *Journal of Periodontology*. 2014;85(1):160-9.
13. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. *Science*. 1999;284(5418):1318-22.
14. Steinstraesser L, Koehler T, Jacobsen F, Daigeler A, Goertz O, Langer S, et al. Host defense peptides in wound healing. *Molecular Medicine*. 2008;14(7-8):528-37.
15. Westerhoff HV, Juretic D, Hendler RW, Zasloff M. Magainins and the disruption of membrane-linked free-energy transduction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1989;86(17):6597-601.
16. Alves CS, Melo MN, Franquelim HG, Ferre R, Planas M, Feliu L, et al. Escherichia coli Cell Surface Perturbation and Disruption Induced by Antimicrobial Peptides BP100 and pepR. *Journal of Biological Chemistry*. 2010;285(36):27536-44.
17. Kragol G, Lovas S, Varadi G, Condie BA, Hoffmann R, Otvos L. The antibacterial peptide pyrrolicin inhibits the ATPase actions of DnaK and prevents chaperone-assisted protein folding. *Biochemistry*. 2001;40(10):3016-26.
18. Yeaman MR, Yount NY. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacological Reviews*. 2003;55(1):27-55.

19. Shai Y. Mode of action of membrane active antimicrobial peptides. *Biopolymers*. 2002;66(4):236-48.
20. Jonckheere AI, Smeitink JAM, Rodenburg RJT. Mitochondrial ATP synthase: architecture, function and pathology. *Journal of Inherited Metabolic Disease*. 2012;35(2):211-25.
21. Uekama K, Hirayama F, Irie T. Cyclodextrin drug carrier systems. *Chemical Reviews*. 1998;98(5):2045-76.
22. Loftsson T, Masson M, Brewster ME. Self-association of cyclodextrins and cyclodextrin complexes. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2004;93(5):1091-9.
23. Teixeira KIR, Araujo PV, Neves BRA, Mahecha GAB, Sinisterra RD, Cortes ME. Ultrastructural changes in bacterial membranes induced by nano-assemblies beta-cyclodextrin chlorhexidine: SEM, AFM, and TEM evaluation. *Pharmaceutical Development and Technology*. 2013;18(3):600-8.
24. Irie T, Uekama K. Cyclodextrins in peptide and protein delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 1999;36(1):101-23.
25. Aachmann FL, Otzen DE, Larsen KL, Wimmer R. Structural background of cyclodextrin-protein interactions. *Protein Engineering*. 2003;16(12):905-12.
26. Kolenbrander PE, Palmer RJ, Jr., Rickard AH, Jakubovics NS, Chalmers NI, Diaz PI. Bacterial interactions and successions during plaque development. *Periodontology 2000*. 2006;42:47-79.
27. Kolenbrander PE, Palmer RJ, Jr., Periasamy S, Jakubovics NS. Oral multispecies biofilm development and the key role of cell-cell distance. *Nature Reviews Microbiology*. 2010;8(7):471-80.
28. Foster JS, Kolenbrander PE. Development of a multispecies oral bacterial community in a saliva-conditioned flow cell. *Applied and Environmental Microbiology*. 2004;70(7):4340-8.

29. Stewart PS, Costerton JW. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet*. 2001;358(9276):135-8.
30. Busscher HJ, van der Mei HC. Physico-chemical interactions in initial microbial adhesion and relevance for biofilm formation. *Adv Dent Res*. 1997;11(1):24-32.
31. Davies DG, Parsek MR, Pearson JP, Iglewski BH, Costerton JW, Greenberg EP. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science*. 1998;280(5361):295-8.
32. Burmolle M, Webb JS, Rao D, Hansen LH, Sorensen SJ, Kjelleberg S. Enhanced biofilm formation and increased resistance to antimicrobial agents and bacterial invasion are caused by synergistic interactions in multispecies biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*. 2006;72(6):3916-23.
33. Lewis K. Riddle of biofilm resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2001;45(4):999-1007.
34. Li J, Helmerhorst EJ, Leone CW, Troxler RF, Yaskell T, Haffajee AD, et al. Identification of early microbial colonizers in human dental biofilm. *Journal of Applied Microbiology*. 2004;97(6):1311-8.
35. Teles R, Teles F, Frias-Lopez J, Paster B, Haffajee A. Lessons learned and unlearned in periodontal microbiology. *Periodontology 2000*. 2013;62:95-162.
36. Uzel NG, Teles FR, Teles RP, Song XQ, Torresyap G, Socransky SS, et al. Microbial shifts during dental biofilm re-development in the absence of oral hygiene in periodontal health and disease. *Journal of Clinical Periodontology*. 2011;38(7):612-20.
37. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL. Microbial complexes in subgingival plaque. *Journal of Clinical Periodontology*. 1998;25(2):134-44.

38. Haffajee AD, Socransky SS, Patel MR, Song X. Microbial complexes in supragingival plaque. *Oral Microbiology and Immunology*. 2008;23(3):196-205.
39. Donlan RM. Role of biofilms in antimicrobial resistance. *Asaio Journal*. 2000;46(6):S47-S52.
40. Socransky SS, Haffajee AD. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontology 2000*. 2002;28:12-55.
41. O'Toole GA, Kolter R. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Molecular Microbiology*. 1998;28(3):449-61.
42. Ceri H, Olson M, Morck D, Storey D, Read R, Buret A, et al. The MBEC assay system: Multiple equivalent biofilms for antibiotic and biocide susceptibility testing. *Microbial Growth in Biofilms, Pt B*. 2001;337:377-85.
43. Ceri H, Olson ME, Stremick C, Read RR, Morck D, Buret A. The Calgary Biofilm Device: New technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. *Journal of Clinical Microbiology*. 1999;37(6):1771-6.
44. Allison D, Maira-Litran T, Gilbert P. Perfused biofilm fermenters. *Biofilms*. 1999;310:232-48.
45. Camper AK, Jones WL, Hayes JT. Effect of growth conditions and substratum composition on the persistence of coliforms in mixed-population biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*. 1996;62(11):4014-8.
46. Kharazmi A, Giwercman B, Hoiby N. Robbins device in biofilm research. *Biofilms*. 1999;310:207-15.
47. Zelver N, Hamilton M, Pitts B, Goeres D, Walker D, Sturman P, et al. Measuring antimicrobial effects on biofilm bacteria: From laboratory to field. *Biofilms*. 1999;310:608-28.

48. Donlan RM, Priede JA, Heyes CD, Sanii L, Murga R, Edmonds P, et al. Model system for growing and quantifying *Streptococcus pneumoniae* biofilms in situ and in real time. *Applied and Environmental Microbiology*. 2004;70(8):4980-8.
49. Harrison JJ, Stremick CA, Turner RJ, Allan ND, Olson ME, Ceri H. Microtiter susceptibility testing of microbes growing on peg lids: a miniaturized biofilm model for high-throughput screening. *Nature Protocols*. 2010;5(7):1236-54.
50. Soares GMS, Teles F, Starr JR, Feres M, Patel M, Martin L, et al. Effects of Azithromycin, Metronidazole, Amoxicillin, and Metronidazole plus Amoxicillin on an In Vitro Polymicrobial Subgingival Biofilm Model. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2015;59(5):2791-8.
51. Goeres DM, Loetterle LR, Hamilton MA, Murga R, Kirby DW, Donlan RM. Statistical assessment of a laboratory method for growing biofilms. *Microbiology-Sgm*.2005;151:757-62.
52. Harrison JJ, Ceri H, Yerly J, Stremick CA, Hu Y, Martinuzzi R, et al. The use of microscopy and three-dimensional visualization to evaluate the structure of microbial biofilms cultivated in the Calgary Biofilm Device. *Biological Procedures Online*. 2006;8:194-215.
53. Harrison JJ, Turner RJ, Ceri H. High-throughput metal susceptibility testing of microbial biofilms. *Bmc Microbiology*. 2005;5.

ARTIGO

ARTIGO

Antimicrobial effect of LyeTxI peptide and LyeTxI/ β CD association compound against biofilms of periodontopathogens

Edison Andrés Cruz Olivo,* Maria Elena de Lima,† Vera Lúcia dos Santos,‡
Rubén Dario Sinisterra,§ Maria Esperanza Cortés ||

* Department of Periodontology, Faculty of Dentistry, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

† Department of Biochemistry and Immunology, Institute of Biological Sciences, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

‡ Department of Microbiology, Institute of Biological Sciences, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

§ Department of Inorganic Chemistry, Faculty of Chemistry, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

|| Department of Restorative Dentistry, Faculty of Dentistry, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

Corresponding author:

Prof. Maria Esperanza Cortés, Av. Antônio Carlos 6627, Faculty of Dentistry, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte - MG, 31270-901, Brazil Fax: +55-31 3409-2430; e-mail: mecortes@ufmg.br

Word count (4000), number of Figures and Tables (6), references (38).

Running title: Antimicrobial peptides and periodontal biofilms

Artigo sometido para publicação no periódico *Journal of Periodontology*

(Fator de impacto: 2,706, Qualis CAPES: A1)

ABSTRACT

Background: Antimicrobial peptides (AMPs) have shown rapid and potent effect against planktonic bacteria. However, control of biofilms is a challenge even for AMPs. We aimed to determine the antimicrobial activity of synthetic peptide LyeTxI and the association compound LyeTxI/ β CD against an in vitro multispecies biofilm.

Methods: Multispecies biofilms were grown on pegs using the Calgary Biofilm Device (CBD). Morphology of biofilms were studied by Scanning Electron Microscopy (SEM) at 2, 5 and 10 days. Sensibility to LyeTxI and LyeTxI/ β CD was determined for Gram-positive and Gram-negative periodontopathogens. Killing kinetics assays were performed at MICs values for all tested strains. The minimal biofilm eradication concentration (MBEC) was determined for 2-day and 4-day multispecies biofilms. Metabolic activity of biofilms was determined by fluorometry study.

Results: Biofilms showed a reproducible cell density on pegs of the CBD. LyeTxI and LyeTxI/ β CD were active against all strains tested at concentrations $\leq 62.5 \mu\text{g/mL}$. Kinetic assays showed a rapid bactericidal effect of LyeTxI against all periodontopathogens. Minimal biofilm eradication concentration of LyeTxI against multispecies 2-day biofilms was twofold higher than the MIC value of shed cells from biofilms. LyeTxI was able to reduce in 90% the multispecies 2-day metabolic activity. Multispecies 4-day biofilms were tolerant to all agents tested.

Conclusion: LyeTxI and LyeTxI/ β CD are active against Gram-positive and Gram-negative periodontopathogens showing a rapid bactericidal effect. In addition, 2-day multispecies biofilms were sensitive to LyeTxI and LyeTxI/ β CD at twofold the MIC values.

Key Words

LyeTxI; antimicrobial cationic peptides; periodontal bacteria; biofilms; periodontitis; cyclodextrins.

INTRODUCTION

Periodontitis is an infection of the periodontium caused by a dynamic interaction between periodontal pathogenic bacteria, the environment and a susceptible host. The bacterial challenge induces an inflammatory response that results in destruction of connective tissue, alveolar bone and apical migration of epithelial attachment onto the root surface ^{1, 2}. In addition, bacteria express virulence factors such as fimbriae, adhesins, specific proteases and leukotoxins that host defense cannot arrest, thus, bacteria can spread, colonize and grow ^{1, 3}.

In addition, periodontal pathogenic bacteria lives in microcolonies as organized communities within the biofilm. In fact, biofilm provides protection against toxic substances from the environment ⁴. Periodontal bacterial biofilms are a structured community of bacterial cells enclosed in a self-produced polymeric matrix adhered to dental surface that induces a prolonged inflammatory response and tissue destruction seen in periodontitis. In addition, biofilm cells release antigens stimulating the production of antibodies and chemotaxis of phagocytes. However, neither the antibodies nor the phagocytes can kill bacteria within biofilms, because enzymes released by phagocytes cannot infiltrate the glycocalyx matrix; instead, they damage the connective tissue and bone surrounded. Furthermore, cells shed from the biofilm colonize neighbor tissues inducing the regrowth of microcolonies and thus, prolonging the bacterial infection ⁴.

Conventional treatment of periodontitis is the disruption of biofilm by means of scaling and root planning⁵. In addition, mechanical therapy along with antibiotics as adjunctive therapy can control recolonization by periodontal pathogens ^{6, 7}. However, although antibiotic therapy reduces the number of planktonic bacteria it cannot eradicate biofilm cells. The exopolysaccharide matrix of biofilm protects sessile

bacteria against antimicrobial agent by delaying its diffusion into the full depth of the biofilm⁴. This explains why periodontal pathogens are resistant to amoxicillin, clindamycin, doxycycline, metronidazole, and the combination of amoxicillin plus metronidazole⁸. These facts encourage the implementation of antimicrobial peptides (AMPs) as a strategy to control bacterial infection.

Antimicrobial peptides (AMPs) are molecules composed by amino acids that participate in innate immunity⁹. AMPs have been synthesized and used in antimicrobial therapy exhibiting a wide spectrum against bacteria, fungus¹⁰ and virus¹¹. Moreover, previous studies using natural and synthetic AMPs have shown activity against bacterial biofilms^{10,12}.

Among synthetic AMPs, LyeTxI is a cationic antimicrobial peptide isolated from the venom of spider *Lycosa erythognatha* that have shown antibacterial activity against *S. aureus* and *E. coli*¹³. A previous study showed that LyeTxI is active against oral pathogens such as *F. nucleatum*, *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans* and is capable to change the γ -potential of bacterial surface (surface charge) thus, altering its capacity of co-aggregation¹⁴. When LyeTxI was included into β -cyclodextrin (β CD), not only its membrane permeability, stability and solubility improved, but also its antibacterial activity against Gram negative periodontopathogens was higher than the free peptide¹⁴. Nevertheless, biofilm cells also express passive and adaptive resistant mechanisms against AMPs making difficult to eradicate and thus bacterial infection persists¹⁵.

To the best of our knowledge, the antibacterial activity of LyeTxI and LyeTxI/ β CD against biofilms of periodontal pathogenic bacteria is unknown. Therefore, we characterize the association between LyeTxI and β -cyclodextrin by Infrared

Spectroscopy (IR). Then, to verify biofilm morphology formed on pegs, we examined biofilms by Scanning Electron Microscopy. In addition, we determined the antibacterial activity of LyeTxI and LyeTxI/ β CD against Gram-positive and Gram-negative periodontopathogens and against multispecies biofilm. Thus, the aim of this research was to assess the antibacterial activity of LyeTxI and LyeTx I/ β CD on planktonic and biofilms of periodontal pathogenic bacteria.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains

Strains were kindly provided by the Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ; Manguinhos, RJ, Brazil) and were used for the antimicrobial assays: *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), *Streptococcus oralis* (ATCC 10557), *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556), *Lactobacillus acidophilus* (ATCC 4356), *Lactobacillus casei* (ATCC 4336), *Eikenella corrodens* (ATCC 23834), *Fusobacterium nucleatum* (ATCC 25586), *Prevotella intermedia* (ATCC 49046), *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 23834) and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (ATCC 29522).

Media and culture conditions

Sub-cultures of *S. mutans*, *S. oralis*, *S. sanguinis* were cultured on Tryptic Soy Agar (TSA) with 1% hemin and 2% horse blood while *L. acidophilus* and *L. casei* were cultured on Brain Heart Infusion (BHI) agar, and *A. actinomycetemcomitans*, *P. intermedia* were cultivated on BHI agar with 1% hemin under anaerobic conditions (90% nitrogen, 10% CO₂). *P. gingivalis* and *F. nucleatum* were cultured on TSA with 1% hemin, 5% menadione and 2% horse blood under anaerobic conditions.

To standardize the bacterial cell suspension for susceptibility assays against planktonic and sessile (biofilm) cells, colonies were suspended into BHI broth supplemented with 1% hemin, and resuspended in 0.9% sterile saline to reach an OD₆₀₀ value of 0.08 (equivalent 1 x 10⁸ cells/mL). This standardized inoculum was diluted 1:10 in BHI broth and the inoculum size was confirmed by colony counting.

Planktonic growth curve

We studied the bacterial growth to identify the exponential phase of each strain. Briefly, suspension of each strain was adjusted to yield an OD₆₀₀ of 0.01 to obtain the baseline values. Aerobic and anaerobic bacteria were cultured on BHI broth separately in aerobic and anaerobic conditions respectively on orbital shaker. Each hour, aliquots 2000 µL were analyzed by OD₆₀₀ to check the bacterial growth through 15 hours. In addition, aliquots (20 µL) were serially diluted and plated for colony counting.

Multispecies biofilm formation

To standardize the inoculum, the optical density OD₆₀₀ nm was adjusted to 0.1 corresponding to 0.5 McFarland Standard (1.5×10^8 cells/mL) for each species. Then, each suspension was diluted to 10^6 cells/mL and aliquots of 100 µL from each species were mixed to produce a final multispecies inoculum. Twenty-two milliliters of BHI broth with 1% hemin and 2% horse blood was added to yield a final volume of 23 mL of inoculum. The multispecies biofilm was cultured with modifications using the Calgary Biofilm Device (CBD) as previously described^{16, 17} (Appendix 1). Briefly, each well of 96-microtiter plate was inoculated with 150 µL of the standardized inoculum and cultivate under anaerobic conditions on orbital shaker. In presence of shear, planktonic bacteria adhere to the peg surface and form biofilms. After two days of incubation, the peg lids were transferred daily to new 96-well microtiter plate with fresh BHI broth with 1% hemin, 2% horse blood until yield 7-day biofilms on each peg of the lid.

Biofilm growth curve

To identify the ability of each strain to form biofilm on CBD, and the time required to yield the exponential phase of each mono-species biofilm, we cultured the bacteria in the CBD over different times (24, 48 72 h and 4, 5 days) following the protocol described above. Growth curves were constructed by plotting the Log CFU/mL vs time.

Antimicrobial peptide compound preparation

Antimicrobial peptide LyeTxI (IWLTKALKFLGKNLGKHLALKQQLAKL) was synthesized and purified by reversed phase High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) as previously reported¹³. To prepare the association compound, LyeTxI and β CD were dissolved separately in ultrapure water at 1:1 molar ratio. The aqueous solution of LyeTxI and β CD was mixed and stirred for 4 h. Then, this mixed solution was frozen in liquid nitrogen and lyophilized (Savant Moduly D-Freeze Dried, Thermo Electron Corp., Waltham, MA, USA) for 48 h to obtain a solid compound.

Characterization of the association compound LyeTxI/ β CD

The samples of the association compound LyeTxI/ β CD were prepared in KBr tablets and characterized by Infrared Spectroscopy (IR). The spectra were captured from 4000-400 cm^{-1} region using a Perkin Elmer spectrum GX (Thermo Fisher Scientific). Then, the stretching vibrations of functional groups of both LyeTx I/ β CD and free β CD were compared.

Bacterial susceptibility testing

Minimal Inhibitory Concentration and Minimal Bactericidal Concentration Assays

Minimal Inhibitory Concentration (MIC) was determined using the microdilution method according to the CLSI guidelines^{17,21}. Briefly, serial twofold dilutions (125-0.06 $\mu\text{g}/\text{mL}$) of LyeTxI and the association compound LyeTxI/ β CD were prepared in Mili-Q water and pipetted in a 96-well U-bottom polypropylene microtiter plates (Costar, cat. No. 3790, Corning incorporated, NY, USA). Each well was inoculated with 50 μL of the standardized inoculum to yield a final test suspension of 1×10^5 cells/mL. After incubation at 37 °C under appropriate conditions, the MIC was defined as the lowest concentration of the antibacterial agent that prevented visible growth of the microorganism. Minimal Bactericidal Concentration (MBC) was determined by plating the wells without turbidity in BHI agar. After 24 hours of growth, MBC was defined as the lowest concentration that did not permit visible growth on the surface of

the agar. We used 0.12% chlorhexidine (CHX) as positive control. All MIC and MBC assays were performed in triplicate.

Planktonic metabolic activity

The planktonic metabolic activity was determined by fluorometry study using resazurin (7-hydroxy-3H-phenoxazin-3 one-10-oxide) as an indirect measure of bacterial metabolic activity because is proportional to the number of metabolically active cells. After 24 h of exposure to antibacterial agents tested, 20 μ L of resazurin solution were pipetted in each well. Fluorescence intensity (λ_{ex} 570 nm/ λ_{em} 590 nm) was measured after 20 minutes of incubation in darkness at 37°C^{20, 21}.

Time-Kill Kinetic Assay

Time-Kill kinetic assay was assessed against periodontopathogens using a broth microdilution method. Briefly, 50 μ L of the standardized inoculum of each strain (1×10^5 cells/mL) was exposed to LyeTxI at the corresponding MIC values during 15, 30, 60 minutes, and 2, 6, 12, and 14 hours, at 37°C under appropriated aerobic and anaerobic conditions. Killing curves were constructed by plotting the Log_{10} CFU/mL⁻⁵ vs time over 24 hours.

Minimal biofilm eradication concentration (MBEC) assay

We tested the antibacterial activity of LyeTxI and the association compound LyeTxI/ β CD against periodontopathogenic multispecies biofilm after 2 and 4 days of incubation. Briefly, to remove non-adherent bacteria from the pegs, biofilms were washed two times in 200 μ L of rinse solution (1% phosphate-buffered saline)²². Then, in a new 96-well plate (challenge plate), pegs were exposed to serial twofold dilutions (250-0.12 μ g/mL) of LyeTxI and the compound LyeTxI/ β CD, and were incubated for 24 hours. Chlorhexidine (Periogard, 0.12% chlorhexidine gluconate) was used as positive control (Figure 1). Each experiment was tested in triplicate. The minimal biofilm eradication concentration (MBEC) was defined as the minimal concentration of LyeTxI and LyeTxI/ β CD required to eradicate the biofilm after 16 hours of incubation.

In addition, cells shed from the multispecies biofilm will grow on the challenge plate medium, therefore, the MIC values of LyeTxI and LyeTxI/ β CD against shed cells from biofilms were determined.

Biofilm metabolic activity

The biofilm metabolic activity was determined by fluorometry study using resazurin (7-hydroxy-3H-phenoxazin-3 one-10-oxide) as an indirect measure of bacterial metabolic activity because it is proportional to the number of metabolically active cells. After 24 h of exposure to antibacterial agents tested, biofilms were transferred to a 96-well microtiter plate with 180 μ L of BHI broth, and then they were sonicated to recover the shed cells from biofilm. Next, 20 μ L of resazurin solution were pipetted in each well. Fluorescence intensity (λ_{ex} 570 nm/ λ_{em} 590 nm) was measured after 20 minutes of incubation in darkness at 37°C^{20, 21}.

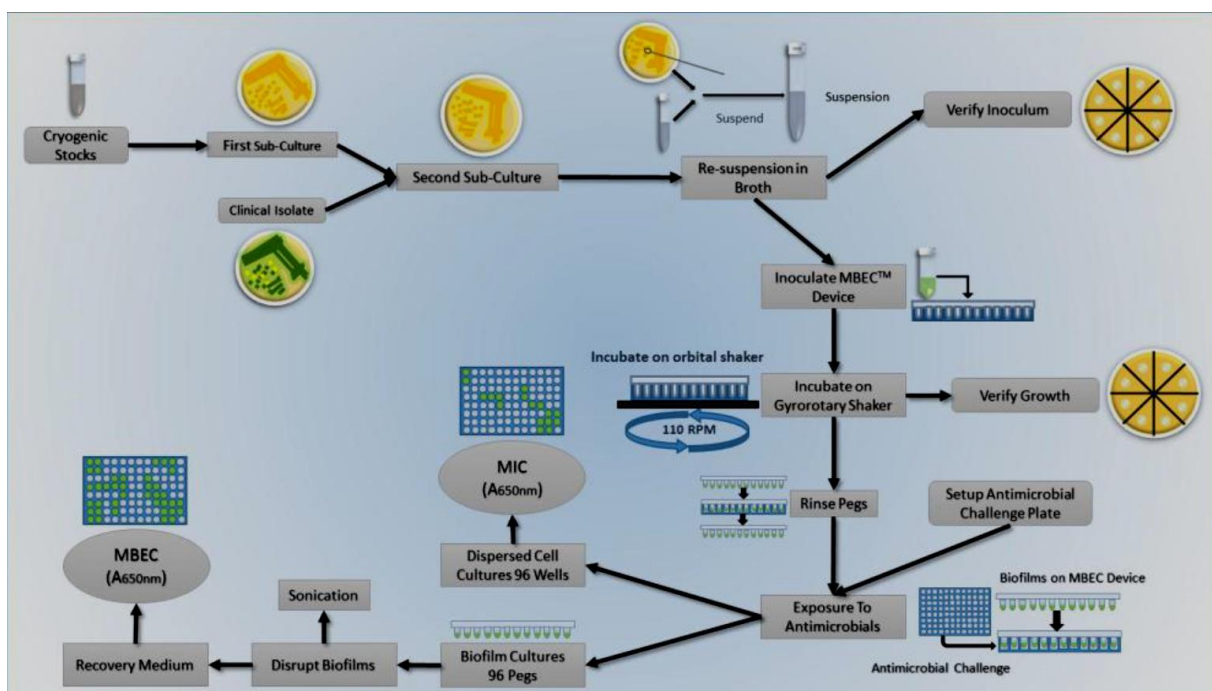


Figure 1. Methodology used for biofilm growth on the Calgary Biofilm Device.

Scanning Electron Microscopy (SEM)

Biofilms formed in different times (2, 5, 10 days) were examined by SEM before and after exposure to LyeTxI and LyeTxI/ β CD. Briefly, samples were fixed with 2.5%

glutaraldehyde in 0.15 M sodium cacodylate buffer (pH 7.4) for 16 h. Next, samples were allowed to air-dry and then post-fixed in 1% osmium tetroxide, dehydrated through a graded ethanol series (50, 70, 80, 95, and 100%), dried with hexamethyldisilazane, fixed on steel stubs, sputter coated with a mixture of gold/palladium (Polaron E5100), and imaged using a Quanta 3D FEG electron microscope at 5 KV.

Statistical analysis

All experiments were performed in triplicate and in two independent experiments. Statistical significance of differences was calculated by ANOVA-test followed by Tukey's multiple comparison post-test using GraphPad Prism version 4.00 for Windows (GraphPad Software, San Diego, California, USA). A *P*-value < 0.05 was considered as statistically significant.

RESULTS

Characterization of association compound by Infrared Spectroscopy (IR)

The infrared spectra are in Figure 1 of LyeTxI/ β CD and β CD measured at 4000 - 400 cm^{-1} regions. The spectra of the association compound depicts at the 3410 cm^{-1} region the absorption band of O-H stretching vibrations, and at the 2960 cm^{-1} region the absorption band of C-H stretching vibrations. Those bands were equally found in the spectra of free β CD, thus confirming the presence of the β CD in the association compound. In addition, we found differences between band shapes of the association compound and β CD observed at 1700-1200 cm^{-1} region. In fact a decrease of functional group C-H aliphatic stretching vibrations suggest an interaction between β CD and LyeTxI. Moreover, bands perceived at 1000-1200 cm^{-1} region are related with C-O-C and C-O-H stretching vibrations of the β CD respectively. Appendix 2 depicts the IR bands of stretching region (4000-400 cm^{-1}).

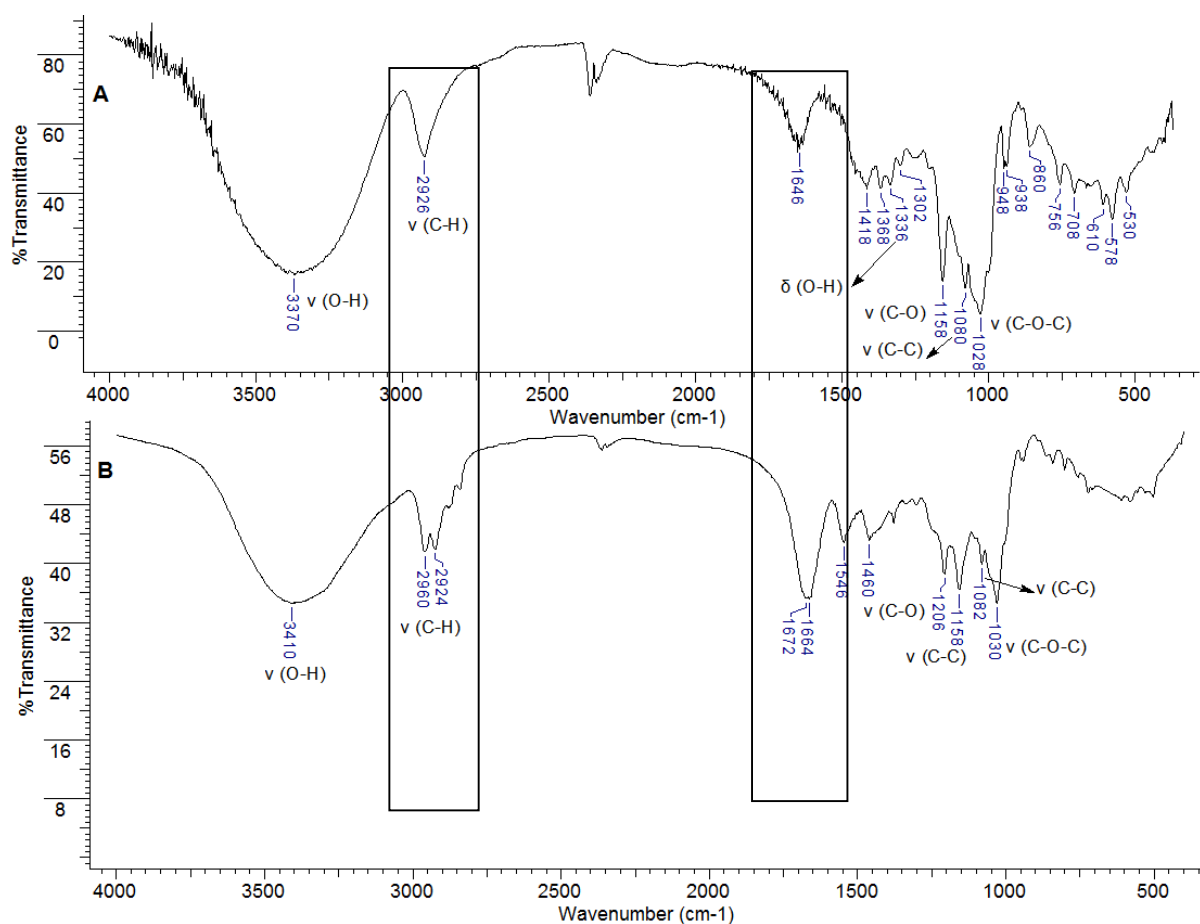


Figure 2. IR spectra of the stretching region (4000-400 cm^{-1}) in KBr pellet of LyeTxI/ β CD association compound. A) Spectra of free β -cyclodextrin; B) spectra of association compound LyeTx I/ β -cyclodextrin.

Planktonic growth curve

Figure 3 represent the growth curve of *S. mutans*, *S. oralis*, *S. sanguinis*, *L. acidophilus*, *L. casei*, *F. nucleatum*, *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, *P. intermedia*, *E. corrodens* expressed in terms of OD_{600} values and Log_{10} UFC mL^{-6} . Planktonic bacteria showed a standard growth curve along 15 hours of growth. All bacterial strains yield the stationary phase after 4 hours of incubation. *S. oralis*, *S. sanguinis*, *L. acidophilus*, *L. casei* yield the exponential phase after 11 h of culture with $7.4 (\pm 2.6) \text{Log}_{10} \text{UFC mL}^{-1}$ while *S. mutans*, *F. nucleatum*, *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, *P. intermedia*, *E. corrodens* after 7 hours of culture. The stationary phase was maintained over 7 hours.

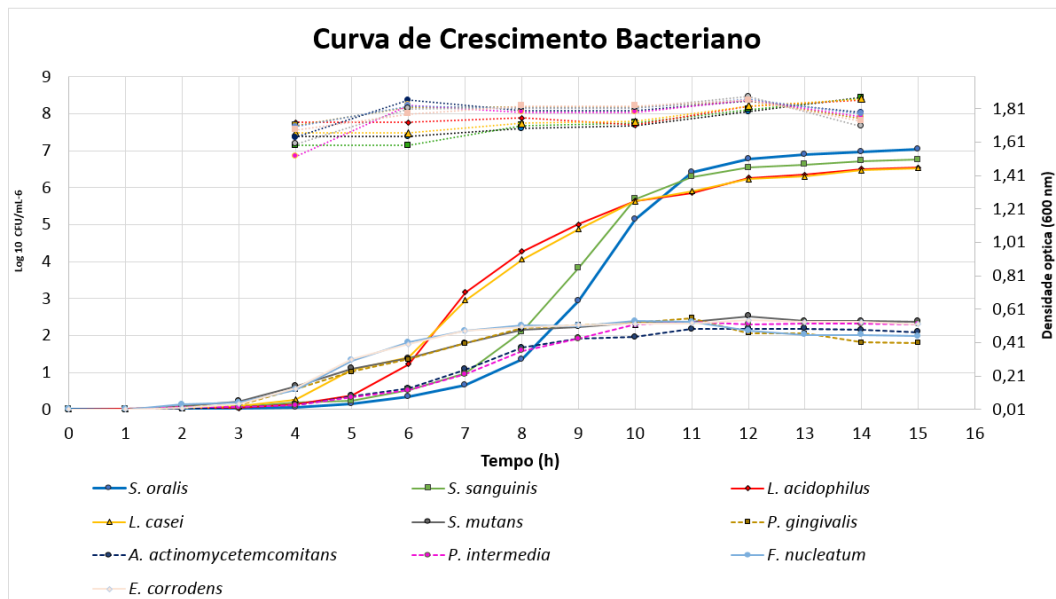


Figure 3. Bacterial growth curve of all strains cultured in Brain Heart Infusion broth based on values obtained from the optical density and the \log_{10} of the number of viable cells per mL over 15 hours of incubation at 37°C.

Biofilm growth curve

Figure 4 and Table 1 describes the biofilm growth curve of *S. mutans*, *S. oralis*, *S. sanguinis*, *L. acidophilus*, *L. casei*, *F. nucleatum*, *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, *P. intermedia*, *E. corrodens* expressed in terms of Log_{10} CFU peg^{-1} . All bacterial strains formed individual biofilm along 148 hours of incubation. In fact, they started the exponential phase in the firsts 24 hours, except for *S. oralis* that began exponential phase after 48 hours. The stationary phase was identified after 48 hours in almost all bacterial strains. Biofilms of *S. mutans*, *S. sanguinis*, *E. corrodens*, *L. acidophilus*, *L. casei* and *P. gingivalis* grown with mean density of $6.0 \pm 0.3 \text{ Log}_{10}$ CFU peg^{-1} , while *F. nucleatum* and *P. intermedia* grown to an overall mean density of $7.0 \pm 0.05 \text{ Log}_{10}$ CFU peg^{-1} in BHI broth supplemented with 1% hemin and 2% blood horse. This corresponded to 48 hours of incubation at 35°C under anaerobic conditions (90% nitrogen and 10% CO_2).

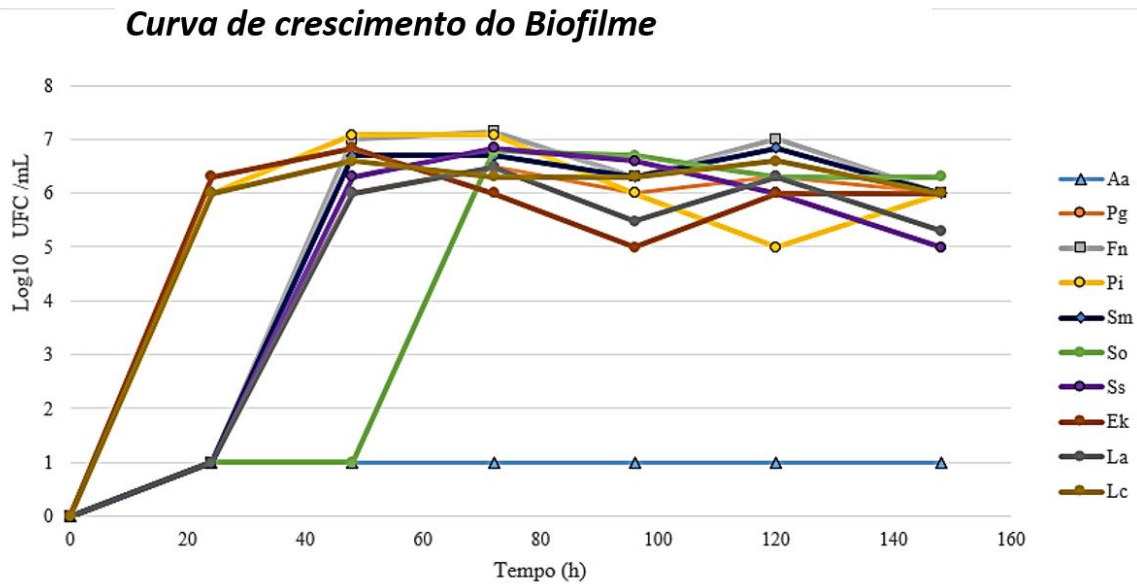


Figure 4. Monospecies biofilm growth curve expressed in terms of Log_{10} CFU peg^{-1} along 160 hours, of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa), *Porphyromonas gingivalis* (Pg), *Fusobacterium nucleatum* (Fn), *Prevotella intermedia* (Pi), *Streptococcus mutans* (Sm), *Streptococcus oralis* (So), *Streptococcus sanguinis* (Ss), *Eikenella corrodens* (Ek), *Lactobacillus acidophilus* (La) and *Lactobacillus casei* (Lc) incubated in the Calgary Biofilm Device.

Table 1. Log_{10} CFU peg^{-1} from monospecies biofilms of periodontal pathogens along 160 hours of incubation in the Calgary Biofilm Device.

Bacterial Strains	Time (hours)						
	0	24	48	72	96	120	148
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	0	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
<i>P. gingivalis</i>	0	1.00	6.00	6.47	6.00	6.30	6.00
<i>F. nucleatum</i>	0	1.00	7.00	7.14	6.30	7.00	6.00
<i>P. intermedia</i>	0	6	7.07	7.07	6.00	5.00	6.00
<i>S. mutans</i>	0	1.00	6.69	6.69	6.30	6.84	6.00
<i>S. oralis</i>	0	1.00	1.00	6.77	6.69	6.30	6.30
<i>S. sanguinis</i>	0	1.00	6.30	6.84	6.60	6.00	5.00
<i>E. corrodens</i>	0	6.30	6.84	6.00	5.00	6.00	6.00
<i>L. acidophilus</i>	0	1.00	6.00	6.47	5.47	6.30	5.30
<i>L. casei</i>	0	6.00	6.60	6.30	6.30	6.60	6.00

Scanning Electron Microscopy

We examined *in situ* the multispecies biofilms growth into the CBD at different times (2, 5, 10 days) using SEM. After 2 days of culture, SEM microphotographs showed surface adherent bacteria growing as a thin layer and mounds on pegs. Most of the cells were isolated and in some stage of cell division. The layer depicted a homogeneous granular appearance (Figure 5). After 5 days of growth, the number of bacteria increased significantly and thus, the multispecies biofilm revealed a more complex arrangement with cells morphology related to *coccus* and *bacillus* strains. Biofilms were composed by multilayered microcolonies encased in extracellular polysaccharide that connected the cells with each other and to the peg surface. These layers were estimated to be up to 10 μm in height in some areas. (Figures 6). Microphotographs of 10-day biofilms showed a differentiated mature biofilm composed by layers of cells entrapped in a dense polymeric matrix. (Figure 7).

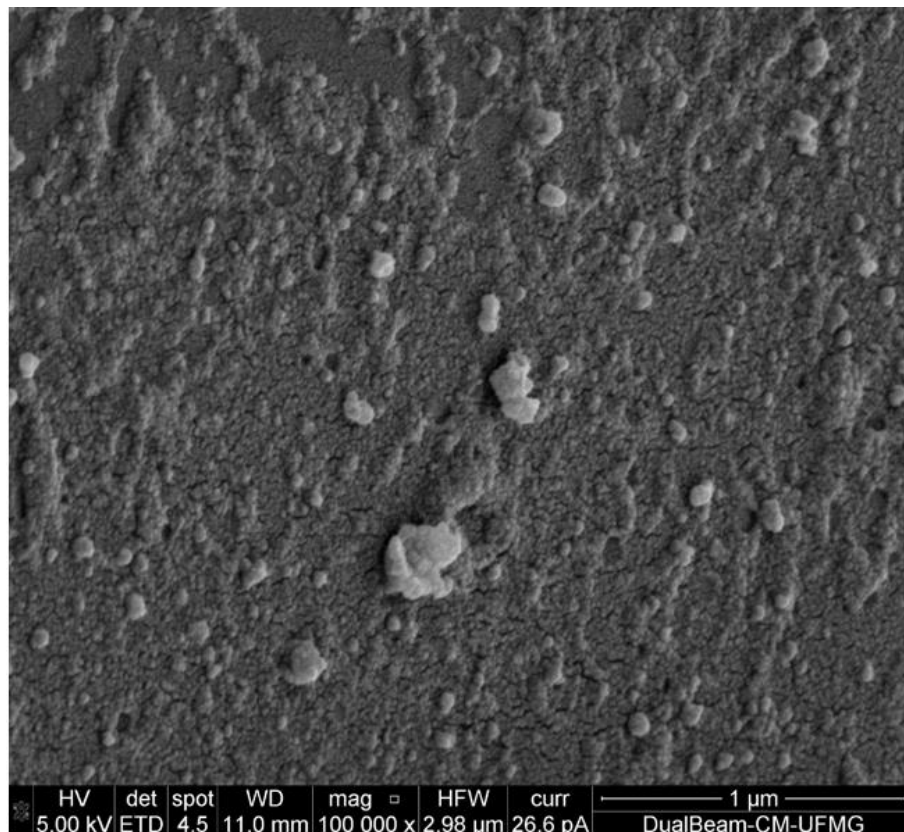


Figure 5. Scanning electron photomicrograph of multispecies biofilm formed on pegs from the Calgary Biofilm Device after 2 days of incubation in BHI broth. Adherent bacteria forming a thin layer on peg surface. Cells with different morphology but predominantly coccus (magnification 100000 x).

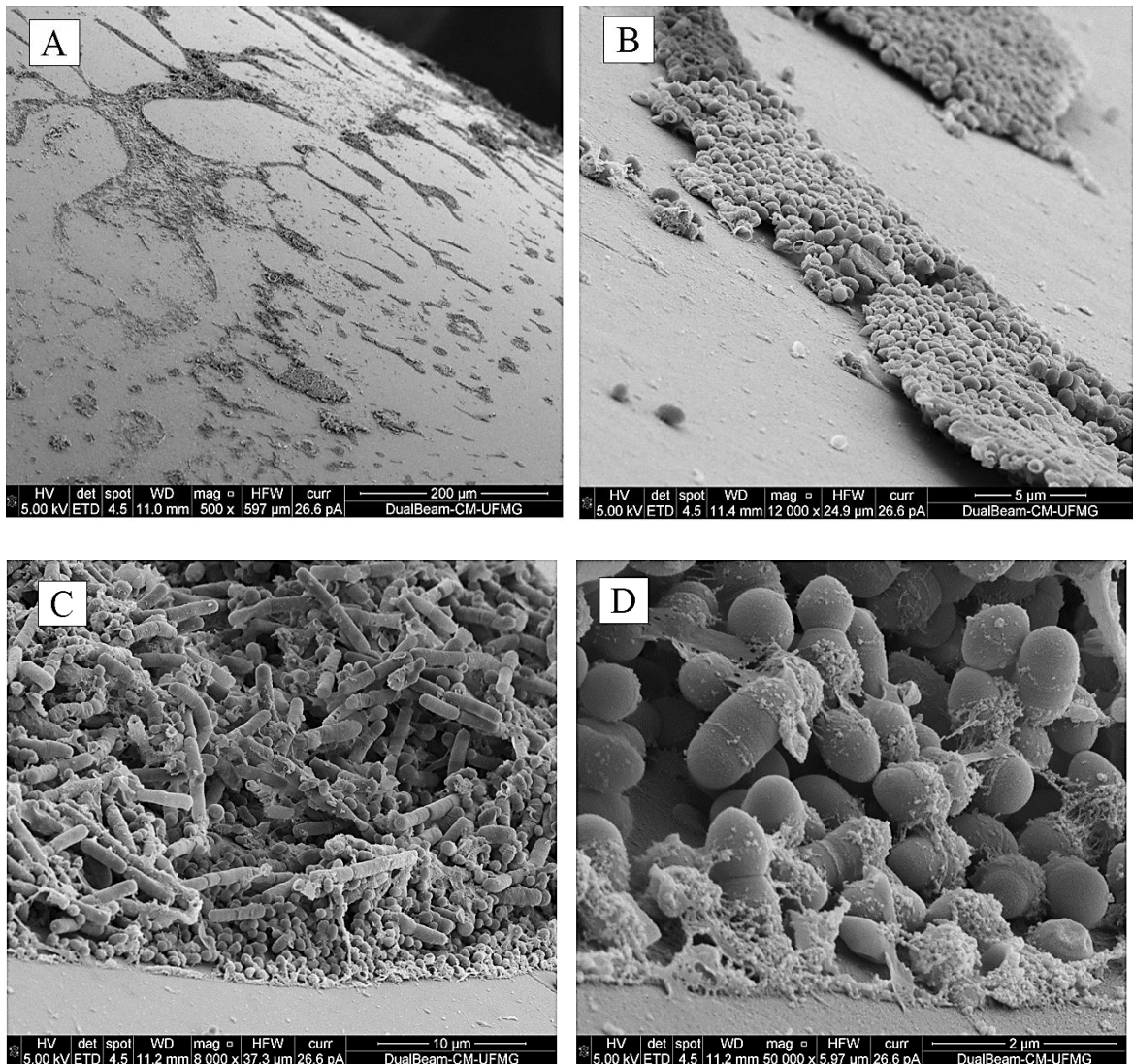


Figure 6. Scanning electron photomicrographs of multispecies biofilm formed on pegs from the Calgary Biofilm Device after 5 days of incubation in BHI broth. A) Layer of multispecies cells growing on the peg (magnification 500 x). B) Apical region of the biofilm was composed by many layers of cells with *coccoid* and *coccobacillary* morphology expanding over the peg surface forming a microcolony (magnification 12000 x). C) Bacterial cells conforming layers of biofilm with irregular structure. The apical region of biofilm was composed by a cell layer and is observed with presence

of long and short rod-like coccus, spirochete-shapes and filamentous cells (magnification 8000 x). D) Coccus attached to the peg surface and bonded each other by the polymeric matrix, the distance between each cell is less than 1 μm in some areas of the microcolony (magnification 50000 x).

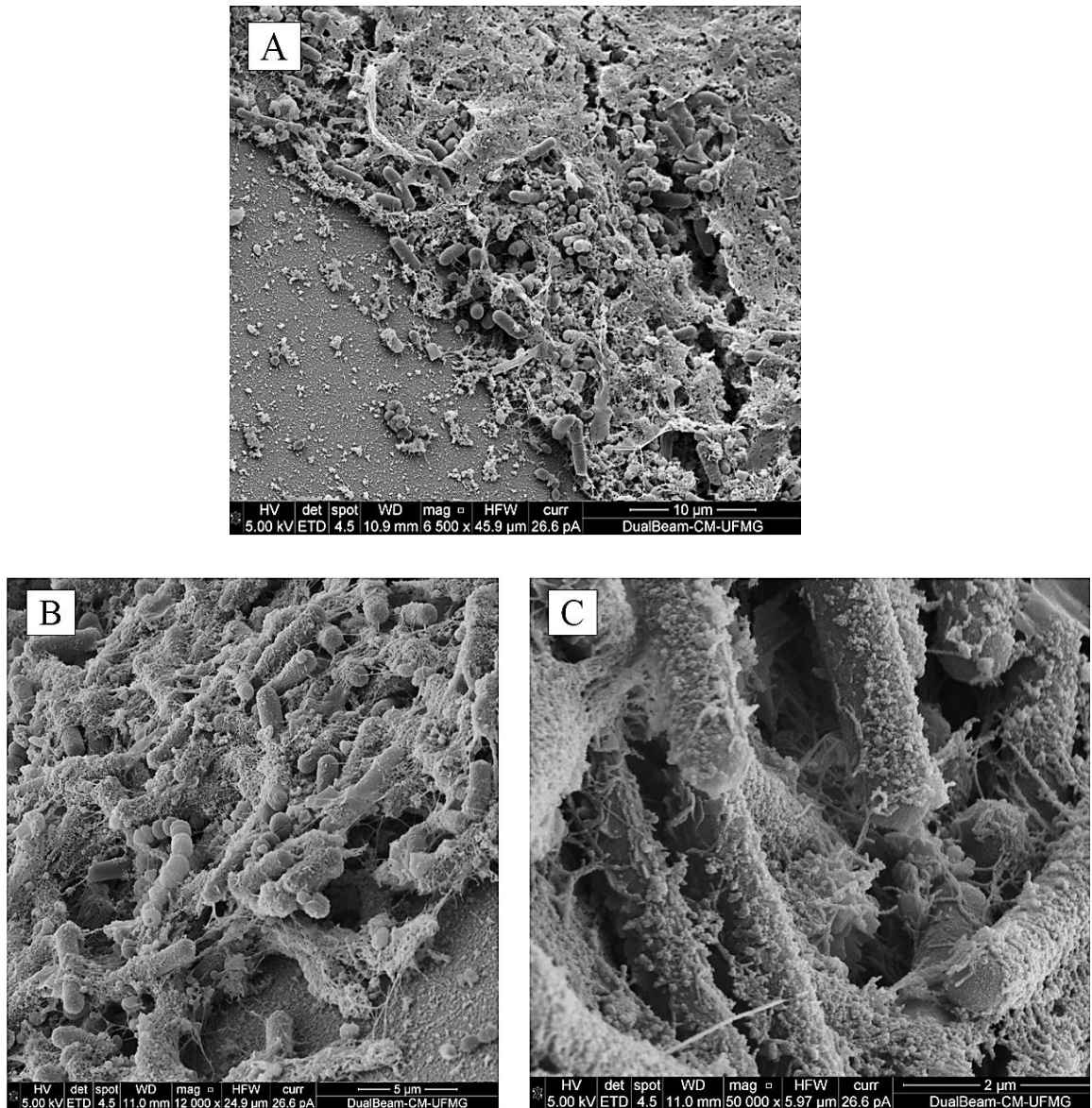


Figure 7. Scanning electron photomicrographs of multispecies biofilm formed on pegs from the Calgary Biofilm Device after 10 days of incubation in BHI broth. A) Mature multispecies biofilm with complex structural conformation, polymeric matrix is seen covering the upper cell layer (magnification 6500 x). B) *Streptococci* and *bacillus* cells enclosed by bands of exopolysaccharide matrix (magnification x 5 μm). C)

Filaments over the bacterial strains at the lower layers of the biofilm (magnification x 2 μm).

Bacterial susceptibility testing

Minimal Inhibitory Concentration (MIC)

LyeTxI and LyeTxI/ β CD showed antibacterial activity against *S. mutans*, *S. oralis*, *S. sanguinis*, *L. acidophilus*, *L. casei*, *E. corrodens* and *P. intermedia* (Table 2). In overall, LyeTxI showed MICs values against all strains tested in the range of 15.62 to 62.50 $\mu\text{g/mL}$. On the other hand, LyeTxI/ β CD exhibited MIC values at lower concentrations than did LyeTxI and those were found in the range of 1.95 to 15.62 $\mu\text{g/mL}$ (Table 2).

Table 2. Periodontal pathogenic bacterial susceptibility to LyeTxI and LyeTxI/ β CD.

Strains	Antibacterial agents					
	LyeTx I ($\mu\text{g/mL}$)		LyeTx I/ β CD ($\mu\text{g/mL}$)		Chlorhexidine ($\mu\text{g/mL}$)	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
<i>S. mutans</i>	31.25	62.50	15.62	31.25	0.12	0.48
<i>S. sanguinis</i>	31.25	62.50	1.95	7.81	0.24	0.48
<i>S. oralis</i>	15.62	31.25	15.62	31.25	0.12	0.24
<i>L. casei</i>	62.50	125	7.81	15.62	0.24	0.48
<i>L. acidophilus</i>	31.25	62.50	15.62	31.25	0.24	0.48
<i>E. corrodens</i>	62.50	125	7.81	15.62	0.48	0.97
<i>P. intermedia</i>	62.50	125	15.62	31.25	0.48	0.97

Planktonic metabolic activity

The metabolic activity of planktonic cells was measured by fluorometry study as an indirect measure of the antibacterial activity of LyeTxI and LyeTxI/ β CD. Both LyeTxI and LyeTxI/ β CD reduced the planktonic cells metabolic activity at the MIC values for

each strain (Figure 8). When compared the reduction of metabolic activity at MIC values between LyeTxI with control (CHX), LyeTxI showed a higher inhibition than CHX against *S. mutans*, *S. sanguinis*, *S. oralis*, *L. acidophilus*, *E. corrodens* and *P. intermedia* and this difference was significant after ANOVA and Dunnett's multiple comparison test ($p < 0.05$) (Table 3 and Appendix 3). However, CHX showed a higher inhibition than LyeTxI against *L. casei* (13.90% vs. 9.27% respectively). In fact, *L. casei* was the less sensitive to LyeTxI among all strains ($9.27\% \pm 7.60$) while *E. corrodens* was the most sensitive ($91.44\% \pm 2.84$) (Table 3).

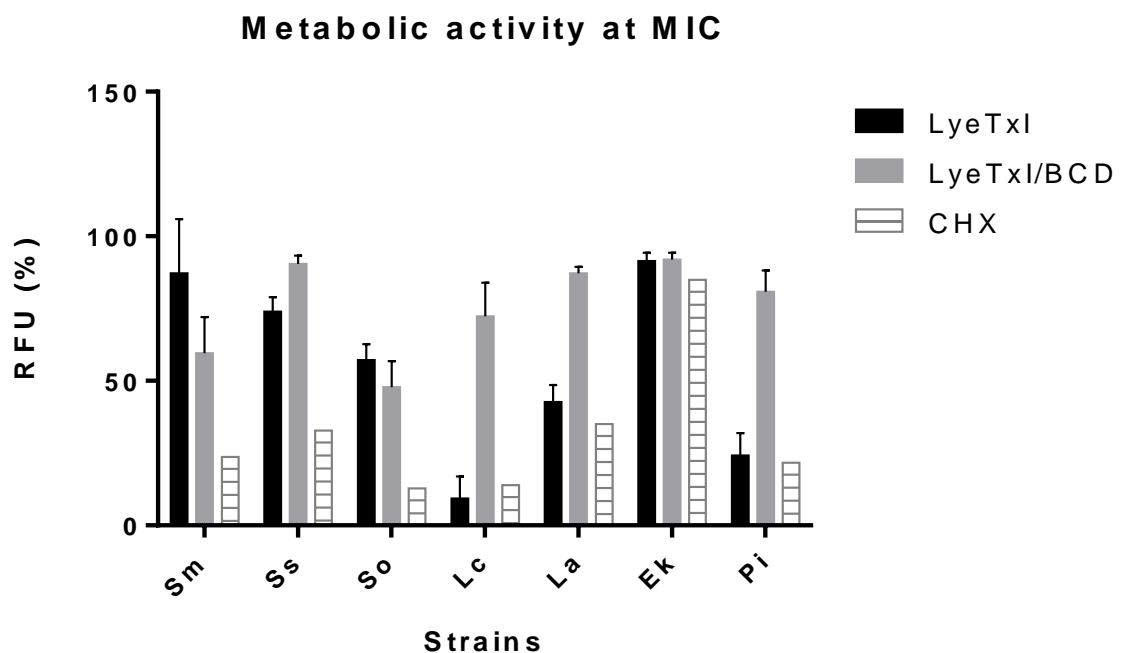


Figure 8. Percent of inhibition of metabolic activity reported in percent of relative fluorescent units (RFU %) of LyeTxI and LyeTxI/βCD at MIC values. *S. mutans* (Sm), *S. sanguinis* (Ss), *S. oralis* (So), *L. casei* (Lc), *L. acidophilus* (La), *E. corrodens* (Ek), *P. intermedia* (Pi) were exposed to LyeTxI, LyeTxI/βCD and Chlorhexidine 0.12% (control) at MIC values, then the metabolic activity was measured and compared.

Table 3. Reduction of metabolic activity of planktonic cells after exposure to LyeTxI and LyeTxI/ β CD at MIC values

Bacterial Strains	% of reduction of metabolic activity after exposure to		
	LyeTx I (mean \pm SD)	LyeTx I/ β CD (mean \pm SD)	Chlorhexidine (mean \pm SD)
<i>S. mutans</i>	87.00 \pm 19.02	59.60 \pm 12.44	23.65 \pm 0.00
<i>S. sanguinis</i>	73.96 \pm 5.03	90.49 \pm 2.77	32.83 \pm 0.00
<i>S. oralis</i>	57.12 \pm 5.61	47.86 \pm 8.97	12.79 \pm 0.00
<i>L. casei</i>	9.27 \pm 7.60	72.31 \pm 11.66	13.90 \pm 0.00
<i>L. acidophilus</i>	42.64 \pm 5.92	87.24 \pm 2.15	35.10 \pm 0.00
<i>E. corrodens</i>	91.4 \pm 2.84	91.93 \pm 2.35	84.93 \pm 0.00
<i>P. intermedia</i>	24.23 \pm 7.74	80.81 \pm 7.34	21.69 \pm 0.00

SD= Standard deviation

On the other hand, LyeTxI/ β CD highly reduced the metabolic activity of *S. sanguinis*, *L. acidophilus*, *E. corrodens* and *P. intermedia* at MIC values (Table 3). Indeed, *E. corrodens* and *S. sanguinis* were the most sensitive to LyeTxI/ β CD (91.93% and 90.49% respectively) while *S. oralis* was the less sensitive to LyeTxI/ β CD among all strains (27.86%). When compared the reduction of metabolic activity at MIC values of LyeTxI/ β CD with control (CHX), LyeTxI/ β CD showed a higher inhibition than CHX against *S. mutans*, *S. oralis*, *S. sanguinis*, *L. casei*, *L. acidophilus*, *E. corrodens* and *P. intermedia*, and this difference was significant after analysis with ANOVA and Tukey's multiple comparison test ($p < 0.05$) (Tables 3 and Appendix 3). Finally, we compared the reduction of metabolic activity at MIC values between LyeTxI and LyeTxI/ β CD. LyeTxI/ β CD reduced more effectively the metabolic activity than LyeTxI and this difference was statistically significant ($p < 0.05$).

Time-Kill kinetics assay

After achieve the stationary phase, we exposed *S. mutans*, *S. oralis*, *S. sanguinis*, *L. casei*, *L. acidophilus*, *E. corrodens*, *F. nucleatum*, *P. intermedia*, *P. gingivalis* and *A. actinomycetemcomitans* to LyeTxI at their correspondingly MIC values in order to understand the time at LyeTxI start its antimicrobial effect. The results of the killing-kinetic assay of LyeTxI showed a rapid bactericidal effect and are presented in Figure 9. In addition, the bactericidal effect observed continued along 10 hours once there were no CFU identified on agar plates until that time of exposition. In fact, the only strain that showed regrowth was *P. gingivalis* (Figure 9.1).

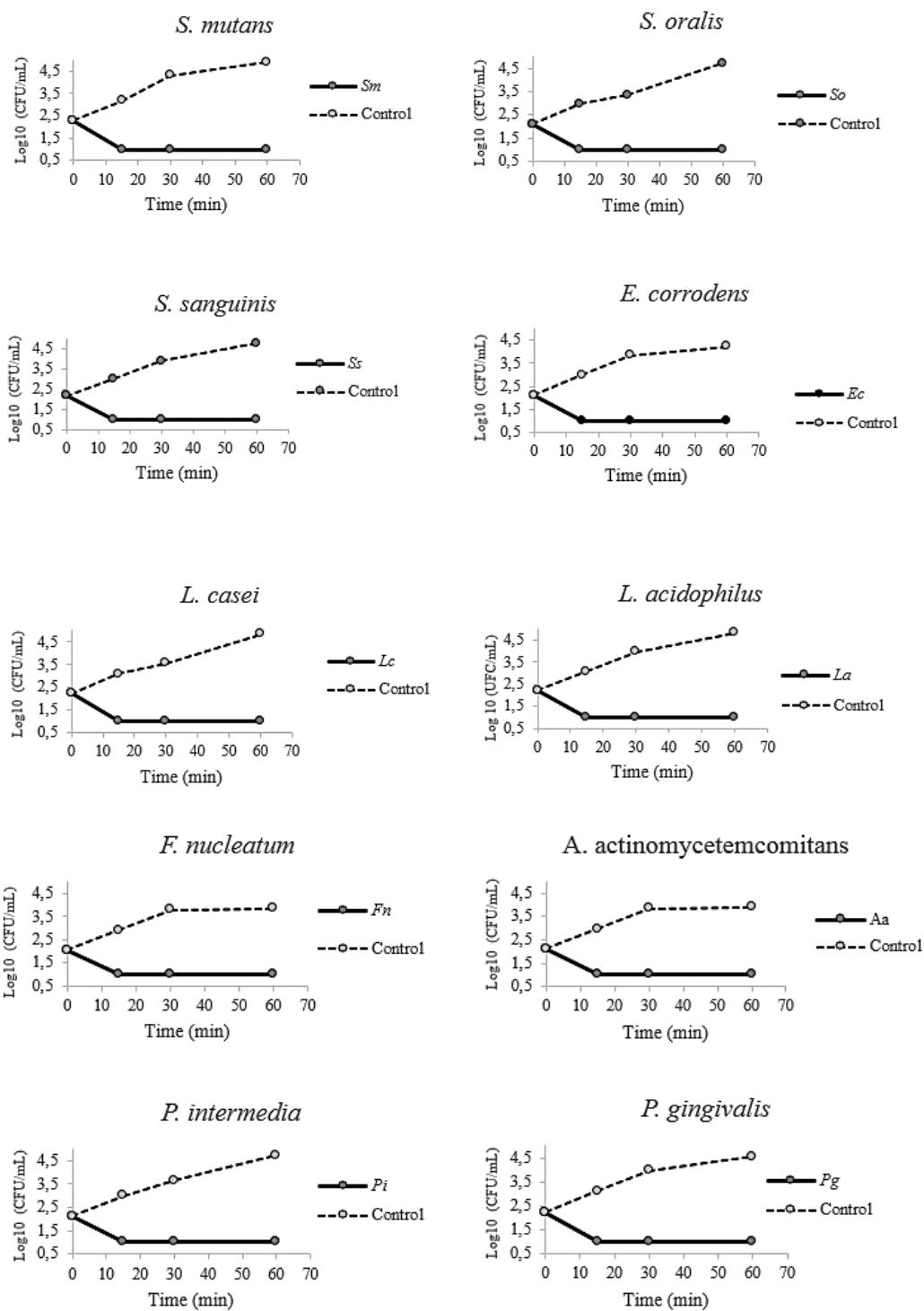


Figure 9. Time-killing kinetics (0-60 min) of peptide LyeTxI. *S. mutans*, *S. oralis*, *S. sanguinis*, *L. casei*, *L. acidophilus*, *E. corrodens*, *F. nucleatum*, *P. intermedia*, *P. gingivalis* and *A. actinomycetemcomitans* were exposed to 1 x MICs values of LyeTxI. Each control had no treatment. The assays were performed in microdilution and in two independent experiments.

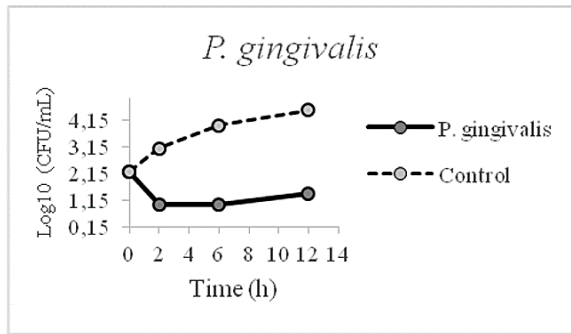


Figure 9.1. Time-killing kinetics (0-12 h) of peptide LyeTxI against *P. gingivalis* in microdilution assays. *P. gingivalis* was exposed to LyeTxI for 12 hours, however, after 10 hours of exposition, *P. gingivalis* exhibited regrowth.

Minimal biofilm eradication concentration (MBEC) assay

After exposed the multispecies biofilm to LyeTxI and LyeTxI/βCD, both agents partially eradicate the 2-day multispecies biofilms at concentration of 250 μg/mL and 125 μg/mL respectively (Table 4). In contrast, Chlorhexidine exhibited a MBEC value at 15.62 μg/mL. On the other hand, both LyeTxI and LyeTxI/βCD did not eradicate the 4-day multispecies biofilms at the highest concentration tested (Table 4) (Appendix 3).

As previously mentioned, cells shed from biofilms in the challenge plate and turned to planktonic stated allowed us to determine the MIC values of LyeTxI and LyeTxI/βCD against multispecies planktonic cells (Table 4). All of the agents tested inhibited planktonic growth of cells shed from 2-day biofilm. In fact, LyeTxI/βCD and Chlorhexidine (control) were active against shed cells from 2-day biofilms at lower concentrations than LyeTxI (62.50 and 1.95 μg/mL respectively). On the other hand, shed cells from 4-day biofilms were not sensitive against LyeTxI and LyeTxI/βCD. Chlorhexidine, however, inhibited planktonic cells growth at 7.81 μg/mL (Table 4).

Table 4. Comparative susceptibility of bacterial biofilms to LyeTxI, LyeTxI/ β CD and Chlorhexidine after 24 hours of exposure.

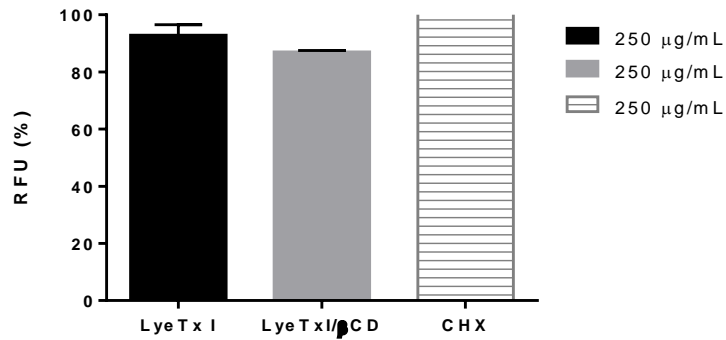
Multispecies Biofilms	Antibacterial agents					
	LyeTxI ($\mu\text{g/mL}$)		LyeTxI/ β CD ($\mu\text{g/mL}$)		Chlorhexidine ($\mu\text{g/mL}$)	
	MIC	MBEC	MIC	MBEC	MIC	MBEC
2-day	125	250	62.5	125	1.95	15.62
4-day	> 250	> 250	> 250	> 250	7.81	> 250

Biofilm metabolic activity

The biofilm metabolic activity was measured by fluorometry study as an indirect measure of the antibacterial activity of LyeTxI, LyeTxI/ β CD and Chlorhexidine (control). All of the agents tested reduced the 2-day biofilm cells metabolic activity at the highest concentration (250 $\mu\text{g/mL}$) and it is presented in Figure 10. In addition, when comparing the antimicrobial activity at the highest concentration between agents tested, Chlorhexidine (control) reduced the 2-day biofilm cells metabolic activity more strongly than did LyeTxI and LyeTxI/ β CD. Moreover, LyeTxI exhibited a higher reduction of the 2-day biofilm metabolic activity than LyeTxI/ β CD (Table 5), however after analysis with ANOVA and Tukey's multiple comparisons test, there was no statistical difference among treatments ($p > 0.05$) (Appendix 3).

In addition, the antibacterial activity of LyeTxI and LyeTxI/ β CD decreased the metabolic activity of 4-day biofilm cells at the highest concentration (Figure 10). Moreover, LyeTxI showed a higher reduction of 4-day biofilm metabolic activity than did LyeTxI/ β CD ($67.18\% \pm 3.05$ vs. $28.26\% \pm 15.64$) (Table 5). This difference was significant after analysis with ANOVA and Tukey's multiple comparisons test ($p < 0.05$). Furthermore, Chlorhexidine was superior to LyeTxI and LyeTxI/ β CD in reducing the 4-day biofilm metabolic activity ($p < 0.05$) (Appendix 3).

Reduction of metabolic activity 2-day Biofilm



Reduction of metabolic activity 4-day Biofilm

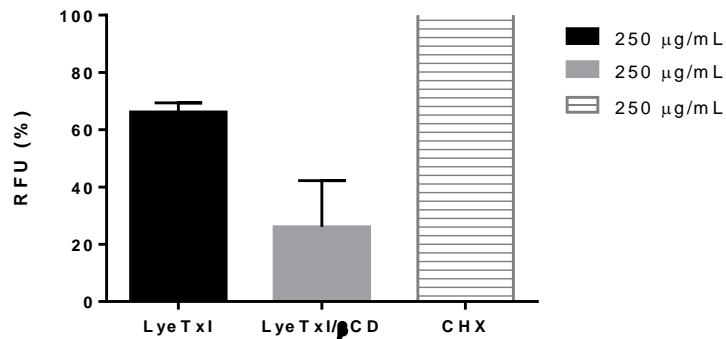


Figure 10. Reduction of metabolic activity expressed in percent of relative fluorescent units (RFU) of 2-day and 4-day multispecies biofilms after exposition to LyeTxI and LyeTxI/βCD at the highest concentration (250 μg/mL).

Table 5. Reduction of metabolic activity of 2-day and 4-day biofilms after exposure to LyeTxI and LyeTxI/βCD at the highest concentration (250 μg/mL).

Multispecies Biofilms	% of reduction of metabolic activity after exposure to (mean ± SD)		
	LyeTxI	LyeTxI/βCD	Chlorhexidine
2-day	92.87 ± 3.66	87.00 ± 0.50	97.65 ± 0.00
4-day	67.18 ± 3.05	28.26 ± 15.64	94.75 ± 0.00

SD= standard deviation

We determined the metabolic activity of cells shed from the 2-day and 4-day biofilms after exposition to LyeTxI and LyeTxI/βCD and Chlorhexidine at the highest concentration (250 μg/mL) (Figure 11). Chlorhexidine (control) strongly reduced the

metabolic activity of planktonic cells from 2-day and 4-day biofilms and was superior to the agents tested ($p < 0.05$). In addition, LyeTxI was superior than LyeTxI/ β CD in reducing the metabolic activity of cells shed from 2-day biofilms (82.45% vs. 41.82% respectively) and of 4-day biofilms (72.53% vs. 44.78% respectively) (Table 6) and this difference was significant ($p < 0.05$). (Appendix 3).

Table 6. Reduction of metabolic activity of planktonic cells from 2-day and 4-day biofilms after exposure to LyeTxI and LyeTxI/ β CD at the highest concentration (250 μ g/mL).

Planktonic Cells	% of reduction of metabolic activity after exposure to		
	LyeTx I (mean \pm SD)	LyeTx I/ β CD (mean \pm SD)	Chlorhexidine (mean \pm SD)
2-day growth	82.45 \pm 0.36	41.82 \pm 9.36	100 \pm 0.00
4-day growth	72.53 \pm 1.69	44.78 \pm 8.02	100 \pm 0.00

SD= Standard deviation

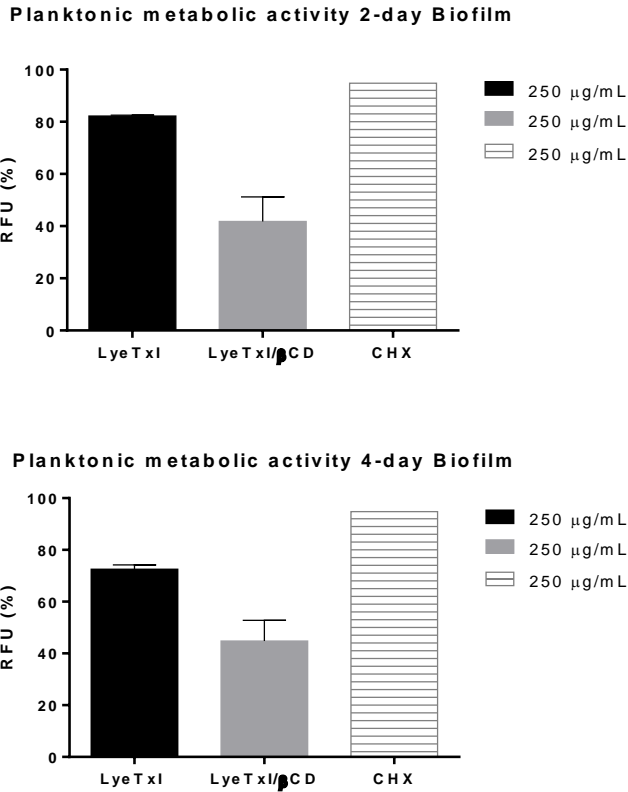


Figure 11. Reduction of metabolic activity expressed in percent of relative fluorescent units (RFU) of planktonic cells shed from 2-day and 4-day multispecies biofilms after exposition to LyeTxI and LyeTxI/βCD at the highest concentration (250 μg/mL).

Biofilms SEM microphotography after exposure to antibacterial agents

After exposition to LyeTxI and LyeTxI/βCD for 24 hours, the multispecies biofilm composed by *S. mutans*, *S. oralis*, *S. sanguinis*, *L. acidophilus*, *L. casei*, *E. corrodens*, *F. nucleatum*, *P. intermedia*, *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans* showed changes in the morphology and exopolysaccharide matrix. In addition, the polymeric matrix was observed with an extensive zone of degradation (Figure 12).

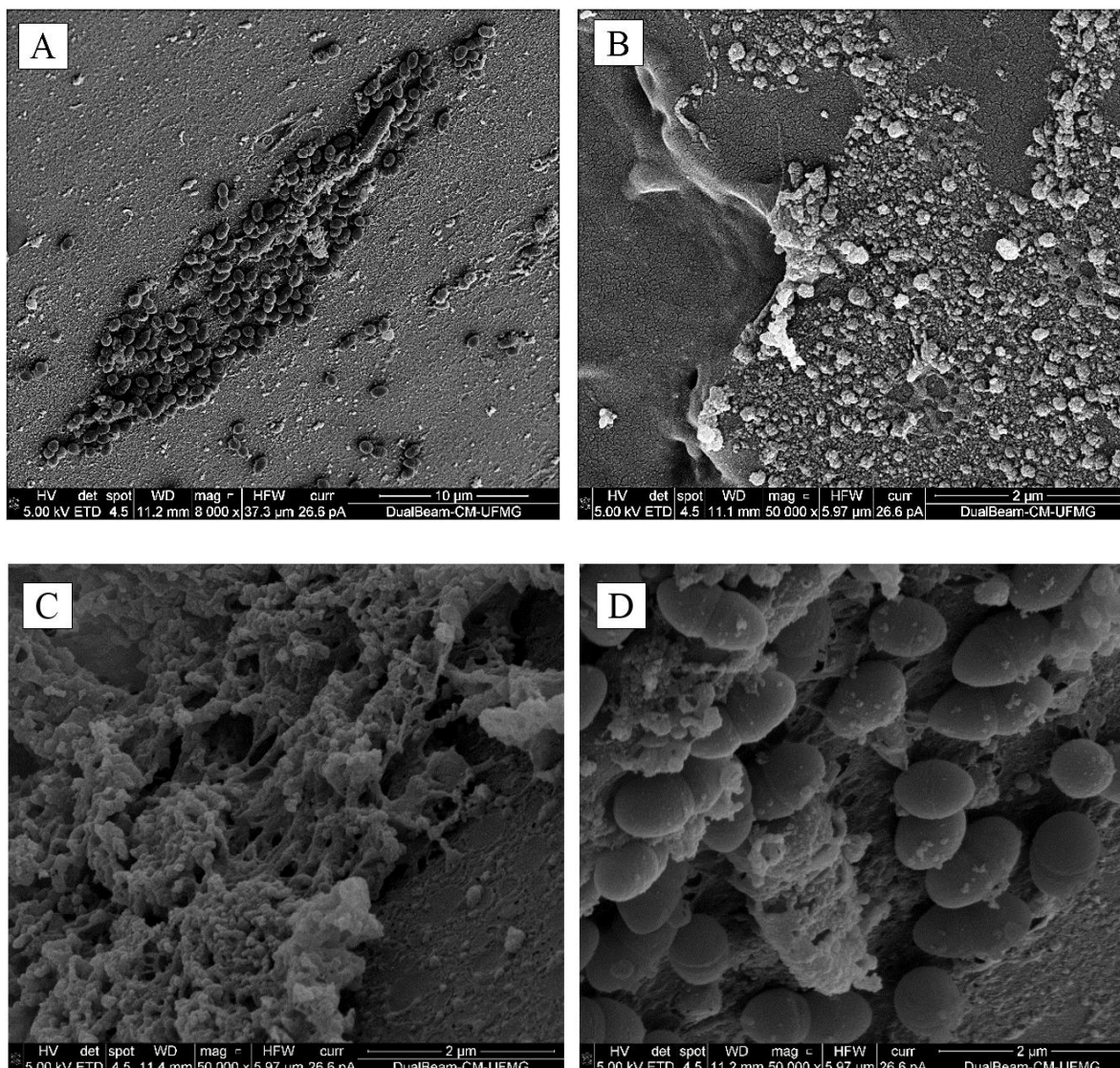


Figure 12. Scanning electron microphotographs of biofilms exposed to 250 µg/mL of LyeTxI. A) Microcolony of cells with lack of polymeric matrix (magnification 8000 x). B) The biofilm exhibit lack of cells and the exopolysaccharide matrix is degraded and displaying a zone of erosion (magnification 50000x). C) Biofilm with disorganized structure and morphology (magnification 5000 x). D) Some biofilm cells shows no change in their morphology and the exopolysaccharide matrix did not attach cells to the peg surface.

DISCUSSION

This study evaluated the activity of LyeTxI associated with β CD as strategy to improve the functional form of the free peptide as previously reported ¹⁴. We characterized the association between LyeTxI with β CD by Infrared Spectroscopy in order to determine their molecular interaction. This technique identifies the bonds of functional groups among molecules by measuring the infrared absorption bands, and thus allowing the identification of the molecule tested ²³. After comparing the stretching vibrations 1158 cm^{-1} (ν C-O) and 2926 cm^{-1} (ν C-H) of free β CD with LyeTxI/ β CD, we observed that the frequency changed to 1206 cm^{-1} (ν C-O) and 2924 cm^{-1} (ν C-H) respectively, suggesting the presence of the association compound LyeTxI/ β CD. Those changes are explained by the formation of hydrogen bonding and the presence of van der Waals forces during their interaction between β CD and LyeTxI ²⁴.

Scanning electron microscopy have been useful for observing *in vitro* ²⁵ and *in vivo* supragingival and subgingival dental plaque samples ²⁶. We provide microphotographs from the SEM that confirm the presence of multispecies biofilm grown on Calgary Biofilm Device. Moreover, we provide insights of the morphology of 2-day, 5-day and 10-day biofilms cultured in pegs. Microphotographs of 2-day, 5-day and 10-day biofilms showed microcolonies surrounded by an exopolysaccharide matrix. The typical *coccoid*, *coccobacillary*, *spirochete-shaped* morphology of cells from 5-day and 10-day biofilms are similar with bacteria from dental plaque samples observed in previous studies that used SEM for clinical and *in vitro* evaluation ²⁷⁻³⁰. Moreover, we found that 10-day biofilms showed dense aggregates of multispecies bacteria held together by diffuse extracellular polymeric matrix. As previous described by Socransky & Haffajee (2002) ³¹, the network of exopolysaccharides can display ordered or disordered forms depending of the conditions under the biofilm grows; such as temperature, pH, nutrients and shear forces. High temperatures and low ionic concentrations induce formation of disordered exopolysaccharide network. Shear stress affects the rate at which nutrients are transported to the surface of the biofilm, thus, biofilms grown under high shear forces are thinner and denser than those grown under lower shear. Using the CBD we were able to form biofilms under the same growth conditions and thus, observe newly formed biofilms (2-day) and differentiated biofilms (10-day) with morphological characteristics seen *in vivo*.

In addition, we tested the antibacterial activity of LyeTxI and LyeTxI/ β CD against early and intermediate colonizers of dental plaque. Our findings indicated that LyeTxI/ β CD was superior than LyeTxI arresting the bacterial growth of *S. mutans*, *S. oralis*, *S. sanguinis*, *L. acidophilus*, *L. casei*, *E. corrodens* and *P. intermedia* at concentrations $\leq 15.62 \mu\text{g/mL}$. In fact, *S. sanguinis*, *L. casei* and *E. corrodens* were the most sensitive to LyeTxI/ β CD at concentrations between $15.62\text{-}1.95 \mu\text{g/mL}$. In agreement with previous studies, our results suggest that LyeTxI/ β CD exhibited antibacterial activity against Gram-positive and Gram-negative periodontal pathogens in planktonic state^{13, 14}.

Moreover, a previous study found that Gram-negative periodontopathogens such as *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans* and *F. nucleatum* are sensitive to LyeTxI and LyeTxI/ β CD at lower concentrations ($<0.03 - 30.38 \mu\text{g/mL}$)¹⁴. In our study, however, the MICs values of LyeTxI/ β CD tested against Gram-positive bacteria were higher than those obtained by Consuegra et al. (2013). Among all strains tested, *S. sanguinis*, *L. casei* and *E. corrodens* were highly sensible to LyeTxI/ β CD when compared with LyeTxI.

In addition, our findings showed that the association compound LyeTxI/ β CD was more effective than LyeTxI in reducing the metabolic activity of planktonic cells. This finding may be explain as follows: First, the cationic peptide LyeTxI bind to the anionic cell membrane and disrupts the phospholipid chain^{15, 32, 33}. This effect acts synergistically with the β CD because, it enhance peptide adhesion to the cell membrane through hydrogen bonds and thus, increase the solubility, the concentration gradient and the bioavailability of LyeTxI³³.

We performed the killing kinetics assays to determine the time at LyeTxI exert its antimicrobial activity against planktonic cells *S. mutans*, *S. oralis*, *S. sanguinis*, *L. acidophilus*, *L. casei*, *E. corrodens*, *P. intermedia*, *F. nucleatum*, *P. gingivalis* and *A. actinomycetemcomitans* at MIC values. Our findings showed that LyeTxI exhibit a rapid bactericidal effect and, this effect continue through 10 hours. A recent study showed that Licotoxin I and Lycotoxin II - AMPs with similar molecular structure to LyeTxI - strongly inhibit ATP synthase at highest concentration and thus exhibited a rapid bactericidal effect against *E. coli*³⁴. ATP synthase is known as the enzyme necessary for ATP generation in cells, and is located in the inner membranes of mitochondria and

plasma membrane of bacteria³⁵. As AMPs exert bactericidal effect through inhibition of ATP synthase³⁶, Lycotoxin I and Lycotoxin II may act at both intracellular and membrane level, explaining why bacteria dies quickly. A second finding from this study was that, the inhibition of ATP synthase by Lycotoxin I and Lycotoxin II is reversible. After reducing the peptides concentrations, the ATP synthase regained activity suggesting that both peptides establish a non-covalent bond to receptor sites at intracellular level.

To determine whether a 2-day and 4-day multispecies biofilms are sensitive to LyeTxI and LyeTxI/ β CD, we performed the minimal biofilm eradication concentration (MBEC) assay using the CBD. Two-day biofilms were most sensitive than the 4-day biofilms to the activity of LyeTxI and LyeTxI/ β CD at the highest concentration (250 μ g/mL). In addition, we were able to determine the MIC values of LyeTxI and LyeTxI/ β CD against cells shed from the 2-day biofilms that returned to planktonic state. More importantly, the MBEC values were twofold higher than the MIC values (125 vs. 62.50 μ g/mL respectively). Therefore, this difference in susceptibility between planktonic and biofilm cells proves that biofilms protect bacteria not only against antibiotics but also against antimicrobial peptides. Our results were in agreement with a previous study that used the same biofilm model to grow biofilms of *P. aeruginosa*¹⁶. They found that biofilms of *P. aeruginosa* survived after treatment with antibiotics at concentrations 100 times higher than the MIC values¹⁶. In agreement with their results, we found that the MBEC values against 2-day and 4-day biofilm cells were twofold higher than the MIC values against planktonic cells.

A broad model system has been used for the *in vitro* study of metabolic activity on biofilms^{21, 37}. Viability assays that measure fluorescence are commonly used because allows the quantification of viable cells³⁸. Thus, resazurin-base viability staining is used to quantify viable biofilm cells grown on microtiter plates, once metabolic active cells reduce the non-fluorescent resazurin into a reduced resorufin which is fluorescent and can be measured²⁰. In our study, we use the reduction of resazurin to measure the metabolic activity of biofilm cells after exposition to LyeTxI and LyeTxI/ β CD and thus, indirectly evaluate their antibacterial activity. Both, LyeTxI and LyeTxI/ β CD decreased the metabolic activity of 2-day biofilms at the highest concentration (250 μ g/mL). However, LyeTxI showed a higher reduction of metabolic activity of 2-day biofilm cells thus, our findings indicate that LyeTxI is active in the early

stages of *in vitro* biofilm development. In addition, a recent study found that the combination of amoxicillin and metronidazole reduced the metabolic activity of multispecies 7-day biofilms ³⁹.

In fact, they reported that this combination had greater antimicrobial effect than the two drugs working independently due to a synergistic effect of these antimicrobials. Differences between their results with ours may be explained by the different mechanism of action of those antibiotics with LyeTxI. The synergistic effect of these antibiotics is due the activity of metronidazole against anaerobic species capable to produce beta-lactamases ⁴⁰, therefore, as decrease the levels of beta-lactamase it enhance the activity of amoxicillin ⁴¹. In contrast, LyeTxI and LyeTxI/ β CD act at the membrane level by means of electrostatic interaction. In fact, the association compound has a synergistic effect due the β CD that enhance the adhesion, the concentration gradient and the bioavailability of LyeTxI. Therefore, it is expected that the reduction of metabolic activity of LyeTxI and LyeTxI/ β CD was lower than amoxicillin with metronidazole. On the other hand, it would be interesting to evaluate synergistic effect of LyeTxI with another antimicrobial as reported in literature ⁴²⁻⁴⁴. AMPs may increase the bacterial killing of antibiotics against bacteria by disrupting the cell membrane and allowing the entrance of the antibiotic into the bacterial cell, thus killing the bacteria regardless the mode of action of the antibiotic ⁴².

One limitation of our study is that biofilms cultured on peg lids reactors are not capable to form a thicker mass as seen clinically on periodontal pockets. However, the CBD not only allowed us to produce biofilms of periodontal pathogenic bacteria with reproducible cell density, but also enable us to determine their susceptibility to LyeTxI and LyeTxI/ β CD under the same conditions. In addition, CBD allowed us to provide evidence that *in vitro* biofilms share characteristics of biofilms from periodontal pockets, through SEM microphotographs at 2, 5 and 10 days of culture.

Therapies against biofilms should include the mechanical debridement along with an antimicrobial agent that, ideally, diffuse within the polymeric matrix and act at concentrations capable to kill cells in different spatial locations. Our study provide new evidence of the antibacterial activity of LyeTxI and LyeTxI/ β CD against planktonic Gram-positive and Gram-negative periodontal pathogens and multispecies 2-day biofilms. In agreement with a previous study ³³, the antibacterial activity of the

association compound LyeTxI/ β CD was enhanced by β CD, thus confirming the potential use of cyclodextrin association complexes to enhance drugs' therapeutic efficacy. In addition, the biological activity *in vitro* of LyeTxI and LyeTxI/ β CD against early-formed biofilms suggests that both antimicrobial agents could be potentially used to control early stages of biofilm development in order to arrest bacterial colonization and thus biofilm formation.

CONCLUSION

Both, LyeTxI and the association compound LyeTxI/ β CD are effective antimicrobial agents against Gram-positive and Gram-negative periodontal pathogens, showing a rapid bactericidal effect at MIC values ($\leq 62.50 \mu\text{g/mL}$) with capacity to reduce the metabolic activity of planktonic and 2-day multispecies biofilm cells at concentrations below $250 \mu\text{g/mL}$.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by the Coordination for the Improvement of Higher Level Education Personnel (CAPES), the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), the State of Minas Gerais Research Foundation (FAPEMIG), the National Institute in Science and Technology in Nanobiopharmaceutics-Nanobiofar, Brazil. The authors would like to acknowledge the Center of Microscopy at the *Universidade Federal de Minas Gerais*, for providing the equipment and technical support for experiments involving electron microscopy. The authors report no conflicts of interest related to this study.

REFERENCES

1. Offenbacher S. Periodontal diseases: pathogenesis. *Ann Periodontol* 1996;1:821-878.
2. Armitage GC. Clinical-evaluation of periodontal-diseases. *Periodontology 2000* 1995;7:39-53.
3. Teles R, Teles F, Frias-Lopez J, Paster B, Haffajee A. Lessons learned and unlearned in periodontal microbiology. *Periodontology 2000* 2013;62:95-162.
4. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. *Science* 1999;284:1318-1322.
5. Guidelines for periodontal therapy. *Journal of Periodontology* 1998;69:405-408.
6. Cruz Olivo EA, Ramirez Escobar JH, Contreras Rengifo A. Moxifloxacin an adjunct in the treatment of periodontitis. *Revista clínica de periodoncia, implantología y rehabilitación oral* 2014;7:200-208.
7. Herrera D, Alonso B, Leon R, Roldan S, Sanz M. Antimicrobial therapy in periodontitis: the use of systemic antimicrobials against the subgingival biofilm. *Journal of Clinical Periodontology* 2008;35:45-66.
8. Rams TE, Degener JE, van Winkelhoff AJ. Antibiotic Resistance in Human Chronic Periodontitis Microbiota. *Journal of Periodontology* 2014;85:160-169.
9. Travis SM, Anderson NN, Forsyth WR, et al. Bactericidal activity of mammalian cathelicidin-derived peptides. *Infection and Immunity* 2000;68:2748-2755.
10. Scarsini M, Tomasinsig L, Arzese A, D'Este F, Oro D, Skerlavaj B. Antifungal activity of cathelicidin peptides against planktonic and biofilm cultures of *Candida* species isolated from vaginal infections. *Peptides* 2015;71:211-221.
11. Zasloff M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 2002;415:389-395.
12. Chennupati SK, Chiu AG, Tamashiro E, et al. Effects of an LL-37-derived antimicrobial peptide in an animal model of biofilm *Pseudomonas* sinusitis. *American Journal of Rhinology & Allergy* 2009;23:46-51.

13. Santos DM, Verly RM, Pilo-Veloso D, et al. LyeTx I, a potent antimicrobial peptide from the venom of the spider *Lycosa erythrognatha*. *Amino Acids* 2010;39:135-144.
14. Consuegra J, de Lima ME, Santos D, Sinisterra RD, Cortés ME. Peptides: β -cyclodextrin inclusion compounds as highly effective antimicrobial and anti-epithelial proliferation agents. *J Periodontol* 2013;84:1858-1868.
15. Yeaman MR, Yount NY. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacological Reviews* 2003;55:27-55.
16. Ceri H, Olson ME, Stremick C, Read RR, Morck D, Buret A. The Calgary Biofilm Device: New technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. *Journal of Clinical Microbiology* 1999;37:1771-1776.
17. Harrison JJ, Stremick CA, Turner RJ, Allan ND, Olson ME, Ceri H. Microtiter susceptibility testing of microbes growing on peg lids: a miniaturized biofilm model for high-throughput screening. *Nature Protocols* 2010;5:1236-1254.
18. Ouhara K, Komatsuzawa H, Yamada S, et al. Susceptibilities of periodontopathogenic and cariogenic bacteria to antibacterial peptides, beta-defensins and LL37, produced by human epithelial cells. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2005;55:888-896.
19. Wiegand I, Hilpert K, Hancock REW. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols* 2008;3:163-175.
20. O'Brien J, Wilson I, Orton T, Pognan F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *European Journal of Biochemistry* 2000;267:5421-5426.
21. Van den Driessche F, Rigole P, Brackman G, Coenye T. Optimization of resazurin-based viability staining for quantification of microbial biofilms. *Journal of Microbiological Methods* 2014;98:31-34.
22. Supanchart C, Thawanaphong S, Makeudom A, et al. The antimicrobial peptide, LL-37, inhibits in vitro osteoclastogenesis. *Journal of Dental Research* 2012;91:1071-1077.

23. Innocenzi P. Infrared spectroscopy of sol-gel derived silica-based films: a spectra-microstructure overview. *Journal of Non-Crystalline Solids* 2003;316:309-319.
24. Hamdi H, Abderrahim R, Meganem F. Spectroscopic studies of inclusion complex of beta-cyclodextrin and benzidine diammonium dipicrate. *Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 2010;75:32-36.
25. Carrassi A, Soligo D, Vogel G, Lambertenghideliliers G, Zambon JJ. Identification of actinobacillus-actinomycetemcomitans by gold immunolabeling and scanning electron-microscopy. *Journal of Periodontology* 1990;61:249-253.
26. Noiri Y, Ebisu S. Identification of periodontal disease-associated bacteria in the "plaque-free zone". *Journal of Periodontology* 2000;71:1319-1326.
27. Kigure T, Saito A, Seida K, Yamada S, Ishihara K, Okuda K. Distribution of porphyromonas-gingivalis and treponema-denticola in human subgingival plaque at different periodontal pocket depths examined by immunohistochemical methods. *Journal of Periodontal Research* 1995;30:332-341.
28. Noiri Y, Li L, Ebisu S. The localization of periodontal-disease-associated bacteria in human periodontal pockets. *Journal of Dental Research* 2001;80:1930-1934.
29. Noiri Y, Li L, Yoshimura F, Ebisu S. Localization of Porphyromonas gingivalis-carrying fimbriae in situ in human periodontal pockets. *Journal of Dental Research* 2004;83:941-945.
30. Noiri Y, Ozaki K, Nakae H, Matsuo T, Ebisu S. An immunohistochemical study on the localization of Porphyromonas gingivalis Campylobacter rectus and Actinomyces viscosus in human periodontal pockets. *Journal of Periodontal Research* 1997;32:598-607.
31. Socransky SS, Haffajee AD. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontology 2000* 2002;28:12-55.
32. Alves CS, Melo MN, Franquelim HG, et al. Escherichia coli Cell Surface Perturbation and Disruption Induced by Antimicrobial Peptides BP100 and pepR. *Journal of Biological Chemistry* 2010;285:27536-27544.

33. Teixeira KIR, Araujo PV, Neves BRA, Mahecha GAB, Sinisterra RD, Cortes ME. Ultrastructural changes in bacterial membranes induced by nano-assemblies beta-cyclodextrin chlorhexidine: SEM, AFM, and TEM evaluation. *Pharmaceutical Development and Technology* 2013;18:600-608.
34. Azim S, McDowell D, Cartagena A, Rodriguez R, Laughlin TF, Ahmad Z. Venom peptides cathelicidin and lycotoxin cause strong inhibition of *Escherichia coli* ATP synthase. *International Journal of Biological Macromolecules* 2016;87:246-251.
35. Jonckheere AI, Smeitink JAM, Rodenburg RJT. Mitochondrial ATP synthase: architecture, function and pathology. *Journal of Inherited Metabolic Disease* 2012;35:211-225.
36. Kragol G, Lovas S, Varadi G, Condie BA, Hoffmann R, Otvos L. The antibacterial peptide pyrrococin inhibits the ATPase actions of DnaK and prevents chaperone-assisted protein folding. *Biochemistry* 2001;40:3016-3026.
37. Peeters E, Nelis HJ, Coenye T. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *Journal of Microbiological Methods* 2008;72:157-165.
38. Hamalainen-Laanaya HK, Orloff MS. Analysis of cell viability using time-dependent increase in fluorescence intensity. *Analytical Biochemistry* 2012;429:32-38.
39. Soares GMS, Teles F, Starr JR, et al. Effects of Azithromycin, Metronidazole, Amoxicillin, and Metronidazole plus Amoxicillin on an In Vitro Polymicrobial Subgingival Biofilm Model. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2015;59:2791-2798.
40. Handal T, Olsen I, Walker CB, Caugant DA. beta-lactamase production and antimicrobial susceptibility of subgingival bacteria from refractory periodontitis. *Oral Microbiology and Immunology* 2004;19:303-308.
41. Lopez NJ, Socransky SS, Da Silva I, Japlit MR, Haffajee AD. Effects of metronidazole plus amoxicillin as the only therapy on the microbiological and clinical parameters of untreated chronic periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology* 2006;33:648-660.
42. Nuding S, Frasch T, Schaller M, Stange EF, Zabel LT. Synergistic Effects of Antimicrobial Peptides and Antibiotics against *Clostridium difficile*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2014;58:5719-5725.

43. Choi H, Lee DG. Synergistic effect of antimicrobial peptide arenicin-1 in combination with antibiotics against pathogenic bacteria. *Research in Microbiology* 2012;163:479-486.

44. Naghmouchi K, Le Lay C, Baah J, Drider D. Antibiotic and antimicrobial peptide combinations: synergistic inhibition of *Pseudomonas fluorescens* and antibiotic-resistant variants. *Research in Microbiology* 2012;163:101-108.

CONCLUSÃO

5. CONCLUSÃO

Na presente pesquisa apresenta a caracterização do composto de associação LyeTxI/ β CD por meio de Espectroscopia de Infravermelho (IV), confirmando que existe uma interação entre as duas moléculas.

Adicionalmente, nossa pesquisa fornece nova evidência sobre a atividade antibacteriana do peptídeo LyeTxI e do composto de associação LyeTxI/ β CD frente a bactérias patogênicas periodontais tanto Gram-positivas quanto Gram-negativas a concentrações $\leq 62.50 \mu\text{g/mL}$. O composto de associação melhorou a atividade antibacteriana do LyeTxI. Por sua vez, LyeTxI apresentou um rápido efeito bactericida após do teste da curva de morte, sugerindo um potente efeito antimicrobiano do peptídeo. Além do mais, a atividade biológica do LyeTxI e do LyeTxI/ β CD frente a biofilmes jovens sugere que, tanto o peptídeo quanto o composto de associação poderiam ser usados imediatamente após a terapia mecânica periodontal como agentes coadjuvantes, visando-se evitar a recolonização bacteriana por conta das células planctônicas despreendidas dos biofilmes.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

APPENDIX 1.

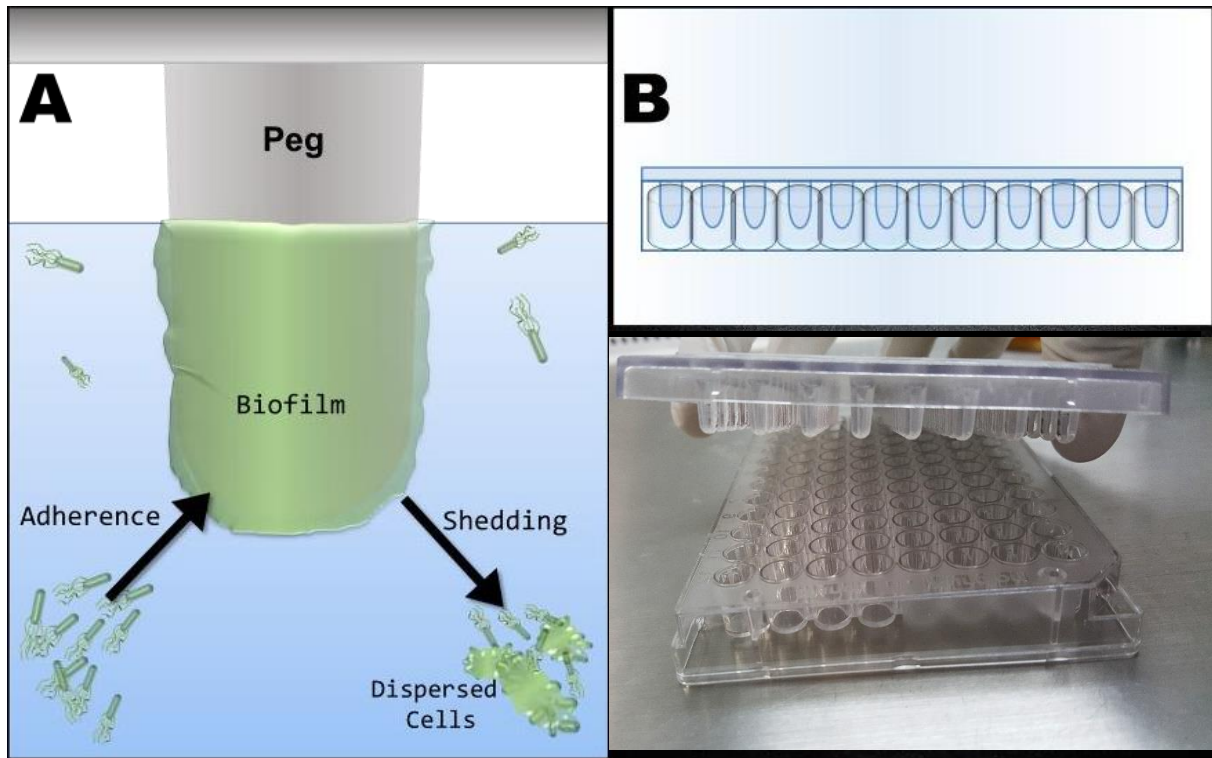


Figure 1. The MBEC™ Assay. A) Biofilms form on the pegs of the MBEC™ Biofilm Inoculator when planktonic bacteria adhere to the surface. In the presence of shear, these bacteria become attached and form mature biofilms. Biofilms are encased in 'slime', which is sometimes visible to the naked eye. Dispersed cells are also shed from the surface of biofilms, which serve as an inoculum for MIC determinations. B) Esquematical representation of the peg lid has 96 identical pegs. The average surface area of each peg on the MBEC™ device is 108.9 mm². (Below) Picture of the lid fits into a standard 96-well microtiter or trough plate with channels that are set up to contain an inoculated growth medium. The entire device is placed on a gyratory shaker or a rocking platform in an incubator, which provides the shearing force for facilitating the formation of 96 biofilms on the peg lid.

APPENDIX 2.

Table 1. IR bands of the stretching region (4000-400 cm^{-1}) obtained in KBr pellet of LyeTxI/ β CD inclusion compound and β -cyclodextrin.

Compounds	Wavenumber (cm^{-1})				
	$\delta\text{O-H}$	uC-H	uC-O	uC-C	uC-O-C
β -cyclodextrin	3370 s 1336 w	2926 w	1158 w	1080 w	1028 vs
LyeTx I/ β CD	3410 s	2924 w	1206 w	1158 w	1030 vs

vs= very strong, s= strong, w= weak,

APPENDIX 3.

Table 1. Results of the evaluation of LyeTxI and LyeTxI/ β CD with Chlorhexidine (control) in reducing the metabolic activity of planktonic periodontal pathogens at MIC values by ANOVA test.

Table Analyzed	MIC bact Vs, CHX
Two-way ANOVA Alpha	Ordinary 0.05

Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?
Interaction	20.59	0.0014	**	Yes
Concentrations	39.59	< 0.0001	****	Yes
Agents tested	19.93	< 0.0001	****	Yes

ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Interaction	11547	12	962,3	F (12; 35) = 3.63	P = 0.0014
Concentrations	22207	6	3701	F (6; 35) = 13.96	P < 0.0001
Agents tested	11179	2	5589	F (2; 35) = 21.09	P < 0.0001
Residual	9277	35	265		

Number of missing values	7
-----------------------------	---

Table 2. Results of Dunnett's multiple comparisons test between LyeTxI and LyeTxI/ β CD at MICs values compared with Chlorhexidine (Mean of difference at 95% confidence interval)

Dunnett's multiple comparisons test	Mean diff. (95% CI)	Significant
Chlorhexidine vs LyeTxI	-20.06 (-31.64 – -8.48)	***
Chlorhexidine vs LyeTxI/ β CD	-36.76 (-48.71 – -22.82)	****

p<0.05 **** ns= not significant

Table 3. Results of the ANOVA test comparing the reduction of metabolic activity at MIC values between LyeTxI and LyeTxI/ β CD.

Table Analyzed	MIC LyeTxI Vs, LyeTxI/ β CD				
Two-way ANOVA Alpha	Ordinary 0,05				
Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?	
Interaction	20,59	0.0014	**	Yes	
Concentrations	39,59	< 0.0001	****	Yes	
Agents tested	19,93	< 0.0001	****	Yes	
ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Interaction	11547	12	962,3	F (12; 35) = 3.631	P = 0.0014
Concentrations	22207	6	3701	F (6; 35) = 13.96	P < 0.0001
Agents tested	11179	2	5589	F (2; 35) = 21.09	P < 0.0001
Residual	9277	35	265		
Number of missing values	7				

Table 4. Results of Tukey's multiple comparisons test of reduction of metabolic activity at MIC values between LyeTxI and LyeTxI/ β CD.

Tukey's multiple comparisons test	Mean diff. (95% CI)	Significant
LyeTx I vs. LyeTx I/ β CD	-15.70 (-29.45 – -1.97)	*
LyeTx I vs. Chlorhexidine	20.06 (7.76 – 32.36)	***
LyeTx I/ β CD vs. Chlorhexidine	35.76 (22.02 – 49.51)	****

$p < 0.05$ **** ns= not significant

Table 5. Results of the ANOVA test comparing the reduction of metabolic activity of 2-day biofilm cells between LyeTxI and LyeTxI/ β CD at the highest concentration (250 μ g/mL).

Table Analyzed	MBEC 2 sensitivity 2 days comparison 250 μ g/mL				
ANOVA summary					
F	33.05				
P value	0.009				
P value summary	**				
Are differences among means statistically significant? (P < 0.05)	Yes				
R square	0.9566				
Brown-Forsythe test					
F (DFn, DFd)	+infinity (2; 3)				
P value	< 0.0001				
P value summary	****				
Significantly different standard deviations? (P < 0.05)	Yes				
<hr/>					
ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Treatment (between columns)	4110	2	2055	F (2; 3) = 33.05	P = 0.0090
Residual (within columns)	186.6	3	62.19		
Total	4297	5			
<hr/>					
Data summary					
Number of treatments (columns)	3				
Number of values (total)	6				

Table 6. Results of Tukey's multiple comparisons test of the reduction of metabolic activity of 2-day biofilm cells between LyeTxI and LyeTxI/ β CD at the highest concentration (250 μ g/mL).

Tukey's multiple comparisons test	Mean diff. (95% CI)	Significant
LyeTx I vs. LyeTx I/ β CD	5.87 (-3.69 – 15.43)	ns
LyeTx I vs. Chlorhexidine	-8.69 (-18.26 – 0.86)	ns
LyeTx I/ β CD vs. Chlorhexidine	-14.57 (-24.13 – -5.00)	*

$p < 0.05$ **** ns= not significant

Table 7. Results of the ANOVA test comparing the reduction of metabolic activity of 4-day biofilm cells between LyeTxI and LyeTxI/ β CD at the highest concentration (250 μ g/mL).

Table Analyzed	4 day Biofilm comparison 250 μ g/mL MBEC				
ANOVA summary					
F	39.77				
P value	0.0023				
P value summary	**				
Are differences among means statistically significant? (P < 0.05)	Yes				
R square	0.9521				
Brown-Forsythe test					
F (DFn, DFd)	17.28 (2; 4)				
P value	0.0108				
P value summary	*				
Significantly different standard deviations? (P < 0.05)	Yes				
<hr/>					
ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Treatment (between columns)	5556	2	2778	F (2; 4) = 39.77	P = 0.0023
Residual (within columns)	279.4	4	69.85		
Total	5835	6			
<hr/>					
Data summary					
Number of treatments (columns)	3				
Number of values (total)	7				

Table 8. Results of Tukey's multiple comparisons test of the reduction of metabolic activity of 4-day biofilm cells between LyeTxI and LyeTxI/ β CD at the highest concentration (250 μ g/mL).

Tukey's multiple comparisons test	Mean diff. (95% CI)	Significant
LyeTx I vs. LyeTx I/ β CD	40.08 (12.79 – 67.36)	*
LyeTx I vs. Chlorhexidine	-35.36(-62.65 – -8.077)	*
LyeTx I/ β CD vs. Chlorhexidine	-14.57 (-105.3 – -45.55)	**

p < 0.05 ** ns= not significant

Table 9. Results of the ANOVA test comparing the reduction of metabolic activity of cells shed from 2-day biofilm (planktonic) between LyeTxI and LyeTxI/ β CD at the highest concentration (250 μ g/mL).

Table Analyzed	MIC 2-day 250 ug/mL
ANOVA summary	
F	52.26
P value	0.0047
P value summary	**
Are differences among means statistically significant? (P < 0.05)	Yes
R square	0.,9721
Brown-Forsythe test	
F (DFn, DFd)	+infinity (2; 3)
P value	< 0.0001
P value summary	****
Significantly different standard deviations? (P < 0.05)	Yes
<hr/>	
ANOVA table	SS DF MS F (DFn, DFd) P value
Treatment (between columns)	3060 2 1530 F (2; 3) = 52.26 P = 0.0047
Residual (within columns)	87.83 3 29.28
Total	3148 5
<hr/>	
Data summary	
Number of treatments (columns)	3
Number of values (total)	6

Table 10. Results of Tukey's multiple comparisons test of the reduction of metabolic activity of cells shed from 2-day biofilm (planktonic) between LyeTxI and LyeTxI/ β CD at the highest concentration (250 μ g/mL).

Tukey's multiple comparisons test	Mean diff. (95% CI)	Significant
LyeTx I vs. LyeTx I/ β CD	40.37 (17.76 – 62.98)	*
LyeTx I vs. Chlorhexidine	-12.56 (-35.18 – -10.05)	ns
LyeTx I/ β CD vs. Chlorhexidine	-52.94 (-75.55 – -30.33)	**

$p < 0.05$ ** ns= not significant

11. Results of the ANOVA test comparing the reduction of metabolic activity of cells shed from 4-day biofilm (planktonic) between LyeTxI and LyeTxI/ β CD at the highest concentration (250 μ g/mL).

Table Analyzed	MIC 4-day 250 ug/mL				
ANOVA summary					
F	55,83				
P value	0.0042				
P value summary	**				
Are differences among means statistically significant? (P < 0.05)	Yes				
R square	0.9738				
Brown-Forsythe test					
F (DFn, DFd)	+infinity (2; 3)				
P value	< 0.0001				
P value summary	****				
Significantly different standard deviations? (P < 0.05)	Yes				
ANOVA table					
	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Treatment (between columns)	2507	2	1254	F (2; 3) = 55,83	P = 0.0042
Residual (within columns)	67.36	3	22.45		
Total	2575	5			
Data summary					
Number of treatments (columns)	3				
Number of values (total)	6				

Table 12. Results of Tukey's multiple comparisons test of the reduction of metabolic activity of cells shed from 4-day biofilm (planktonic) between LyeTxI and LyeTxI/ β CD at the highest concentration (250 μ g/mL).

Tukey's multiple comparisons test	Mean diff. (95% CI)	Significant
LyeTx I vs. LyeTx I/ β CD	27.75 (7.94 – 47.55)	*
LyeTx I vs. Chlorhexidine	-22.22 (-42.03 – -2.42)	*
LyeTx I/ β CD vs. Chlorhexidine	-49.97 (-69.77– -30.17)	**

$p < 0.05$ ** ns= not significant

PRODUÇÃO CIENTÍFICA DURANTE O MESTRADO

6. PRODUÇÃO CIENTÍFICA DURANTE O MESTRADO

Colaboração em orientação de Iniciação Científica

- Bolsista PROBIC-FAPEMIG Matheus de Paula Martins
- Bolsista PROBIC-FAPEMIG Natália Neves

Apresentação de trabalhos em eventos científicos

- Apresentação de pôster na 32ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica, 2015.

Olivo EAC, Monteiro APF, Sinisterra RD, Cortés ME. Potencial citotóxico do peptídeo antimicrobiano KR-20 associado a Hidroxipropil β -ciclodextrina (HP- β CD) em osteoblastos. Em: 32ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica, 2015, Campinas, São Paulo, Brasil.

Resumos de trabalhos publicados em anais de eventos científicos

- Olivo EAC, Monteiro APF, Sinisterra RD, Cortés ME. Potencial citotóxico do peptídeo antimicrobiano KR-20 associado a Hidroxipropil β -ciclodextrina (HP- β CD) em osteoblastos. Em: 32ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica, 2015, Campinas, São Paulo, Brasil. *Brazilian Oral Research*, 2015; 29(Suppl 1): 428.

[\[http://www.sbpqo.org.br/hotsite2015/anais.asp\]](http://www.sbpqo.org.br/hotsite2015/anais.asp)

Artigos em processo de redação

- Olivo EAC, Neves N, Cortés ME. Role of antimicrobial peptide LL-37 in Periodontal Diseases: A systematic review. Intention for submission in: *Journal of Clinical Periodontology*. (Fator de impacto: 4,01, Qualis CAPES: A1).

