

CARACTERIZAÇÃO DE BIOFILMES ORAIS FORMADOS *IN SITU* NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE CLOREXIDINA

KATIELLE VALENTE BRAUNER¹; TAMIRES TIMM MASKE²; CÁCIA SIGNORI³;
RODRIGO ALEX ARTHUR⁴; MAXIMILIANO SERGIO CENCI⁵

¹Universidade Federal de Pelotas – katiellevb@gmail.com

² Universidade Federal de Pelotas – tamiresmaske@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – caciasignori@gmail.com

⁴Universidade Federal do Rio Grande do Sul - rodrigoarthur.ufrgs@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – cencims@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A Cárie dentária é considerada uma das doenças orais mais comuns em seres humanos (SELWITZ et al., 2007), e resulta de um desequilíbrio da atividade metabólica do biofilme (NYVAD et al., 2013). A presença de placa cariogênica tem sido considerada como causa direta para o desenvolvimento de lesões de cárie e resulta de um elevado nível de microrganismos patogênicos. (MARSH, 2006). Os microrganismos são selecionados no biofilme pelo ambiente ácido criado pela fermentação do açúcar, porém o efeito dos polissacarídeos extracelulares nas contagens de bactérias cariogênicas não é totalmente claro (TENUTA et al., 2006), por isso, métodos moleculares têm apresentado dimensões novas e estimulantes para o estudo e compreensão da microbiologia, patogenicidade e interações bacterianas.

Modelos *in vitro* e *in situ* têm tentado mimetizar a formação de biofilme e consequente processo de desenvolvimento de cárie em um ambiente mais controlado, uma vez que o estudo das variáveis relacionadas a cárie dentária em estudos *in vivo* traz consigo a complexidade relacionada a doença e as dificuldades inerentes a questões éticas (MCBAIN, 2009). Com isso, o objetivo desse trabalho foi avaliar e caracterizar as respostas microbiológicas, minerais e moleculares de biofilmes desenvolvidos *in situ* na presença e ausência de clorexidina 0,12%.

2. METODOLOGIA

2.1 Estudo piloto

Foi realizado um estudo piloto para analisar como deveria ser o comportamento dos microrganismos frente à aplicação de clorexidina 0,12%. Para isso, foi coletado 1ml de saliva de 5 voluntários, 3 deles participantes do estudo *in situ*, antes da aplicação de clorexidina (baseline), 10 minutos, uma hora e 12

horas depois de um bochecho durante 1 minuto com 15 ml de clorexidina 0,12%. Todas as coletas foram diluídas em NaCl a 0,9% e diluições seriadas foram inoculadas em duplicata nos mesmos meios de cultura que seriam utilizados para o estudo *in situ*: Ágar Sangue para cultivo da microbiota anaeróbica total; Ágar Mitis Salivarius Bacitracina (MSB), para contagem de *Estreptococos mutans*, Ágar Rogosa para contagem de lactobacilos, e Brain Heart Infusion Ágar (BHI) para contagem de acidúricos totais. As placas foram incubadas em anaerobiose por 96h. As unidades formadoras de colônia (UFC) foram quantificadas e os resultados expressos como UFC/ml de saliva.

2.2 Delineamento experimental

O estudo *in situ* foi randomizado, duplo-cego e do tipo boca-dividida, no qual amostras de esmalte dental bovino foram submetidos a tratamentos em dois níveis: sacarose 20% 8x/dia (grupo controle), e sacarose 20% 8x/dia em associação a aplicação de clorexidina 0,12%, 2x/dia (grupo teste). Os discos foram inseridos em pequenas recessões presentes nos dispositivos intraorais palatinos, confeccionados com resina acrílica quimicamente ativável, e recobertos com tela plástica, o que permitiu que todo o biofilme formado sobre os blocos de esmalte dental permanecesse estagnado na superfície do bloco. Cada dispositivo intraoral continha 8 amostras de esmalte dental do lado direito e 8 discos no lado esquerdo. O tempo experimental do estudo foi de 21 dias e o biofilme formado sobre os discos de esmaltes foram coletados após 14 e 21 dias de formação para ambos os grupos experimentais (n= 4 discos/ dia de coleta/ tratamento).

2.3 Coleta do biofilme

Pelo menos $1,0 \pm 0,01$ mg de biofilme úmido foi coletado para análise microbiológica, essas amostras foram suspensas em 1 ml de solução de NaCl a 0,9% e sonicadas em 7 W por 60 s para análise microbiológica. Para a análise da expressão gênica, parte do biofilme remanescente do recesso correspondente foi coletado e mantido em solução *RNAlater* (Ambion, Austin, ex., EUA), para preservação da integridade do RNA. As amostras de esmalte foram removidas dos recessos e armazenadas em ambiente úmido para posteriores análises. O dispositivo palatino teve os recessos da coleta recobertos por cera utilidade e foi novamente entregue ao voluntário.

2.4 Análise microbiológica

Foi realizado o mesmo procedimento do estudo piloto, porém dessa vez ao invés de inocular a saliva, foi inoculado o biofilme formado no aparelho.

2.5 Extração de RNA e PCR Quantitativo em Tempo Real (RT-PCR)

As extração de RNA foi realizada de acordo com Cury e Koo (2007) e modificações de Aires et al. (2008). Foi realizado RT-PCR para avaliar a expressão dos genes *ftf*, e *vicX*. Para isso, RNA e *primers* específicos para cada um dos genes foram utilizados para gerar o c-DNA (kit de síntese de cDNA iScript, Bio-Rad Laboratories, CA, EUA). Os cDNAs resultantes foram amplificados por um sistema de detecção em tempo real de PCR usando o SYBR Green Supermix (Bio-Rad Laboratories, Inc., na Califórnia, EUA) e *primers* específicos para os mesmos genes (Tabela 1). O número total de cDNA foi normalizado, utilizando gene *S. mutans* específico 16S rRNA (Koo et al., 2006).

2.6 Análise da perda mineral

Após cada período experimental, os discos (n=2/grupo) foram coletados e seccionados longitudinalmente a partir do centro de cada disco, embutidos em resina acrílica e polidos para determinar a microdureza de secção transversal (MST). Esta determinação foi realizada de acordo com Cury et al. (2000), nas indentações de 10, 20, 30, 40, 50, 100, 150, e 200 μm de distância da superfície externa do esmalte. Os valores de MST foram utilizados para o cálculo da área integrada de desmineralização (ΔS) para cada tratamento. As análises foram realizadas em duplicata com um microdorômetro Future-Tech FM acoplado a um endentador Knoop. As indentações foram realizadas com cargas de 50g por 5s.

2.7 Análise Estatística

Os dados foram através do teste de ANOVA de duas vias, seguida pelo teste de Tukey. Para todos os testes, $p<0.05$ foi considerado como significante.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em relação ao estudo piloto, com exceção do grupo *S. mutans* ($p=0,001$), nenhum outro microrganismo apresentou diferença estatística entre baseline e tempos após aplicação de CLX. E no estudo *in situ*, não houve diferença estatística entre nenhum grupo de microrganismos frente ao tratamento com CLX ($p>0.05$).

Sobre a análise de perda mineral integrada do esmalte (ΔS) houve diferença estatística para os tempos experimentais ($P =0.038$), o grupo sacarose apresentou maiores valores de ΔS em 21 dias comparado aos 14 dias. Houve diferença significante para os tratamentos ($P<0.001$). CLX apresentou menores valores de ΔS ao 14 e 21 dias.

A expressão gênica demonstrou que o gene *VicR* não apresentou diferença nem em relação ao tempo ($p=0,3224$) nem ao tratamento ($p=0,0753$). Já o gene *ftf*, apresentou maiores valores de sacarose aos 21 dias ($p>0,05$), e para CLX, a expressão do gene não mostrou diferença significativa entre os tempos. Além disso, o gene *ftf* foi mais expresso no grupo da sacarose. O teste mostrou que houve influência do tempo ($p=0,0015$) e do tratamento ($p<0,0001$) na expressão deste gene.

O uso de CLX 0,12%, de forma geral, mostrou ser eficiente para a redução de cárie, quando utilizada de modo contínuo. Isso pode ter ocorrido devido a diminuição da expressão de genes ligados, principalmente, à adesão de *S. mutans*, tendo em vista que a recolonização de microrganismos voltava a ocorrer antes de cada nova aplicação de CLX. Porém, novos estudos devem ser feitos a fim de provar a interferência de antimicrobianos na expressão de genes virulentos, e que assim, diminuam a incidência de patogêneses no ambiente oral.

4. CONCLUSÕES

Dentro das limitações do estudo, o uso de clorexidina 0,12% não apresentou diferença na redução de microrganismos depois de 12 horas, porém, houve efetividade na redução de cárie no esmalte, e do gene virulento *ftf*, relacionado ao biofilme.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CURY JA and KOO H. Extraction and purification of total RNA from *S. mutans* biofilms. **Anal Biochem.** 365:208-214 (2007)
2. NYVAD B, Crielaard W, Mira A, Takahashi N, Beighton D. Dental caries from a molecular microbiological perspective. **Caries Research.** 47:89–102 (2013)
3. TENUTA LMA, Ricomini Filho AP, Del Bel Cury AA, Cury JA. Effect of sucrose on the selection of mutans Streptococci and Lactobacilli in dental biofilm formed in situ. **Caries Research.** 40:546–549 (2013)
4. MBBAIN, AJ. Chapter 4: In vitro biofilm models: an overview. **Adv Appl Microbiol.** 69:99-132 (2009)
5. Selwitz RH, Ismail AI, Pitts NB. Dental caries. **Lancet.** 6;369(9555):51-9 (2007)
6. MARSH, PD. Dental plaque as a biofilm and a microbial community – implications for health and disease. **BMC Oral Health.** 6(Suppl 1):S14 (2006)