

MODELOS DE BIOFILME *IN VITRO* PARA ESTUDOS DE CÁRIE DENTÁRIA: REVISÃO SISTEMÁTICA

TAMIRES TIMM MASKE¹; RODRIGO ALEX ARTHUR²; FRANÇOISE HÉLÈNE
VAN DE SANDE³; MAXIMILIANO SÉRGIO CENCI⁴

¹Universidade Federal de Pelotas –tamirestmaske@gmail.com

²Universidade Federal do Rio Grande do Sul- rodrigoarthur.ufrgs@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas– fvandesande@gmail.com

⁴Maximiliano Sérgio Cenci- cencims@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Cárie dentária é uma das mais prevalentes doenças orais (SELWITZ, 2007) relacionadas a não perturbação do crescimento bacteriano na superfície dentária em resposta a uma dieta rica em sacarose. A cavidade oral é capaz de influenciar diversidade dos biofilmes dentais em seu crescimento devido a sua capacidade de gerar condições seletivas ambientais como localização dentária, pH, pO₂, tipo de substrato, entre outros (BRADSHAW et al., 1998). Modificações ambientais, fisiológicas ou pressões seletivas que podem ocorrer durante o crescimento bacteriano são capazes de simular a proliferação de certos microorganismos específicos que podem levar a um biofilme cariogênico (PARISSOTO et al., 2010).

A complexidade desse ambiente oral, associado a problemas éticos provenientes de experimentação clínica tem levado ao desenvolvimento de modelos laboratoriais com o esforço de simular aquelas condições clínicas *in vitro*. Nesse contexto, modelos microbianos laboratoriais complexos e simplificados tem sido utilizados para o desenvolvimento de lesões de cárie artificiais. Biofilmes artificiais tem sido cultivados a partir de monocultura, consórcio ou por microcosmos; em diferentes modelos como em placas de 24 poços, placas de petri, em simuladores de bocas artificiais, Fermentadores, quemostatos, reatores e em câmaras ou células de fluxo (MC BAIN, 2009).

Até agora, a escolha por um modelo microbiológico específico *in vitro* para o estudo de cárie dental parece depender da preferencia do pesquisador, da facilidade logística ou da questão a ser respondida. Não existe consenso ou evidência até então sobre qual modelo é melhor adequado para simular o desenvolvimento do biofilme e da cárie. Portanto, o objetivo dessa revisão sistemática foi explorar e ponderar diferentes modelos *in vitro* considerando aspectos metodológicos como dose-resposta de cada modelo para substâncias anti-cáries or antimicrobianas. Além disso, visa gerar a evidência para seleção adequada de um modelo de biofilme dental para estudar a cárie dentária.

2. METODOLOGIA

Critérios de elegibilidade e estratégia de busca

Para investigar as características metodológicas dos modelos de biofilme *in vitro* para estudos da cárie dentária, os critérios foram divididos em parte I e II. Para parte I, os estudos deveriam: i) usar um modelo de biofilme *in vitro*, ii) permitir o desenvolvimento de biofilme cariogênico ou cárie dentária artificial e iii) flutuação de pH. Para parte II, estudos deveriam ter os critérios i, ii, iii e ter testado o efeito de substâncias antimicrobianas ou anticariogênicas. Somente

estudos completos foram selecionados e os estudos sem os critérios foram excluídos. Foram usadas três bases de dados: PubMed, Scopus e Isi Web of Knowledge, para a busca dos artigos. A estratégia de busca incluiu vocabulário controlado e termos livres como cárie dental, placa dental e modelos de biofilme. As referências dos artigos elegidos foram analisados manualmente para detectar outros estudos em potencial. A busca foi limitada por data (1990 até agora) e linguagem (inglês).

Seleção dos estudos, coleta de dados e avaliação do risco de viés

Todas as referências foram manejadas e armazenadas no programa EndNote X7® (Thomson Reuters, San Francisco, CA, USA). A remoção das duplicatas foi realizada nesse programa. Dois examinadores independentes (TTM e FHS) avaliaram todos os estudos selecionados nas bases de dados. Não foi realizado nenhum cegamento para títulos e autores dos estudos e os estudos foram primeiramente selecionados pelo título, depois pelo abstract e por fim pelo texto completo. Em caso de dúvida, um terceiro examinador foi consultado (MSC) para o consenso. Durante a seleção de dados, os artigos foram incluindo e excluídos utilizando tabelas pilotos nomeadas como: 1) Modelo microbiológico (sim ou não); 2) Desenvolvimento de biofilme cariogênico e/ou lesões artificiais de cárie (sim ou não); 3) Oscilação de pH por carboidrato (sim ou não); 4) Avaliação de substância anticariogênica ou antimicrobiana (sim ou não).

Para Parte I, foram extraídos os seguintes dados: modelo de biofilme usado; fonte do inóculo, substrato para o crescimento do biofilme, duração do experimento, meio de cultura e taxa de seu fluxo, fonte de carboidrato e frequência de exposição. Para Parte II, os dados coletados envolveram: métodos de avaliação; substâncias antimicrobianas ou anticariogênicas usadas, dose-resposta do modelo, significância dos efeitos dentro das variáveis de resposta. Dois revisores extraíram os dados simultaneamente. Uma descrição breve dos modelos foi feita, e eles foram categorizados em complexos e simplificados baseados na presença ou ausência de fluxo de meio de cultura. A qualidade dos estudos incluídos na parte II foi avaliada usando o critério de SARKIS-ONOFRE et al., (2014) modificado. Os parâmetros utilizados foram: presença do cálculo de amostra, grupo controle, reprodutibilidade experimental, blinding, padronização das amostras e controle de contaminação. Se os autores reportaram os parâmetros eles receberam “S”(sim), se a informação não era encontrada recebia “N” (não). Artigos com 1-3 “S” forma considerados de alto risco, 4-5 de médio risco e de 6-7 de baixo risco de viés.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A busca realizada encontrou 371 artigos. Depois da remoção das duplicatas, 295 títulos foram avaliados. A avaliação dos resumos resultou em 105 artigos completos para leitura. Cinquenta e três estudos foram nucleados para a Parte I, enquanto 29 foram incluídos na Parte II, avaliando o efeito de substâncias anticariogênicas e antimicrobianas. As razões para exclusão foram: não ser um modelo de biofilme(n=5), não ter oscilação de pH (n=45), o artigo não pode ser acessado (n=2). Dentro da parte I, 90.6% eram modelos complexos de biofilme enquanto 9.4% representou modelos simplificados. Na parte II, 93.1% correspondeu a modelos complexos enquanto 6.9% correspondeu a modelos

simplificações. Somente 20.7% dos estudos selecionados mostraram validação dose-resposta. Risco médio de viés foi encontrado em 61.1% enquanto alto risco de viés representou 37.9% dos estudos avaliados.

Modelos simples e complexos foram capazes de produzir lesões de cárie e biofilme artificialmente. Dentre os modelos complexos, 31.25% usaram MAM-*Multiplaque Artificial Mouth* (SISSONS et al., 1991), 18.75% CDF-*Constant Depth Film Fermenter* (PETERS et al., 1988), 37.5% câmaras ou células de fluxo (LYNCH et al., 2006), 4.17% AMCC-*Artificial Mouth Controlled by Computer* (MEY et al., 2013), 6.25% Quemostatos (BRADSHAW et al., 1994) e 2.08% usaram reator de biofilme (RUDNEY et al., 2012). Para os modelos simplificados, 80% usaram modelo de placas de 24-poços e o restante de petri.

Dez diferentes tipos de saliva artificiais foram reportadas. A escolha para a solução apropriada parece depender mais da complexidade do inóculo do que do modelo. Em geral a necessidade do biofilme cultivado a partir de monocultura de microorganismos puros permite o uso de meio de cultura baseado em triptona, peptona, extrato gástrico, caseína e um fonte de energia (açúcar). No entanto, a complexidade dos modelos de consórcio ou microcosmo requerem um meio de cultura mais enriquecido cuja composição química é mas semelhante a saliva humana. As salivas humanas artificiais são baseadas em baixo conteúdo de carboidrato, mas com proteínas, eletrólitos aminoácidos e complementos que permite o crescimento de diversos microorganismos de especificidades nutricionais diferentes. A redução do carboidrato estimula o sinergismo e o antagonismo metabólico entre microorganismos como aquele da cavidade oral. A escolha do meio de cultura parece depender do tipo do inóculo, a seleção do inóculo depende da necessidade ou pergunta do estudo. Monoculturas são melhor indicadas para avaliar aspectos fisiológicos específicos, consórcios são escolhidos para estudar modificações ecológicas.

Diferentes regimes de exposição a sacarose foram encontrados e mostraram uma direta relação entre a dieta cariogênica e o desenvolvimento de lesões de cárie e biofilme em resposta a as oscilações de pH. Essas oscilações geram pressões ecológicas e fazem a seleção de microorganismos, indo ao encontro da Teoria Ecológica da Placa (MARSH, 2003) para o desenvolvimento das lesões de cárie. Tendo um modelo capaz de reproduzir as modificações ecológicas encontradas na cavidade oral, isso é mais próximo da condição clínica.

Dentro dos estudos selecionados, dentes humanos e bovinos (esmalte, dentina e raiz dentinária) formam geralmente usados para o desenvolvimento das lesões de cárie artificial, enquanto superfícies inertes (plástico ou vidro) ou discos de hidroxiapatita foram usados para permitir o crescimento do biofilme.

4. CONCLUSÃO

Diversos são os modelos de biofilme *in vitro* disponíveis para o desenvolvimento da cárie dental. A falta de controle dos parâmetros metodológicos nas condições experimentais impede a avaliação da reprodutibilidade dos modelos. Embora os modelos de biofilme mostraram médio e alto risco de viés, a validação dose-resposta à substâncias antimicrobianas e anticariogênicas parecem ser a melhor evidência para usar um modelo de biofilme para o desenvolvimento de cárie.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

SELWITZ RH, ISMAIL AI, PITTS NB: Dental caries. **Lancet**, v.369, p.51-59, 2007.
BRADSHAW DJ, MARSH PD: Analysis of ph-driven disruption of oral microbial communities in vitro. **Caries research**, v.32, p.456-462, 1998.

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**, v.55, p.365-373, 2010.

SARKIS-ONOFRE R, SKUPIEN JA, CENCI MS, MORAES RR, PEREIRA-CENCI T: The role of resin cement on bond strength of glass-fiber posts luted into root canals: A systematic review and meta-analysis of in vitro studies. **Operative dentistry**, v.39, p.31-44, 2014.

MARSH PD: Are dental diseases examples of ecological catastrophes? **Microbiology**, v.149, p.279-294, 2003.

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

BRADSHAW DJ, MARSH PD: Effect of sugar alcohols on the composition and metabolism of a mixed culture of oral bacteria grown in a chemostat. **Caries research**, v. 28, p. 251-256, 1994.

MEI ML, CHU CH, LO EC, SAMARANAYAKE LP: Preventing root caries development under oral biofilm challenge in an artificial mouth. **Medicina oral, patologia oral y cirugia bucal**, v.18, p.557-563, 2013.

RUDNEY JD, CHEN R, LENTON P, LI J, LI Y, JONES RS, REILLY C, FOK AS, APARICIO C. A reproducible oral microcosm biofilm model for testing dental materials. **Journal of applied microbiology**, v.113, p.1540-1553, 2012.

PETERS AC, WIMPENNY JW. A constant-depth laboratory model film fermentor. **Biotechnology and bioengineering**, v.32, p.263-270, 1988.

LYNCH RJ, TEN CATE JM. Effect of calcium glycerophosphate on demineralization in an in vitro biofilm model. **Caries research**, v.40, p.142-147, 2006.