

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Centro de Desenvolvimento Tecnológico – CDTec
Curso de Biotecnologia



Trabalho de Conclusão de Curso

Análise Microbiológica e Potencial Cariogênico de Biofilmes Formados *in vitro*

Leina Nakanishi

Pelotas, 2014

Leina Nakanishi

Análise Microbiológica e Potencial Cariogênico de Biofilmes Formados *in vitro*

Trabalho acadêmico apresentado ao Curso de Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Maximiliano Sérgio Cenci
Orientadora de estágio: Mestranda Tamires Timm Maske

Pelotas, 2014

Dados de catalogação na fonte:
Ubirajara Buddin Cruz – CRB-10/901
Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

N163a **Nakanishi, Leina**
 Análise microbiológica e potencial cariogênico de biofilmes formados *in vitro*/ Leina Nakanishi. – 45f. – Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Biotecnologia). Universidade Federal de Pelotas. Centro de Desenvolvimento Tecnológico. Pelotas, 2014. – Orientador Maximiliano Sérgio Cenci.

1.Biotecnologia. 2.Biofilme. 3.Microcosmo. 4.Cárie. 5.Desmineralização.. I.Cenci, Maximiliano Sérgio. II.Título.

CDD: 660.6

Banca examinadora:

Prof. Dr. Maximiliano Sérgio Cenci (Orientador)
Doutor em Odontologia – Cariologia pela Universidade Estadual de Campinas

Prof. Dr. Fábio Leivas Leite
Doutor em Ciências Veterinárias pela University of Wisconsin

Prof. Dra. Marina Souza Azevedo
Doutora em Odontopediatria pela Universidade Federal de Pelotas

Agradecimentos

Ao meu orientador Prof. Dr. Maximiliano S Cenci, pela oportunidade, orientação, amizade, carinho e confiança depositada. Pelo seu belo exemplo como pessoa e profissionalmente. Por sempre incentivar e instigar novos conhecimentos;

A Tamires T Maske, pela paciência, generosidade e disponibilidade para uma rica orientação. Pelos conhecimentos repassados, pelo tempo em que passamos juntas; dias, noites e finais de semana, regados de muito trabalho e de uma boa e nova amizade;

À minha família, por sempre terem me apoiado, com muito amor e carinho. Por serem à base de tudo, apesar da distância o que me sustenta nas dores e alegrias. Eternamente grata a Deus por ter me abençoado com essa rica família;

Aos meus pais Noriko e Toru, pelo amor incondicional, pelo conforto, pela educação e por serem exemplos de pessoas e principalmente serem minha fonte de expiração. Obrigada por todo o apoio e suporte para essa conquista e sempre estarem ao meu lado, vocês são incríveis, todas as minhas vitórias e conquistas são dedicados a vocês e a nossa família;

Ao meu avô e segundo pai, que sempre me apoiou e me deu forças. Agradeço por ter sido um exemplo de vida. Hoje cuida e ora por nós;

Ao Laboratório de Microbiologia, em especial as técnicas Carmem e Lizângela e as colegas de trabalho, Katielle e Cácia. Agradeço a ajuda, ao companheirismo, as boas risadas e por terem me recebido com muito carinho;

Aos meus queridos amigos de faculdade Camila, Caroline, Giovanni, Luíza e Patrícia. Obrigada pela amizade, companheirismo, apoio e por serem a minha segunda família;

Ao Felipe, pela paciência, pelo apoio e por ter me apresentado essa fantástica área da odontologia. Pela amizade que fomos criando ao longo do tempo, pelos sinceros carinhos e por muito amor. E a sua família, pelo acolhimento, e incentivo;

Aos professores, pela paciência e generosidade de compartilhar seus conhecimentos;

À Universidade Federal de Pelotas, em especial aos cursos de Odontologia e Biotecnologia;

Muito Obrigada!!

NOTAS PRELIMINARES

O presente trabalho de conclusão de curso foi redigida segundo o Manual de Normas para Dissertações, Teses e Trabalhos Científicos da Universidade Federal de Pelotas de 2013, adotando o Nível de Descrição em capítulos. Disponível no endereço eletrônico: (<http://sisbi.ufpel.edu.br/?p=manual>).

Resumo

NAKANISHI, Leina. **Análise Microbiológica e Potencial Cariogênico de Biofilmes Formados *in vitro*** 2014. 45f. Trabalho de Conclusão de Curso — Curso de Bacharelado em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas.

A formação da cárie dentária está diretamente relacionada ao acúmulo de biofilme na superfície do dente frente a uma dieta rica em carboidrato fermentável. Metodologias laboratoriais que permitem investigar a sua formação e desenvolvimento auxiliam no seu melhor entendimento e são essenciais para o avanço na pesquisa pré-clínica. Esse estudo objetiva verificar através de dois protocolos experimentais a capacidade de um simulador multifuncional de cavidade bucal (MOCS) em permitir a formação de microbiota cariogênica e a desmineralização do esmalte dental. Para ambos protocolos, os biofilmes foram formados sobre discos de esmalte bovino, e a saliva humana (microcosmos) foi usada como inóculo. O protocolo experimental 1 (PE1), utilizou fluxo intermitente de 10% sacarose (1,2 ml/min, 5min, 8x/dia) em associação a fluxo contínuo de saliva artificial (meio definido enriquecido de mucina (DMM) a 0,04 ml/min) por até 14 dias. No protocolo experimental 2 (PE2), utilizou fluxo intermitente de sacarose 5% (0,25ml/min, 6min, 3x/dia) e fluxo contínuo de DMM a 0,06 ml/min por até 21 dias. Para cada tempo experimental (4, 7, 14 ou 21 dias) biofilmes foram coletados e quantificados micro-organismos totais (MT), estreptococos do grupo mutans (EGM), lactobacilos (L) e aciduricos totais (AT). A análise mineral foi avaliada através da porcentagem de perda de dureza superficial (%PDS). Os dados foram analisados estatisticamente por ANOVA e teste Tukey ($p < 0,05$). Para PE1 em 4 dias houve um crescimento dos MT, AT e L em relação ao baseline da saliva do doador. EGM manteve-se constante 4 dias e nos outros tempos experimentais. Após 14 dias, MT, AT e L aumentaram em relação ao primeiro tempo experimental, no entanto, não mostraram diferença significativa em relação a primeira semana. A %PDS foi maior para os 14 dias, seguido de 7 e 4 dias, havendo diferença somente entre os tempos iniciais e finais. Para o PE2 maiores contagem de MT, EGM, AT são observadas aos 4 dias comparado ao baseline do doador. As contagem de MT permaneceram constantes para os tempos experimentais de 4, 14 e 21 dias. Com exceção dos MT, em 21 dias todos microorganismos tiveram uma significativa redução na contagem em comparação a 14 dias. A %PDS foi significativamente menor para 4 dias em comparação aos demais tempos, no entanto a %PDS foi maior e não estatisticamente significativa entre demais tempos. O PE1 permitiu o desenvolvimento de microbiota cariogênica e elevada perda mineral de forma rápida, o PE2 obteve perdas minerais mais brandas, sendo mais indicado para estudos relacionados ao desenvolvimento da cárie, portando a MOCS sugere ser um recurso laboratorial para pesquisas pré-clínicas relacionadas a cárie dentária.

Palavras chave: biofilme; microcosmo; desmineralização; cárie

Abstract

NAKANISHI, Leina. **Microbiological Analysis and Potential of Cariogenic Biofilms Formed *in vitro***. 2014. 45f. Final Project (Biotechnology Undergraduate Program) - Bachelor of Biotechnology. Federal University of Pelotas, Pelotas, 2014.

The formation of dental caries is directly related to biofilm accumulation on the surface of the tooth front of a diet rich in fermentable carbohydrate. Laboratory methodologies that allow to investigate the formation and development aid at its best and understanding are essential to progress in preclinical research. This study aims to verify the two experimental protocols using the capacity of a multifunctional simulator oral cavity (MOCS) to allow the formation of cariogenic microflora and demineralization of bovine enamel. For both protocols, biofilms were formed on enamel discs, and human saliva (microcosm) was used as inoculum. The experimental protocol 1 (PE1), intermittent flow used 10% sucrose (1.2 ml / min, 5 min, 8x / day) in combination with continuous stream of artificial saliva (mucin rich defined medium (DMM) 0,04 ml / min) for up to 14 days. In the experimental protocol 2 (PE2) used for intermittent flow 5% sucrose (0,25 ml / min, 6 min, 3x / day) and streaming DMM 0,06 ml / min for up to 21 days. For each experimental time (4, 7, 14 or 21 days) biofilms were collected and quantified total microorganisms (MT), *Streptococcus mutans* (EGM), *Lactobacilli* (L) and total aciduricos (AT). Mineral analysis was assessed by the percentage of loss of surface hardness (% SMC). Data were analyzed statistically by ANOVA and Tukey test ($p < 0.05$). For PE1 in 4 days there was a growth of MT, EGM and L in relation to donor saliva baseline. EGM remained constant 4 days and the other time points. After 14 days, MV, HV and L increased over the first experimental time, however, showed no significant difference from the first week. The PDS% was higher for 14 days, followed by 7 for 14 days, with only difference between the initial and final times. For larger PE2 MT count, EGM, AT are observed at 4 days compared to the donor baseline. MT count remained constant for experimental periods of 4, 14 and 21 days. With the exception of MT in 21 days all organisms had a significant reduction in counts compared to 14 days. The% PDS was significantly shorter for four days compared to the other times, however the PDS% was higher and not statistically significant between other times. The PE1 allowed the development of cariogenic microorganisms and high mineral loss quickly, the PE2 got softer mineral loss, and is more suitable for studies related to the development of caries, carrying the MOCS suggests be a laboratory tool for preclinical research related to tooth decay.

Keywords: biofilm; microcosm; demineralization; caries

Lista de Figuras

Figura 1	Diferença na composição da microbiota submetidas a condições saudáveis e pressões ecológicas	17
Figura 2	Processo de Formação do Biofilme	18
Figura 3	Desenho esquemático da MOCS	23
Figura 4	Técnica de confecção de disco de esmalte bovino	25
Figura 5	Disco de esmalte	25

Lista de Tabelas

Tabela 1	Médias e desvio padrão dos dados microbiológicos (UFC/mg-Log ₁₀) e minerais referentes ao Protocolo Experimental 1	30
Tabela 2	Médias e desvio padrão dos dados microbiológicos (UFC/mg-log ₁₀) e minerais referentes ao Protocolo Experimental 2	31

Lista de Abreviaturas e Siglas

μm	Micrômetro
DMM	<i>Defined medium with mucin</i> – meio definido enriquecido com mucina
%PDS	Perda de dureza de superfície
MOCS	Simulador Multifuncional de Cavidade Oral
UFC	Unidade Formadora de Colônia
PE	Protocolo Experimental
CDFE	<i>Constant-depth Film Fermenter</i>
MAM	<i>Multiplaque Artificial Mouth</i>
RPM	Rotação por minuto
W	Watt
BHI	Brain heart infusion – Infusão cérebro e coração
°C	Graus Celsius
s	Segundo
g	Gramma
h	Hora
min	Minuto
mm	Milímetro
mmol	Milimol
x	Veze

SUMÁRIO

1	Introdução	14
2	Revisão	16
2.1	Cárie dentária	16
2.2	Biofilme	17
2.3	Modelos de Biofilme	18
3	Objetivo	20
3.1	Objetivo Geral	20
3.2	Objetivos específicos	20
4	Materiais e Métodos	21
4.1	Delineamento experimental	21
4.2	Configurações do Simulador Multifuncional de Cavidade Oral (MOCS)	21
4.3	Confecção de saliva artificial – DMM	23
4.4	Preparo da solução de sacarose	23
4.5	Preparo das amostras de tecido dentário	23
4.6	Esterilização da MOCS e amostras	25
4.7	Coleta da saliva, inóculo e formação do biofilme	25
4.8	Protocolo Experimental 1	25
4.9	Protocolo Experimental 2	26
4.10	Análise dos perfis Microbianos/Crescimento da Placa	26
4.11	Análise da alteração de dureza nos discos de esmalte	27
4.12	Análise Estatística	27
5	Resultados	29
5.1	Protocolo Experimental 1	--
5.2	Protocolo Experimental 2	30
6	Discussão	32
7	Conclusão	36
	Referências	37
	Anexos	41

1. INTRODUÇÃO

A cárie dentária tem sido considerada uma das mais prevalentes doenças encontradas em humanos, sendo caracterizada como multifatorial e de caráter crônico (SELWITZ et al., 2007), no entanto, a presença de placa cariogênica é considerada como causa direta para o seu desenvolvimento (MARSH; PERCIVAL, 2006). A atividade metabólica das bactérias presentes na placa dental frente a uma dieta rica em carboidrato está relacionada à desmineralização dos tecidos dentários (PARISOTTO et al., 2010). Segundo a teoria da ecológica da placa (BRADSHAW et al., 1989; BOWDEN et al., 1997), em um estado de baixa frequência de ingestão de carboidratos, espécies associadas a doença cárie estão em menor quantidade e convivem em equilíbrio com as demais espécies do ambiente oral. Modificações ambientais, distúrbios fisiológicos ou pressões seletivas que podem ocorrer durante o desenvolvimento do biofilme, no entanto, são capazes de estimular a proliferação de microorganismos específicos que levam ao desenvolvimento da placa cariogênica e conseqüentemente desmineralização do substrato dentário (MARSH, 2005; MARSH; PERCIVAL, 2006).

A complexidade desse ambiente oral e os problemas éticos relacionados ao estudo das doenças orais *in vivo*, principalmente da cárie dentária, têm levado ao desenvolvimento de modelos laboratoriais que simulem o ambiente bucal (TANG, 2003; MCBAIN, 2009). Ao longo do tempo, várias metodologias envolvendo modelos de biofilme mais ou menos complexos em seu desenvolvimento tem sido desenvolvidos. Destacam-se o *Constant Depth Film fermenter* (CDFF) (DENG; TEN CATE, 2004; ZAURA et al., 2011), *Multiplaque Artificial Mouth* (MAM) (SISSONS et al., 2007), e biofilmes formados em microplacas (FILOCHE; SOMA, SISSONS, 2007; VAN DE SANDE et al., 2011). Modelos como esses, permitem a formação de biofilme a partir de uma única espécie de microorganismo, mais de uma espécie (consórcio) ou através de microcosmos (biofilmes complexos) provenientes da placa dental ou a partir de inóculo de saliva (MC BAIN, 2009). Quando se deseja uma maior aproximação do comportamento natural, como manutenção da heterogeneidade microbiana durante a formação dos biofilmes, os experimentos originados de microcosmos são mais vantajosos por serem mais fiéis, mantendo a complexidade do inóculo original e as relações entre os ecossistemas *in vitro*

(FILOCHE et al., 2008; MCBAIN, 2009).

Dentro desses modelos, os biofilmes podem ser desenvolvidos em sistemas de cultura onde as exposições ao meio nutritivo são disponibilizados de forma contínua ou intermitente. Os ecossistemas naturais, provavelmente, funcionam de uma maneira análoga a cultura contínua, na qual os substratos são fornecidos por fluxo de fluido de forma constante ou descontinuamente. A vantagem do sistema de cultura contínua é a possibilidade de ter maior controle das taxas de crescimento e outras variáveis (MCBAIN, 2009).

Modelos de biofilme formados frente a fluxo contínuo, podem simular o fluxo salivar variável e as diferentes tensões de cisalhamento que poderiam afetar a adesão bacteriana (ROSENTRITT et al., 2007). Além disso, podem mimetizar o fluxo nutricional no ambiente oral, caracterizando uma alta ou baixa disponibilidade de nutrientes e sacarose para o meio, possibilitando a alteração de pH e permitindo a seleção e sucessão microbiana, de acordo com a teoria da placa (BRADSHAW et al., 1989). O desenvolvimento de um modelo de biofilme de microcosmo em fluxo contínuo, que tenha capacidade de mimetizar os eventos mediados pelo biofilme dental que ocorre em condições clínicas, como as lesões de cárie, seria extremamente interessante no contexto odontológico laboratorial.

2. REVISÃO

2.1 Cárie dentária

A cárie dentária é classificada como uma das doenças mais prevalente em todo o mundo (SELWITZ et al., 2007). Sua causa direta está relacionada presença de bactérias cariogênicas que frente a carboidratos fermentáveis produzem subprodutos ácidos os quais desencadeiam a desmineralização do substrato dentário. O processo de desmineralização e remineralização do substrato dentário ocorre frequentemente na cavidade oral, e a saliva tem papel principal como solução tampão, neutralizando o pH do biofilme, e conseqüentemente remineralizando o substrato antes desmineralizado. A cárie dentária é consequência de períodos de desmineralização maiores do que os de remineralização. Esse fenômeno ocorre quando o biofilme formado na superfície dentária está exposto a um período prolongado ou com alta frequência de presença de carboidratos fermentáveis (MARSH, 2003).

Espécies relacionadas a formação da cárie dentária são naturalmente encontradas na placa dentária, porém estão em menores proporções em relação a microbiota total como ilustrada na Figura 1 (MARSH, 2006). A teoria da placa ecológica, frente a baixas ingestões de carboidratos, essas bactérias estão em menor proporção em relação aos outros micro-organismos presentes, juntamente com o processo de de-remineralização mantendo o equilíbrio. A estabilidade ou homeostase microbiana é um equilíbrio imposto por numerosas interações microbianas, como sinergismo e antagonismo (MARSH, 1989). O aumento da ingestão de carboidratos fermentáveis, aumentará o tempo que a placa permanecerá em pH crítico (pH 5,5), o que desencadeará a desmineralização dentária. Esse ambiente com baixo valor de pH, proveniente do ácido do metabolismo dos açúcares da dieta, favorecem a proliferação de bactérias acidúricas e acidogênicas, as quais estão relacionadas com a etiologia da cárie.

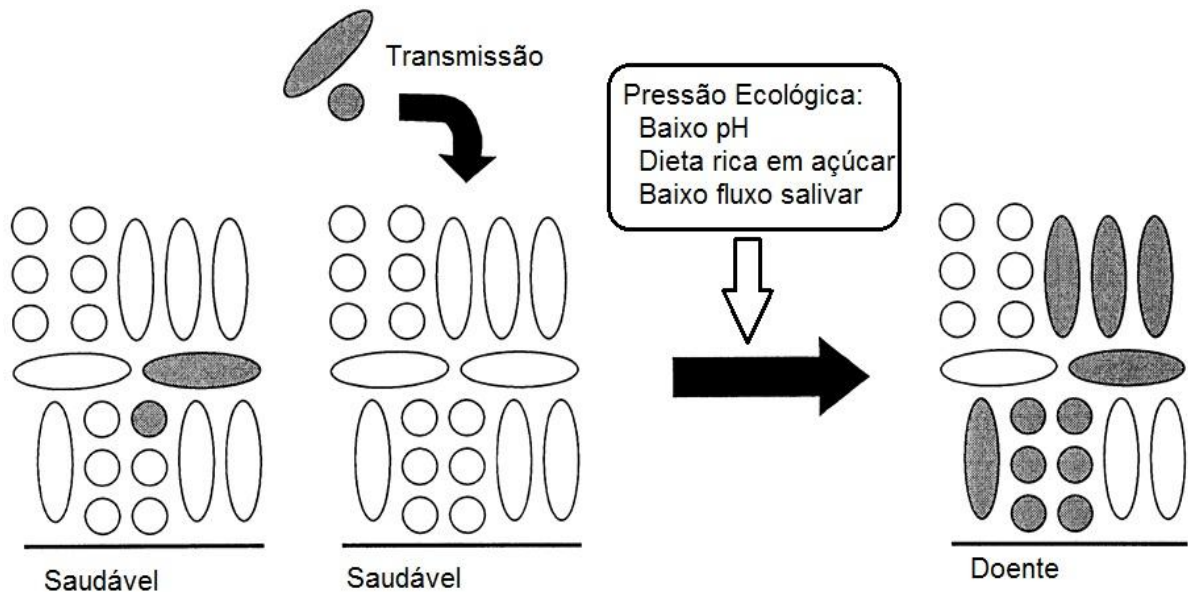


Figura 1 – Diferença na composição da microbiota quando submetidas a condições saudáveis e pressões ecológicas. A composição da microbiota oral é diferente em pessoas saudáveis e doentes, bactérias patogênicas podem ser favorecidas por uma pressão ecológica que ocorre no ambiente, acontece desequilíbrio, favorecendo a proliferação dos microorganismos patogênicos.

FONTE: ADAPTADO DE MARSH PD, 2003

2.2 Biofilme

Os biofilmes são complexos ecossistemas microbianos, podem ser formados a partir de espécies selecionadas ou de microcosmo (MCBAIN, 2009). Constituídas por células ligadas a um substrato, ou umas às outras por meio de uma interface, incorporadas numa matriz de substâncias poliméricas extracelulares, podendo apresentar diferentes fenótipos, de acordo com o ambiente (DONLAN, 2002). O ambiente bucal oferece condições ideais para o crescimento de diversos microorganismos, como temperatura de 35-36°C, ambiente úmido, pH neutro (6,75 e 7,25), que é controlado pelo fluxo salivar de composição iônica (MARSH, 2003). Colonizadores iniciais crescem e modificam as condições ambientais, tornando o local adequado para a colonização de espécies patogênicas. A frequente exposição a baixos valores de pH, podem desequilibrar a comunidade microbiana, favorecendo o crescimento de espécies acidogênicas e acidúricas, em grande parte *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* e *Lactobacillus* spp (SELWITZ, 2007).

A formação da placa ou biofilme dental ocorre em etapas coordenadas, ilustradas na

Figura 2. Inicialmente, colonizadores primários aderem-se a superfície do substrato através da película adquirida (Figura 2A). Essas células aderidas desenvolvem microcolônias que sintetizam uma matriz exopolissacarídica, que atua como substrato para a associação de microorganismos colonizadores secundários (Figura 2B). Os colonizadores secundários podem se aderir diretamente aos primários ou formarem coagregados com outros microorganismos e então se aderirem aos primários (Figura 2C), formando o biofilme maduro, composto por multiespécie estruturalmente e funcionalmente organizado, sendo mais tolerantes a agentes antimicrobianos e as defesas do hospedeiro (Figura 2D) (RICKARD *et al.*, 2003; DO *et al.*, 2013).

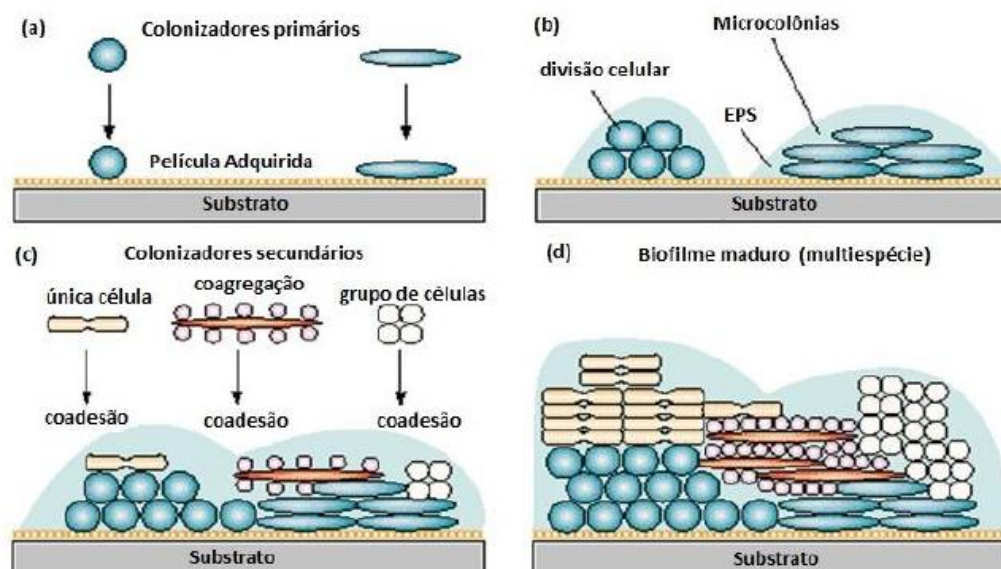


Figura 2: Processo de Formação de Biofilme
 FONTE: ADAPTADO DE RICKARD *et al.*, 2003

2.3 Modelos de Biofilme

Os primeiros estudos *in vitro* relacionados ao que se conhece como modelos de biofilme se iniciaram no final do século XIX. De forma simplificada, dentes extraídos eram submetidos a um meio bacteriológico ou a uma mistura de saliva e pão (TANG *et al.*, 2003). A necessidade de superar a complexidade do ambiente bucal e os problemas éticos tem estimulado os estudos *in vitro* (TANG *et al.*, 2003). A partir desses estudos, novas pesquisas visam o aperfeiçoamento das

metodologias de formação de biofilmes e consequente indução de lesões de cárie artificiais, porém, levando em consideração as variáveis da temperatura, pH, meio nutritivo, condições atmosféricas e o controle da contaminação (TANG et al., 2003). A manutenção de biofilmes em laboratório permite o estudo de vários aspectos da fisiologia, simulando as condições de replicação *in situ*, além da facilidade com que podem ser estabelecidos, mantidos e replicados (MCBAIN, 2009).

Vários modelos para a obtenção de biofilmes veem sendo desenvolvidos de acordo com a necessidade e finalidade, diferindo as espécies microbiológicas utilizadas, espécies isoladas (ALTMAN et al., 2006), mais de uma espécie (SHU et al., 2000; LEE et al., 2010) ou de microcosmos (VAN DE SANDE et al., 2011; ZAURA et al., 2011; AZEVEDO et al., 2011) e o tipo de exposição ao meio nutritivo, de forma contínua ou intermitente. Modelos como o *Constant Depth Film fermenter* (CDFS) (DENG 2004; ZAURA et al., 2011), sistema fechado e com monitoramento de meio nutritivo, gás do ambiente e inóculo podem ser controlados; *Multiplaque Artificial Mouth* (MAM), desenvolvida por SISSONS et al., (1991), permite o crescimento a longo prazo, estudos sobre a reprodutibilidade da variação do pH induzida por sacarose, monitoramento contínuo do crescimento e metabolismo do biofilme (TANG et al., 2003) (SISSONS et al., 2007). O modelo de microplacas permite o crescimento de forma individualizada em um curto período de tempo (GUGGENHEIM et al., 2004; SISSONS, 2007; VAN DE SANDE et al., 2011). O crescimento em câmara de fluxo é capaz de simular o fluxo salivar e nutricional do ambiente oral, possibilitando estudos com diferentes doses e concentrações de sacarose, permitindo a alteração do pH e estudos relacionados a lesões de cárie e de testes de agentes antimicrobianos (SEEMAN et al.; 2005; LEE et al., 2010).

3. OBJETIVO

3.1 Objetivo geral

Verificar através de dois protocolos experimentais (PE) a capacidade de um simulador multifuncional de cavidade bucal (MOCS) em mimetizar o processo de formação de biofilme cariogênico e de desmineralização do esmalte dental.

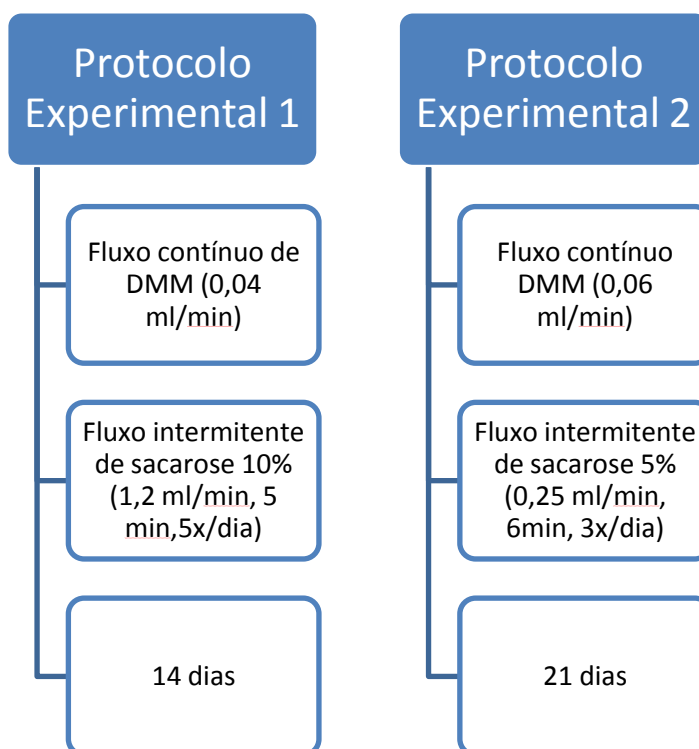
3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a capacidade de produção de biofilme cariogênico frente a diferentes protocolos de utilização da MOCS .
- Avaliar a porcentagem de perda de dureza superficial de amostras de esmalte mantidos no simulador frente a diferentes protocolos de utilização

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Delineamento experimental

Um simulador multifuncional de cavidade oral foi estabelecido para produção de biofilme cariogênico. Biofilmes foram originados a partir de saliva humana e crescidos independentemente sobre amostras de esmalte bovinos sob dois protocolos experimentais (PE) independentes.



Nos tempos experimentais de 4, 7, 14 ou 21 dias, amostras microbiológicas e minerais foram coletadas (n=10) e as variáveis de resposta foram avaliadas através de porcentagem de perda de dureza superficial (%PDS) e contagem de unidades formadoras de colônia microbianas (UFC).

4.2 Configurações do Simulador multifuncional de cavidade oral (MOCS)

O simulador é constituído por um sistema de câmara acoplada a uma estufa de aquecimento ($37\pm 2^{\circ}\text{C}$). No interior da câmara, encontram-se 10 unidades

individuais e independentes para acomodação de amostras experimentais. Cada unidade individual apresenta um dispositivo removível que permite até cinco amostras. Esses dispositivos apresentam recessões que direcionam o fluxo sobre as amostras (Figura 3). A câmara e seus componentes são constituídos de aço inox e o sistema ainda possui janelas de observação em vidro temperado. Essas janelas localizam-se na porção superior e lateral da câmara e servem também para posicionamento e retirada das amostras. O dispositivo permite simular ambiente controlado de oxigênio através de tubulação com suplementação de gás de anaerobiose (10% CO₂, 10% H₂ e 80% N₂). Sobre cada unidade de acomodação de amostras, localizam-se três inlets para passagem de saliva artificial, solução de sacarose e do inóculo bacteriano. Tubulações de silicone partem de reservatórios específicos (solução de sacarose e saliva artificial), passam pelo sistema de infusão composto por duas bombas peristálticas de 10 canais (FC 100, ChaoChuing, China) e chegam aos respectivos 'inlets'. Um computador é acoplado as bombas peristálticas e um software desenvolvido para o sistema (Daxta, Pelotas, RS) foi usado para o controle dos fluxos diários de saliva e sacarose. O fluxos provenientes dos reservatórios percorrem as unidades de acomodação e são direcionados a um reservatório de resíduos.

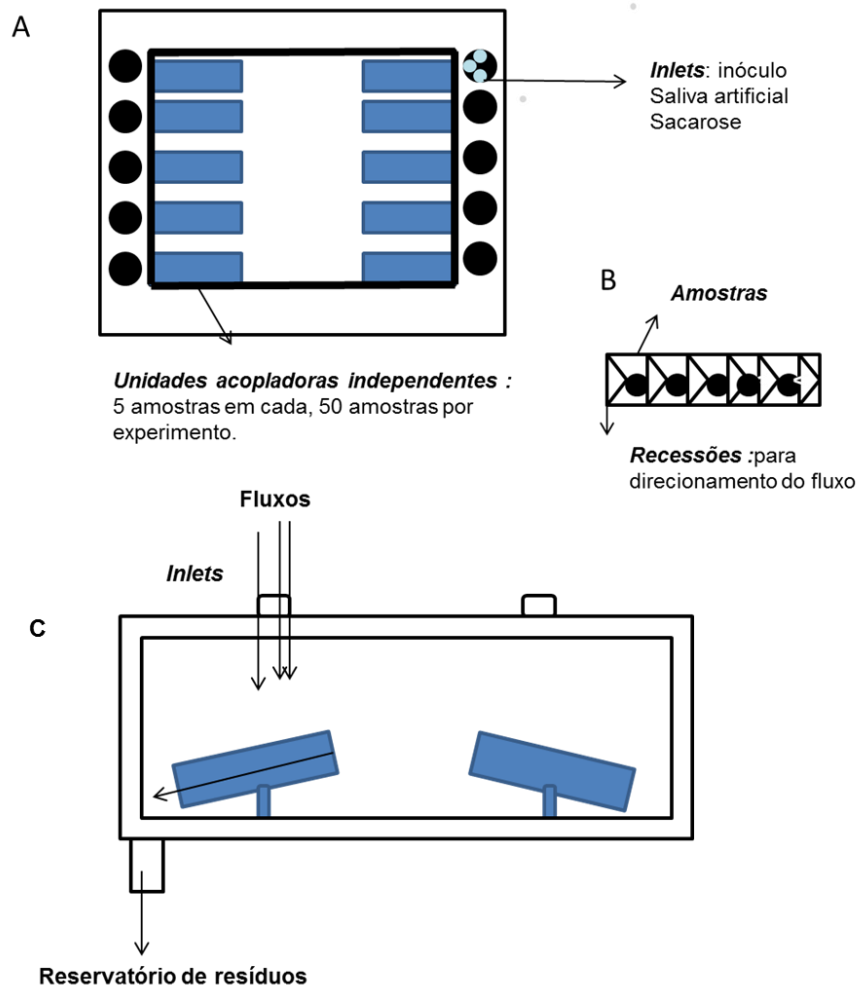


Figura 3 – Desenho esquemático da MOCS. A) Desenho esquemático da vista superior da MOCS. Presença de inlets para a entradas dos fluxos. Unidades acopladoras individuais e independentes. B) Dispositivo para posicionamento das amostras. C) Desenho esquemático da vista frontal da MOCS. Unidades acopladoras individuais são posicionadas para facilitar o posicionamento do fluxo.

4.3 Confeção de saliva artificial– DMM

A confecção do meio DMM (meio definido enriquecido com mucina) foi realizado de acordo com o protocolo descrito por Wong & Sissons (2001), o qual contém mucina gástrica de suíno (2,5g/l), uréia (1.0mmol/l), sais (em mmol/l: de CaCl₂, 1,0; MgCl₂, 0,2; KH₂PO₄, 3,5; K₂HPO₄, 1,5; NaCl, 10,0; KCl, 15,0; NH₄Cl, 2,0), mistura de 21 aminoácidos livres, 17 vitaminas e fatores de crescimento. O meio contém aminoácidos para o equivalente em proteína/ peptídeo (em mmol/l) em concentrações baseadas nas da saliva humana: alanina (1,95), arginina (1,30), asparagina (1,73), ácido aspártico (1,52), cisteína (0,05), ácido glutâmico (5,41 mmol/l), glutamina (3,03), glicina (1,95), histidina (1,08), isoleucina (2,38), leucina

(3,68), serina (3,46), tretonina (1,08), triptofano (0,43), tirosina (2,17), valina (2,38), e caseína (5,0g/l).

4.4 Preparo da solução de sacarose

Para ambos os protocolos experimentais as soluções de sacarose foram preparadas da seguinte forma: Sacarose foi pesada em balança de precisão (Marte, modelo AL500C, Brasil), acrescida de água destilada e gentilmente misturada até homogeneização. Para PE1 a sacarose foi confeccionada na concentração de 10% e para o PE2 a 5%. Após preparo do volume final, a solução foi autoclavada a 121 °C por 15 min.

4.5 Preparo das amostras de tecido dentário

Amostras de esmalte foram obtidas de incisivos bovinos, provenientes de um frigorífico local. Os dentes foram raspados, limpos e armazenados em água destilada (-20°C). A Figura 4 ilustra a obtenção dos discos de esmalte. O terço médio vestibular foi seccionado em furadeira industrial com broca de núcleo de diamante (tipo trefina) em velocidade de 400 RPM (Fig. 4B) e discos de 5mm de diâmetro e 2,5mm de espessura foram obtidos (Fig. 4D). Canaletas laterais foram confeccionadas em cada disco para colocação de dispositivo metálico, utilizou-se ponta diamantada (#4138) sob refrigeração para o corte. A superfície de esmalte foi planificada através de lixas d'água de granulação decrescente em politriz (320, 600, 1200 e 2500). O dispositivo metálico foi posteriormente posicionado e a base (dentina) e as laterais do disco foram isoladas com esmalte para unhas (Fig. 4E), deixando apenas a superfície do esmalte exposta, observado na Figura 5.

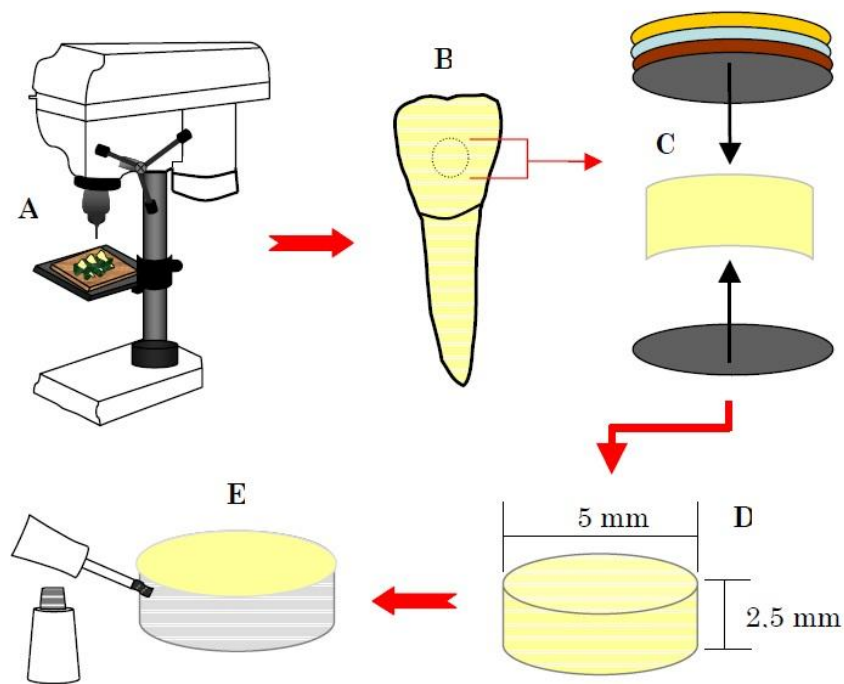


Figura 4 – Técnica de confecção de disco de esmalte bovino. Terço médio vestibular seccionado com furadeira industrial com broca de núcleo de diamante (tipo trefina) em velocidade de 400 RPM. Discos de lixa foram utilizadas para planificação da superfície.
 FONTE: Imagem adaptada VAN DE SANDE et al., 2011.

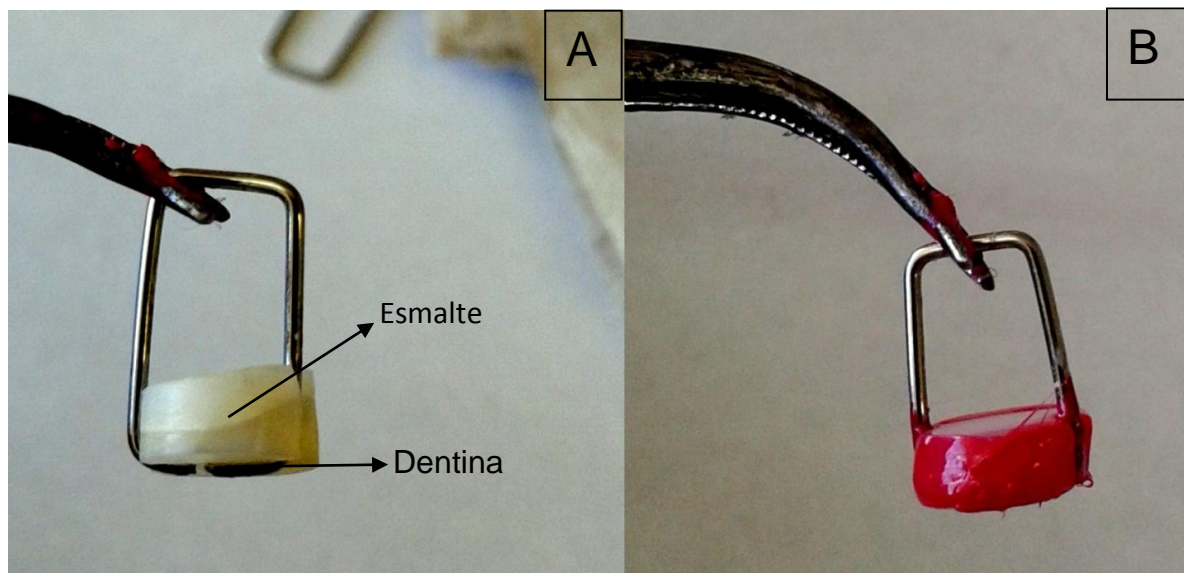


Figura 5 – Disco de esmalte. Figura A ilustra a superfície (esmalte) e a base (dentina). A lateral e a base dos discos foram isoladas com esmalte de unha, como ilustrado na fig. B.

4.6 Esterilização da MOCS e amostras

Através da abertura da janela superior da câmara, cinco amostras de esmalte foram

colocadas em posição sobre cada uma das unidades acopladoras. O sistema foi fechado e autoclavado em protocolo de pressão de 1 ATM, 121 °C a 30 minutos.

4.7 Coleta da saliva, inóculo e formação do biofilme

Após aprovação do Comitê de Ética em pesquisa (ANEXO 1), foi realizada a coleta de 20 ml de saliva estimulada por filme de parafina (Parafilm .M[®], American National CanTM, Chicago, IL, EUA) de um doador saudável (51 anos) que suspendeu a higiene oral por 24h e a alimentação por 2h previas à coleta de saliva. A saliva foi depositada em um tubo de 50 mL estéril e homogeneizada em vortex. Quatorze ml de saliva foram adicionadas em 240 mL de DMM previamente preparado, e o restante foi submetido a quantificação microbiológica (dados expressos em UFC/mL-baseline).

A mistura de saliva e DMM foi agitada e 21 ml dessa solução foram adicionados através de cada inlet específico localizado sobre as unidades acopladoras. O inóculo permaneceu sobre os discos de esmalte por 1 hora, para formação de película adquirida e após esse período, DMM foi perfundido em velocidade média de 0.04 ou 0.06 ml/min conforme protocolo. O desafio cariogênico foi simulado por fluxo intermitente 5 ou 6 min de sacarose 5 ou 10%, 8 ou 3x ao dia em velocidade de fluxo de 1,2 ou 0,25ml/min. Os biofilmes foram formados independentemente sobre os discos de esmalte bovino, em condições de anaerobiose dado através fluxo médio de gás de 250ml/min aplicados durante 30 minutos, 3x ao dia (SISSONS, 1991).

4.8 Protocolo Experimental 1

Os biofilmes formados a partir desse protocolo foram formados utilizando os seguintes parâmetros: Saliva artificial (DMM), utilizada em fluxo contínuo na velocidade de 0,04 ml/min. A solução de sacarose 10% foi aplicada 8x ao dia com intervalos de 2 horas para cada pulso de 5 minutos em velocidade de 1,2 ml/min. Após 1h do período de inoculação, o DMM foi aplicado por 2h, quando o fluxo de sacarose foi ativado. Após 5 minutos de aplicação da solução de sacarose, o fluxo de DMM foi novamente religado e esse processo ocorreu de forma intermitente durante 8 pulsos. Ao encerramento desse ciclo, DMM permaneceu ligado em regime

contínuo até se iniciar um novo ciclo (Ciclos de 24h em 24h). Esse regime permaneceu pelos 14 dias de experimento, somente sendo parado no momento da coleta das amostras.

4.9 Protocolo Experimental 2

Saliva artificial (DMM) foi utilizada em fluxo contínuo na velocidade de 0,06 ml/min. A solução de sacarose 5% foi aplicada 3x ao dia com intervalos de 8 horas para cada pulso de 6 minutos em velocidade de 0,25 ml/min. Após 1h do período de inoculação, DMM foi aplicado por 8h, quando o fluxo de sacarose foi ativado. Após 6 minutos de aplicação da solução de sacarose, o fluxo de DMM foi novamente religado e esse processo ocorreu de forma intermitente durante 3 pulsos diários. Esse regime permaneceu os 21 dias de experimento, somente sendo parado no momento da coleta das amostras.

4.10 Análise dos Perfis Microbianos/ Crescimento da Placa

No primeiro estudo piloto, a câmara foi assepticamente aberta e as amostras foram coletadas após 4, 7 e 14 dias. Os discos de esmaltes foram removidos com pinça estéril, sem perturbar o biofilme formado na superfície do disco e colocados em superfícies individuais estéreis. Foi realizada coleta de biofilme através de microbrush também estéril. O biofilme coletado de cada amostra foi colocado em microtubos estéreis pré-pesados. O peso úmido de cada amostra foi então determinado através de nova pesagem em balança de precisão. Para o segundo estudo piloto, as coletas foram realizadas após 4, 7, 14 e 21 dias, seguindo o mesmo processo de coleta do piloto 1.

Após a obtenção do peso úmido, foram adicionados 1mL de solução salina estéril (0,9%) para cada miligrama de biofilme em cada microtubo e esses foram sonificados (Sonicador de Ponteira/Desruptor de Células Ultrassônico DES500, Unique, Brasil) com potência de 20W, amplitude de 5%, usando 3 pulsos de 10 segundos cada para obtenção do biofilme em suspensão homogênea. As suspensões foram diluídas em solução salina em séries até 1:10⁷ e imediatamente inoculadas em duplicata nos seguintes meios de cultura: Ágar sangue para microrganismos totais; Ágar mitis salivarius com 0,2 unidades de bacitracina/mL

(MSB), para quantificação de estreptococos do grupo mutans; Ágar Rogosa SL para lactobacilos e BHI com pH ajustado a 4,8 para quantificação de microorganismos acidúricos totais. As placas foram incubadas em condição de anaerobiose (80% N₂, 10% CO₂ e 10% H₂), a 37°C por 96h. As contagens foram feitas por unidades formadoras de colônia e os resultados expressos em UFC/mg de espécime de biofilme (peso úmido) e em porcentagem de estreptococos do grupo mutans, de lactobacilos e microorganismos acidúricos totais em relação aos microorganismos totais cultiváveis.

4.11 Análise da alteração de dureza nos discos de esmalte

Os discos de esmalte foram previamente avaliados quanto as valores de dureza superficial. Foram feitas três edentações centrais ao disco e espaçadas 100 µm cada. Foi utilizado uma força de 50g e tempo de 5s para execução das edentações. Foi utilizado um microdurômetro (Microhardness Tester FM 700, Future-Tech Corp., Kawasaki, Tóquio, Japão) para essas avaliações. Após cada fase de crescimento dos biofilmes, a dureza de superfície do esmalte foi novamente mensurada e a perda (em relação à dureza inicial) da dureza da superfície foi calculada percentualmente (%PDS) (Cury et al., 2000).

4.12 Análise Estatística

Os dados foram analisados usando o Programa SigmaStat v.3.5 (Systat Software Inc., Chicago, IL, USA). As premissas de igualdade de variâncias e distribuição normal de erros foram verificadas para todas as variáveis de resposta testadas e aquelas que não satisfizeram esses pressupostos foram transformadas. Para o PE1, dados de %PDS e contagem microbiana para os lactobacilos foram ranqueados e dados de microorganismos totais, mutans e acidúricos transformados em log₁₀. Para o PE2, dados acidúricos totais foram ranqueados e dados de microorganismos totais, mutans e acidúricos transformados em log₁₀. Para ambos protocolos experimentais, os dados de %PDS e contagem de UFC foram submetidos separadamente a testes de ANOVA de uma via seguida pelo teste de Tukey. Para todos os testes, $p < 0.05$ foi considerado como significativo.

5. RESULTADOS

5.1 Protocolo Experimental 1

A Tabela 1 apresenta os resultados da multiplicação microbiano e porcentagem de perda mineral dos discos de esmalte para o PE1. Em 4 dias de experimento, maiores contagem de MT, AT e L foram observadas em relação ao baseline. EGM apresentou uma mínima diferença em relação ao baseline do doador, e manteve-se significativamente constante em relação aos outros tempos experimentais ($p=0.790$). A partir da primeira semana de experimento, houve aumento de MT, AT ($p<0,03$) e lactobacilos ($p=0,261$) em relação aos 4 dias. Em duas semanas de crescimento bacteriano de MT, AT e L foi significativamente maior do que o primeiro tempo experimental ($p\leq 0.036$), no entanto, não mostrou diferença significativa da primeira semana.

Com relação a desmineralização do esmalte, observou-se que na %PDS houve maiores valores para os 14 dias, seguido de 7 e 4 dias. No entanto, não houve diferença estatística significativa para os tempos experimentais de 4 e 7 dias e nem para os períodos de 7 e 14 dias ($p<0,05$), havendo diferença somente entre os tempos iniciais e finais, 4 e 14 dias respectivamente.

Tabela 1. Médias e desvio padrão dos dados microbiológicos (UFC/mg-Log10) e porcentagem das perdas minerais referentes ao Protocolo Experimental 1.

	Micro-organismos totais	S. Mutans	Acidúricos Totais	Lactobacilos	%PDS
Baseline do doador	7.41	5.30	5.22	5.35	-
4 dias	7.60 (0.67)a	4.83(0.66)a	5.52(0.61)a	6.14(0.69)a	80.93(17.28)a
7 dias	6.99(0.61)b	4.88(0.61)a	6.55(0.44)b	6.35(1.43)ab	90.97(8.48)ab
14 dias	6.95(0.61)b	4.59(1.28)a	6.62(0.82)b	6.64(1.07)b	94.76(5.42)*b

Letras diferentes representam diferença estatística entre os tempos experimentais na mesma coluna (Anova, Tukey, $p < 0.05$) Para cada tempo experimental ($n=10$). * Duas amostras apresentaram perda de continuidade na superfície (erosão) e não foram validadas.

5.2 Protocolo experimental 2

A Tabela 2 demonstra os resultados do crescimento microbiano e porcentagem de perda mineral dos discos de esmalte para o PE2. Maiores contagem de micro-organismos totais (MT), estreptococos do grupo mutans (EGM), acidúricos totais (AT) e lactobacilos (L) são observadas aos 4 dias comparado ao baseline do doador. Para os tempos experimentais de 7 e 14 dias, houve um aumento significativo de EGM, L ($p \leq 0.015$) e para AT ($p=0.142$) em comparação tempo experimental de 4 dias, mas não houve diferença significativa entre eles ($p \geq 0.233$). As contagem de MT permaneceram constantes para os tempos experimentais de 4, 14 e 21 dias ($p \geq 0.08$). Com exceção dos MT, na terceira semana de experimento todos os outros micro-organismos tiveram uma significativa redução na contagem de UFC em comparação a segunda semana de crescimento no modelo.

Para as análises minerais observou-se que para os diferentes tempos experimentais a %PDS foi significativamente menor para 4 dias em comparação aos demais tempos ($p < 0.05$), no entanto a %PDS foi maior e não estatisticamente significante entre os demais tempos.

Tabela 2. Médias e desvio padrão dos dados microbiológicos (UFC/mg- \log_{10}) e minerais referentes ao Protocolo Experimental 2.

	Micro-organismos totais	S. Mutans	Acidúricos Totais	Lactobacilos	%PDS
Baseline do doador	7.4	5.29	5.22	5.34	-
4 dias	7.31 (0.63) ^{ab}	3.21(0.36) ^a	6.03 (0.38) ^a	2.51(0.3) ^a	38.53(3.60) ^a
7 dias	7.72 (0.86) ^b	6.08(0.59) ^b	6.92 (1.36) ^c	4.68(1.31) ^b	46.75(7.80) ^b
14 dias	7.09 (0.61) ^a	5.86(0.37) ^b	6.72 (0.42) ^{ac}	4.9(0.68) ^b	51.99(9.96) ^b
21 dias	6.88 (0.69) ^a	2.6 (0.92) ^a	4.76 (0.75) ^b	3.8(1.34) ^c	51.72(6.36) ^b

Na mesma coluna letras diferentes representam diferença estatística para cada tempo experimental. Anova seguido de Teste Tukey ($p < 0.05$). Para cada tempo experimental ($n=10$).

6. DISCUSSÃO

Modelos de biofilme utilizando microcosmos como inóculos, tendem a ser mais fiéis na mimetização do que ocorre no ambiente bucal. São capazes de manter a complexidade do inóculo original e as relações entre os ecossistemas em um ambiente *in vitro* (MCBAIN, 2009). Quando observa-se os valores do baseline e dos outros tempos experimentais para ambos PEs, percebe-se que a heterogeneidade do inóculo continua a mesma, se consideradas os micro-organismos avaliados. As mesmas bactérias iniciais ainda encontram-se no biofilme, no entanto, em proporção maior devido as condições de crescimento disponibilizadas.

A presença intermitente de sacarose permitiu que curvas de Stephan fossem simuladas no modelo. As quedas de pH intermitentes simulando uma ingestão frequente ou mais branda de carboidrato fermentável (Sacarose 10 ou 5%, 5x ou 3x ao dia) permitiram a seleção de micro-organismos mais acidúricos e acidogênicos. O ambiente com baixo pH também é tolerado pelos EGM (VAN HOUTE, 1994; BECKER et al., 2002), no entanto, maiores contagens EGM foram observadas somente para o PE2 nas duas primeiras semanas. A contagem de EGM permaneceu constantes para o PE1 nesse mesmo período. Embora EGM tem sido relatado como um dos principais micro-organismos envolvido no processo cárie, é importante considerar que as modificações que ocorrem na superfície dos tecidos duros dentais é resultado da integração entre a composição microbiana e o metabolismo do biofilme. Assim o potencial cariogênico da microbiota e as interações fisiológicas entre as partes não são relacionadas somente ao papel de uma única colônia (TAKAHASHI and NYVAD, 2008).

A seleção de micro-organismos acidogênicos e acidúricos vai ao encontro da teoria ecológica da placa, a qual menciona que frente a baixas ingestões de carboidratos, as essas bactérias apresentam em menor proporção em relação aos

outros micro-organismos presentes e quando ocorre o aumento da ingestão de carboidratos elas passam a ser favorecidas em sua proliferação (MARSH, 2006).

Um ambiente com constante baixo valor de pH é responsável pelo processo de desmineralização do substrato dental. Quando existe substrato fermentável disponível, os micro-organismos acidogênicos passam a metabolizá-lo e a produzir resíduos ácidos os quais fazem com que o biofilme tenha um valor de pH baixo e propicie a desmineralização dos tecidos dentários (MARSH, 2003,2006). Os dados minerais e microbiológicos parecem relacionar-se a essa assertiva. Para ambos os protocolos experimentais observa-se maior %PDS quando existe maior presença de micro-organismos desse tipo (L, AT e M). É possível comparar os tempos experimentais de 4 e 7 dias, onde o aumento microbiano é refletido em maior perda mineral frente a um regime constante de sacarose. Entre uma e duas semanas de crescimento bacteriano é possível observar uma estabilização do crescimento bacteriano e da perda mineral.

No entanto, esse fenômeno em que ocorre a estabilização da perda mineral, pode ser explicado pela configuração do modelo adotado para o desenvolvimento do biofilme. Modelos de biofilmes formados em simuladores de fluxo contínuo apresentam uma taxa de crescimento bastante acelerada, uma vez que a disponibilidade de nutrientes é entregue de forma contínua (MCBAIN, 2006) e diante dessa premissa, pode haver a formação da comunidade clímax de forma bastante rápida. Parece que o estágio de equilíbrio dinâmico entre os micro-organismos que compõe esse biofilme é atingido após uma semana de crescimento, quase não havendo diferenças entre MT, EGM, AT E L entre a primeira e a segunda semana de crescimento no modelo. A partir do primeiro dia de crescimento diversas modificações ambientais ocorrem de forma que diferentes gêneros e espécies microbianas variem até atingir uma fase de equilíbrio. Este equilíbrio é dinâmico, pois envolvem constantes modificações fisiológicas, para que a comunidade sobreviva no nicho colonizado. As variações na composição e proporção das espécies são menores, a não ser que grandes variações ambientais ocorram. No PE2, onde é possível observar o crescimento microbiano até 21 dias, percebe-se que ocorre uma variação na proporção de EGM, AT, L, os quais diminuem significativamente comparados as primeiras semanas. No entanto, a quantidade de micro-organismos totais ainda permanece constante. Esse achado pode ser indício de que variações ambientais podem estar ocorrendo no biofilme formado, o que

desencadeiam a diminuição de micro-organismos acidogênicos e acidúricos em detrimento da seleção de outros e explicaria a estabilização da perda mineral. Neste trabalho utilizou-se somente a técnica tradicional de cultura bacteriana e os mesmos micro-organismos foram avaliados ao longo dos tempos experimentais. A utilização de metodologias de cunho molecular poderiam permitir a identificação e quantificação de outras espécies microbianas que poderiam estar se selecionando frente as condições impostas pelo simulador.

Em ambos protocolos experimentais o processo cárie foi mimetizado. Para o PE1 a %PDS foi elevada alcançando a média de 94% de perda mineral, enquanto que para o PE2 a %PDS foi bem mais branda. Os valores de %PDS do PE2 que ocorreram após 14 dias, mesmo que em quantidades de aplicações diárias de sacarose e concentração diferentes, estão de acordo com os resultados encontrados em estudos *in situ*, onde a aplicação de sacarose 8x ao dia gerou %PDS de aproximadamente 57.3 ± 32.3 e 50.4 ± 26.7 após 14 dias (PECHARKI et al., 2000; PAES LEME et al., 2004). Estudos *in situ* são aqueles que mais se aproximam do estudo *in vivo*, dado as suas proporções, porém, eles demonstram a desvantagem de expressarem grande variabilidade de resultados como consequência da atuação de fatores intrínsecos do paciente, tais como fluxo salivar, capacidade tampão da saliva, mas principalmente relacionados aos seus hábitos dietéticos e de higiene bucal (ZERO et al., 2005; TENUTA et al., 2006; AIRES et al., 2008; VAN STRIJP et al., 2008). Ter um experimento laboratorial que simule a perda mineral ocorrida nesses estudos, parece ser relevante do ponto de vista ético e metodológico. Modelos laboratoriais, que consigam mimetizar o ambiente *in situ* e as variáveis de resposta dele, podem proporcionar uma menor variabilidade entre os resultados e não necessitar do ambiente oral dos indivíduos (ZERO et al., 2005).

O protocolo experimental 1 apresentou %PDS mais elevada quando comparado ao PE2 e em um período relativamente curto de tempo, o que não ocorrerá naturalmente na cavidade oral. No entanto, o protocolo permitiu o desenvolvimento de microbiota cariogênica e perda mineral em esmalte de forma ainda que rápida, mas coerentes com padrões da etiologia da cárie dentária. Protocolos como esses podem, por exemplo, ser aproveitados para estudos laboratoriais onde se precisa de substratos afetados por cárie de forma rápida. O PE2, por sua vez, parece ser melhor indicado para estudos relacionados ao desenvolvimento da cárie dentária. A MOCS demonstrou ser capaz de simular o

ambiente bucal, capaz de replicar a heterogeneidade do inóculo, promover o crescimento de um biofilme com bactérias cariogênicas e desencadear a perda mineral no substrato utilizado.

7. CONCLUSÃO

O Simulador Multifuncional de Cavidade Oral demonstrou ser capaz de simular o ambiente bucal e sugere ser um recurso laboratorial válido para pesquisas pré-clínicas relacionadas a cárie dentária.

Referências

- AIRES C, P, DEL BEL CURY A, A, TENUTA L, M, A, KLEIN M, I, KOO H, DUARTE S, CURY J, A, Effect of Starch and Sucrose on Dental Biofilm Formation and on Root Dentine Demineralization. **Caries Research** 2008;42:380-386.
- ALTMAN H, STEINBERG D., PORAT Y, MOR A, FRIEDMAN D, FRIEDMAN M, et al., In vitro assessment of antimicrobial peptides as potential agents against several oral bacteria, **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** 58 (1) (2006) pp. 198-201.
- AZEVEDO MS, VAN DE SANDE FH, ROMANO AR, CENCI MS. Microcosm biofilms originating from children with different caries experience have similar cariogenicity under successive sucrose challenges. **Caries Research** 2011, 45: 510-7.
- BECKER MR, PASTER BJ, LEYS EJ, et al. Molecular Analysis of Bacterial Species Associated with Childhood Caries. **Journal of Clinical Microbiology**, 2002;40(3):1001-1009. doi:10.1128/JCM.40.3.1001-1009.2002.
- BRADSHAW, D. J.; MCKEE, A. S.; MARSH, P. D. Effects of carbohydrate pulses and pH on population shifts within oral microbial communities in vitro. **Journal of Dental Research**, v.68, n.9, p.1298-1302, Sep. 1989.
- CURY JA, REBELO MA, DEL BEL CURY AA, DERBYSHIRE MT, TABCHOURY CP. Biochemical composition and cariogenicity of dental plaque formed in the presence of sucrose or glucose and fructose. **Caries Research** 2000 Nov-Dec;34(6):491-7.
- CURY, J. A.; REBELLO, M. A.; DEL BEL CURY, A. A. In situ relationship between sucrose exposure and the composition of dental plaque. **Caries Research**, v.31, n.5, p.356-360. 1997.
- DENG, D.M; TEN CATE, J.M “Demineralization of dentin by Streptococcus mutans biofilms grown in the constant depth film fermentor,” **Caries Research**, vol. 38, no. 1, pp. 54–61, 2004.
- DO T, DEVINE D, MARSH PD. Oral biofilms: molecular analysis, challenges, and future prospects in dental diagnostics. **Clinical, Cosmetic and Investigational Dentistry** 2013;5:11-19. doi:10.2147/CCIDE.S31005.
- FILOCHE, S. K.; SOMA, D.; VAN BEKKUM, M.; SISSONS, C. H. Plaques from different individuals yield different microbiota responses to oral-antiseptic treatment. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, Jul 16. 2008.
- FILOCHE, S. K.; SOMA, K. J.; SISSONS, C. H. Caries-related plaque microcosm biofilms developed in microplates. **Oral Microbiology and Immunology**, v.22, n.2, p.73-79, Apr. 2007.
- GUSSY MG, WATERS EG, WALSH O, KILPATRICK NM: Early childhood caries: current evidence for etiology and prevention. **Journal Pediatric Child Health** 2006; 42: 37–43.

JENSEN, M. E. & SCHACHTELE, C. F. Plaque pH measurements by different methods on the buccal and approximal surfaces of human teeth after a sucrose rinse. **Journal Dental Research** 62, (1983) 1058–1061.

LEE, V. A; KARTHIKEYAN, R; RAWLS H. R; AMAECHI, B. T. Anti-cariogenic effect of a cetylpyridinium chloride containing nanoemulsion. **Journal of Dentistry**, v.38, p. 742 – 749, Jun. 2010.

MARSH, P D Are dental diseases examples of ecological catastrophes? **Microbiology** 2003;149:279-94.

MARSH, P D Dental plaque: biological significance of a biofilm and community lifestyle. **Journal of Clinical Periodontology**, v.32 Suppl 6, p.7-15. 2005.

MARSH, P D Dental plaque as a biofilm and a microbial community - implications for health and disease. **BMC Oral Health**, v.6 Suppl 1, p.S14. 2006.

MARSH PD, FEATHERSTONE A, MCKEE AS, HALLSWORTH AS, ROBINSON C, WEATHERELL JA, NEWMAN HN, PITTER AF: A microbiological study of early caries of approximal surfaces in schoolchildren. **Journal of Dental Research** 1989, 68:1151-1154.

MCBAIN, A. J: Chapter 4: In vitro biofilm models: an overview, **Advances in Applied Microbiology**, 69 (2009) pp. 99-132.

PARISOTTO TM, STEINER-OLIVEIRA C, DUQUE C, PERES RC, RODRIGUES LK, NOBRE-DOS-SANTOS M: Relationship among microbiological composition and presence of dental plaque, sugar exposure, social factors and different stages of early childhood caries. **Archives of Oral Biology** 2010; 55: 365–373.

PERES MA, DE OLIVEIRA LATORRE MDO R, SHEIHAM A, PERES KG, BARROS FC, HERNANDEZ PG, MAAS AM, ROMANO AR, VICTORA CG: Social and biological early life influences on severity of dental caries in children aged 6 years. **Community Dental Oral Epidemiology** 2005; 33: 53–63.

RICKARD, A. H., P.; GILBERT, N. J.; HIGH, P. E. KOLENBRANDER; P. S. HANDLEY. Bacterial coaggregation: an integral process in the development of multi-species biofilms. **Trends Microbiology**, v.11, p.94-100, 2003.

ROSENTRITT M, HAHNEL S, GRÖGER G, MÜHLFRIEDEL B, BÜRGERS R, HANDEL G. Adhesion of *Streptococcus mutans* to various dental materials in a laminar flow chamber system. **Journal Biomedical Materials Research B Applied Biomaterials**, v. 86, n. 1, p. 36-44, Jul. 2008.

SELWITZ RH, ISMAIL AI, PITTS NB: **Dental caries**. *Lancet* 2007; 369: 51–59.

SISSONS, CH; ANDERSON, S.A; WONG, L; COLEMAN, M.J; WHITE, D.C. Microbiota of Plaque Microcosm Biofilms: Effect of Three Times Daily Sucrose

Pulses in Different Simulated Oral Environments. **Caries Research**, 2007, 41:413–422.

SHU, M.; WONG, L.; MILLER, J. H.; SISSONS, C. H. Development of multi-species consortia biofilms of oral bacteria as an enamel and root caries model system. **Archives of Oral Biology**, v.45, n.1, p.27-40, Jan. 2000.

SISSONS, C. H.; CUTRESS, T. W.; HOFFMAN, M. P.; WAKEFIELD, J. S. A multi-station dental plaque microcosm (artificial mouth) for the study of plaque growth, metabolism, pH, and mineralization. **Journal of Dental Research**, v.70, n.11, p.1409-1416, Nov. 1991.

SOUSA, R. P.; ZANIN, I. C.; LIMA, J. P.; VASCONCELOS, S. M.; MELO, M. A.; BELTRAO, H. C.; RODRIGUES, L. K. In situ effects of restorative materials on dental biofilm and enamel demineralisation. **Journal of Dentistry**, v.37, n.1, p.44-51, Jan. 2009.

TAKAHASHI N, NYVAD B, Caries Ecology Revisited: Microbial Dynamics and the Caries Process. **Caries Research** 2008;42:409-418

TANG, G.; YIP, H. K.; CUTRESS, T. W.; SAMARANAYAKE, L. P. Artificial mouth model systems and their contribution to caries research: a review. **Journal of Dentistry**, v.31, n.3, p.161-171, Mar. 2003.

TEN CATE, J. M. Biofilms, a new approach to the microbiology of dental plaque. **Odontology**, v.94, n.1, p.1-9, Sep. 2006.

TENUTA, Livia Maria Andaló et al . Effect of plaque accumulation and salivary factors on enamel demineralization and plaque composition in situ. **Pesquisa Odontológica Brasileira**, São Paulo , v. 17, n. 4, Dec. 2003 .

TENUTA L, M, A, RICOMINI FILHO A, P, DEL BEL CURY A, A, CURY J, A, Effect of Sucrose on the Selection of Mutans Streptococci and Lactobacilli in Dental Biofilm Formed in situ. **Caries Reserach** 2006;40:546-549.

VAN DE SANDE FH, AZEVEDO MS, LUND RG, HUYSMANS MC, CENCI MS. An in vitro biofilm model for enamel demineralization and antimicrobial dose-response studies. **Biofouling** 2011;27:1057-63.

VAN HOUTE J, LOPMAN J, KENT R. The Predominant Cultivable Flora of Sound and Carious Human Root Surfaces **Journal of Dental Research**, 1994 73: 1727-1734, doi:10.1177/00220345940730110801.

VAN STRIJP A, J, P, GERARDU V, A, M, BUIJS M, J, VAN LOVEREN C, TEN CATE J, M, Chlorhexidine Efficacy in Preventing Lesion Formation in Enamel and Dentine. **Caries Research** 2008;42:460-465.

WONG, L.; SISSONS, C. A comparison of human dental plaque microcosm biofilms grown in an undefined medium and a chemically defined artificial saliva. **Archives Oral Biology**, v.46, n.6, p.477-486, Jun. 2001.

ZAURA, E; BUIJS, M. J; HOOGENKAMP, M. A; CIRIC, L; PAPETTI, A; SIGNORETTO, C; STAUDER, M; LINGSTRÖM, P; PRATTEN, J; SPRATT, D.A; WILSON, M. The Effects of Fractions from Shiitake Mushroom on Composition and Cariogenicity of Dental Plaque Microcosms in an In Vitro Caries Model. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2011. Set. 2011.

ZERO, D. T. AND LUSI, A. (2005), Erosion — chemical and biological factors of importance to the dental practitioner. **International Dental Journal**, 55: 285–290. doi: 10.1111/j.1875-595X.2005.tb00066.x

Anexo

Anexo A – Aprovação do Comitê de Ética

FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE
PELOTAS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ESTABELECIMENTO E VALIDAÇÃO DOSE-RESPOSTA DE UM MODELO DE BIOFILME DE MICROCOSMOS EM FLUXO CONTÍNUO

Pesquisador: Maximiliano Sérgio Cenci

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 23941413.6.0000.5317

Instituição Proponente: Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Pelotas

Patrocinador Principal: MINISTERIO DA CIENCIA, TECNOLOGIA E INOVACAO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 453.023

Data da Relatoria: 31/10/2013

Apresentação do Projeto:

O biofilme dental está diretamente envolvido na etiologia da doença cárie. A análise dos mecanismos que envolvem a sua formação e desenvolvimento podem auxiliar em um melhor entendimento do surgimento e progressão da cárie dentária, bem como definir seu tratamento mais efetivo. Assim, metodologias que permitem investigar as interações presentes no conjunto formado pelo tecido dental e biofilme cariogênico são essenciais para o avanço em pesquisa pré-clínica. O objetivo desse trabalho, portanto, será o desenvolvimento de um modelo de biofilme, em câmara de fluxo, que tenha capacidade de mimetizar os eventos mediados pelo biofilme dental que ocorre em condições clínicas na cavidade bucal, tais como oscilações de pH, sucessões microbianas e o surgimento de lesões de cárie. Será realizado um estudo in vitro, no qual serão formados biofilmes em câmaras de fluxo sobre discos de esmalte, tendo como inóculo saliva humana (microcosmos) que serão crescidos independentemente por 3, 6, 10 e 14 dias (n=8). Serão realizados 3 experimentos independentes relacionados ao desenvolvimento do modelo, a validação doseresposta

à Clorexidina e a reprodutibilidade. No primeiro, será realizado o crescimento microbiano por até 14 dias, em meio definido de mucina (DMM) associado com pulsos de sacarose. No segundo ocorrerá crescimento microbiano por até 6 dias para diferentes concentrações de

Endereço: Rua Prof Araujo, 465 sala 301

Bairro: Centro

CEP: 96.020-360

UF: RS

Município: PELOTAS

Telefone: (53)3284-4960

Fax: (53)3221-3554

E-mail: cep.famed@gmail.com

FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE
PELOTAS



Continuação do Parecer: 453.023

Clorexidina (CLX) e no terceiro, uma condição de CLX associada a 6 dias de crescimento microbiano será selecionada para o experimento. As análises serão compostas por determinação das alterações em esmalte decorrente ao processo de desafio cariogênico por microdureza de superfície e longitudinal, e composição microbiológica do biofilme através da contagem das unidades formadoras de colônias.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo geral é desenvolver um modelo de biofilme de microcosmos em fluxo contínuo para o estudo de aspectos relacionados ao desenvolvimento de lesões de cárie dental.

Os objetivos específicos serão validar o presente modelo através da avaliação de dose-resposta a Clorexidina e testar a sua reprodutibilidade.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

O trabalho oferece risco mínimo, pois suspender a escovação 24h oferece, ainda que temporariamente, danos ao paciente.

Benefícios:

O paciente apresentando atividade de cárie receberá o tratamento necessário baseado em seu exame clínico bucal completo. Todos os tratamentos necessários serão realizados na clínica odontológica da Pós-graduação da Faculdade de Odontologia de Pelotas (UFPEL) e não haverá custo algum para o doador.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Será realizado um estudo in vitro, completamente aleatorizado, no qual serão formados biofilmes em câmaras de fluxo sobre discos de esmalte, tendo como inóculo saliva (microcosmos) de um voluntário adulto e saudável. Os biofilmes serão crescidos independentemente por até 14 dias sobre discos de esmalte presentes nas câmaras de fluxo.

Serão realizados 3 experimentos independentes: o primeiro para desenvolvimento do modelo (experimento 1), o segundo para validação dose-resposta à CLX (experimento 2), e o terceiro para testar a reprodutibilidade do modelo (experimento 3).

Em todos os experimentos, as variáveis de resposta serão obtidas por: determinação das alterações em esmalte por microdureza de superfície e longitudinal e por composição microbiológica do biofilme.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

OK

Endereço: Rua Prof Araujo, 465 sala 301

Bairro: Centro

CEP: 96.020-360

UF: RS

Município: PELOTAS

Telefone: (53)3284-4960

Fax: (53)3221-3554

E-mail: cep.famed@gmail.com

FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE
PELOTAS



Continuação do Parecer: 453.023

Recomendações:

OK

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

OK

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PELOTAS, 11 de Novembro de 2013

Assinador por:
Patricia Abrantes Duval
(Coordenador)

Endereço: Rua Prof Araujo, 465 sala 301
Bairro: Centro **CEP:** 96.020-360
UF: RS **Município:** PELOTAS
Telefone: (53)3284-4960 **Fax:** (53)3221-3554 **E-mail:** cep.famed@gmail.com