

VALIDAÇÃO IN SITU DE MODELO DE BIOFILME DE MICROCOOSMOS PARA A FORMAÇÃO DE LESÕES DE CÁRIE SECUNDÁRIA

THAIS MAZZETTI¹; TAMIRES TIMM MASKE²; NICOLIEN KUPER³; MARIE-CHARLOTTE HUYSMANS⁴; MAXIMILIANO SERGIO CENCI⁵

¹Universidade Federal de Pelotas – thmazzetti@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – tamiresmaske@gmail.com

³Radboud Universiteit – nicolien.kuper@radboudumc.nl

⁴Radboud Universiteit – marie-charlotte.huysmans@radboudumc.nl

⁵Universidade Federal de Pelotas – cencims@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A cárie dentária é considerada uma das doenças mais prevalentes da cavidade bucal (Selwitz et al. 2007; Kassem et al. 2015) e em decorrência disso, os fatores relacionados ao seu desenvolvimento vêm sendo amplamente estudados. Por questões éticas, a cárie dentária tem sido estudada através de estudos laboratoriais ou através de estudos *in situ*.

Modelos microbianos simplificados ou complexos *in vitro* têm sido utilizados para produzir lesões de cárie artificiais e estudar os fatores relacionados a seu desenvolvimento (Filoche et al. 2007; Ccahuana-Vásquez e Cury 2010; van de Sande et al. 2011). Esses modelos laboratoriais permitem o desenvolvimento de lesões de cárie através da formação de biofilmes cariogênicos em condições controladas e com condições semelhantes a cavidade bucal. Modelos *in situ*, por sua vez, são considerados uma ponte entre a situação clínica e os estudos altamente controlados de laboratório. Nesses modelos, voluntários usam dispositivos contendo substrato dentário para formação de lesões artificiais de cárie através da formação de biofilme *in loco* (Zero, 1995).

Quando modelos laboratoriais são usados para estudar o desenvolvimento das lesões de cárie dentária, é necessário que esses tenham sido validados através de avaliações de dose-resposta a antimicrobianos ou a soluções anticáries e de reprodutibilidade. Além disso, os modelos laboratoriais deveriam ter respostas semelhantes aos modelos *in situ* que são aqueles mais próximos da realidade clínica e representam modelos de teste pré-clínicos (Maske et al. 2017).

Diante do exposto, o presente estudo tem o objetivo validar um modelo de biofilme de microcosmos através da sua comparação com um modelo de biofilme *in situ* para a formação de lesões de cárie secundária.

2. METODOLOGIA

Dois estudos independentes foram realizados *in situ* e *in vitro* para avaliar o desenvolvimento de lesões de cárie secundária em interfaces dente-resina composta com gaps de 30, 60 e 90 µm ou com interfaces contendo sistema adesivo (B) ou não (NB).

2.1 Formação de biofilme *in situ*

Para o estudo *in situ*, 16 voluntários com boa saúde geral e bucal (média de 28,4 anos) foram selecionados dentro do campus da universidade de Radboud (Nijmegen, Países Baixos). Após assinatura de um termo livre e esclarecido (CMO code NL 56622.091.16), os voluntários usaram um dispositivo oclusal

modificado contendo amostras de restaurações com as condições de interface descritas acima por 21 dias. Os dispositivos oclusais foram submetidos a um regime de sacarose 20% (8x/dia) durante 10 minutos e expostos ao dentífrico contendo flúor (1x/dia por 2 min).

2.2 Formação de biofilme *in vitro*

Para o estudo laboratorial, as amostras de restaurações com as condições mencionadas (30, 60, 90 µm, B e NB) foram acomodadas individualmente em placas de 24 micro-poços e inoculados com saliva. Após 1 h (37°C), um meio definido enriquecido com mucina (DMM) com sacarose à 1% foi adicionado sobre as amostras e estas foram incubadas em estufa microbiológica por 6 h. Subsequentemente, as amostras foram lavadas em solução salina estéril e novamente incubados em DMM sem sacarose, por 18 h. Esse protocolo foi seguido por 14 dias.

2.3 Desfecho para a cárie dentária e análise estatística

A variável de análise para a cárie dentária foi a perda mineral (PM) para ambos os estudos. As amostras provenientes dos estudos foram analisadas através de TWIM (Microrradiografia de Onda Transversal Independente). Os dados de ambos os estudos foram comparados utilizando correlação de Pearson e através de modelos de regressão linear ($p < 0,05$).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A tabela 1 descreve os valores de perda mineral (PM; µm.vol%) para as lesões de cárie secundária considerando as condições de interface no estudo in situ.

Tabela 1. Valores de perda mineral (PM) considerando as condições de interface avaliadas nos voluntários.

Condições de interface	Lesão de Parede	
	Média ± SD	PM (µm.vol%)
B		16.6 ± 451.3
NB		196.5 ± 327.3
30 µm		904.1 ± 658.0
60 µm		1289.3 ± 1113.5
90 µm		1483.9 ± 1399.5

Nota: B [n= 14] / NB [n=13] / 30, 60 e 90 µm [n= 15].

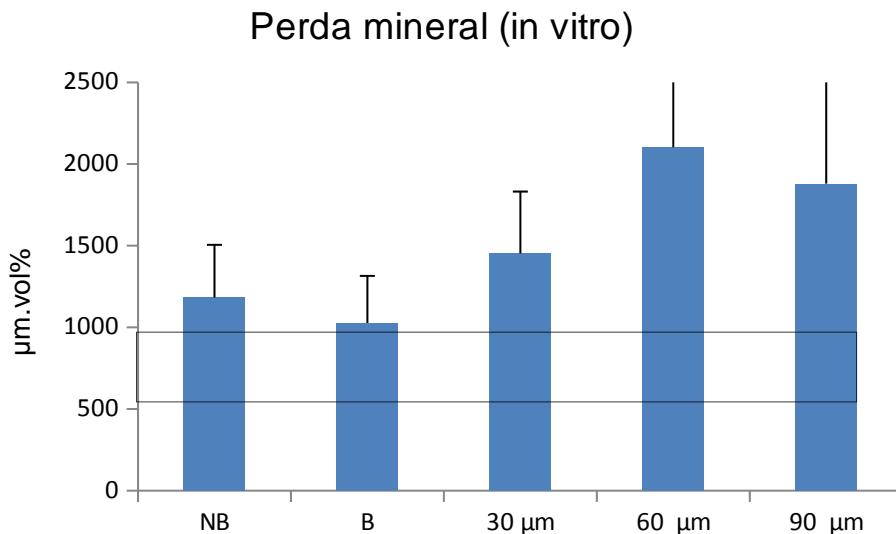


Figura 1. Valores de perda mineral (PM) para as condições de interface avaliadas. O retângulo representa os valores do substrato hígido.

A figura 1 representa os valores para PM para as condições avaliadas no estudo in vitro. É possível notar que em ambos os estudos as lesões de cárie secundária foram formadas quando gaps maiores do que 30 μm estavam presentes. Quando os dados de PM dos dois modelos são comparados entre si existe uma correlação significativa entre eles ($R^2 > 0,43$). Sendo assim, parece que os modelo de microcosmos avaliado se comporta de forma semelhante ao modelo in situ frente ao desenvolvimento de lesões de cárie secundária.

Tabela 2. Resultados das regressões lineares para os dois modelos de biofilme considerando os valores de PM (μm.vol%).

Variáveis	In vitro ($r^2=0.4$)	In situ ($r^2= 0.4$)		
	Efeito	Valor de p	Efeito	Valor de p
Constante	1026.6	0.000	-44.4	0.913
NB	155.5	0.529	208.6	0.718
30 μm	425.4	0.091	1065.8	0.071
60 μm	1075.6	0.000	2080.5	0.001
90 μm	852.7	0.001	1825.8	0.002

Nota: grupo B é o grupo de comparação.

É possível também notar que em ambos os modelos, as condições B e NB não permitiram a formação de lesões de cárie secundária. As análises de regressão lineares (tabela 2) que visam demonstrar o comportamento dos dados nos dois estudos, mostraram que ambos os modelos de biofilme parecem se comportar da mesma maneira para o desenvolvimento das lesões de cárie secundária, com exceção de que no modelo in situ as lesões pareceram ser maiores do que no modelo in vitro. Isso poderia ser explicado pela configuração e protocolos usados nos dois modelos. O estudo in situ utilizou-se de um desafio cariogênico mais severo do que aquele usado para o estudo in vitro. Além disso, o estudo in situ teve uma maior duração.

4. CONCLUSÕES

Ambos modelos de biofilme foram capazes de desenvolver lesões de cárie secundária. O modelo de biofilme de microcosmos foi capaz de reproduzir resultados semelhantes aos encontrados no modelo *in situ*.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CCAHUANA-VÁSQUEZ, R.A.; CURY, J.A. S. mutans biofilm model to evaluate antimicrobial substances and enamel demineralization. **Brazilian Oral Research**, v.24, p. 135-141, 2010.
- FILOCHE, S.K.; SOMA, K.J.; SISSONS, C.H. Caries-related plaque microcosm biofilms developed in microplates, **Oral Microbiology Immunology**, New Zealand, v.22, n.2, p.73-79, 2007.
- KASSEBAUM, N.J.; BERNABÉ, E.; DAHIYA, M.; BHANDARI, B.; MURRAY, C.J.; MARCENES, W. Global burden of untreated caries: a systematic review and metaregression. **Journal of Dental Research**, Michigan, v.94, p. 650-658, 2015.
- MASKE, T.T., VAN DE SANDE, F.H., ARTHUR, R.A., HUYSMANS, M.C.D.N.J.M., CENCI, M.S. In vitro biofilm models to study dental caries: a systematic review. **Biofouling**, London, v.33, n.8, p. 661-675, 2017.
- SELWITZ, R.H.; ISMAIL, A.I.; PITTS, N.B. Dental caries. **Lancet**, Reino Unido, v.369, n.9555, p.51-59, 2007.
- VAN DE SANDE, F.H.; AZEVEDO MS, LUND RG, HUYSMANS MC, CENCI MS. An in vitro biofilm model for enamel demineralization and antimicrobial doseresponse studies. **Biofouling**, London, v.27, p. 1057-1063, 2011.
- ZERO, D.T. In situ caries models. **Advances in Dental Research**, v.9, n.3, p. 214-230, 1995.