

VALIDAÇÃO DE UM MODELO DE BIOFILME ATRAVÉS DE AVALIAÇÃO DE DOSE-RESPOSTA A CLOREXIDINA

MASKE, Tamires Timm¹

VAN DE SANDE, Françoise Hélène²
AZEVEDO, Marina Souza³
LUND, Rafael Guerra⁴

¹ Acadêmica de Odontologia FO-UFPEL. tamirestmaske@hotmail.com

² Doutoranda em Dentística FO-UFPEL. fvandesande@gmail.com

³ Doutoranda em Odontopediatria FO-UFPEL. marinasazevedo@hotmail.com

⁴ Doutor em Dentística, Professor de Dentística FO-UFPEL. rafael.lund@gmail.com

CENCI, Maximiliano Sérgio⁵

⁵ Doutor em Cariologia, Professor de Dentística FO-UFPEL. cencims@gmail.com

1 INTRODUÇÃO

Para o estudo de eventos mediados por biofilmes, como as lesões de cárie dentária, a investigação de condições experimentais em voluntários frequentemente apresenta limitações, como muitas variáveis incontrolláveis ou restrições éticas. Assim, metodologias laboratoriais que permitam o estabelecimento de biofilmes sob condições controladas são úteis para investigações preliminares (MCBAIN, 2009).

Modelos experimentais para formação de biofilmes *in vitro* têm sido amplamente desenvolvidos. Contudo, poucos modelos foram validados para testar o efeito de soluções antimicrobianas em estudos de desmineralização do esmalte sob condições cariogênicas (GUGGENHEIM et al., 2004).

Um modelo de biofilme de microcosmos foi previamente estabelecido para estudos de desmineralização do esmalte (VAN de SANDE, 2010). Neste, os biofilmes são formados a partir de saliva humana e, assim, preservam uma diversidade microbiana (microcosmos) semelhante a biofilmes formados *in vivo* (FILOCHE; SOMA; SISSONS, 2007). Diversos regimes de exposição à sacarose foram avaliados, e uma condição – exposição intermitente a sacarose 1% no meio – foi selecionada para avaliações adicionais do modelo.

O presente estudo objetivou validar o modelo para estudos com soluções antimicrobianas, avaliando a resposta do modelo frente ao tratamento com diversas concentrações de clorexidina.

2 METODOLOGIA (MATERIAL E MÉTODOS)

2.1. Delineamento experimental:

Os biofilmes foram formados a partir de inóculo de saliva humana sobre discos de esmalte bovino em placas de 24 micropoços. O meio de crescimento utilizado foi o DMM - meio definido enriquecido com mucina, suplementado com 1% de sacarose em regime intermitente. Os biofilmes foram cultivados em anaerobiose a 37°C durante 5 dias (VAN de SANDE, 2010). Os tratamentos consistiram de imersão em solução de clorexidina, em concentrações que variaram de 0,012% a

0,12%, e foram aplicados diariamente, antes das exposições a sacarose (Figura 1). Cada condição (tratamento) foi realizada em quadruplicata, e o experimento foi repetido duas vezes (n=8). A resposta do modelo foi obtida através de avaliações da acidogenicidade do meio (pH) e da porcentagem de perda de dureza de superfície do esmalte (%PDS).

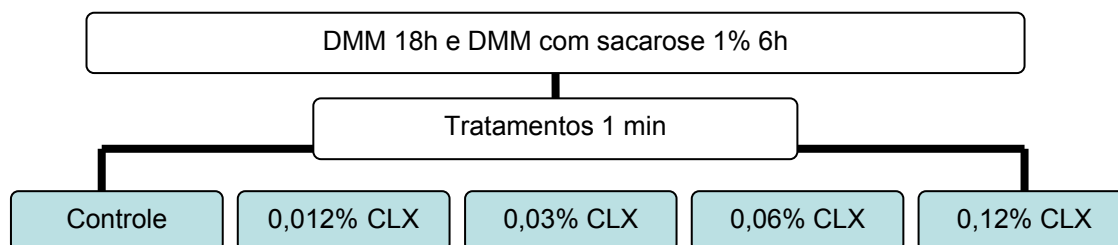


FIGURA 1. Representação esquemática do delineamento do modelo. Regime intermitente de exposição à sacarose, tratamentos com 1 min de imersão nas soluções de clorexidina (CHX) e controle (solução salina).

2.2. Preparo dos discos de esmalte:

Quarenta discos de esmalte foram obtidos de incisivos bovinos irrompidos e livres de falhas, recentemente extraídos. Para padronização dos discos (5 mm de diâmetro e 2,5 mm de espessura), a secção do terço médio vestibular dos incisivos foi realizada em uma furadeira industrial com broca do tipo trefina. Adicionalmente, foi realizado um processo de planificação das superfícies com auxílio de discos de lixa de granulometria decrescente e polimento com feltro e pasta diamantada, sob refrigeração por água em politriz. Posteriormente, a base (dentina) e as laterais do disco foram isoladas com esmalte para unhas, deixando apenas a superfície do esmalte exposta. Por fim, as amostras foram autoclavadas e armazenadas em condição de umidade a 4°C até utilização.

2.3. Coleta de Saliva:

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia (UFPel) sob parecer N° 076/2009. Vinte 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. Antecedendo a coleta, o voluntário foi instruído a se abster de higiene oral por 24 h e a não se alimentar nas 2 h prévias a coleta. A saliva foi depositada em um coletor graduado estéril e transportada em gelo ao Laboratório de Microbiologia (FO-UFPel).

2.4. Processo de inoculação e formação do biofilme:

A saliva foi inoculada em volumes de 400 µL sobre os discos de esmalte 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 1% de sacarose foram adicionados em cada poço, e as placas incubadas. Após 6 h, os discos foram enxaguados através de imersão em 2 mL de solução salina estéril, inseridos em uma nova placa contendo DMM, e novamente incubados por 18 h. Os biofilmes foram formados de forma individualizada sobre os discos de esmalte suspensos em dispositivos de fio ortodôntico, em cada micro-poço. As placas foram incubadas em condição

atmosférica de anaerobiose (5-10% CO₂) em jarras com geradores de anaerobiose sob temperatura controlada (37°C), e mantidas em repouso na incubadora.

2.5. Tratamentos:

Os tratamentos consistiram de imersão durante um minuto em 2mL de solução de clorexidina, em concentrações de 0,012%, 0,03%, 0,06% e 0,12%. Eles iniciaram no segundo dia do experimento e foram aplicados antes das exposições à sacarose. Após os tratamentos, os discos eram lavados em solução salina estéril por imersão durante 10 s. O grupo controle foi tratado com soro fisiológico estéril sob o mesmo protocolo. Após os períodos experimentais, os discos foram limpos com escova de dente e água destilada e mantidos a 4° C em microtubos (ambiente úmido) até análise de desmineralização.

2.6. pH

A leitura do pH foi realizada a cada troca de meio, após 18 h em DMM e após 6 h em DMM com sacarose, diariamente.

2.7. Porcentagem de perda de dureza de superfície (%PDS):

A leitura de dureza de superfície dos discos de esmalte foi realizada através de 6 endentações espaçadas em 100 µm, com uma ponta de diamante do tipo Knoop, com carga de 25 g de peso por 5 s (Micro Hardness Tester FM 700, Future-Tech Corp, Tóquio, Japão). As leituras foram realizadas antes (DS) e após o experimento (DS2). Com os valores de dureza inicial (DS) e final (DS2) foi calculada a porcentagem de variação/perda de dureza de superfície [%PDS = 100 (DS2-DS) /DS].

2.8. Análise estatística:

Os dados foram analisados com ANOVA e teste Tukey ($\alpha = 0,05$), utilizando o programa SAS v. 9.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC, E.U.A.).

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Analisando os dados pode-se observar uma resposta dose-dependente aos tratamentos com clorexidina no modelo, para as duas variáveis de resposta, o pH e a porcentagem de perda mineral. A acidogenicidade do meio foi significativamente afetada pelos tratamentos ($P < 0,001$), sendo que os menores e maiores valores de pH após os desafios com sacarose ocorreram para o grupo controle e CLX 0,12%, respectivamente. Em relação à %PDS do esmalte, as médias em ordem decrescente por grupo foram: CLX 0,012% 0,03- 0,06- 0,12%. A %PDS foi significativamente menor para CLX 0,12% em relação ao controle ($p < 0,05$).

É importante ressaltar que para o desenvolvimento de modelos *in vitro* para avaliação de potencial antimicrobiano/anticariogênico de terapias, os mesmos devem apresentar um padrão de dose-resposta para antimicrobianos de ação conhecida, como a clorexidina (ANDERSON, 2007).

Modelos laboratoriais apresentam limitações inerentes ao tipo de modelo, no entanto, alguns cuidados metodológicos podem ser realizados com intuito de maior aproximação de situações clínicas (GUGGENHEIM et al., 2001).

Neste sentido, os tratamentos devem ser realizados com curtos períodos de exposição e rapidamente eliminados (GUGGENHEIM et al., 2004), o que foi respeitado no presente estudo. As concentrações de clorexidina e o protocolo utilizado tiveram como objetivo produzir um efeito bacteriostático, e não bactericida (RIBEIRO; HASHIZUME; MALTZ, 2007). Além disso, os tratamentos foram aplicados após 24 h de formação do biofilme, permitindo seu o crescimento inicial.

Dentro das limitações deste, o modelo é promissor para avaliar tratamentos com soluções antimicrobianas em estudos de desmineralização do esmalte. Entretanto, mais estudos devem ser realizados para avaliar a reprodutibilidade do modelo e capacidade de dose-resposta para outros agentes antimicrobianos e anticariogênicos.

4 CONCLUSÕES

O modelo respondeu adequadamente a avaliação proposta, sendo possível observar o efeito em esmalte em resposta às concentrações de clorexidina testadas.

5 REFERÊNCIAS

ANDERSON, M. H. A Review of the Efficacy of Chlorhexidine on Dental Caries and the Caries Infection. **J Calif DentAssoc.** v. 31, n. 3, p. 211-4, 2007.

FILOCHE, S. K; SOMA, K. J; SISSONS, C. H. Caries-related plaque microcosm biofilms developed in microplates, **Oral Microbiol Immunol** 22 (2) (2007) pp. 73-9.

GUGGENHEIM, B; GIERTSEN, E; SCHUPBACH, P; SHAPIRO, S. Validation of an in vitro biofilm model of supragingival plaque, **J Dent Res**, v. 80, n. 1, p. 363-70, 2001.

GUGGENHEIM, B; GUGGENHEIM, M; GMUR, R; GIERTSEN, E; THURNHEER, T. Application of the Zurich biofilm model to problems of cariology, **Caries Res**, v.38, n.3,p. 212-22, 2004.

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

RIBEIRO, L.G; HASHIZUME, L.N; MALTZ, M. The effect of different formulations of chlorhexidine in reducing levels of mutans streptococci in the oral cavity: A systematic review of the literature, **J Dent**, v.35, n.5, p. 359-70, 2007.

VAN de SANDE, Françoise Hélène Leite. **Desenvolvimento de um modelo de biofilme para estudos de desmineralização do esmalte.** 2010. Dissertação (Mestrado em Dentística) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2010.