

## DESENVOLVIMENTO DE UM MODELO DE BIOFILME DE MICROCOSMOS PARA ESTUDOS DE DESMINERALIZAÇÃO DO ESMALTE

**VAN DE SANDE, Françoise Hélène<sup>1</sup>**

**AZEVEDO, Marina Sousa<sup>2</sup>**

**MATTIAZZI, Vinícius<sup>3</sup>**

**LUND, Rafael Guerra<sup>4</sup>**

<sup>1</sup> *Doutoranda em Dentística FO-UFPEL. fandesande@gmail.com*

<sup>2</sup> *Doutoranda em Odontopediatria FO-UFPEL. marinasazevedo@hotmail.com*

<sup>3</sup> *Acadêmico de Odontologia FO-UFPEL. vinimattiazz@hotmail.com*

<sup>4</sup> *Doutor em Dentística, Professor de Dentística FO-UFPEL. rafael.lund@gmail.com*

**CENCI, Maximiliano Sérgio<sup>5</sup>**

<sup>5</sup> *Doutor em Cariologia, Professor de Dentística FO-UFPEL. cencims@gmail.com*

### 1 INTRODUÇÃO

Para o estudo de eventos mediados por biofilmes, como ocorre na desmineralização do esmalte sob a placa dentária cariogênica, a utilização de modelos de biofilme permite o delineamento de estudos preliminares à experimentação em voluntários (SISSONS, 1997; GUGGENHEIM *et al.*, 2004; MCBAIN, 2009).

Atualmente vários modelos têm sido desenvolvidos, explorando distintas metodologias e tecnologias (MCBAIN, 2009). Os biofilmes são formados em condições controladas, em sistemas de cultura onde as exposições ao meio nutritivo são disponibilizadas de forma contínua ou intermitente, caracterizando modelos estáticos, semi-dinâmicos e dinâmicos (MCBAIN, 2009).

Para o desenvolvimento de biofilmes em superfícies, como discos de esmalte, os sistemas estático e semi-dinâmico apresentam características que facilitam o desenvolvimento deste tipo de modelo, sendo mais acessíveis para reprodução em diferentes laboratórios. Os biofilmes podem ser formados em placas de micro-poços (GUGGENHEIM *et al.*, 2004; FILOCHE *et al.*, 2007), permitindo seu crescimento de forma individualizada sobre o substrato que for conveniente. Várias condições podem testadas nas placas concomitantemente, e diversos experimentos realizados em um curto período de tempo.

Ainda, a origem e a diversidade das espécies microbiológicas envolvidas variam entre as metodologias desenvolvidas. Os biofilmes podem ser formados a partir de espécies selecionadas ou de microcosmos (MCBAIN, 2009). Estes últimos são biofilmes com comunidades microbianas complexas originadas do ecossistema natural, neste contexto a saliva ou a placa/biofilme dental (WIMPENNY, 1997).

Poucos modelos de biofilmes foram desenvolvidos em placas de micro-poços para avaliar a desmineralização do esmalte sob diferentes exposições a sacarose, sobretudo com biofilmes originados de microcosmos.

O objetivo deste estudo foi desenvolver um modelo de biofilme de microcosmos que possibilitasse detectar diferenças em perda mineral proporcionada por diferentes exposições à sacarose.

## 2 METODOLOGIA

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia (UFPEL) sob parecer N° 076/2009. O voluntário doador de saliva assinou um termo de consentimento livre e esclarecido.

Para construção do modelo, modificações foram realizadas em um modelo previamente descrito (FILOCHE *et al.*, 2007) a fim de adequá-lo para estudos de perda mineral. Os experimentos foram realizados com dois regimes de exposição à sacarose, descritos a seguir e representados esquematicamente (Figura 1).

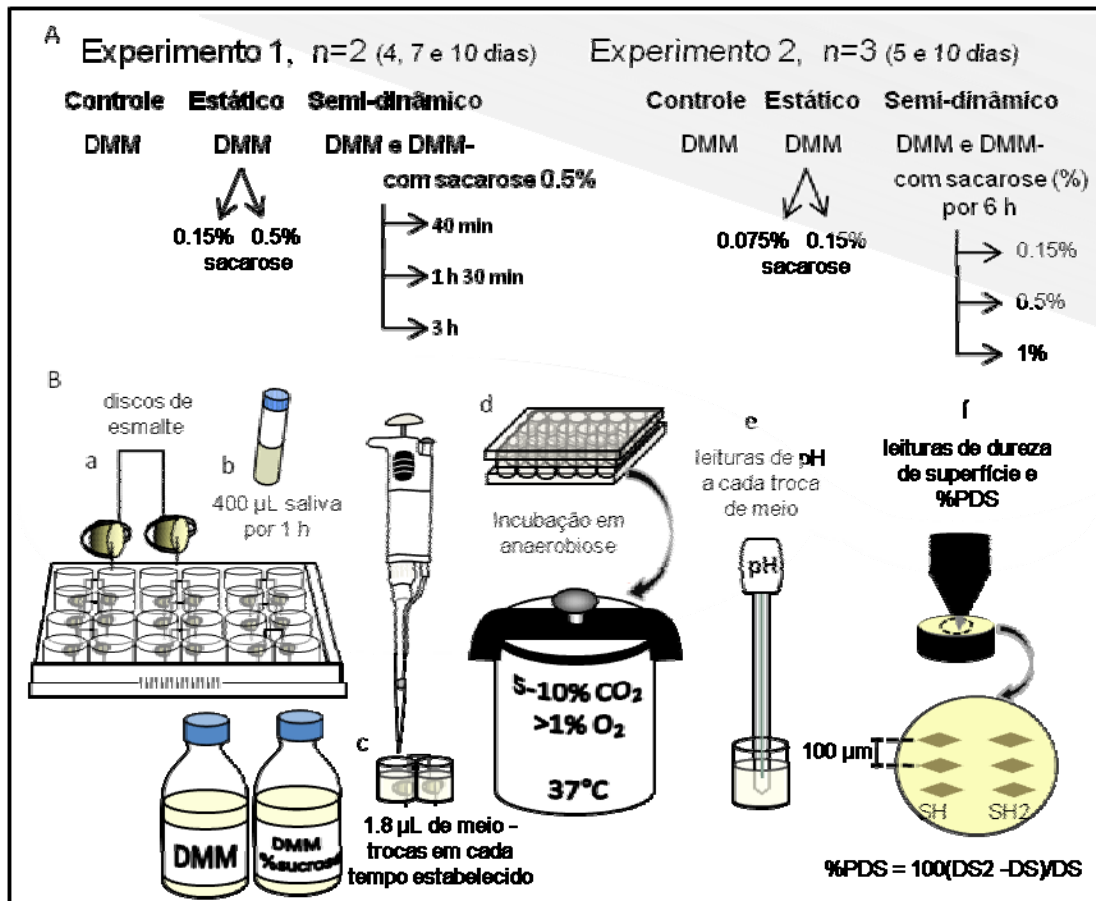


Figura 1. Representação esquemática dos experimentos. A. Condições experimentais realizadas. B. Descrição do protocolo experimental. a. discos de esmalte preparados e suspensos individualmente em cada poço das placas; b. inoculação com 400 µL de saliva sobre cada disco de esmalte por 1 h; c. adição de 1.8 µL de meio em cada poço de acordo com os grupos, e trocas diárias em cada tempo pré-determinado; d. incubação das placas em anaerobiose a 37°C; e. leitura de pH a cada troca de meio; f. leituras de dureza antes dos experimentos (DS) e leituras finais (DS2) após cada tempo, e cálculo da porcentagem de perda de dureza superficial (%PDS).

O estudo foi completamente aleatorizado, e o desenho foi do tipo fatorial para cada variável de estudo (tempo X %sacarose X regime X n) (Figura 1A). Os biofilmes foram formados independentemente em placas de cultura 24 de micro-poços sobre discos de esmalte bovino padronizados (5 mm de diâmetro e 2,5 mm de espessura), tendo como inóculo saliva para obtenção de microcosmos. Em cada experimento, 40 mL de saliva estimulada por filme de parafina foi coletada de um voluntário (sexo feminino, 26 anos) saudável, que não havia estado sob terapia antibiótica por um ano. O meio de cultivo utilizado foi o DMM (pH 6.8) - meio definido enriquecido com

mucina (WONG e SISSONS, 2001). O DMM foi suplementado com sacarose em concentrações que variaram de 0,075 a 1%, sob regimes de exposição constante – modelo estático (ME), ou intermitente – modelo semi-dinâmico (MSD) com exposições de 40 min a 6 h (Figura 1A). O grupo controle recebeu apenas DMM.

Protocolo dos experimentos (Figura 1B) - A saliva foi inoculada em volumes de 400 µL sobre os discos de esmalte suspensos em dispositivos de fio ortodôntico, em placas de 24 micro-poços. Após 1 h em repouso, a saliva foi delicadamente aspirada da base dos poços. 1,8 mL de meio (DMM) com de sacarose foram adicionados em cada poço, e as placas incubadas. Após os tempos determinados, os discos foram enxaguados através de imersão por 10 s, em 2 mL de solução salina estéril, inseridos em uma nova placa contendo DMM, e novamente incubados. As placas foram incubadas em repouso a 37°C, em jarras com geradores de anaerobiose (5-10% CO<sub>2</sub>). As trocas foram realizadas diariamente, até 10 dias.

Foram realizadas avaliações da acidogenicidade dos biofilmes (pH) e da porcentagem de perda de dureza de superfície do esmalte (%PDS) (Figura 1B). As análises foram realizadas com ANOVA de duas entradas e teste Tukey (p=0.05).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Através da avaliação dos dados de pH, foi observado que a acidogenicidade do meio foi influenciada pela concentração de sacarose (Tabela 1); a %PDS do esmalte foi influenciada pela concentração e regime de exposição à sacarose. No ME com 0,075% de sacarose, a %PDS do esmalte foi semelhante ao controle (DMM) (p>0,05; Figura 2). Em concentrações de 0,15 e 0,5% de sacarose os efeitos na %PDS do esmalte foram regime e tempo dependentes. Para 0,15% a %PDS foi significativamente maior no ME do que no MSD (p<0,05; Figura 2). Para 0,5% a %PDS não foi significativa para exposições de até 3 h, mas em 6 h a perda mineral foi significativa (p<0,05; Figura 2) e semelhante à observada para 1% de sacarose (p>0,05; Figura 2).

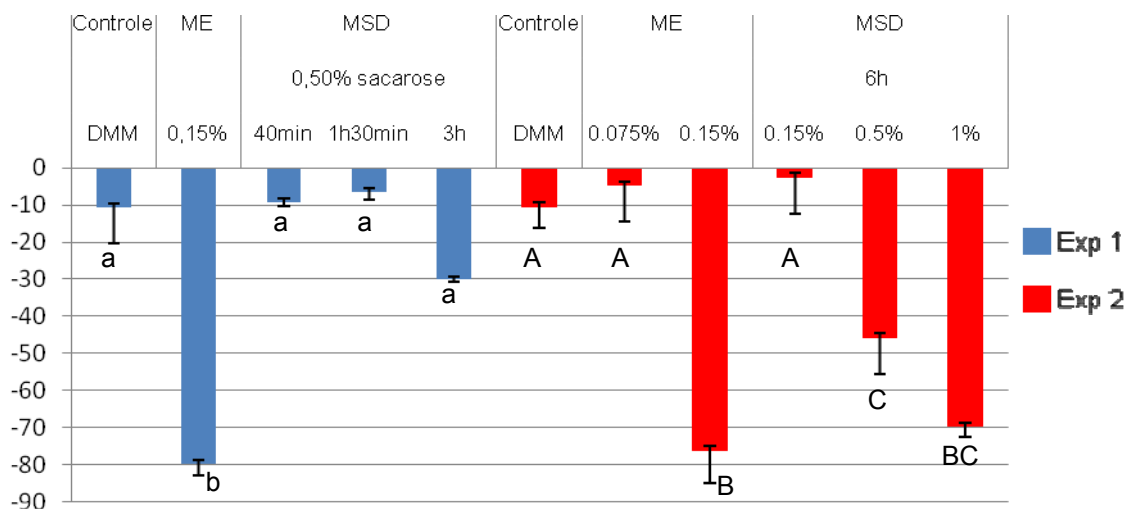


Figura 2. Representação gráfica da %PDS nos grupos, em cada experimento. As barras representam as médias e respectivos desvio-padrão. As comparações foram realizadas em cada experimento, sendo representadas por letras minúsculas no exp 1, e maiúsculas no exp 2. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as condições (p<0,05).

Os regimes estáticos e semi-dinâmicos para suplementação de sacarose, em diversas concentrações, permitiram a observação de diferentes respostas em pH e na perda mineral do esmalte. Cabe salientar que até o presente momento nenhum modelo de biofilme de microcosmos em placas de cultura foi validado para estudos de des e re-mineralização. O modelo desenvolvido se mostra promissor para estudos de desmineralização do esmalte. No entanto, avaliações adicionais devem ser realizadas para verificar se o modelo responde a substâncias antimicrobianas/ anticariogênicas, possibilitando sua utilização em avaliações de potencial anticariogênico de tratamentos.

**Tabela 1. Experimentos 1 e 2. Leituras de pH nos diferentes regimes e controle. Os valores no regime semi-dinâmico referem-se às leituras após a exposição à sacarose.**

	Estático		semi-dinâmico 0,5%			Controle
	0,15%	0,5%	40 min	1 h 30 min	3 h	DMM
<b>4 dias</b>	6,0 ±0,16	4,3 ±0,04	5,4 ±0,34	5,1 ±0,35	4,8 ±0,04	7,5 ±0,15
<b>7 dias</b>	6,5 ±0,18	4,3 ±0,05	5,9 ±0,68	5,9 ±0,88	5,6 ±0,85	7,7 ±0,24
<b>10 dias</b>	6,3 ±0,58	4,3 ±0,16	5,8 ±0,67	5,7 ±0,70	5,3 ±0,61	7,5 ±0,41

	Estático		semi-dinâmico 6 h			Controle
	0,075%	0,15%	0,15%	0,5%	1%	DMM
<b>5 dias</b>	7,1 ±0,08	5,3 ±0,22	5,6 ±0,08	4,6 ±0,07	4,6 ±0,11	7,4 ±0,05
<b>10 dias</b>	7,1 ±0,06	6,2 ±0,13	5,8 ±0,12	4,7 ±0,05	4,7 ±0,10	7,4 ±0,05

Os valores estão apresentados em médias ± desvio-padrão.

#### 4 CONCLUSÕES

Como conclusão, o modelo foi capaz de produzir diferentes níveis de desafio cariogênico em resposta à suplementação por sacarose, possibilitando sua utilização para estudos desmineralização do esmalte.

#### 5 REFERÊNCIAS

FILOCHE, S. K., *et al.* Caries-related plaque microcosm biofilms developed in microplates. **Oral Microbiol Immunol**, v.22, n.2, Apr, p.73-9. 2007.

GUGGENHEIM, B., *et al.* Application of the Zurich biofilm model to problems of cariology. **Caries Res**, v.38, n.3, May-Jun, p.212-22. 2004.

MCBAIN, A. J. Chapter 4: In vitro biofilm models: an overview. **Adv Appl Microbiol**, v.69, p.99-132. 2009.

SISSONS, C. H. Artificial dental plaque biofilm model systems. **Adv Dent Res**, v.11, n.1, Apr, p.110-26. 1997.

WIMPENNY, J. W. The validity of models. **Adv Dent Res**, v.11, n.1, Apr, p.150-9. 1997.

WONG, L. e 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, Jun, p.477-86. 2001.