

UM MODELO DE BIOFILME *IN VITRO* PARA ESTUDOS DE DOSE-RESPOSTA ANTIMICROBIANA E MINERAL EM UM SIMULADOR MULTIFUNCIONAL DE CAVIDADE ORAL

TAMIRES TIMM MASKE¹; KATIELLE VALENTE BRAUNER²; LEINA NAKANISHI³; FRANÇOISE HÉLÈNE VAN DE SANDE⁴; RODRIGO ALEX ARTHUR⁵; MAXIMILIANO SÉRGIO CENCI⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – tamirestmaske@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – katiellevb@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – leinaa_@gmail.com

⁴IMED Faculdade Meridional – fvandesande@gmail.com

⁵Universidade Federal do Rio Grande do Sul – rodrigoarthur.ufrgs@gmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas – cencims@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A cavidade oral é um ambiente complexo onde comunidades de biofilme são naturalmente formadas. A variabilidade inerente a composição microbiana e as características fisiológicas do ambiente bucal juntamente com as questões éticas associadas aos estudos clínicos fazem com essa condição experimental seja difícil de ser investigada *in vivo*. Assim, o desenvolvimento de modelos laboratoriais que permitam a formação de biofilme sobre condições controladas tem sido úteis para simular o ambiente oral *in vitro* e para estudar os processos naturais de formação de biofilme e o desenvolvimento de lesões de cárie (MCBAIN, 2009; TANG et al. 2003).

Modelos de biofilme laboratoriais complexos ou simplificados desenvolvidos a partir de monocultura, consórcios de espécies definidas ou por microcosmos tem sido usados para produzir biofilme cariogênico ou lesões cariosas usando diferentes dispositivos. Destaca-se a utilização de microplacas, *Constant Depth Film Ferment* (CDFF), quemostatos, células ou câmaras de fluxo e bocas artificiais com diferentes configurações (TANG et al. 2003). A escolha por um modelo microbiológico *in vitro* para estudar o desenvolvimento de cáries artificiais depende da preferência do pesquisador, da facilidade logística e da questão que precisa ser respondida (MCBAIN, 2009).

Modelos de microplacas parecem ser uma alternativa adequada para obtenção de resultados de uma maneira rápida e quando diversas condições experimentais precisam ser respondidas ao mesmo tempo. Modelos mais complexos permitem o crescimento de biofilme por longas semanas e podem levar a resultados mais próximos ao ambiente oral uma vez que visam simular condições fisiológicas e dinâmicas que ocorrem nesse ambiente como fluxo salivar, oscilações de pH e forças de cisalhamento que podem influenciar a adesão microbiana. No entanto, modelos desse tipo requerem o uso de equipamentos sofisticados e não permitem o crescimento de biofilme de forma independente, necessitando mais de uma rodada de experimentos, com exceção de alguns modelos de bocas artificiais.

Aparatos representando bocas artificiais existentes até o momento possuem uma montagem complexa e não são compactos em sua utilização. Assim, o objetivo do estudo foi desenvolver e validar um modelo de biofilme laboratorial complexo que permita crescimento de biofilme independente, com montagem simplificada, compacto, e que permita rodadas simultâneas para testar a mesma condição. Objetivos específicos foram avaliar a desmineralização do esmalte em resposta a condições cariogênicas e validar o modelo através da avaliação da dose-resposta a clorexidina.

2. METODOLOGIA

Simulador Multifuncional de Cavidade Oral (MOCS)

O simulador consiste em uma câmara de cultura em aço inox acoplada a uma estufa microbiológica ($37\pm 2^{\circ}\text{C}$). No interior da câmara existem 10 unidades independentes para acomodação de amostras. Cada unidade possui um dispositivo removível para inserção de até 5 amostras e possuem recessões específicas que permitem o direcionamento do fluxo sobre as amostras. O simulador mimetiza o ambiente controlado de oxigênio através de suplementação de gás de anaerobiose. Três *inlets* individuais são localizados sobre cada uma das unidades independentes e permitem a inserção de inóculo, meio de cultura e sacarose ao sistema. Tubos de silicones estéreis partem de reservatórios (sacarose e meio), atravessam um sistema de bombas de infusão controladas por software, chegam aos *inlets* e são direcionados para as unidades independentes. Assim, as soluções chegam até as amostras e caem no interior da câmara, sendo então direcionadas para um reservatório de resíduos.

Delineamento Experimental

A MOCS foi estabelecida para o crescimento de biofilme cariogênico e lesões de cárie artificial. Saliva humana foi usada como inóculo e esmalte bovino como substrato. Meio enriquecido e definido de mucina (DMM) foi usado para o crescimento do biofilme (WONG e SISSONS, 2011). Dois experimentos independentes (Estudo 1- E1 e Estudo 2 - E2) foram realizados para estabelecer as condições experimentais para o modelo de biofilme a ser desenvolvido. Biofilmes foram crescidos por até 21 dias sobre 2 condições de crescimento. O modelo de biofilme foi testado com soluções de clorexidina (CLX; $n=10$): 0,012; 0,03; 0,06 e 0,12% para validação dose-resposta (Estudo 3- E3). Para todos estudos mencionados acima, as variáveis de resposta foram determinadas por porcentagem de perda de dureza superficial (%PDS) e contagem microbiológica (UFC/mg biofilm). Para E1 e E2, perda mineral integrada do esmalte foi também avaliada através do teste de dureza transversal.

Preparação das amostras

Discos padronizados foram obtidos de esmalte bovino. Foi realizado a avaliação inicial da dureza superficial (D1) através de 3 endentações realizadas no centro do disco e espaçadas 100 μm cada, usando um microedentador knoop (50 g por 5 s). Os discos foram fixados em holders de fios ortodônticos e recobertos com esmalte de unha ao redor das paredes laterais e em sua base, deixando a porção de esmalte dental superficial exposta. As amostras foram então colocadas nos dispositivos removíveis e acopladas nas unidades independentes da câmara de cultura, o qual foi esterelizado em autoclave (121°C for 15 min).

Coleta da saliva, inoculação do sistema e crescimento do biofilme e tratamentos com CLX

Doze ml de saliva foi coletada de um voluntário saudável que se absteve de higiene oral por 24h antes da coleta, e foi adicionada a 240 ml de DMM. Após homogeneização da solução, 21 ml da mesma foram injetados em cada unidade independente através do inlet específico. Após 1 hora da inoculação, o DMM começou a ser adicionado ao sistema numa taxa de fluxo de 0,04 ou 0,06 ml/min (E1 e E2 respectivamente). Os pulsos de sacarose começaram 2h depois do

DMM para o E1 (10% sacarose, 1,2 ml/min, 5 min de exposição, 5x por dia a cada 2h) e 8h depois para E2 (5% sacarose, 0.25ml/min, 6 min de exposição, 3x por dia a cada 8h). Os experimentos foram realizados por até 21 dias e amostras de biofilme e esmalte foram coletadas depois de 4, 7, 14 ou 21 dias. Para o E3, biofilmes foram crescidos por 7 dias com mesmo protocolo utilizado no E2. O tratamento com CLX (5ml) por 1 minuto foi realizado após 24h de crescimento do biofilme por 2x diárias (12 horas de intervalo). Para todos os experimentos os biofilmes foram mantidos em anaerobiose.

Avaliação microbiológica e mineral

Depois do processo de inoculação dos E1 e E2, uma alíquota de saliva foi dispersada em vortex, serialmente diluída em solução salina e cultivada em Ágar Sangue, BHI 4.8, Rogosa e MSB para contagem microbilógica inicial (baseline) de microorganismos totais (MT), acidúricos totais (AT), lactobacilos (L) e estreptococos do grupo mutans (EGM). Para coleta dos discos de esmalte e do biofilme, a câmara de cultura foi assepticamente aberta e amostras coletadas. Biofilmes foram coletados da superfície do disco, colocados em eppendorfs pré-pesados e seu peso determinado. Solução salina (1ml) foi adicionado a cada eppendorf e os biofilmes foram dispersos por vortex e sonicados (30w, 20s). A solução foi seriamente diluída e cultivada nos meios de cultura mencionados acima. Para o E3 somente MT e EGM foram cultivados para dose-resposta às soluções de CLX.

Após coleta de biofilme, os discos de esmalte foram novamente analisados quando a sua dureza superficial (D2). A %PDS foi calculada pela fórmula: $\%PDS = 100(D2-D1)/D1$, onde D1 é a dureza inicial e D2 a final (CURY et al. 2000). Depois do teste de dureza superficial foi realizada a análise dureza transversal para determinar a perda de dureza integrada (ΔS). Assim, os discos foram central e transversalmente seccionados. Metade do disco foi embebido em resina acrílica e após polimento foram feitas duas colunas de edentações com profundidades de 10, 20, 30, 40, 50, 100, 150, and 200 μm a partir da superfície do esmalte. A perdamineral integrada foi calculada subtraindo o perfil de dureza com lesões de cárie do perfil de esmalte hígido.

Análise estatística

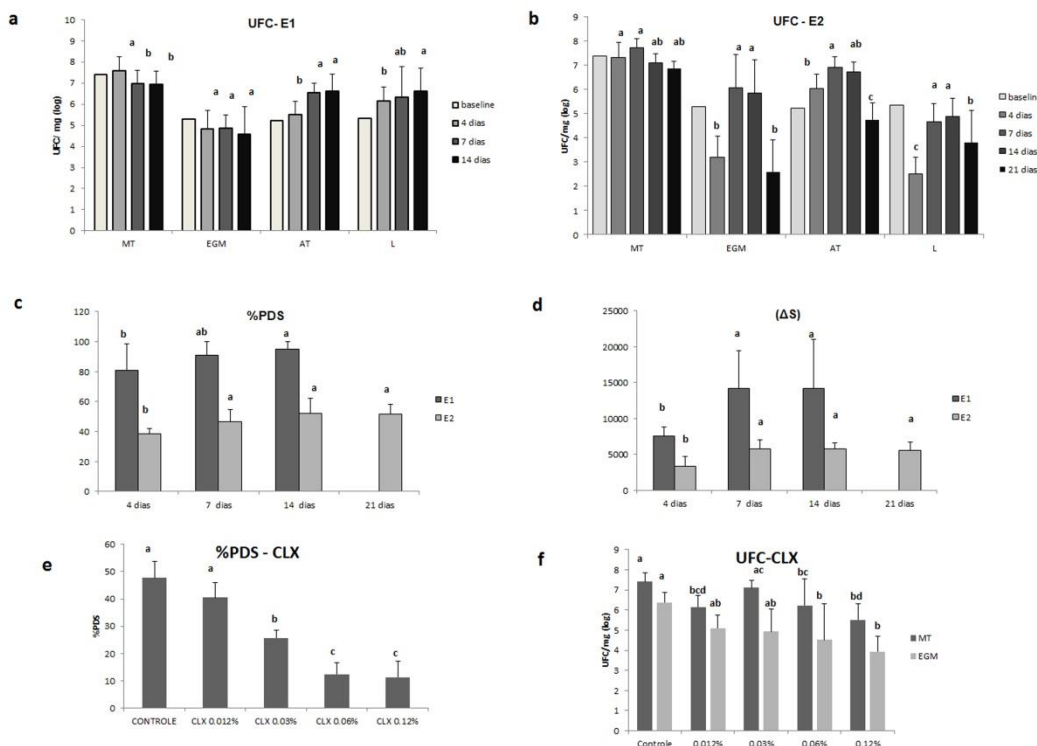
Para E1, E2 e E3, os dados de %PDS, ΔS , e microbiológicos foram analisados com ANOVA de uma via seguido de Teste Tukey. Correlação entre a dose-resposta das concentrações de CLX, %PDS e contagem de MT e EGM foi estimada por Correlação de Pearson. Teste T foi usado para comparar os valores de %PDS e dados microbiológicos do grupo controle (E3) para avaliação da reprodutibilidade. Para todos testes o nível de significância foi 5% e o programa estatístico utilizado foi o SigmaStat v.11.0.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Resultados das análises minerais e microbiológicas dos E1, E2 e E3 estão descritos na figura abaixo. Houve correlação significativa entre os valores de %PDS e MT ou EGM ($R=0.50$ e 0.55 , respectivamente). Observou-se que os valores de %PDS e de MT e EGM para o grupo controle do E3 não mostraram diferença significativa dos valores encontrados no E2 aos 7 dias de experimento (Teste T, $p>0.05$). Dados provenientes dos E1, E2 demonstram o desenvolvimento de lesões de cárie artificial, sendo os valores minerais de E2 mais brandos comparados ao E1. Ambos mostraram a seleção de bactérias cariogênicas frente a seus protocolos, de forma semelhante a teoria ecológica da

placa (MARSH, 2003). O modelo de biofilme escolhido demonstrou dose-resposta a CLX. Quanto maior a concentração de CLX, menor a perda mineral. Os valores encontrados no E1, mostrou valores semelhantes a aqueles encontrados em estudos *in situ*, e isso é particularmente importante devido as questões éticas envolvidas nesse tipo de estudo.

Figura 1. Dados minerais (%PDS, ΔS) e microbiológicos (UFC/mg) dos E1, E2 e E3.



Nota: A) UFC para E1; B) UFC para E2; C) %PDS para E1 e E2; D) ΔS para E1 e E2; E) %PDS para concentrações de CLX; F) UFC para concentrações de CLX.

4. CONCLUSÕES

A MOCS permitiu o desenvolvimento de biofilme de microcosmos e o modelo de biofilme proposto nesse dispositivo mostrou validação dose-resposta e reprodutibilidade.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- MARSH PD: Are dental diseases examples of ecological catastrophes? **Microbiology**, v.149, p.279-294, 2003.
- MCBAIN, A. J: Chapter 4: In vitro biofilm models: an overview. **Adv Appl Microbiol**, v.69, p. 99-132, 2009.
- WONG, L.; Sissons, C. A comparison of human dental plaque microcosm biofilms grown in an undefined medium and a chemically defined artificial saliva. **Arch Oral Biol**, v.46, n.6, p.477-86, 2001.
- TANG G, YIP HK, CUTRESS TW, SAMARANAYAKE LP. 2003. Artificial mouth model systems and their contribution to caries research: a review. **Journal of dentistry** 31:161-17