

POTENCIAL CARIOGÊNICO DO BIOFILME ORIGINADO DE INÓCULOS DE SÍTIOS DENTAIS COM E SEM LESÕES ATIVAS DE CÁRIE

CÁCIA SIGNORI¹; TAMIRES TIMM MASKE²; KATIELLE BRAUNER³;
FRANÇOISE HÉLÈNE VAN DE SANDE⁴; MAXIMILIANO SÉRGIO CENCI⁵;
ELENARA FERREIRA DE OLIVEIRA⁶

¹Universidade Federal de Pelotas/Faculdade de Odontologia – caciasignori@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas/Faculdade de Odontologia – tamirestmaske@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas/Faculdade de Odontologia – katiellevb@gmail.com

⁴Faculdade de Odontologia/IMED Faculdade Meridional, Passo Fundo – fvandesande@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas/Faculdade de Odontologia – cencims@gmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas/Faculdade de Odontologia – elenaraferreira@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A característica chave de modelos de biofilmes de microcosmos é a complexidade ecológica, comparado à consórcios ou biofilmes de espécies únicas (FILOCHE et al., 2007). Esses modelos simulam o ambiente oral, fornecendo uma versão *in vitro* da placa natural, sob condições altamente controladas (TANG et al., 2003). A modulação da composição de biofilmes e prevalência de espécies microbianas relacionadas à cárie dental dentro de uma comunidade complexa como a placa pode ser manipulada pela exposição à sacarose e condições de crescimento (FILOCHE et al., 2007; SISSONS et al., 2007). Recursos naturais da cavidade oral, como a saliva e amostras de placa dental agrupada, têm sido usadas como inóculo em uma variedade de modelos experimentais (FILOCHE et al., 2008; RUDNEY et al., 2012; SISSONS et al., 2007; van de SANDE et al., 2011).

A manutenção, sob condições *in vitro*, das diferenças de cariogenicidade da placa dental existentes *in vivo*, e o potencial cariogênico de biofilmes de microcosmos derivados da placa dental de sítios distintos da cavidade oral ou da saliva, sob condições controladas, ainda não está bem esclarecida. Nesse contexto, o presente estudo visou investigar o potencial cariogênico de biofilmes originados de inóculos de sítios dentais específicos, com lesões ativas de cáries, e livres de cárie, em um modelo de biofilme de microcosmos.

2. METODOLOGIA

Dez voluntários foram selecionados de cada condição de cárie (livres de cárie e cárie-ativos) para coleta pareada de placa dental e saliva. Biofilmes de microcosmos foram iniciados, a partir do inóculo, sobre espécimes de esmalte individualmente dispostos em placas de 24 poços. Primeiramente, realizou-se a deposição de saliva clarificada sobre os espécimes, com permanência por 20 minutos em estufa a 37°C, para formação da película adquirida. Após, aspiração cuidadosa da mesma e inoculação com suspensão de placa (260µL) dos respectivos pares (placa-saliva clarificada) do mesmo indivíduo, sobre os discos de esmalte destinados a inoculação com placa. Aos discos de esmalte, cuja inoculação seria a partir do fluido salivar, nenhum tratamento prévio para formação da película adquirida foi feito. Uma alíquota (260µL) da saliva ajustada 2(mL/saliva):1(mL/RTF) correspondente a cada doador foram dispensados sobre

os discos de esmalte. Após 1 hora, em estufa, um meio definido com mucina (DMM) enriquecido com 1% de sacarose foi adicionado aos poços.

Os biofilmes cresceram em meio definido enriquecido com mucina, e foram submetidos a desafio cariogênico diário (meio definido suplementado com sacarose 1% por 6h/dia). Para o controle do baseline, uma alíquota dos inóculos originais, saliva ajustada e suspensão de placa, foi diluída (10^1 - 10^7) em solução salina, e plaqueada nos meios de cultura ágar sangue, ágar mitis salivarius com bacitracina e BHI com pH ajustado a 4,8.

Após 10 dias, para a avaliação do crescimento dos biofilmes, os discos de esmalte foram removidos dos poços com pinças estéreis, lavados em solução salina, e tiveram o biofilme coletado com instrumentos plásticos estéreis de toda superfície de esmalte de cada disco. Os biofilmes foram dispostos em eppendorfs pré-pesados. Biofilmes foram serialmente diluídos ($10^1 - 10^7$) e inoculados em duplicata nos meios de cultura: BHI (Brain Heart Infusion) pH 4.8; ágar mitis salivarius associado a 0.2 unidades de bacitracina/mL, ágar rogosa e ágar sangue. Depois as placas foram incubadas em atmosfera de anaerobiose por 96 horas. O número de unidades formadoras de colônia foi determinado por um pesquisador treinado, e os resultados expressos em UFC/mg de biofilme (peso úmido). As análises para perda de dureza de superfície foram realizadas com a utilização de um microdurômetro (Future-Tech FM) acoplado a um endentador Knoop. As indentações foram feitas com cargas de 50 gramas, durante 5 s.

Análise estatística foi realizada com testes T-pareado (contagem UFCs para o baseline – saliva *versus* placa), Modelo de Análise Multivariada Linear, para comparações estatísticas independentes de acordo com tipo de inóculo, fonte e interações, e Coeficiente de correlação de Pearson, para verificar correlação entre variáveis. Para a análise foi considerado o nível de significância de 5%, utilizando o software IBM SPSS Statistics para Windows versão 22.0 (IBM Corp. Armonk, NY).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A composição microbiana dos biofilmes de microcosmos derivados da saliva e da placa dental mostrou níveis similares de bactérias ácido-tolerantes ($p = 0.699$; $p = 0.525$), lactobacilos ($p = 0.084$; $p = 0.100$), estreptococos do grupo mutans ($p = 0.399$; $p = 0.267$) e microrganismos anaeróbicos totais ($p = 0.275$; $p = 0.596$), após 10 dias de crescimento sob desafio cariogênico, considerando o tipo de inóculo e status de cárie dos indivíduos, respectivamente. Ao se analisar os resultados do baseline, ou seja da amostra inicial que originou os biofilmes, diferenças foram observadas quanto ao tipo e fonte do inóculo. A placa dental coletada de sítios com lesões ativas de cárie demonstrou maiores níveis de bactérias ácido-tolerantes e estreptococos do grupo mutans se comparado à superfícies saudáveis, o que vai de encontro à um estudo prévio que relatou a diferença entre sítios (SVENSATER et al., 2003).

Embora diferenças tenham sido encontradas no baseline, as mesmas desapareceram quando submetidas à condições padronizadas. O alto desafio cariogênico do modelo favoreceu o crescimento de bactérias capazes de sobreviver em ambientes ácidos, confirmando a Hipótese da Placa Ecológica (MARSH, 2005). A exposição sucessiva a sacarose, ao provocar a queda no pH, promovendo a desmineralização da superfície dental (LEE et al, 2013), reflete a acidogenicidade do biofilme resultando na perda mineral (van de SANDE et al., 2011), como vista no presente estudo, onde se obteve uma perda mineral de

superfície de 92% e 90% quando a placa dental foi usada como inóculo, e de 90% e 92% quando a saliva foi usada como inóculo, de amostras de indivíduos cárie-ativos e livres de cáries, respectivamente.

Nesse estudo, foi visualizado um aumento nos níveis de bactérias ácido-tolerantes ao se comparar o baseline com o biofilme desenvolvido, sendo encontrada correlação positiva entre a contagem de bactérias ácido-tolerantes e desmineralização dental. Não foram encontradas diferenças no potencial cariogênico dos biofilmes, apesar da fonte ou tipo de inóculo. Sob condições padronizadas *in vitro*, a composição da comunidade microbiana estará associada às características do “novo ambiente”, onde fatores como a natureza do substrato, meio nutritivo, e disponibilidade de oxigênio irão promover mudanças bacterianas ao longo do tempo (TANG et al., 2003).

Assim, mesmo que a placa dental seja retirada de superfícies específicas, uma vez que será inoculada sobre superfícies similares e receba iguais condições, as pressões ecológicas presentes no sítio original não estarão mais presentes. Futuros estudos ainda se fazem necessários para esclarecer a influência da fonte do inóculo na resposta cariogênica de biofilmes desenvolvidos em sistemas de fluxo contínuo, já que esses sistemas conseguem se aproximar mais de situações reais, devido ao controle da taxa de fluxo e da disponibilidade de sacarose.

4. CONCLUSÕES

Dentro das limitações do presente estudo, pode-se concluir que o potencial cariogênico dos biofilmes desenvolvidos em um modelo de biofilme de microcosmos, sob condições padronizadas (exposição à sacarose), é similar, independentemente do tipo e fonte do inóculo.

No entanto, futuros estudos devem ser conduzidos com o objetivo de avaliar a influência da fonte do inóculo na resposta cariogênica em sistemas de fluxo contínuo, os quais permitem o controle da taxa de fluxo e disponibilidade de sacarose, mimetizando assim, de forma mais próxima, o ambiente oral.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

FILOCHE, S. K.; SOMA, K. J.; SISSONS, C. H. Caries-related plaque microcosm biofilms developed in microplates. **Oral Microbiology and Immunology**, v.22, n.2, p.73-79, 2007.

FILOCHE, S. K.; SOMA, D.; VAN BEKKUM, M.; SISSONS, C. H. Plaques from different individuals yield different microbiota responses to oral-antiseptic treatment. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.54, n.1, p.27-36, 2008.

LEE, E. S.; KANG, S. M.; KO, H. Y.; KWON, H. K.; KIM, B. I. Association between the cariogenicity of a dental microcosm biofilm and its red fluorescence detected by Quantitative Light-induced Fluorescence-Digital (QLF-D). **Journal of Dentistry**, v.41, n.12, p.1264-1270, 2013.

TANG, G.; YIP, H. K.; CUTRESS, T. W.; SAMARANAYAKE, L. P. Artificial mouth model systems and their contribution to caries research: a review. **Journal of Dentistry**, v.31, n.3, p.161-171, 2003.

RUDNEY, J. D.; CHEN, P.; LENTON, J.; LI, J.; LI, Y.; JONES, R. S.; REILLY, C.; FOK, A. S.; APARICIO, C. A reproducible oral microcosm biofilm model for testing dental materials. **Journal of Applied Microbiology**, v.113, n.6, p.1540-1553, 2012.

VAN DE SANDE, F. H.; AZEVEDO, M. S.; LUND, R. G.; HUYSMANS, M. C.; CENCI, M. S. An in vitro biofilm model for enamel demineralization and antimicrobial dose-response studies. **Biofouling**, v.27, n.9, p.1057-1063, 2011.