

UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO

Leticia Stefenon

**DESENVOLVIMENTO DE MODELO
EXPERIMENTAL DE BIOFILME SUPRA E
SUBGENGIVAL EM ESMALTE/DENTINA E
TITÂNIO**

Passo Fundo

2012

Letícia Stefenon

**DESENVOLVIMENTO DE MODELO
EXPERIMENTAL DE BIOFILME SUPRE E
SUBGENGIVAL EM ESMALTE/DENTINA E
TITÂNIO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da UPF, para obtenção do título de Mestre em Odontologia – Área de Concentração em Clínica Odontológica, sob orientação do prof. Dra. Luciana Ruschel dos Santos e coorientação do prof. Dr. Maximiliano Sérgio Cenci.

Passo Fundo

2012

Folha reservada para
Ata de aprovação da Banca Examinadora

Observação:

Mantenha esta página no seu arquivo, imprimindo-a.
Após, faça a substituição pela Ata de aprovação fornecida pela
Secretaria para manter a correta numeração do seu trabalho.

CIP – Catalogação na Publicação

S816d Stefenon, Leticia

Desenvolvimento de modelo experimental de biofilme supra e subgingival em esmalte/dentina e titânio/ Leticia Stefenon. – 2012.

90 f. ; 30 cm.

Orientação: Profª. Dra. Luciana Ruschel dos Santos.

Co-orientador: Prof. Dr. Maximiliano Cenci

Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Universidade de Passo Fundo, 2011.

1. Ciência da saúde - Odontologia. 2. Implante. I. Santos, Luciana Ruschel, orientadora. II. Cenci, Maximiliano. III. Título.

CDU: 616

Catalogação: Bibliotecária Vanessa Peres Domingues - CRB 10/2006

BIOGRAFIA DO AUTOR

Letícia Stefenon, nascida em 3 de julho de 1979 na cidade de Passo Fundo. Graduada em Odontologia pela Universidade de Passo Fundo. Atua como cirurgiã-dentista em consultório particular. Exerceu a docência na Universidade Regional Integrada – URI Campus Erechim nos cursos de Fisioterapia, Enfermagem, Farmácia e Odontologia. Atualmente atua como docente no curso de Odontologia da Faculdade Especializada na área de Saúde – FASURGS em Passo Fundo-RS.

OFERECIMENTOS E AGRADECIMENTOS

A Faculdade de Odontologia da UPF pela minha formação acadêmica e por ter me instigado a prosseguir na busca do saber.

Ao PPGOdonto pelas oportunidades de crescimento, principalmente na pessoa do seu Coordenador Prof. Dr. Álvaro Della Bona, sempre nos estimulando a buscar mais e ultrapassar os nossos limites.

A Secretária da PPGOdonto, Fabiana Pimentel, por ser sempre uma referência para os alunos do mestrado, sempre disponível e disposta para ajudar de maneira muitíssimo competente.

A Universidade Federal de Pelotas pelo acolhimento nas pessoas do Prof. Dr. Flávio Fernando Demarco e Prof. Dr. Maximiliano Sérgio Cenci, que possibilitaram a execução dessa pesquisa.

A todas as pessoas que contribuíram para que o projeto se concretizasse: os alunos da UFPel que me auxiliaram na parte experimental, a Carmem, funcionária do Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Odontologia da UFPel e aos voluntários da pesquisa.

A Prof. Dr. Luciana Ruschel dos Santos que se mostrou uma grande amiga durante esses dois anos.

Ao Prof. Dr. Maximiliano Sérgio Cenci, pela disponibilidade ímpar em me auxiliar desde o desenvolvimento até a execução do projeto.

A doutoranda da UFPel, Anelise Fernandes Montagner, que foi minha parceira em longas horas de laboratório, e a quem devo o andamento do meu experimento. Nunca vou conseguir agradecer o suficiente.

A minha família pelo apoio, incentivo e compreensão.

A minha mãe, Terezinha, pelo “apoio logístico” durante esses dois anos.

Ao meu pai, Rosemar, por ser sempre um exemplo de pessoa ética e comprometida, e por ser sempre um porto seguro.

Aos meus irmãos, Paula e Eduardo, pelo apoio incondicional que sempre me deram, amo vocês.

Ao meu esposo, Rodrigo, pela paciência e ausência durante esse período bastante conturbado.

A minha Nicole, minha razão de viver, por recarregar minhas baterias com seu sorriso e carinho.

Aos meus colegas de mestrado, Tiago, Juliana, Marielle, Luana, Lisiane, Audrea, Luciana, Fabrício e Gaspar, companheiros de jornada.

A empresa Titanium Fix pelo apoio ao projeto, com a doação dos corpos de prova.

A todos muitíssimo obrigada.

SUMÁRIO

BIOGRAFIA DO AUTOR	7
OFERECIMENTOS E AGRADECIMENTOS	9
SUMÁRIO	11
LISTA DE TABELAS	13
LISTA DE ABREVIATURAS	15
1. INTRODUÇÃO	21
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	23
3. PROPOSIÇÃO	45
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	47
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	53
6. CONCLUSÕES	59
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	61
REFERÊNCIAS.....	63
APÊNDICES.....	73
ARTIGO SUBMETIDO	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Rugosidade inicial.....	44
Tabela 2 – Relação tempo de crescimento e quantidade de biofilme formado.....	46
Tabela 3 – Relação entre inóculos e quantidade de biofilme formado.....	47
Tabela 4 – Relação entre substrato e quantidade de biofilme.....	47
Tabela 5 – PH do meio DMM no tempo em função de dois substratos e sais inóculos.....	48

LISTA DE ABREVIATURAS

PCR	Polimerase Chain Reaction
pH	Potencial Hidrogeniônico
mm	milímetros
µm	micrômetros
UPF	Universidade de Passo Fundo
UFPel	Universidade Federal de Pelotas
°C	Graus Celsius
rpm	rotações por minuto
DMM	meio definido enriquecido com mucina
g/l	gramas por litro
mmol/l	milimol por litro
ml	mililitro
UFC/ml	unidades formadoras de colônia por mililitro
g	gramas
min	minuto
µl	microlitro

RESUMO

O presente estudo se propôs a estudar o desenvolvimento de biofilme através da técnica de microcosmo sobre superfície de titânio e de discos padronizados de esmalte/dentina, no intuito de comparar a formação do mesmo nas duas superfícies e em diferentes tempos, assim como analisar a rugosidade superficial dos materiais antes e depois do experimento, e o pH do meio de cultura. Testando a hipótese de que esse é um modelo experimental viável e de baixo custo. Os dados obtidos foram analisados pelo teste ANOVA e Tuckey com valor de $\alpha = 0,05$. As análises mostraram que não houve diferença estatística entre as médias de rugosidade inicial e final. O biofilme formado foi maior na superfície de esmalte/dentina sendo o pico de crescimento em 24 horas. O pH do meio de cultura sofreu alcalinização com o passar do tempo sendo mais básico em 48 h. Mais análises são necessárias para testar a competência experimental do modelo, porém os dados obtidos sugerem que o modelo apresentado seja analisando em até 48 h e que mais estudos comparativos entre as superfícies devem ser feitos para justificar a diferença na formação de biofilme que foi maior nas amostras de tecido dentário do que em titânio.

Palavras-chave: microcosmo, biofilme, implantes, titânio, esmalte.

ABSTRACT¹

The present study aimed at studying the development of biofilm through the microcosm technique on titanium surface, as well as on the surface of standardized disks of enamel/dentin, in order to compare the biofilm's formation on both surfaces and at different times. It also had the objective of analyzing the surface roughness of the materials before and after the experiment, and the pH level of the culture medium. Testing the hypothesis that this is a feasible and low cost model. Data were analyzed by ANOVA and Tukey $\alpha = 0.05$ tests. The analyses showed no statistical difference between the initial and final roughness averages. The biofilm was higher on the enamel/dentin surface with a peak increase in 24 hours. The pH became more alkaline in the course of time and showed to be more basic in 48 hours. More analyses are needed to test the experimental competence of the model; however, the data suggest that the presented model should be analyzed within 48 hours, and more comparative studies of the surfaces should be done in order to justify the difference in the biofilm formation which was higher in the samples of dental tissue.

Key words: microcosm, biofilm, implants, titanium, enamel

¹ Title: Development of experimental model of supra and subgingival biofilm in enamel/dentin and titanium

1. INTRODUÇÃO

A reabilitação oral de forma total ou parcial através do uso de implantes dentários de titânio tem sido utilizada com frequência nos últimos anos. No entanto, insucessos nesses tratamentos são relatados e muitas vezes relacionados à perimplantite.

A perimplantite é descrita como um processo inflamatório destrutivo que afeta tecidos moles e duros circunjacentes ao implante, sendo que a microbiota nesses casos é semelhante àquela encontrada nas doenças periodontais.

Ainda não se conhece completamente o modo como os biofilmes se desenvolvem nos tecidos bucais e nos diferentes biomateriais bem como a inter-relação entre esses biofilmes.

As doenças perimplantares são uma causa importante da perda de implantes dentários o que torna necessário mais estudos sobre o desenvolvimento dos biofilmes responsáveis por essa patologia.

O fato de o biofilme oral ser extremamente complexo torna seu estudo complicado, uma vez que a atuação das bactérias não ocorre de forma isolada, mas sim de forma mutualística, criando comportamentos diferentes daqueles estudados em culturas puras.

Microcosmo é a representação *in vitro* da placa bacteriana, onde a presença da biodiversidade e da estrutura será mimetizada. A literatura tem feito essa representação de duas formas: coletando material

biológico de doadores (saliva ou amostras de biofilme) ou desenvolvendo microcosmos artificiais (consórcios) a partir da mistura de culturas isoladas.

O estudo do desenvolvimento de biofilme pela técnica de microcosmo, a partir da coleta de material de pacientes periodontais, parece ser a possibilidade de estudo *in vitro* mais próxima da realidade existente na cavidade oral já que a flora perimplantar parece ser semelhante àquela dos elementos dentários afetados pela doença periodontal. Além disso, essa técnica possibilita também estudos variados no campo da microbiologia sem problemas técnicos e éticos encontrados em estudos clínicos com diminuição das limitações de estudos com culturas puras, mostrando-se uma possibilidade promissora para pesquisas nessa área.

O modelo experimental proposto no presente estudo baseia-se na experiência adquirida com um modelo de biofilme para avaliações na área de cardiologia, dentística e materiais dentários, utilizado na Faculdade de Odontologia da UFPel, esse modelo foi modificado com o objetivo de mimetizar as condições subgingivais, buscando o desenvolvimento de um modelo experimental simples e de baixo custo para pesquisas nessa área.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Biomateriais

Os biomateriais têm sido amplamente utilizados tanto na medicina quanto na odontologia (MABBOUX *et al.*, 2004), porém um problema comum ao uso desses materiais é a formação de biofilmes na sua superfície. A solução para esse problema parece ser o desenvolvimento de biomateriais que possibilitem uma ótima integração com o tecido do hospedeiro, mas que limite a habilidade de colonização bacteriana (DRAKE *et al.*, 1999). Além disso, a composição dos biomateriais pode ter influência no biofilme (TEUGHELIS *et al.*, 2006).

A preocupação com a formação de biofilme sobre os biomateriais de uso odontológico tem sido percebida nas mais diferentes áreas como ortodontia, dentística, prótese, periodontia e implantodontia (MEI *et al.*, 2009).

Os implantes osseointegrados foram idealizados por Brånemark e colaboradores na década de 1960, porém somente em 1977 houve a publicação de seu primeiro trabalho clínico comprovando a osseointegração (LORENZO, 2004). Desde então os implantes de titânio têm sido utilizados em uma variedade de casos, desde a substituição de um único elemento dentário até reabilitações completas com relativo sucesso em longo prazo (ONG *et al.*, 1992; TAKANASHI *et al.*, 2004;

MABBOUX *et al.*, 2004; PÍER-FRANCESCO *et al.*, 2006; SHIBLI *et al.*, 2008; ELTER *et al.*, 2008; PYE *et al.*, 2009).

O titânio é o material de escolha para implantes orais, devido a suas características mecânicas, físico-químicas e bioquímicas, particularmente a tolerância tecidual e biocompatibilidade (BUNETEL *et al.*, 2001; SUBRAMANI *et al.*, 2009). Além disso, apresenta boa solidez, resistência à corrosão e módulo de elasticidade similar ao osso (PÍER-FRANCESCO *et al.*, 2006). Alguns autores referem que o titânio não possui atividade antibacteriana (LEONHARDT & DAHLEN, 1995), mas essas observações continuam controversas (ELAGLI *et al.*, 1992; SCHACKLETON *et al.*, 1994). Oga *et al.* (1993) relataram aderência bacteriana ao titânio e sugeriram que ele possa diminuir a efetividade de antibióticos.

Os implantes dentários são parcialmente expostos ao meio oral, sendo necessário que sua superfície possua propriedades que inibam a aderência bacteriana. Apesar disso, estudos *in vivo* e *in vitro* tem mostrado que é mais importante o controle da placa do que o tratamento das superfícies (YOSHINARI *et al.*, 2000, YOSHINARI *et al.*, 2001).

A rugosidade tem sido uma das principais características da superfície dos biomateriais estudada, sendo considerada a que apresenta maior influência, principalmente no que tange a adesão bacteriana inicial (MEI *et al.*, 2009). A adesão e a colonização por bactérias em superfícies sólidas representa um fator chave na formação do biofilme, sendo que essas podem diferir de acordo com os diferentes substratos existentes na cavidade oral. Assim, pode-se considerar que diferentes substratos apresentem diferentes biofilmes, e que o controle da formação desses é

dependente do controle da adesão inicial, o que é inerente à superfície (SHEMESH *et al.*, 2010).

Outra característica importante a ser discutida quando se estuda biomateriais e sua interação com a cavidade oral são as características da superfície do mesmo. Sabe-se que uma superfície rugosa (áspera) melhora a osseointegração, porém essa mesma característica pode aumentar a adesão bacteriana. Nesse sentido, a indústria tem produzido implantes que apresentam tratamento de superfície somente nas porções média e apical e lisa na região cervical, numa tentativa de diminuir o risco de perimplantite, melhorando o desempenho de seus produtos. Assim, os autores afirmam que o controle da perimplantite deve se dar pelo controle da formação de biofilme na superfície lisa (colonização inicial), pois depois dessa instalada ocorrerá a formação de bolsa periodontal e uma colonização secundária da superfície rugosa, que será de difícil controle (MOMBELLI, 2002).

Ong *et al.* (1992) já relatavam que apesar do alto índice de sucesso nos tratamentos com implantes, falhas ocasionais são relatadas, sendo essas associadas a fatores técnicos, microbiológicos ou ambos. Quando ocorre a perda de osseointegração, a maioria dos casos evolui para a perda do implante. A literatura tem associado como causas para o insucesso a carga oclusal excessiva e a perimplantite, esse último em um percentual variando de 2-10%. Nos casos de perimplantite, bactérias periodontopatogênicas foram localizadas nos sítios dos implantes perdidos (TAKANASHI *et al.*, 2004).

Takanashi *et al.* (2004) relatam que, apesar da presença de periodontopatógenos em sítios de perimplantite parecer ser consequência da migração de bactérias dos dentes para os implantes, o processo ainda

não é claro. Sendo assim, os autores avaliaram a presença de *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia* antes e ao longo de seis meses após a colocação dos implantes, sendo que a contaminação dos mesmos iniciou no momento da exposição ao meio bucal. Ong *et al.* (1992) já haviam avaliado a presença dos periodontopatógenos *P. gingivalis*, *P. intermedia* e *Actinomyces actinomycetemcomitans* em sítios de implantes relatando a relação de doença periodontal e perimplantar.

2.2 Biofilme Oral

Os biofilmes são comunidades microbiológicas altamente organizadas que se desenvolvem em superfícies sólidas, sendo que os seus componentes se tornam fenotipicamente diferentes de quando estavam isolados. Ou seja, esses microrganismos realizam adaptações para maximizar o seu potencial proliferativo e de formar biofilme. Assim, a adaptação tanto à superfície como aos demais microrganismos e as características do meio vão determinar o tipo, o desenvolvimento e a sobrevivência do biofilme (MARSH, 2004; JENKINSON & LAMONT, 2005; ZIJNGE *et al.*, 2010).

Biofilme é uma comunidade microbiológica séssil, caracterizada pela adesão a um substrato ou interface embebida em uma matriz de polímeros bacterianos. Os biofilmes formados na superfície dental têm sido denominados placa dental, porém, hoje, é estendido a todas as superfícies orais. O biofilme oral é composto por uma comunidade complexa de microrganismos embebida em uma matriz polimérica, primariamente de origem bacteriana e salivar. As bactérias da placa são responsáveis pela etiologia das doenças cárie, gengivite,

periodontite, perimplantite e estomatites (RICKARD *et al.*, 2003; SUZUKY *et al.*, 2005; SUBRAMANI *et al.*, 2009).

Suzuky *et al.* (2005) afirmam que além das espécies bacterianas, a sua concentração no biofilme seria importante para o desenvolvimento das patologias, indicando que essa seja quantificada por técnicas como PCR real-time.

Embora a placa dental compreenda uma grande variedade de espécies, a colonização segue um padrão, onde ocorre uma adesão inicial sobre a película adquirida, colonização secundária através de adesão e coadesão interespecies (FÜRST *et al.*, 2007). O sucesso em isolar e caracterizar espécies da placa dental levou os microbiologistas a relacionarem o desenvolvimento de determinadas doenças a presença desses microrganismos, de acordo com os postulados de Koch. Porém, não é a presença de uma única espécie dentro de uma comunidade complexa que determinará as propriedades do biofilme, mas sim as interações entre os residentes do mesmo (KURAMITSU *et al.*, 2007).

Embora o risco de desenvolver algumas patologias esteja ligado à presença de determinados grupos de microrganismos e à ausência de outros seja relatada, o entendimento molecular ainda está longe de ser alcançado. Sabe-se, hoje, que entender o funcionamento molecular das comunidades bacterianas é de suma relevância para o desenvolvimento de novas tecnologias. Embora o maior acesso a ferramentas moleculares e uma melhor perspectiva ecológica já seja uma realidade, ainda existe a necessidade de mais pesquisas para entender a composição e o metabolismo das comunidades orais, o que possibilitaria o desenvolvimento de estratégias de prevenção (LAMONT &

JENKINSON, 1998; JENKINSON & LAMONT, 2005; SUZUKI *et al.*, 2005; GUGGENHEIN *et al.*, 2009; ZIJNGE *et al.*, 2010).

Segundo Stingu *et al.* (2008) uma gengiva saudável está relacionada a um biofilme supragengival simples (1-20 camadas), com poucas camadas de *streptococci*, bacilos Gram-positivos e alguns cocos Gram-negativos. Essas bactérias são colonizadoras pioneiras que sobrevivem em ambientes aeróbios. Já nas gengivites a placa se torna mais organizada (100-300 camadas) com predominância de bacilos anaeróbios Gram-negativos e espiroquetas. As espécies envolvidas no desenvolvimento do biofilme podem variar dependendo da localização e das condições do ambiente, mas o esquema da colonização segue sempre um mesmo padrão.

As comunidades bacterianas do biofilme oral tendem a se agrupar em complexos de acordo com a disponibilidade de nutrientes e oxigênio. A instalação da periodontite e a sua progressão estão associadas a várias espécies do complexo vermelho e laranja (*P. gingivalis*, *T. forsythia*, *T. denticola*, *P. intermedia*, *F. nucleatum*) (STINGU *et al.*, 2008). Porém segundo Marsh (2001) as bactérias ditas “protetoras” também têm um papel importante no desenvolvimento dessa patologia, fazendo o controle das bactérias patogênicas através de seu metabolismo antagonista ou por inativação dos patógenos. Alguns componentes do complexo amarelo apresentam essas características, principalmente algumas espécies de estreptococos (STINGU *et al.*, 2008).

Seguindo esse raciocínio, Stingu *et al.* (2008) avaliaram a prevalência das diferentes espécies de estreptococos em biofilme subgengival de pacientes saudáveis e com periodontite agressiva,

constatando uma diferença significativa principalmente na concentração de *Streptococcus sanguinis*, sendo pouco presente nas periodontites agressivas, o que sugere que essa espécie tem certa capacidade de proteção frente a progressão da doença periodontal. E, além disso, a concentração de espécies de estreptococos em pacientes saudáveis não sofreu variação.

Já é consenso que a adaptação das bactérias aos diferentes tipos de substratos existentes na cavidade oral está relacionada a diferentes padrões de expressões gênicas, especialmente dos genes associados com a regulação e formação do biofilme, assim como a fisiologia bacteriana (MARSH, 2004, SHEMESH *et al.*, 2010). Estudo que analisou as modificações moleculares ocorridas em biofilmes de *Streptococcus mutans* em superfícies de resina, titânio e hidroxiapatita demonstrou que em cada uma das superfícies o perfil molecular dessa espécie bacteriana se modificava. (SHEMESH *et al.*, 2010).

O entendimento atual sobre as doenças periodontais e, conseqüentemente, perimplantares, indica que essas patologias são resultantes da ação direta da microbiota e da indução do processo inflamatório. Um aumento na quantidade de bactérias patogênicas ocasiona aumento da quantidade de produtos tóxicos incrementando a resposta inflamatória e imunológica, que irão moldar a população bacteriana, e, conseqüentemente levar a destruição tecidual presente em estágios mais avançados da doença (LORENZO, 2004; SEDLACEK & WALKER, 2007; KULIK *et al.*, 2008; ASIKAINEN *et al.*, 2010).

A microbiota periodontal é dependente de biofatores presentes no plasma, sangue e fluido gengival, sendo consideravelmente estimulados por esses. Assim estes biofilmes apresentam bactérias com

metabolismo predominantemente proteolítico, Gram-negativas e anaeróbias obrigatórias (LORENZO, 2004).

A cavidade oral apresenta temperatura média de 25-40°C e variação de pH entre 5,0 e 7,8, ambiente adequado para a maioria dos microrganismos. O pH fisiológico da saliva se mantém entre 6,7 e 7,3 podendo ser modificado pela alimentação e metabolismo bacteriano. Variações no pH podem exercer um efeito seletivo na microbiota, o que é bem conhecido no processo da cárie, onde um ambiente com pH ácido provoca a seleção de bactérias acidófilas, acidúricas e acidogênicas, mantendo essa condição e levando a desmineralização do esmalte. Paralelamente, o biofilme acumulado no sulco produz um aumento do exsudato gengival, pelo estímulo inflamatório persistente, sendo que esse fluido funciona como um meio de cultura para bactérias proteolíticas, características nas patologias periodontais e, nesses casos, apresentando um pH no ambiente tecidual mais básico (LORENZO, 2004; JORGE, 2007).

É denominado biofilme subgengival aquele que se forma a partir da migração apical do biofilme abaixo da linha gengival, sendo menos espesso que o supragengival. Podem ser identificadas três porções: uma aderida, associada ao elemento dentário; uma não aderida associada ao epitélio do sulco gengival; e uma intermediária, na qual os microrganismos estão na forma planctônica no exsudato gengival (JORGE, 2007).

Uma fonte de nutrientes importante para o biofilme são as proteínas encontradas na saliva e no fluido crevicular gengival que são produzidas pelos tecidos orais do hospedeiro assim como pelas bactérias. Microrganismos altamente proteolíticos apresentam vantagens de

crescimento em ambientes com pouca saliva, o que justifica o crescimento acentuado das mesmas no espaço subgengival, como, por exemplo, da *P. gingivalis* que prontamente coloniza essas áreas e está associada à doença periodontal, assim como bactérias que apresentem menor capacidade de proteólise, mas aproveitem o ambiente criado pela primeira, comprovando relações simbióticas entre espécies nos biofilmes (LAMONT & JENKINSON, 1998; KURAMITSU *et al.*, 2007).

Comunidades microbianas como a placa dental podem produzir infecções polimicrobianas, onde os microrganismos interagem em sinergismo. A doença periodontal representa essa situação, sendo a melhor documentada das infecções polimicrobianas. *P. gingivalis*, *Treponema denticola* e *Tannerella forsythia* são fortemente associadas ao desenvolvimento da periodontite do adulto. Esse entendimento leva a crer que um melhor entendimento da periodontite pode levar a uma melhora na compreensão dos fatores de virulência atuantes nessas infecções mistas, colaborando no diagnóstico, prevenção e tratamento dessas patologias tão complexas (SLOTS & TING, 1999; KURAMITSU *et al.*, 2007; ZIJNGE *et al.*, 2010).

Kuramitsu *et al.* (2007) reconhecem que o entendimento do que ocorre entre os microrganismos residentes do biofilme ainda é incipiente. A expansão do conhecimento em um futuro próximo depende de novas tecnologias desenvolvidas para identificar múltiplas propriedades do biofilme de maneira simultânea. Estas informações serviriam como base para modulação externa dessas interações entre os constituintes do biofilme, resultando futuramente em novas maneiras de controlar os mesmos.

Socransky & Haffajee (2002) descreveram a sucessão bacteriana subgingival através dos complexos amarelo (*Streptococcus sanguinis*, *S. mitis*, *S. gordonii* e *S. oralis*), azul (*Actinomyces spp*), verde (*Capnocytophaga achraceae*, *C. sputigena*, *C. gingivalis* e *Actinobacillus*) e violeta (*Veillonella parvula* e *Actinomyces odontolyticus*) são compostos por bactérias com capacidade de adesão na superfície dental, sendo considerados os colonizadores iniciais, não patogênicos e possibilitam a agregação de bactérias do complexo laranja (*S. constellatus*, *Campylobacter rectus*, *C. showae*, *C. gracilis*, *Prevotella intermedia*, *P. nigrescens*, *Peptostreptococcus micros*, *Fusobacterium nucleatum* e *F. periodonticum*) envolvidos na patogênese da doença periodontal e que permitem a colonização pelo complexo vermelho (*Porphyromonas gingivalis*, *Bacterioides forsythus* e *Treponema denticola*) patógenos envolvidos com a profundidade e sangramento de sondagem. Os cinco complexos teriam pouca relação entre si, mas, o complexo vermelho aparece sempre relacionado aos parâmetros clínicos de doença periodontal (SOCRANSKY *et al.*, 1998).

A *Porphyromonas gingivalis* é o agente etiológico mais citado como responsável pela doença periodontal, principalmente associada com outras bactérias sabidamente periodontopatogênicas como a *Prevotella intermedia*, *F. nucleatum*, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola* (KURAMITSU *et al.*, 2007).

Abiko *et al.* (2010) compararam amostras coletadas de sulco gengival e bolsa periodontal de pacientes periodontalmente saudáveis e com periodontite crônica qualitativa e quantitativamente pela técnica de Polimerase Chain Reaction (PCR), concluindo que as bactérias anaeróbias estritas (*T. forsythia*, *P. gingivalis* e *E. saphenum*) foram

identificadas predominantemente nos sujeitos com periodontite enquanto espécies de *Streptococcus* foram identificadas em pacientes saudáveis. Este achado sugere uma mudança do ambiente subgengival favorecendo a colonização por anaeróbios obrigatórios e conseqüentemente determinando as características clínicas da periodontite.

A periodontite é uma das patologias orais mais prevalentes em pacientes acima dos 40 anos e representa uma das doenças crônicas bacteriana mais comum nos homens (ASIKAINEN *et al.*, 2010).

Até 1999 a periodontite crônica era conhecida como periodontite do adulto que consiste em um processo inflamatório persistente, com degradação de colágeno acarretando em uma migração apical do epitélio juncional, formando a bolsa gengival (LORENZO, 2004; MAYORGA-FAYAD *et al.*, 2007). A formação da bolsa periodontal favorece a colonização por bactérias anaeróbias estritas, assim como o acúmulo de fluido gengival fornece uma maior quantidade de nutrientes para o biofilme bacteriano, fazendo com que ocorra uma modificação da microbiota subgengival, sendo essa representada em sua maioria por microrganismos Gram-negativos (75%) e anaeróbios estritos (90%) (LORENZO, 2004).

Mayorga-Fayad *et al.* (2007) realizaram um estudo do perfil epidemiológico da periodontite crônica e agressiva em Bogotá, Colômbia, e verificaram que as espécies bacterianas eram basicamente as mesmas, sendo que na periodontite agressiva ocorria um aumento expressivo de *P. gingivalis* e uma diminuição de *A. actinomycetemcomitans*.

Lo *et al.* (2009) consideram a *P. gingivalis* uma bactéria presente no biofilme maduro relacionado a periodontite crônica. Ao avaliar a expressão gênica desta bactéria quando em biofilme e na forma planctônica, mostraram que esta sofre adaptações e subregulação dos genes relacionados a crescimento e metabolismo quando em biofilme.

Mombelli (2002) descreve a perimplantite como uma inflamação que acomete os tecidos vizinhos ao implante, resultando em formação de bolsa perimplantar e perda óssea, tendo como consequência a perda de suporte e estabilidade do implante após a colocação de carga sobre o mesmo.

As perimplantites são a principal complicação relacionada com a presença de implantes e a sua principal causa de insucesso (DRAKE *et al.*, 1999; BUNETEL *et al.*, 2001, SUBRAMANI *et al.*, 2009). É uma doença inflamatória que afeta os tecidos circunjacentes ao implante osseointegrado resultando em perda óssea (YOSHINARI *et al.*, 2001; PÍER-FRANCESCO *et al.*, 2006, HEUER *et al.*; 2007) e consequente perda do implante (GRÖSSNER-SCHREIBER *et al.*, 2009). A adesão microbiana e o acúmulo de biofilme patogênico são considerados as principais causas da patogênese da perimplantite e a perda de implantes (BÜRGER *et al.*, 2010).

Embora estudos apontem a perimplantite como a principal causa de insucesso, Montes *et al.* (2007) constataram que essa era a causa do insucesso em apenas 1% dos casos estudados, sendo a maioria das falhas relacionadas a características do paciente, como quantidade e qualidade óssea.

Rams & Link (1987) avaliaram a microbiota coletada de três implantes com perda de inserção superior a 10mm, sangramento e perda

óssea constatando que a mesma era composta por microrganismos anaeróbios estritos e Gram-negativos, assim como a periodontite. Já Lang *et al.* (1993) estudaram o efeito o desenvolvimento do biofilme em tecidos periodontais e perimplantares de macacos, confirmando que ambas as patologias evoluem de maneira similar. Alguns autores relatam que existe diferença entre a composição do biofilme de pacientes parcialmente dentados e desdentados, sugerindo que os dentes vizinhos e as mucosas são fontes de bactérias que irão colonizar os implantes, indicando, assim, um controle atento tanto do profissional como do paciente da saúde dos dentes remanescentes (LORENZO, 2004).

Bauman *et al.* (1992) afirmam que o nicho periodontal é muito semelhante aquele criado com a colocação do implante, diferindo essencialmente na superfície onde o biofilme vai aderir. Além disso, relatam que o biofilme se desenvolve mais em dentes naturais do que na superfície dos implantes, sugerindo que talvez essas superfícies possuíssem propriedades antimicrobianas. Já para Fürst *et al.* (2006), deve existir diferença na colonização da superfície dentária e nos implantes.

Heydenrijk *et al.* (2002) afirmam que a flora oral determina a composição da flora perimplantar, e que a microflora presente ao redor de implantes estáveis é semelhante a placa subgingival de pacientes saudáveis, assim como a placa nas perimplantites é a mesma da doença periodontal. Afirmam, também, que os microrganismos potencialmente patogênicos da flora oral não estão necessariamente associados à etiologia da perimplantite, sendo essa multifatorial, e que as características genéticas do hospedeiro são fatores a ser considerados.

2.3 Microcosmo

A placa dental humana é um biofilme complexo com variadas concentrações de espécies bacterianas nos diferentes ambientes. O estudo da placa *in vivo* se torna difícil devido a sua heterogeneidade, pouca quantidade disponível, acesso limitado, ambientes variados e sem a possibilidade de controle nos mesmos, além dos problemas éticos. Por essas razões Wong & Sissons (2001) desenvolveram um sistema de cultura de placa em boca artificial, o que significa estudar o microcosmo, na tentativa de solucionar as limitações do estudo dos biofilmes. Assim, o microcosmo é definido como uma entidade microbiológica que representa a placa dental natural *in vitro*. Assim, ele retém a complexidade natural do biofilme oral sua biodiversidade e estrutura heterogênea (SISSONS, 1997; SISSONS *et al.*, 1991, FILOCHE *et al.*, 2007b).

Vários autores têm buscado a utilização da técnica do microcosmo a partir da saliva de pacientes devido a sua maior capacidade de mimetizar a realidade da cavidade oral para os mais diferentes estudos, na maioria voltada para a área de cardiologia e de teste de substâncias antissépticas (SISSONS 1997, SISSONS *et al.*, 1991; FILOCHE *et al.*, 2007, 2008; LEITE, 2009; ZAURA *et al.*, 2011). Filoche *et al.* (2007a), por exemplo, utilizaram essa técnica para estudar biomassa e viabilidade bacteriana pós tratamentos com antissépticos orais, concluindo que a biomassa foi diminuída por todas as soluções testadas, mas a viabilidade não foi alterada.

As propriedades de crescimento e patogenicidade da placa resultam da interação entre a microbiota e o ambiente oral e têm sido

estudadas através de modelos experimentais compostos por espécies isoladas ou pequenos grupamentos. A técnica de microcosmo é uma versão *in vitro* da placa natural que tem sido utilizada uma vez que é um modelo de microflora, pois está em um ambiente mais controlado (WONG & SISSIONS, 2001; FILOCHE *et al.*; 2007b).

Segundo Walker & Sedlacek (2007) apesar de vários modelos de estudo para placa supragengival já terem sido propostos são raros modelos para placa subgengival. Assim, os autores propuseram um modelo *in vitro* de placa subgengival sobre discos de hidroxiapatita, onde foram inoculadas alíquotas de dispersão de biofilme subgengival coletado de pacientes portadores de periodontite e de pacientes saudáveis. Esse modelo foi realizado em anaerobiose em meio TSB por até 10 dias (comunidade clímax) sendo o meio renovado a cada 48h, mostrando composição e proporção semelhantes às encontradas nos inóculos.

Outro estudo realizado para o desenvolvimento de um modelo de biofilme *in vitro* obteve resultado satisfatório, quando se comparou quantidades e espécies bacterianas presentes na coleta e após o processamento e crescimento bacteriano em discos de hidroxiapatita. Os autores citam que quanto mais jovem o biofilme mais susceptível ele é às alterações ambientais (WALKER & SEDLACEK, 2007; SEDLACEK & WALKER, 2007).

Ledder *et al.* (2009), utilizaram uma técnica de microcosmo para avaliação de enzimas hidrolíticas como agentes de controle de placa, porém esse microcosmo foi criado a partir de culturas puras de *Actinomyces naeslundii*, *Fusobacterium nucleatum*, *Polymorphum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Neisseria subflava*, *Porphyromonas*

gingivalis, *Prevotella oralis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus sanguinis* e *Veillonella dispar* que cresceram em anaerobiose a 37°C por 7 dias em meio Wilkins-Chalgren antes da inoculação. Mei *et al.* (2009) também se utilizaram da técnica de microcosmo artificial para avaliação de biofilmes sobre superfície braquete-adesivo-esmalte. Já Guggenheim *et al.* (2009) utilizaram essa mesma técnica para avaliar a interação do biofilme formado com uma cultura primária de células epiteliais humanas para buscar um melhor entendimento entre o biofilme e os tecidos do hospedeiro.

2.4 Biofilmes e Substrato

Existe pouca informação sobre a inter-relação entre os tecidos do hospedeiro, colonização bacteriana e a natureza físico-química dos implantes, o que limita o entendimento de como essas interações influenciam o sucesso ou a falha clínica dos tratamentos com implantes (DRAKE *et al.*, 1999, FÜRST *et al.*, 2007). A falta desse conhecimento deve-se principalmente a impossibilidade de estudos não invasivos em implantes osseointegrados, sendo que os estudos para analisar as reações teciduais frente ao biofilme têm sido feitos em implantes falhos ou *in vitro*, limitando o conhecimento nessa área (ELTER *et al.*, 2008).

Até 2008 não existem relatos na literatura de estudos clínicos atraumáticos do efeito da barreira perimplantar na diferenciação da aderência de biofilme supra e subgingival na superfície dos implantes (ELTER *et al.*, 2008).

O sucesso dos implantes depende da osseointegração, assim como a presença de uma mucosa livre de processo inflamatório (PIÉR-

FRANCESCO *et al.*, 2006; BÜRGERS *et al.*, 2010). Os insucessos são divididos em duas categorias: a falha na obtenção da osseointegração (falha prematura) e a falha na manutenção da osseointegração (falha tardia) (PIÉR-FRANCESCO *et al.*, 2006).

As características da superfície dos materiais também influenciam a qualidade de adesão do tecido mole ao implante, o que previne infecções. Essas características são bastante relevantes, uma vez que no ambiente oral a placa dentária é um constante desafio por desenvolver periodontite e perimplantite em indivíduos susceptíveis (BUNETEL *et al.*, 2001, GRÖSSNER-SCHREIBER *et al.*, 2009).

Pongnarisorn *et al.* (2007) sugeriram que o desenvolvimento da inflamação associada aos implantes independe do tipo de superfície, mas sim da presença de placa. Além disso, observaram que o tipo da superfície não tem influência na qualidade do infiltrado inflamatório, sendo as células T predominantes em todos os casos, assim como parece não ter influência no tipo de microbiota perimplantar, embora a presença de ranhuras na área subgengival facilite o acúmulo de placa e, conseqüentemente, aumente o infiltrado inflamatório.

As bactérias associadas às perimplantites são as mesmas responsáveis pela doença periodontal (LEONHARDT *et al.*, 2003; HEUER *et al.*, 2007; PYE *et al.*, 2009) e incluem bactérias anaeróbias como a *Porphyromonas gingivalis*, *Actinobacillus*, *A. actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia* e espiroquetas (MOMBELLI & LANG, 1998). Já Braga *et al.* (2010) reforça a associação entre a periodontite crônica e a *P. gingivalis*.

Os fatores de risco associados à perimplantite parecem estar relacionados à composição do biofilme ao redor do implante e a

habilidade da bactéria aderir na sua superfície (QUIRYNEN *et al.*, 2002).

Uma vez que a superfície limpa do implante é exposta à cavidade oral ela é imediatamente coberta por uma película de saliva e colonizada por microrganismos que, dependendo da sua patogenicidade, podem induzir a perimplantite. As subseqüentes inflamações da mucosa e do osso perimplantar podem comprometer a longevidade dos implantes (ELTER *et al.*, 2008). A colonização da superfície dos implantes parece ser uma competição por espaço entre as células do hospedeiro e as bactérias orais. Além disso, parece haver uma diferença na composição do biofilme de implantes saudáveis e implantes falhos. Fatores como o tipo de organismos, concentração, fase de crescimento e propriedades da superfície dos materiais afetam os níveis de colonização em vários graus (DRAKE *et al.*, 1999).

Inicialmente na formação do biofilme o fluido crevicular, o epitélio juncional e as fibras circulares estabelecem uma barreira à penetração dos microrganismos. Assim o baixo acúmulo de biofilme e a aderência firme da mucosa são condições para a saúde perimplantar (ELTER *et al.*, 2008). Estudos sugerem que a colonização do implante na submucosa e a presença de fluidos sulculares devem ocorrer de 10 a 14 dias após a instalação do implante (DE BOEVER & DE BOEVER, 2006).

Fürst *et al.* (2007) observaram uma deficiência de informações sobre a colonização inicial e a formação do biofilme nos implantes dentários de titânio, e nenhuma informação do impacto das bactérias presentes nos dentes vizinhos. Assim, em seu estudo avaliaram implantes 30 minutos após a sua colocação e 1, 2, 4, 8 e 12 semanas

após; observando que a colonização inicia 30 minutos após a colocação do implante. Esta colonização inicial se dá em padrões diferentes quando se considera a superfície dentária e a superfície do implante, principalmente no padrão de distribuição de *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* e algumas espécies de estreptococos.

Heuer *et al.* (2007) avaliaram quantitativamente a formação de biofilme *in vivo* de maneira atraumática, e a presença de *Haemophilus actinomycetemcomitans* e *Porphyromonas gingivalis* no líquido crevicular ao redor dos implantes, não encontrando esses patógenos após 14 dias apesar de grande presença de placa supragengival.

Subramani *et al.* (2009) afirmam que os estreptococos são predominantes depois de quatro horas, enquanto anaeróbios aumentam após 48 horas independente do material utilizado para implante. Os autores afirmam, também, que a superfície do implante influencia na adesão bacteriana, mas não na maturação da placa.

Grössner-Schreiber *et al.* (2009) observaram que implantes de zircônia apresentavam uma redução da quantidade de bactérias e uma simplificação na composição do biofilme.

As características físico-químicas superficiais dos materiais são determinantes no processo de adesão bacteriana (WU-YUAN, 1995; YOSINARI *et al.*, 2001; MABBOUX *et al.*, 2004; PÍER-FRANCESCO *et al.*, 2006; ELTER *et al.*, 2008; SUBRAMANI *et al.*, 2009). Tanto a energia livre de superfície como a rugosidade são as características que mais influenciam o processo de adesão (PÍER-FRANCESCO *et al.*, 2006; SUBRAMANI *et al.*, 2009; BÜRGERS *et al.*, 2010). Aparentemente, uma baixa energia livre e reduzida rugosidade limitam o acúmulo de placa *in vivo* (QUIRYNEN *et al.*, 1996).

Estudos *in vitro* têm mostrado adesão bacteriana de diversas espécies às superfícies de titânio através de suas membranas protéicas. Entre elas, a *Fusobacterium nucleatum* parece ter pouca atração pelo titânio. Já a *P. gingivalis* e a *Prevotella intermedia* tem um nível maior de afinidade ao titânio. Caso algumas bactérias anaeróbias tenham capacidade de aderir diretamente à superfície inerte do titânio, podem acarretar consequências no manejo da infecção dos tecidos perimplantares (KUULA *et al.*, 2004).

Estudos *in vivo* mostraram que a colonização bacteriana na superfície rugosa do titânio é maior que nas superfícies de tecido mole, e que a redução em 0.2µm na rugosidade parece não ter efeito na quantidade e qualidade da adesão e colonização bacteriana (BOLLEN *et al.*, 1996; QUIRYNEN *et al.*, 1996).

Segundo Teughels *et al.* (2006) superfícies rugosas acumulam e retêm maior quantidade de placa. Além disso, após vários dias de formação de placa “sem perturbação” superfícies rugosas desenvolvem uma placa mais madura caracterizada pelo aumento de colônias, organismos móveis e espiroquetas. Assim, com a consequência de sua forma, superfícies dentárias com a superfície rugosa são mais frequentemente cercadas por um periodonto inflamado, caracterizado por um alto índice de sangramento, aumento do líquido crevicular e aumento do infiltrado inflamatório.

Elter *et al.* (2008) em seu estudo demonstraram uma influência significativa da rugosidade da superfície no acúmulo de biofilme supragengival. Além disso, verificaram que o acúmulo de placa supragengival não aumentou significativamente o biofilme subgengival

em 14 dias, e nem a influência da rugosidade do material foi significativa nesse biofilme.

Já Busscher *et al.* (2010) relatam que os biomateriais que possuem coberturas de antimicrobianos que tenham ação por contato são mais promissores que aqueles que apresentem a liberação de agentes antibióticos.

3. PROPOSIÇÃO

Este estudo tem como objetivo geral desenvolver um modelo experimental para estudo *in vitro* de placa supra e subgingival relacionada à perimplantite. Os objetivos específicos deste estudo são:

Avaliar o desenvolvimento de biofilmes sobre substratos distintos em diferentes tempos;

Comparar os biofilmes formados na superfície de titânio com os formados sobre esmalte/dentina;

Avaliar a diferença no crescimento do biofilme nas diferentes superfícies;

Avaliar a rugosidade da superfície antes do crescimento do biofilme;

Avaliar a variação do pH no meio de cultura utilizado.

Admite-se como hipótese experimental que o modelo desenvolvido permite a formação de biofilme em ambas as superfícies.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

O protocolo desta pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Passo Fundo (UPF), com o parecer nº 230/2011 (Apêndice 2).

Foram selecionados três voluntários, pacientes da clínica da Faculdade de Odontologia da UFPel, que após esclarecidos sobre objetivos e procedimentos do estudo, assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido, a fim de autorizar sua participação no estudo (Apêndice 1).

Foi realizado estudo *in vitro*, aleatorizado, no qual foram formados biofilmes em placas de micro poços sobre discos de titânio e discos de esmalte/dentina, tendo como inóculo saliva (microcosmo) de dois voluntários portadores de doença periodontal crônica e de um paciente periodontalmente saudável, todos não-fumantes, que não tinham utilizado antibióticos no último mês e que permaneceram sem higienização por 24 h. Após a coleta da saliva os dois pacientes com doença periodontal foram encaminhados para tratamento.

Os biofilmes foram crescidos de maneira independente por até 72 horas sobre quatro discos para cada inóculo (n=4), sendo que o experimento foi realizado em duplicata e analisado em quatro tempos, totalizando 90 espécimes de titânio e 94 de esmalte/dentina.

4.1 Corpos de prova:

Os corpos de prova de titânio foram obtidos em caráter de doação pela empresa Titanium Fix já estéreis, com 5 mm de diâmetro e 2 mm de espessura, sendo solicitado a empresa que o acabamento da superfície fosse o mesmo dado a região cervical dos implantes, ou seja, superfície polida, simulando a localização da colonização bacteriana inicial.

Foi avaliada a rugosidade inicial dos corpos de titânio antes da confecção dos corpos de prova de esmalte/dentina para que houvesse uma padronização das amostras.

Os corpos de prova de esmalte/dentina foram obtidos de incisivos bovinos irrompidos e livres de falha, obtidos em um frigorífico da cidade de Pelotas, RS, sendo esses raspados, limpos e armazenados em água destilada (-20°C).

Para obtenção de discos de esmalte de 5 mm de diâmetro e 2 mm de espessura o terço médio vestibular foi seccionado em furadeira industrial com broca de núcleo de diamante (tipo trefina) em velocidade de 400 rpm. Para finalização foi realizada planificação da superfície com discos de lixa até a granulometria 320.

A leitura de rugosidade foi semelhante às obtidas nos discos de titânio. Todos os procedimentos durante a confecção dos discos foram realizados sob refrigeração por água.

4.2 Obtenção do meio – saliva artificial:

A obtenção do meio DMM (meio definido enriquecido com mucina) foi realizada conforme protocolo descrito por Wong & Sissons (2001), o qual contém mucina gástrica de suíno (2,5 g/l), uréia (1,0 mmol/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), 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 (5,0 g/l).

4.3 Coleta e processamento da saliva:

Foi realizada coleta de 20 ml de saliva estimulada por filme de parafina (Parafilm "M"®, American NationalCan TM, Chicago, IL, EUA) de dois doadores portadores de doença periodontal crônica e um paciente periodontalmente saudável que suspenderam a higiene oral por 24 horas e a alimentação por 2 horas previamente a coleta da saliva, sendo realizadas duas coletas por voluntário com diferença de uma hora entre elas. A saliva foi depositada em um coletor graduado estéril, transportada em gelo ao Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Odontologia da UFPel.

A saliva foi filtrada através de lã de vidro estéril, armazenada em um recipiente estéril e homogeneizada em vortex (Filoche *et al.*, 2007b). Foram separadas da saliva coletada de cada voluntário duas

alíquotas, uma para quantificação bacteriana (dados em UFC/ml), e outra centrifugada (5000 g, a 4°C por 5 min) sendo o sobrenadante eliminado e o precipitado congelado para análises microbianas posteriores.

4.4 Desenvolvimento do biofilme:

A saliva preparada foi inoculada sobre os corpos de prova (discos de esmalte/dentina e titânio) em placas de micro poços, em um volume de 400 µl por poço. Após 1 hora, a saliva foi delicadamente aspirada da base dos poços e 1,8 ml de saliva artificial – meio DMM previamente preparado – foi adicionado em cada micro poço.

Os biofilmes foram formados de maneira independente sobre os corpos de prova. As placas foram incubadas em condições atmosféricas da anaerobiose (80% N₂, 10% CO₂ e 10%H₂), sob temperatura controlada (37°C) por um período de até 72 horas em jarras de anaerobiose, e mantidas em repouso na incubadora (SCHWARZ *et al.*, 2007).

4.5 Análise do biofilme:

Após 8, 24, 48 e 72 horas (LEONHARDT & DAHLEN, 1995; SCHWARZ *et al.*, 2007), os discos foram removidos dos poços com pinça estéril, e as células não aderidas retiradas gentilmente por lavagem com solução salina estéril (2 ml) (THURNHER *et al.*, 2003). Os discos foram colocados em tubos contendo 1 ml de RTF (meio de transporte reduzido), e sonicados (Sonicador Vibra Cell – Sonics and Materials, Danbury, CT, USA) com potencia de 40 W, amplitude de 5%, usando 3

pulsos de 10 s cada (BOWEN *et al.*, 1986) para obtenção do biofilme de suspensão homogênea. Para que não ocorresse o aquecimento da amostra e possível perda do material biológico entre cada pulso foi realizado um intervalo de 5 s, sendo os tubos mantidos em gelo durante o processo.

Foi realizada diluição seriada das suspensões de biofilme para contagem de microrganismos totais (TETUNA *et al.*, 2006). As suspensões foram diluídas em RTF em séries de até $1:10^7$ e imediatamente inoculadas em duplicata em ágar sangue para microrganismos totais. As placas foram incubadas em condições de anaerobiose - jarra (80% N₂, 10% CO₂, 10% H₂), a 37°C por 96 h.

As unidades formadoras de colônia foram contadas e os resultados expressos em UFC/mg de espécime de biofilme (peso úmido) (BOLLEN *et al.*, 1996; DRAKE *et al.*, 1999; BARBOU *et al.*, 2007; BURGERS *et al.*, 2010).

Após a remoção da alíquota da suspensão microbiana inicial (original) para quantificação, o espécime foi removido da suspensão, e esta foi centrifugada. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado foi armazenado a -80°C para análises microbiológicas posteriores.

4.6 Rugosidade

A leitura da rugosidade superficial foi realizada com rugosímetro SurrCode SE1200 (Kosakalab, Tóquio, Japão), calibrado nos parâmetros V 200, H 25 mm/ λc e λc 0,25 mm, sendo considerado o valor de rugosidade média dada pelo equipamento (Ra).

Para cada corpo de prova foram realizadas três medições em cada lado de forma que essas cobrissem a maior área possível da

superfície e em diferentes direções, para que se realizasse a média de rugosidade de cada corpo de prova (ABNT NBR ISO 4288). O aparelho foi calibrado a cada três corpos de prova, ou toda vez que se notasse discrepância nas leituras.

As leituras iniciais foram realizadas nos corpos de prova de titânio fornecidos pela empresa Titanium Fix, para obtenção de parâmetros para a confecção dos corpos de prova de esmalte/dentina. Durante o acabamento do segundo grupo, a cada lixa eram feitas leituras de rugosidade para que ambos os substratos apresentassem leituras de rugosidade equivalentes, e que essa característica não influenciasse na adesão bacteriana.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Rugosidade

Tabela 1 – Rugosidade Inicial

INÓCULO	TITÂNIO				ESMALTE/DENTINA								
	8	24	48	72	8	24	48	72					
A1	1.15	ns	1.29	1.37	1.30	1.17	ns	1.29	1.44	1.31			
A2	1.20	ns	1.24	1.44	1.25	1.18	b	1.25	ab	1.51	a	1.43	ab
B1	1.17	ns	1.27	1.33	1.27	0.95	b	0.83	b	1.46	a	1.39	a
B2	1.20	ns	1.25	1.34	1.27	1.19	ns	1.25	1.45	1.35			
C1	1.19	ns	1.26	1.33	1.27	1.21	ns	1.26	1.41	1.38			
C2	1.19	ns	1.23	1.28	1.28	1.21	a	1.22	a	0.92	b	1.39	a

Os valores das médias de rugosidade são expressos em μm . Médias seguidas da mesma letra comparam na linha, o tempo, e não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. A e B pacientes com periodontite crônica, C paciente periodontalmente saudável.

As médias de rugosidade de superfície dos corpos de prova de esmalte/dentina mostraram maior variação, provavelmente devido à dificuldade de padronização mesmo se usando uma técnica padrão para a confecção e o cuidado de selecionar os espécimes que visualmente mostravam-se mais lisos. Quando analisados os corpos de prova de titânio, confeccionados industrialmente, notou-se uma padronização maior da amostra (TABELA 1).

Apesar de a rugosidade superficial ser uma das características mais citada na literatura quando se consideram a superfície e a adesão bacteriana, a variação presente nos dados de rugosidade inicial parece não ter influenciado a formação de biofilme. Elter *et al.* (2008) em uma análise de biofilme de 14 dias não perceberam influência significativa da rugosidade superficial no desenvolvimento do mesmo. Além disso, Bollen *et al.* (1996) e Quirynen *et al.* (1996) descreveram que variações de 0,2 μm na rugosidade superficial parecem não influenciar na quantidade e qualidade do biofilme.

5.2 Formação de biofilmes

A análise dos biofilmes foi realizada levando em consideração a quantidade de biofilme formado (peso úmido), não ocorrendo interação significativa entre os fatores estudados (tipo de inóculo, substrato, tempo, quantidade de biofilme), a não ser quando analisados o substrato e o tempo de maneira isolada dos demais fatores, admitindo-se para esse tipo de estudo uma alta amplitude no coeficiente de variação.

Tabela 3 – Relação tempo de crescimento e quantidade de biofilme formado (peso úmido).

TEMPO (horas)	BIOFILME (UFC/mg)	
8	0,23 \pm 0,775	b
24	1,29 \pm 2,496	a
48	0,68 \pm 0,596	ab
72	0,51 \pm 0,401	b

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância

Essa análise demonstrou que maior crescimento bacteriano ocorreu após 24 horas e 48 horas, sugerindo que esses dois períodos seriam mais indicados para esse tipo de estudo (TABELA 3).

A queda no crescimento bacteriano pode ser atribuída a não renovação do meio na presente metodologia, opção contrária a outros modelos experimentais, que optam pela renovação a cada 24 h (BUNETEL *et al.*, 2001; LEITE, 2009) ou 48 h (WALKER & SEDLACEK, 2007). A alternativa de analisar bactérias anaeróbias sem a utilização de câmara de anaerobiose deveu-se a tornar a metodologia menos onerosa. Outros experimentos que não apresentam a necessidade de anaerobiose tendem a avaliar a formação do biofilme em tempos maiores: sete dias (LEEDER *et al.*, 2009), oito dias (ZAURA *et al.*, 2011) quatro horas a dez dias (SEDLACEK & WALKER, 2007), 20 dias (WONG & SISSONS, 2001), de nove a 22 dias (WONG & SISSONS, 2001).

Aparentemente não existe um padrão na literatura sobre o tempo em que o biofilme deve ser analisado, os autores parecem adequar esse fator aos objetivos do experimento e a metodologia empregada. Mei *et al.* (2009) avaliou seus biofilmes em 16 h, Schwarz *et al.* (2007) avaliou seus biofilmes por até 72 h, como o presente estudo. Já Füst *et al.* (2009) realizou a avaliação em 30 min, 1, 2, 4, 8 e 12 semanas.

Tabela 4 – Relação entre inóculos e quantidade de biofilme formado

INÓCULO	BIOFILME (UFC/mg)	
A1	0,60 ± 0,726	Ns
A2	1,21 ± 1,692	
B1	0,45 ± 0,452	
B2	1,00 ± 2,751	
C1	0,30 ± 0,334	
C2	0,57 ± 0,976	

ns = não significativo. A e B pacientes com periodontite crônica, C paciente periodontalmente saudável.

Apesar de existirem dois grupos clínicos (patológico e saudável) não houve diferença estatística entre os inóculos quando considerada a quantidade de biofilme formado (TABELA 4).

Tabela 5 – Relação entre substrato e quantidade de biofilme

SUBSTRATOS	MICROBIOLOGIA	
TITÂNIO	0,38 ± 1,611	b
ESMALTE/DENTINA	0,97 ± 1,187	a

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de significância.

A avaliação da rugosidade inicial não apresentou diferença estatística entre os dois substratos utilizados (esmalte/dentina e titânio). Entretanto quando relacionada com a quantidade de biofilme formado os discos de esmalte/dentina apresentaram uma quantidade maior de biofilme (TABELA 5), o que corrobora com os achados de Fürst *et al.* (2007), que percebeu padrões diferentes sendo que a A.

Actinomyces comitans e *P. gingivalis* foram mais predominantes no esmalte.

5.3 pH

Tabela 6 – pH do meio DMM no tempo em função de dois substratos e seis inóculos.

INÓCULO	TITÂNIO				ESMALTE/DENTINA			
	8	24	48	72	8	24	48	72
A1	6.94 c	7.74 a	7.81 a	7.44 b	7.06 c	7.77 a	7.80 a	7.40 b
A2	7.20 c	7.47 b	7.85 a	7.46 b	7.12 b	7.52 a	7.60 a	7.50 a
B1	7.05 c	7.67 b	7.93 a	7.54 b	7.16 c	7.74 b	7.93 a	7.61 b
B2	7.21 c	7.51 b	7.74a	7.57 b	7.18 c	7.55 b	7.71 a	7.48 b
C1	7.18 c	7.56 b	7.76 a	7.44 b	7.30 c	7.61 b	7.78 a	7.52 b
C2	7.16 b	7.40 a	7.38 a	7.49 a	7.28 b	7.33 b	7.66 a	7.52 a

Médias seguidas da mesma letra comparam na linha o tempo em cada inóculo, e não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. A e B pacientes com periodontite crônica, C paciente periodontalmente saudável.

A verificação do pH do meio DMM mostrou uma ampla variação, porém os valores mais altos em ambos os substratos foram encontrados nas 48 e 24 horas (TABELA 6). A elevação desses valores pode representar a seleção de bactérias proteolíticas características das doenças periodontais e perimplantares (LORENZO, 2004; JORGE, 2007). As condições de pH descritas na Tabela 6 também denotam que o modelo experimental em estudo possui a capacidade de manter valores de pH acima de 7 durante todo o período experimental.

6. CONCLUSÕES

O presente estudo demonstrou diferença estatística entre os biofilmes formados nos diferentes substratos, sendo que os corpos de prova de esmalte/dentina mostraram maior crescimento bacteriano.

Quando comparados os diferentes tempos de crescimento destacaram-se estatisticamente os tempos de 24 e 48 horas como os mais relevantes considerando-se o biofilme desenvolvido.

Não houve relação entre rugosidade inicial e crescimento bacteriano.

O pH do meio de cultura mostrou alcalinização ao longo do tempo experimental, mostrando-se próximo de 7 durante todo o experimento.

Os dados sugerem que esse modelo experimental é adequado para a avaliação de biofilmes com 24 e 48 h de desenvolvimento. Assim como a alcalinização do meio de cultura sugere um meio propício ao desenvolvimento de bactérias subgingivais.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo buscou o desenvolvimento de uma metodologia simples e de baixo custo para estudo de biofilme através da técnica de microcosmo. Essa metodologia possibilitará estudos tanto na área da Implantodontia como da Periodontia, possibilitando testes de substâncias antimicrobianas e tratamento de superfície de implantes dentários.

A literatura sobre esse tipo de metodologia é restrita e muito variada, o que dificulta a discussão dos dados encontrados no presente estudo.

Quando se consideram bactérias anaeróbias estritas, e principalmente os periodontopatógenos, existem dificuldades técnicas de cultivo, necessitando de equipamentos e técnicas especiais, como técnicas moleculares, como o PCR.

Apesar de o modelo experimental proposto parecer adequado, um estudo molecular se faz necessário para a validação do modelo, avaliando a presença de espécies de microrganismos de interesse no biofilme formado.

REFERÊNCIAS

ABIKO, Y.; SATO, T.; MAYANAGI, G.; TAKAHASHI, N. Profiling of subgingival plaque biofilm microflora from periodontally healthy subjects and from subjects with periodontitis using quantitative real-time PCR. *J. Periodontol. Res.*, v. 45, n. 3, p. 389-395.

ABNT. NBR ISO 4288 - Especificações geométricas do produto (GPS) – Rugosidade: Método do perfil – Regras e procedimentos para avaliação de rugosidade. Rio de Janeiro: Associação Brasileira de Normas Técnicas, 2008, 15p.

ASAI, Y.; JINNO, T.; IGARASHI, H.; OHYAMA, Y.; OGAWA, T. Detection and quantification of oral treponemes in subgingival plaque by real-time PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 40, n. 9, p. 3334-3340, 2002.

ASIAIKEN, S.; DOGAN, B.; TURGUT, Z.; PASTER, B.J.; BODUR, A. OSCARSSON, J. Specified species in gingival crevicular fluid predict bacterial diversity. *Plos One*, v. 5, n. 10. disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmc2963608/pdf/pone.0013589.pdf>>, acesso em: 20 de agosto de 2011.

BAUMAN, G.R.; MILS, M.; RAPLEY, J.W.; HALMON, W.W. Plaque-induced inflammation around implants. *Oral Maxillo Implants*, v. 7, n.5, p. 330-336, 1992.

BOLLEN, C.M.; PAPAIOANNO, W.; VAN ELDERE, J.; SCHEPERS, E.; QUIRYNEN, M.; VAN STEENBERGHE, M.D. The influence of abutment surface roughness on plaque accumulation and peri-implant mucositis. *Clin Oral Implants Res*, v. 7, n. 3, p. 201-211, 1996.

BRAGA, R.R.R.; CARVALHO, M.A.R.; BRUÑA-ROMETO, O.; TEIXEIRA R.E.; COSTA, J.E.; MENDES., E.N.; FARIAS, L.M.; MAGALHÃES, P.P. Quantification of five putative periodontal pathogens in female patients with and without chronic periodontitis by real-time polymerase chain reaction. *Anaerobe*, v.1, n.6, p. 234-239, 2010.

BRÅNEMARK, P.L.; HANSSON, B.O.; ADELL, R.; BREINE, U.; LINSTRÖM, J.; HALLÉN, O.; OHMEN, A. Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. Experience from 10-year period. *Scand J Plast Reconstr Surg Suppl*, v. 16, n. 1, p. 1-132, 1977.

BUNETEL, L.; GUÉRIN, J.; AGNANI, G.; PIEL, S.; PINSARD, H.; CORBEL, J.C.; BONNAURE-MALLET, M. *In vitro* study of the effect of titanium on *Porphyromonasgingivalis* in the presence of metronidazole and spiramycin. *Biomaterials*, v. 22, n. 22, p. 3067-72, 2001.

BÜRGER, R.; GERLACH, T.; HAHNEL, S.; SCHWARZ, F.; HANDEL, G.; GOSAU, M. *In vivo* and *in vitro* biofilm formation on two different titanium implant surfaces. *Clin Oral Impl Res*, v. 21, n. 2, p. 156-164, 2010.

BUSSCHER, H.J.; RINASTITI, M.; SISWOMIHARDJO, W.; VAN DER MEI, H.C. Biofilm formation on dental restorative and implant material. *J Dent Res*, v. 87, n. 2, p. 657-665, 2010.

DE BOEVER, A.L.; DE BOEVER, J.A. Early colonization of non-submerged dental implants in patients with a history of advanced aggressive periodontitis. *Clinical Oral Implants Res*, v. 17, n. 1, p. 8-17, 2006.

DE LORENZO, J.L. *Microbiologia para o Estudante de Odontologia*. 1.ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2004. 274p.

DIX, K.; WATANABE, S.M.; MCARDLE, S.; LEE, D.I.; RANDOLPH, C.; MONCLA, B.; SCHWARTZ, D.E. Specific-specific oligodeoxynucleotide probes for the identification of periodontal bacteria. *Journal of Clinical Microbiology*, v.28, n. 2, p. 319-323, 1990.

DRAKE, D.R.; PAUL, J.; KELLER, J.C. Primary bacterial colonization of implant surfaces. *Int J Oral Maxillofac Implants*, v. 14, n. 2, p. 226-232, 1999.

ELAGLI, K.; NEUT, C.; ROMOND, C.; HILDEBRAND, H.F. *In vitro* effects of titanium powder on oral bacterial. *Biomaterials*, v. 13, n. 1, p. 25-7, 1992.

ELTER, C.; HEUER, W.; DEMLING, A.; HANNIG, M.; HEIDENBLUT, T.; BACH, F.W.; STIESCH-SCHOLZ, M. Supra- and subgingival biofilm formation on implant abutments with different surface characteristics. *Int J Oral Maxillofac Implants*, v. 23, n. 2, p. 327-34, 2008.

FILOCHE, S.K.; COLEMAN, M.J.; ANGKER, L.; SISSONS, C.H.A. fluorescence assay to determine the viable biomass of microcosm dental plaque biofilms. *J. Microbiological Meth.*, v.69, n. 3 , p. 489-496, 2007a.

FILOCHE, S.K.; SOMA, K.J.; SISSONS, C.H. Caries-related plaque microcosm biofilms developed in microplates. *Oral.Microbiol.Immunol.*, v.22, n. 2 ,p. 73-79, 2007b.

FILOCHE, S.K.; SOMA, D.; VAN BEKKUM, M.; SISSONS, C.H. Plaques from different individuals yield different microbiota responses to oral-antiseptic treatment *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, v. 54, n. 1, p. 27-36, 2008.

FÜRST, M.M.; SALVI, G.E.; LANG,N.P.; PERSSON, G.R. Bacterial colonization immediately after installation on oral titanium implants. *Clin Oral Implants Res*, v. 18, n. 4, p. 501-508, 2007.

GRÖSSNER-SCHEIBER, B.; GRIEPENTROG, M.; HAUSTEIN, I.; MÜLLER, W.D.; LANGE, K.P.; BRIEDIGKEIT, H.; GÖBEL, U.B. Plaque formation on surface-modified dental implants. An *in vitro* study. *Clin Oral Implants Res*, v. 12, n. 6, p. 543-551, 2001.

GRÖSSNER-SCHEIBER, B.; TEICHMANN, J.; HANNIG, M.; DÖFER, C.; WENDEROTH, D.F.; OTT, S.J. Modified implant surfaces show different biofilm compositions under *in vivo* conditions. *Clin Oral Implants Res*, v. 20, n. 8, p. 817-826, 2009.

GUGGENHEIN, B.; GMUR, R.; GALICIA, J.C.; STATHOPOULUS, P.G.; BENAKANAKERE, M.R.; MEIRER, M.; THURNHEREER, T.; KINANE, D.F. In vitro modeling of host-parasite interactions: the subgingivsl biofilm challenge of primary human epithelial cells. *BMC Microbiol.*, v.9, n. 4 , p. 208-292, 2009.

HEUER, W.; ELTER, C.; DEMLING, A.; NEUMANN, A.; SUERBAUM, S.; HANNIG, M.; HEIDENBLUT, T.; BACH, F.W.; STIESCH-SCHOLZ, M. Analysis of early biofilm formation on oral implants in man. *J Oral Rehab*, v. 34, n. 5, p. 377-382, 2007.

HEYDENRIJK, K.; MEIJER, H.J.A.; VAN DER REIJDEN, W.A.; RAGHOEBAR, G.M.; VISSINK, A.; STEGENGA, B. Microbiota around root-form endosseous implants: a review of the literature. *Int J Oral Maxillofac Implants*, v. 17, n. 6, p. 829-838, 2002.

JENKINSON, H.F.; LAMONT, R.J. Oral microbial communities in sickness and in health. *Trends in Microbiology*, v.13, n.12, p. 589-595, 2005.

JORGE, A.O.C. *Microbiologia Bucal*. São Paulo: Santos Editora, 2007. 198p.

KULIK, E.M.; LENKEIT, K.; CHENAUX, S.; MEYER, J. Antimicrobial susceptibility of periodontopathogenic bacteria. *J. Antimicrobial. Chemotherapy*, v. 61, n. 2 , p. 1087-1091, 2008.

KURAMITSU, H.K.; HE, X.; LUX, R.; ANDERSON, M.H.; SHI, W. Interspecies interaction within oral microbial communities. *Microbiol. Mol. Rev.*, v. 71, n. 4., p. 653-670, 2007.

KUULA, H.; KONONEN, E.; LOUNATMAA, K.; KONTTINEN, Y.T.; KONONEN, M. Attachment of oral gram-negative anaerobic rods to a smooth titanium surface: an electron microscopy study. *Int J Oral Maxillofac Implants*, v. 19, n. 6, p. 803-809, 2004.

LAMONT, R.J.; JENKINSON, H.F. Life below the gum line: Pathogenic mecanisms of Potphyromonas gingivalis. *Microbiol. And Molec Biol. Rev.* v, 62, n. 4, p. 1244-1263, 1998.

LANG., N.P.; BRAGGER, U.; WALTER, D.; BEAMER, B.; KORNMAN, K.S. Ligature-induced peri-implant infection in Cynomolus monkeys: clinical and radiographic findings. *Clin Oral Impl Rev*, v. 4, n. 1, p. 2-11, 1993.

LEDDER, R.G; MADHWAI, T.; SREENIVASAN, P.K.; DE VIZIO, W.; MCBAIN, A.J. Na in vitro evaluation of hydrolytic enzymes as dental plaque control agents. *J. Medical Microbiol.*, v. 58, n. 4 ,p. 482-491, 2009.

LEITE, F.H.VS. *Desenvolvimento de um modelo de biofilme para avaliação de potencial anticariogênico de tratamentos e materiais restauradores*. 2009. 124f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2009.

LEONHARDT, A.; BREGSTRÖM, C.; LEKHOLM,U. Microbiologic diagnostics at titanium implants. *Clin Implan Dent and Relat Res*, v. 4, n. 4, p. 226-232, 2003.

LEONHARDT, A.; DAHLEN, G. Effect of titanium on selected oral bacterial species *in vitro*. *Eur J Oral Sci*, v. 103, n. 6, p. 382-7, 1995.

LO, A.W.; SEERS, C.A.; BOYCE, J.D.; DASHPER, S.G.; SLAKESKI, N.; LISSEL, J.P.; REYNOLDS, E.C. Comparative transcriptomic analysis of *Porphyromonas gingivalis* biofilm and planktonic cells. *BMC Microbiol.*, v. 9, n. 1 , p. 18-29, 2009.

MABBOUX, F.; PONSONNET, L.; MORRIER, L.; JAFFREZIE, N.; BARSOTTI, O. Surface free energy and bacterial retention to saliva-coated dental implant material – an *in vivo* study. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, v. 39, n. 4, p. 199-205, 2004.

MAYORGA-FAYAD, I.; LAFAURIE, G.; CONTRERAS, A.; CASTILLO, D,M,; BARÓN, A.; AYA, M.R. Microflora subgingival em periodontitis crônica y agressiva en Bogotá, Colombia: unumercamiento epidemiológico. *Biomédica*, v.27, n. 3 , p. 21-33, 2007.

MARSH, P.D. Dental plaque as a microbial biofilm. *Caries Res.*, v.38, n. 2, p. 204-211, 2004.

MEI, L.; BUSSCHER, H.; VAN DER MEI, H.C.; CHEN, Y.; VRIES, J.; REN, Y. Oral bacterial adhesion forces to biomaterial surfaces constituting the bracket-adhesive-enamel junction in orthodontic treatment. *Eur. J. Oral Sci.*, v. 117, n. 9, p. 419-426, 2009.

MOMBELLI, A.; LANG, N.P. The diagnosis and treatment of peri-implantitis. *Periodontol 2000*, v. 17, n. 5, p. 63-76, 1998.

MOMBELLI, A. Microbiology and antimicrobial therapy of peri-implantitis. *Periodontol 2000*, v.28, n. 7, p. 177-189, 2002.

MONTES, C.C.; PEREIRA, F.A.; THOMÉ, G.; ALVES, E.D.M.; ACEDO, R.V.; SOUZA, J.R.; MELO, A.C.M.; TREVILATTO, P.C. Failing factors associated with osseointegrated dental implant loss. *Implant Dentistry*, v. 16, n. 4, p. 404-407, 2007.

NONNENMACHER, C.; DALPKE, A.; ROCHON, J.; FLORES-DE-JACOBY, L.; MUTTERS, R.; HEEG, K. Real-time Polymerase Chain Reaction for detection and quantification of bacteria in periodontal patients. *J Periodontol*, v. 4, n. 1, p. 1542-1549, 2005.

NOZAKI, F.; KUSUMOTO, Y.; KITAMIRA, M.; HIRANO, H.; KOHYANA, A.; HAYAKAWA, M.; TAKIGUCHI, H.; ABIKI, Y.; MURAKAMI, S.; OKADA, H. A sensitive method for detecting *Porphyromonas gingivalis* by Polymerase Chain Reaction and its possible clinical application. *J Periodontol*, v. 3, n. 1, p. 1228-1235, 2001.

OGA, M.; ARIZONO, T.; SUGIOKA, Y. Bacterial adherence to bioinert and bioactive materials studied *in vitro*. *Acta Orthop Scand*, v. 64, n. 3, p. 273-6, 1993.

ONG, E.S.M.; NEWMAN, H.N.; WILSON, M.; BULMAN, J.S. The occurrence of periodontitis-related microorganisms in relation to titanium implants. *J. Periodontol.*, v.63, n. 6, p. 200-205, 1992.

ONOFRE, R.S. *Análise Microbiológica de Pacientes com Periodontite Crônica: uma comparação entre fumantes e não fumantes*. 2010. 69 f. Monografia (Conclusão de Curso/ Odontologia) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2010.

PERIASAMY, S; KOLENBRANDER, P.E. Mutualistic biofilm communities develop with *Porphyromonas gingivalis* and initial, early, and late colonizers of enamel. *J Bacteriol*, v. 191, n. 22, p. 6804-6811, 2009.

PIER-FRANCESCO, A.; ADAMS, R.J.; WATERS, M.G.J.; WILLIAMS, D.W. Titanium surface modification and its effect on the adherence of *Porphyromonas gingivalis*: an *in vitro* study. *Clin Oral Implants Res*, v. 17, n. 6, p. 633-637, 2006.

PYE, A.D.; LOCKHART, D.E.A.; DAWSON, M.P.; MURRAY, C.A.; SMITH, A.J.A review of dental implants and infection. *J Hosp Infect*, v. 72, n. 2, p. 104-110, 2009.

PONGNARISORN, N.J.; GEMMELL, E.; TAN, A.E.S.; HENRY, P.J.; MARSHALL, R.I.; SEYMOUR, G.J. Inflammation associated with implants with different surface types. *Clin Oral Impl Res*, v. 18, n. 1, p. 114-125, 2007.

QUIRYNEN, M.; BOLLEN, C.M.; PAPAIOANNOU, W.; VAN ELDERE, J.; VAN STEENBERGHE, D. The influence of titanium abutment surface roughness on plaque accumulation and gingivitis: short-term observations. *Int J Oral Maxillofac Implants*, v. 11, n. 3, p. 169-178, 1996.

QUIRYNEN, M.; DE SOETE, M.; VAN STEENBERGHE, D. Infectious risks for oral implants: a review of the literature. *Clin Oral Impl Res*, v. 13, n. 1, p. 1-19, 2002.

RAMS, T.E.; LINK, C. Microbiology of failing implants in human: electron microscopic observations. *J. Oral. Implantol.*, v. 11, n. 2, p. 93-100, 1983.

RICKERD, A.H.; GILBERT, P.; HIGH, N.J.; KOLENBRANDER, P.E.; HANDLEY, P.S. Bacterial coaggregation: an integral process in the

development of multi-species biofilms. *Trends in Microbiol*, v. 11, n. 2, p. 94-100, 2003.

SAKAMOTO, M.; TAKUISHI, Y.; UMEDA, M.; ISHIKAWA, I.; BENNO, Y. Rapid detection and quantification of five periodontopathogenic bacteria by real-time PCR. *Oral Microbiol and Immunol*, v. 45, n. 8, p. 39-44, 2001.

SCHWARZ, F.; SCULEAN, A.; WIELAND, M.; HORN, N.; NUESRY, E.; BUBE, C.; BECKER, J. Effects of hydrophilicity and microtopography of titanium implant surfaces on initial supragingival plaque biofilm formation. A pilot study. *Mund Kiefer Gesichts Chir*, v. 11, n. 6, p. 333-338, 2007.

SEDLACEK, M.J.; WALKER, C. Antibiotic resistance in an in vitro subgingival biofilm model. *Oral Microbiol Immunol*, v.22, n. 5, p. 333-339, 2007.

SCRANSKY, S. S.; HAFFAJEE, A.D. Dental Biofilms: difficult therapeutic target. *Periodontol 2000*, v. 28, n. 4, p. 12-55, 2002.

SHACKLETON, J.L.; SLABBERT, J.C.; COOGAN, M.M.; BECKER, P.J. The effect of titanium on the growth of plaque micro-organisms *in vitro*. *J Dent Assoc S Afr*, v. 49, n. 9, p. 453-6, 1994.

SHEMESH, M.; TAM, A.; AHRONI, R.; STEINBERG, D. Genetic adaptation of *Streptococcus mutans* during biofilm formation on different types of surfaces. *BMC Microbiology*, v.10, n. 51, p. 312-319, 2010.

SHIBLI, J.A.; MELO, L.; FERRARI, D.S.; FIGUEIREDO, L.C.; FAVERI, M.; FERES, M. Composition of supra- and subgingival biofilm of subjects with healthy and diseased implants. *Clin Oral Impl Res*, v. 19, n. 10, p. 975-982, 2008.

SIQUEIRA JR, J.F.; ROÇAS, I.N. exploiting molecular methods to explore endodontic infections: Part 1 – Current Molecular Technologies for microbiological diagnosis. *J Endodontics*, v. 4, n. 1, p. 411-423, 2005.

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

SISSONS, C.H. Artificial dental plaque biofilm model systems. *Adv Dental Rev.*, v.11, n.1, p.110-126, 1997.

SLOTS, J.; TING, M. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in human periodontal disease: occurrence and treatment. *Periodontology 2000*, v. 20, n. 3, p. 82-121, 1999.

SOCRANSKY, S.S.; HAFFAJIE, A.D.; EUGINI, M.A.; SMITH,C.; KENT, J.R.L. Microbial complexes in subgingival plaque. *J of clinical Periodontal*, v. 25, n. 5, p. 134-144, 1998.

SONG, Y. PCR-based diagnostics for anaerobic infections. *Anaerobe*, v.11, n. 2, p. 79-91, 2005.

STINGU, C.S.; ESCHRICH, K.; RODLOFF, A.C.; SCHAUMANN, R.; JENTSCH, H. Periodontitis is associated with a loss of colonization by *Streptococcus sanguinis*. *J Medical.Microbiol.*, v. 57, n. 11 , p. 495-499, 2008.

SUBRAMANI, K.; JUNG, R.E.; MOLENBERG, A.; HÄMMERLE, C.H.F. Biofilm on dental implants: a review of the literature. *Int J Oral Maxillofac Impl*, v. 24, n. 4, p. 616-626, 2009.

SUZUKI, N.; YOSHIDA, A.; NAKANO, Y. Quantitative Analysis of Multi-species oral biofilm by TaqMan Real-Time PCR. *Clinical Medicine Rev.*, v.3, n.3, p.176-185, 2005.

TAKANASHI, K.; KISHI, M.; OKUDA, K.; ISHIHARA, K. Colonization by *Phorphyromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia* from teeth to osseointegrated implant regions. *Bull. Tokyo Dent.Coll.*, v. 45, n. 2, p. 77-85, 2004.

TEUGHEL, W.; ASSCHE, N.V.; SLIEPEN, I.; QUIRYNEN, M. Effect of material characteristics and/or surface topography on biofilm development. *Clin. Oral Impl. Rev.*, v. 17, n. 2, p. 68-81, 2006.

WALKER, C.; SEDLACEK, M.J. An *in vitro* biofilm model of subgingival plaque. *Oral Microbiol. Immunol.*, v. 22, n.3, p.152-161, 2007.

WALKER, M.R.; RAPLAY, R. *Guia das Rotas na Tecnologia do Gene*. Atheneu Editora, São Paulo, 1999. 327p.

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

WU-YUAN, C.D.; EGANHOUSE, K.J.; KELLER, J.C.; WALTERS, K.S. Oral bacterial attachment to titanium surfaces: a scanning electron microscopy study. *J Oral Implantol*, v. 21, n. 3, p. 207-13, 1995.

YOSHINARI, M.; ODA, Y.; KATO, T.; OKUDA, K.; HIRAYAMA, A. Influence of surface modification to titanium on oral bacterial adhesion *in vitro*. *J Biomed Mater Rev*, v. 52, n. 2, p. 388-394, 2000.

YOSHINARI, M.; ODA, Y.; KATO, T.; OKUDA, K. Influence of surface modifications to titanium on bacterial activity *in vitro*. *Biomaterials*, v. 22, n. 14, p. 2043-2048, 2001.

YOSHINARI, M.; KATO, T.; MATSUZAKA, K.; HAYAKAWA, T.; SHIBA, K. Prevention of biofilm formation on titanium surfaces modified with conjugated molecules comprised of antimicrobial and titanium-binding peptides. *Biofouling*, v. 26, n.1, p. 103-110, 2010.

ZAURA, E.; BUIJIS, M.J.; HOOGENKAMP, M.A.; CIRIC, L.; PAPETTI, A.; SIGNORETTO, C.; STAUDER, M.; LINGSTROM, 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. *J. Biomed. And Biotech.*, v. 3, n. 1, p. 127-132, 2011.

ZIJNGE, V.; VAN LEEUWEN, M.B.M.; DEGENER, J.E.; ABBAS, F.; THURNHEER, T.; GMUR, R.; HERMSEN, H.J.M. Oral Biofilm Architecture on natural teeth. *PlosOne*, v. 5, n. 2, e9321, 2010.

.

APÊNDICES

APÊNDICE 1 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

Você está sendo convidado (a) a participar da pesquisa “Desenvolvimento de biofilme em superfície de titânio e esmalte” de responsabilidade de Letícia Stefenon, aluna do Mestrado em Clínica Odontológica da Universidade de Passo Fundo. O Objetivo dessa pesquisa é desenvolver um modelo experimental para estudo das doenças infecciosas relacionadas ao periodonto e aos implantes, possibilitando pesquisas futuras nessa área.

A sua participação vai se dar pela coleta de saliva no momento em que for diagnosticada doença periodontal. A coleta será realizada por examinadores da UFPel, acompanhados da pesquisadora responsável, nessa instituição. A coleta é realizada com você cuspiendo em um recipiente esterilizado por alguns minutos, e essa saliva será utilizada como inóculo para pesquisa no desenvolvimento de bactérias. Sendo que após a coleta você é liberado de qualquer compromisso com a pesquisa. Esse procedimento não trás desconforto ou risco à saúde. E em qualquer momento você poderá receber esclarecimentos sobre qualquer dúvida ou eventual desconforto, podendo ter acesso aos seus dados em qualquer etapa da pesquisa.

Ao participar dessa pesquisa você receberá as orientações sobre a doença periodontal e será encaminhado para tratamento adequado na instituição (UFPel). Sua participação na pesquisa não é obrigatória e você pode desistir em qualquer momento retirando seu consentimento. Caso tenha alguma despesa relacionada a pesquisa essa será ressarcida, porém você não receberá pagamento pela participação no estudo. As suas informações e informações geradas a partir da sua saliva serão mantidas

em sigilo. Você não será identificado em nenhum momento da pesquisa e da divulgação dos resultados.

Caso você tenha dúvidas ou se considera prejudicado(a) na sua dignidade e autonomia, você pode entrar em contato com a pesquisadora Letícia Stefenon (54) 99681798, com o curso de Mestrado em Clínica Odontológica da UPF, com a Coordenação da Pós-Graduação da UFPel ou também consultar o Comitê de Ética em Pesquisa da UPF pelo telefone (54)33168370.

Dessa forma, concordo em participar da pesquisa de acordo com as explicações e orientações acima. Desde já agradecemos a sua colaboração e solicitamos a sua autorização, que será assinada em duas vias, sendo que uma ficará com você e outra com a pesquisadora.

Pelotas, ____ de _____ de 2011.

Nome do participante: _____

RG: _____

Assinatura: _____

Letícia Stefenon

RG: 2353762163

**APÊNDICE 2- Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da
Universidade de Passo Fundo**

UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
VICE-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

UPF

PARECER Nº 230/2011

O Comitê de Ética em Pesquisa – UPF, em reunião no dia 25/05/11, analisou o protocolo de pesquisa “**Desenvolvimento de biofilme em superfície de titânio e esmalte**”, CAAE nº 0056.0.398.000-11, de responsabilidade da pesquisadora **Luciana Ruschel dos Santos**.

O projeto tem como objetivo desenvolver um modelo experimental para estudo in vitro de placa supra e subgingival relacionada à perimplantite. Trata-se de um estudo in vitro envolvendo material biológico (saliva) de três indivíduos portadores de doença periodontal. A saliva preparada será inoculada sobre os corpos de prova (discos de hidroxiapatita e titânio) em placas de micro-poços, em um volume de 400µl por poço. Após 1 hora, a saliva será delicadamente aspirada da base dos poços, e, 1,8ml de saliva artificial – meio DMM previamente preparado – será adicionado em cada micro-poço. Os biofilmes serão formados independentemente sobre os discos de hidroxiapatita e titânio. As placas serão incubadas em condições atmosféricas da anaerobiose, sob temperatura controlada (37°C) por um período de até 48 horas, e mantidas em repouso na incubadora. Diariamente as placas serão agitadas cuidadosamente, o sobrenadante será removido, o pH será medido e o meio será renovado. Após 12, 24 e 48 horas os discos serão removidos dos poços com pinça estéril, e as células não aderidas serão removidas gentilmente por lavagem com solução salina estéril. Os biofilmes serão formados independentemente sobre os discos de hidroxiapatita e titânio.

As pendências foram ajustadas.

Os direitos fundamentais dos participantes foram garantidos no projeto e no Termo de Consentimento Livre Esclarecido. O protocolo foi instruído e apresentado de maneira completa e adequada. Os compromissos da pesquisadora e das instituições envolvidas estavam presentes. O projeto foi considerado claro em seus aspectos éticos e metodológicos.

Diante do exposto, este Comitê, de acordo com as atribuições definidas na Resolução 196/96, do Conselho nacional de Saúde (CNS), manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa na forma como foi proposto.

Solicita-se que o (a) pesquisador (a) apresente o relatório do projeto para o CEP-UPF no final do estudo.

Situação: PROTOCOLO APROVADO

Passo Fundo, 06 de junho de 2011.

Nadir Antonio Pichler
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa

Apêndice 3 – Tabela da compilação dos dados da pesquisa

TEMPO	SUBSTRATO	INOCULO	CP	MICROBIOLOGIA	PH	RUGINICIAL	RUGFINAL
8	1	A1	1	0,25	6,92	1,153	1,346
8	1	A1	2	0,05	6,88	1,147	1,338
8	1	A1	3	0,03	7,01	1,168	1,363
8	1	A1	4	0,03	6,97	1,162	1,355
8	1	A2	1	0,01	7,19	1,198	1,398
8	1	A2	2	0,01	7,31	1,218	1,421
8	1	A2	3	0,01	7,08	1,180	1,377
8	1	A2	4	0,02	7,22	1,203	1,404
8	1	B1	1	0,02	7,01	1,168	1,363
8	1	B1	2	0,00	7,11	1,185	1,383
8	1	B1	3	0,22	7,05	1,175	1,371
8	1	B1	4	0,01	7,04	1,173	1,369
8	1	B2	1	0,00	7,24	1,207	1,408
8	1	B2	2	0,01	7,21	1,202	1,402
8	1	B2	3	0,02	7,14	1,190	1,388
8	1	B2	4	0,02	7,27	1,212	1,414
8	1	C1	1	0,01	7,07	1,178	1,375
8	1	C1	2	0,01	7,09	1,182	1,379
8	1	C1	3	0,01	7,19	1,198	1,398
8	1	C1	4	0,01	7,24	1,207	1,408
8	1	C2	1	0,01	7,05	1,175	1,371
8	1	C2	2	0,02	7,32	1,220	1,423
8	1	C2	3	0,03	7,18	1,197	1,396
8	1	C2	4	0,01	7,09	1,182	1,379
8	2	A1	1	0,83	7,02	1,170	1,365
8	2	A1	2	0,16	7,04	1,173	1,369
8	2	A1	3	0,11	7,07	1,178	1,375
8	2	A1	4	0,13	7,13	1,188	1,386

8	2	A2	1	0,06	7,12	1,187	1,384
8	2	A2	2	0,12	7,03	1,172	1,367
8	2	A2	3	5,25	7,16	1,193	1,392
8	2	A2	4	1,08	7,18	1,197	1,396
8	2	B1	1	0,05	7,19	0,227	1,236
8	2	B1	2	0,50	7,15	1,192	1,390
8	2	B1	3	0,02	7,19	1,198	1,398
8	2	B1	4	0,55	7,11	1,185	1,383
8	2	B2	1	0,02	7,19	1,198	1,398
8	2	B2	2	0,01	7,15	1,192	1,390
8	2	B2	3	0,02	7,24	1,207	1,408
8	2	B2	4	0,75	7,14	1,190	1,388
8	2	C1	1	0,12	7,32	1,220	1,423
8	2	C1	2	0,05	7,34	1,223	1,427
8	2	C1	3	0,09	7,25	1,208	1,410
8	2	C1	4	0,02	7,29	1,215	1,418
8	2	C2	1	0,03	7,36	1,227	1,431
8	2	C2	2	0,08	7,24	1,207	1,408
8	2	C2	3	0,10	7,34	1,223	1,427
8	2	C2	4	0,06	7,19	1,198	1,398
24	1	A1	1	0,65	7,73	1,288	1,503
24	1	A1	2	0,16	7,76	1,293	1,509
24	1	A1	3	0,40	7,79	1,298	1,515
24	1	A1	4	0,17	7,70	1,283	1,497
24	1	A2	1	0,00	7,39	1,232	1,437
24	1	A2	2	0,80	7,53	1,255	1,464
24	1	A2	3	0,12	7,44	1,240	1,447
24	1	A2	4	0,07	7,54	1,257	1,466
24	1	B1	1	0,04	7,75	1,292	1,507
24	1	B1	2	0,45	7,73	1,288	1,503
24	1	B1	3	0,40	7,57	1,262	1,472

24	1	B1	4	0,85	7,62	1,270	1,482
24	1	B2	1	15,00	7,51	1,252	1,460
24	1	B2	2		7,53	1,255	1,464
24	1	B2	3	0,38	7,48	1,247	1,454
24	1	B2	4	0,28	7,53	1,255	1,464
24	1	C1	1	0,04	7,52	1,253	1,462
24	1	C1	2	0,01	7,49	1,248	1,456
24	1	C1	3	0,14	7,62	1,270	1,482
24	1	C1	4	0,01	7,60	1,267	1,478
24	1	C2	1	0,07	7,43	1,238	1,445
24	1	C2	2	0,73	7,32	1,220	1,423
24	1	C2	3	0,07	7,42	1,237	1,443
24	1	C2	4	0,45	7,43	1,238	1,445
24	2	A1	1	0,22	7,78	1,297	1,513
24	2	A1	2	1,83	7,71	1,285	1,499
24	2	A1	3	1,48	7,83	1,305	1,523
24	2	A1	4	3,75	7,75	1,292	1,507
24	2	A2	1	4,00	7,52	1,253	1,462
24	2	A2	2	6,25	7,48	1,247	1,454
24	2	A2	3	4,75	7,50	1,250	1,458
24	2	A2	4	1,00	7,56	1,260	1,470
24	2	B1	1	0,75	7,71	0,326	1,339
24	2	B1	2	0,90	7,77	0,447	1,370
24	2	B1	3	0,60	7,81	1,302	1,519
24	2	B1	4	1,50	7,68	1,280	1,493
24	2	B2	1	3,75	7,51	1,252	1,460
24	2	B2	2	1,53	7,53	1,255	1,464
24	2	B2	3	0,03	7,58	1,263	1,474
24	2	B2	4	0,03	7,58	1,263	1,474
24	2	C1	1	0,60	7,59	1,265	1,476
24	2	C1	2	0,70	7,65	1,275	1,488

24	2	C1	3	0,08	7,60	1,267	1,478
24	2	C1	4	0,02	7,58	1,263	1,474
24	2	C2	1	1,58	7,32	1,220	1,423
24	2	C2	2	0,10	7,29	1,215	1,418
24	2	C2	3	0,04	7,30	1,217	1,419
24	2	C2	4	5,25	7,40	1,233	1,439
48	1	A1	1	0,48	7,84	1,387	1,538
48	1	A1	2	0,75	7,81	1,427	1,539
48	1	A1	3	0,35	7,82	1,362	1,530
48	1	A1	4	0,04	7,78	1,303	1,514
48	1	A2	1	0,19	7,87	1,343	1,536
48	1	A2	2	3,00	7,88	1,813	1,616
48	1	A2	3	0,05	7,84	1,315	1,526
48	1	A2	4	0,12	7,82	1,323	1,524
48	1	B1	1	0,03	7,99	1,337	1,554
48	1	B1	2	0,08	7,98	1,343	1,554
48	1	B1	3	0,12	7,85	1,328	1,530
48	1	B1	4	0,12	7,90	1,337	1,539
48	1	B2	1	0,14	7,90	1,340	1,540
48	1	B2	2	0,33	7,72	1,342	1,510
48	1	B2	3	0,85	7,64	1,415	1,509
48	1	B2	4	0,08	7,68	1,293	1,496
48	1	C1	1	0,03	7,80	1,305	1,518
48	1	C1	2	0,12	7,76	1,313	1,512
48	1	C1	3	0,16	7,78	1,323	1,517
48	1	C1	4	0,68	7,69	1,395	1,514
48	1	C2	1	0,38	7,51	1,315	1,471
48	1	C2	2	0,12	7,25	1,228	1,413
48	1	C2	3	0,60	7,47	1,345	1,469
48	1	C2	4	0,12	7,30	1,237	1,423
48	2	A1	1	0,75	7,77	1,420	1,532

48	2	A1	2	0,78	7,81	1,432	1,540
48	2	A1	3	0,78	7,81	1,432	1,540
48	2	A1	4	1,23	7,83	1,510	1,557
48	2	A2	1	1,23	7,58	1,468	1,508
48	2	A2	2	1,48	7,62	1,517	1,523
48	2	A2	3	1,33	7,60	1,488	1,515
48	2	A2	4	1,98	7,59	1,595	1,531
48	2	B1	1	0,80	7,93	1,455	1,564
48	2	B1	2	0,65	7,95	1,433	1,564
48	2	B1	3	0,48	7,92	1,400	1,553
48	2	B1	4	1,45	7,91	1,560	1,578
48	2	B2	1	0,93	7,68	1,435	1,519
48	2	B2	2	0,63	7,69	1,387	1,513
48	2	B2	3	1,43	7,76	1,532	1,549
48	2	B2	4	1,18	7,71	1,482	1,532
48	2	C1	1	0,90	7,75	1,442	1,532
48	2	C1	2	0,48	7,77	1,375	1,524
48	2	C1	3	0,48	7,81	1,382	1,532
48	2	C1	4	0,93	7,80	1,455	1,543
48	2	C2	1	0,88	7,67	0,292	1,327
48	2	C2	2	1,13	7,98	1,518	1,583
48	2	C2	3	0,40	7,47	0,385	1,309
48	2	C2	4	1,38	7,52	1,483	1,501
72	1	A1	1	0,33	7,44	1,295	1,511
72	1	A1	2	0,73	7,39	1,353	1,579
72	1	A1	3	0,14	7,49	1,272	1,484
72	1	A2	1	0,08	7,38	1,243	1,451
72	1	A2	2	0,12	7,48	1,267	1,478
72	1	A2	3	0,05	7,54	1,265	1,476
72	1	B1	1	0,04	7,55	1,265	1,476
72	1	B1	2	0,13	7,70	1,305	1,523

72	1	B1	3	0,12	7,38	1,250	1,458
72	1	B2	1	0,08	7,58	1,277	1,489
72	1	B2	2	0,03	7,59	1,270	1,482
72	1	B2	3	0,03	7,55	1,263	1,474
72	1	C1	1	0,25	7,36	1,268	1,480
72	1	C1	2	0,17	7,45	1,270	1,482
72	1	C1	3	0,15	7,51	1,277	1,489
72	1	C2	1	0,13	7,43	1,260	1,470
72	1	C2	2	0,35	7,52	1,312	1,530
72	1	C2	3	0,10	7,52	1,270	1,482
72	2	A1	1	0,50	7,37	1,312	1,530
72	2	A1	2	0,60	7,36	1,327	1,548
72	2	A1	3	0,45	7,44	1,315	1,534
72	2	A1	4	0,43	7,42	1,308	1,526
72	2	A2	1	0,95	7,64	1,432	1,670
72	2	A2	2	1,40	7,41	1,468	1,713
72	2	A2	3	1,10	7,39	1,415	1,651
72	2	A2	4	0,93	7,54	1,412	1,647
72	2	B1	1	0,40	7,56	1,327	1,548
72	2	B1	2	1,58	7,61	1,532	1,787
72	2	B1	3	0,63	7,88	1,418	1,655
72	2	B1	4	0,45	7,38	1,305	1,523
72	2	B2	1	0,90	7,54	1,407	1,641
72	2	B2	2	0,35	7,48	1,305	1,523
72	2	B2	3	0,33	7,40	1,288	1,503
72	2	B2	4	0,93	7,50	1,405	1,639
72	2	C1	1	0,73	7,61	1,390	1,622
72	2	C1	2	0,50	7,39	1,315	1,534
72	2	C1	3	1,08	7,63	1,452	1,694
72	2	C1	4	0,73	7,47	1,367	1,594
72	2	C2	1	0,68	7,61	1,382	1,612

72	2	C2	2	0,90	7,48	1,397	1,629
72	2	C2	3	0,68	7,63	1,385	1,616
72	2	C2	4	1,05	7,38	1,405	1,639

ARTIGO SUBMETIDO

DEVELOPMENT OF SUPRA- AND SUBGINGIVAL BIOFILM EXPERIMENTAL MODEL ON ENAMEL/DENTIN AND ON TITANIUM SURFACES²

Abstract: The present study investigated biofilm formation on titanium surface and on standardized enamel/dentin discs using the microcosm technique in order to compare such formation on both surfaces in different time periods and to assess the surface roughness of materials and the pH of the culture medium. The obtained data were submitted to ANOVA and Tukey's test ($p < 0.05$). Results revealed larger biofilm formation on the enamel/dentin surface, whose peak growth occurred at 24h. The pH became alkaline at 48h. The data suggest that the proposed model is suitable for the assessment of biofilms up to 48h of growth.

Key words: biofilm; microcosm; implants; titanium; enamel.

Letícia Stefenon^a, Luciana Ruschel dos Santos^a, Maximiliano Sérgio Cenci^b, Anelise Fernandes Montagner^c and Álvaro Della Bona^d

1. Introduction

Biofilms are highly organized microbiological communities that develop on solid surfaces and whose components adapt in order to maximize their proliferation and biofilm-forming potential. Thus, adaptation to the surface and to other microorganisms and the culture medium characteristics will determine the biofilm type, development, and survival¹⁻⁴. Although dental plaque includes a wide variety of species, colonization follows a pattern, with initial adhesion to the formed film, secondary colonization, and interspecies co-adhesion⁵.

The development of studies about *in vivo* oral biofilm formation is hindered by their heterogeneity, small amount, limited access, multiple environments and no possibility of control, in addition to ethical problems. For these reasons, Wong & Sissons⁶ developed an artificial mouth plaque culture system, using microcosm in an attempt to solve the limitations of biofilm studies. Several authors have sought to use the microcosm technique, with saliva from patients, due to its capacity to mimic the oral cavity for different studies, most of which focus on cardiology and on tests of antiseptic substances⁷⁻¹⁷.

The aim of this paper was to develop an experimental model for the *in vitro* study of the supra- and subgingival plaque, assessing characteristics such as time, surface roughness, types of substrate and pH variation of the culture medium used.

2. Materials and methods

The study protocol was approved by the Research Ethics Committee of Universidade de Passo Fundo (UPF), process no. 230/2011. A randomized *in vitro* study was carried out, in which biofilm

was grown in microplates on titanium discs and on enamel/dentin discs using saliva (microcosm) from two volunteers with chronic periodontal disease and from one periodontally healthy patient, all of whom were nonsmokers, had not taken antibiotics in the past month and had abstained from oral hygiene for 24h. After saliva collection, the patients were submitted to periodontal treatment.

Biofilms were grown independently for up to 72 hours on four discs for each inoculum (n=4), and the experiment was performed in duplicate and analyzed in four time periods, totaling 90 titanium specimens and 94 enamel/dentin specimens.

Specimens

The sterile titanium specimens were donated by Titanium Fix, measuring 5mm in diameter and 2mm in thickness, and a polished surface was ordered to simulate the location of the initial bacterial colonization. The enamel/dentin specimens were obtained from unerupted bovine incisors with no defects, which were scraped, cleansed and stored in distilled water (-20°C). To obtain the enamel discs with 5mm in diameter and 2mm in thickness, the middle third of the vestibular surface was sectioned with an industrial drill equipped with a diamond-coated (trephine-like) core drill bit at 400 rpm. The surface was flattened with a 320-grit or lower grit sandpaper disc. The initial roughness of titanium specimens was evaluated before the manufacture of enamel/dentin specimens, in order to standardize the samples.

Saliva collection and processing

20 ml of saliva stimulated by parafilm (Parafilm "M"[®], American National Can TM, Chicago, IL, EUA) was collected (two collections by volunteer) with a one-hour interval in between. The saliva was filtered with sterile glass wool, stored in a sterile vessel and homogenized in a vortex mixer. Aliquots of saliva collected from each volunteer were used for bacterial quantification (expressed as CFU/mL) and for centrifugation (5000g, at 4°C for 5 min), and the supernatant was eliminated while the precipitate was frozen for later microbial analyses.

Inoculation and bacterial growth

The prepared saliva was inoculated onto specimens in microplates using a volume of 400µL per well. After 1 hour, the saliva was gently aspirated from the base of the wells and 1.8mL of artificial saliva – previously prepared DMM – was added to each microplate. The biofilms were grown independently on the specimens and the plates were incubated under anaerobic conditions (80% N₂, 10% CO₂, 10% H₂). After 8, 24, 48 and 72 hours, the discs were removed from the wells with sterile tweezers and non-adherent cells were gently washed off with sterile saline (2mL). The discs were placed in tubes containing 1mL of RTF (reduced transport fluid) and sonicated (Vibra Cell Sonicator – Sonics and Materials, Danbury, CT, USA) at 40W at a range of 5%, using three pulses of 10s each to obtain the biofilm with homogenous suspension. A 5-second interval was allowed between each pulse, and the tubes were stored in ice during the procedure.

Biofilm suspensions were serially diluted to count the total number of microorganisms. The suspensions were diluted in RTF in series of up to 10⁷ and immediately inoculated in duplicate on blood agar

plates under anaerobic conditions for 96 hours. The unit-forming colonies were counted and the results were expressed as CFU/mg of biofilm specimen (wet weight). After removal of the initial microbial suspension aliquot for quantification, the specimen was removed from the suspension and the suspension was centrifuged. The supernatant was discarded and the precipitate was stored at -80°C for later microbiological analyses.

Surface roughness was read with a SurrCode SE1200 (Kosakalab, Tokyo, Japan) profilometer, calibrated with V 200, H 25mm/ λc and λc 0,25mm, and the mean roughness (Ra) was that provided by the equipment. Three measurements were made for each specimen on each side so that they covered the broadest possible surface area in different directions in order to obtain the mean roughness of each specimen (ABNT NBR ISO 4288). The equipment was calibrated after the analysis of three specimens or whenever different readings were obtained. The final reading was made after bacterial biofilm growth. To do that, after obtaining the bacterial suspension, the specimens were placed in tubes containing 1mL of 70% alcohol, shaken in a vortex mixer for 30s and dried for the reading of the final surface roughness.

3. Results and Discussion

The roughness results obtained for the specimens are shown in Table 1. The mean surface roughness values for the enamel/dentin specimens varied markedly, due probably to the difficulty in their standardization despite the standard technique used for their manufacture and the caution taken to select the specimens that were visually

smoother. A greater sample standardization was observed for industrially machined titanium specimens.

[Insert Table 1]

The biofilms were analyzed taking into account the amount of biofilm formed (wet weight), without significant interaction between the investigated factors (type of inoculum, substrate, time, amount of biofilm), except when the substrate and time were analyzed separately from the other factors, with a large range of the coefficient of variation. The analysis showed that there was a larger bacterial growth after 24 and 48 hours, indicating that these periods are more appropriate for biofilm studies (Table 2).

[Insert Table 2]

Even though two clinical groups (unhealthy and healthy) were used, no significant difference was observed between inocula when the amount of biofilm formation was taken into consideration (Table 3).

[Insert Table 3]

The initial roughness was not statistically significant between the two substrates used (enamel/dentin and titanium). However, when associated with the amount of biofilm formation, the enamel/dentin discs showed a larger amount of biofilm (Table 4).

[Insert Table 4]

The pH of DMM varied widely, but the highest values in both substrates were observed at 48 and 24 hours (Table 5). The elevation of these values may indicate selection of proteolytic bacteria that are characteristic of periodontal and peri-implant conditions¹⁵⁻¹⁶. The pH conditions described in Table 5 also demonstrate that the proposed experimental model can maintain pH values above 7 throughout the experimental period.

[Insert Table 5]

The mean roughness of enamel/dentin specimens varied substantially, due probably to the difficulty in standardization despite the use of a standard technique for manufacture and the selection of visually smoother specimens. The analysis of industrially machined titanium specimens revealed greater sample standardization. Surface roughness is a relevant characteristic for evaluating the relationship between surface and bacterial adhesion, but the variation in initial roughness data does not appear to have influenced biofilm formation¹⁴.

The final roughness mean values varied widely in both substrates, but there was no significant difference when initial and final roughness values were compared. These data possibly have to do with the type of biofilm used in the present study and with the type of assessment. However, Elter *et al.*¹⁷ assessed biofilm at 14 days and did not observe any significant effect of surface roughness on its growth. Bollen *et al.*¹⁸ and Quirynen *et al.*¹⁹ reported that 0.2 μ m variation in surface roughness apparently does not have an impact on the amount and quality of biofilm.

The amount of biofilm formation (wet weight) was taken into account for the analysis, but there was no significant relationship between the analyzed factors (type of inoculum, substrate, time, amount of biofilm), except when substrate and time were assessed separately from the other factors. The analysis showed larger bacterial growth after 24 hours and 48 hours, suggesting that these two periods are highly recommended for this type of study. The decrease in bacterial growth after 48 hours may be attributed to the fact that the medium was not replaced, which does not occur in experimental models in which the medium is replaced every 24 hours^{12,20} or 48 hours²¹. Other experiments that do not require anaerobic conditions tend to assess biofilm formation at seven days²², eight days¹³ four hours to 10 days²¹, 20 days, and nine to 22 days⁶.

There is no pattern in the literature about the time for biofilm formation, and studies tend to adjust this factor to the experiment goals and to the method used. Mei *et al.*²³ assessed biofilm formation at 16 hours, whereas Schwarz *et al.*²⁴ did it at up to 72h, as in the present study. Fürst *et al.*⁵, on the other hand, assessed it at 30 minutes, 1,2,4,8 and 12 weeks.

Although two clinical groups (unhealthy and healthy) were used in the study, there was no significant difference between inocula when the amount of biofilm was considered.

Initial roughness was not statistically significant between the substrates used (enamel/dentin and titanium). However, enamel/dentin discs had a larger biofilm formation, which is in line with the findings of Fürst *et al.*⁵, who observed different patterns and the greater

predominance of *A. Actinomycetemcomitans* and *P. gingivalis* on enamel.

The pH of DMM varied considerably, with higher values for both substrates at 24 and 48 hours of incubation. The elevation of these values may indicate selection of proteolytic bacteria that are characteristic of periodontal and peri-implant conditions¹⁵⁻¹⁶. The pH conditions described also reveal that the proposed experimental study can maintain pH values above 7 throughout the study period.

The present study sought to develop a method for the investigation of biofilm using the microcosm technique. This method allows for investigations in the fields of implantology and periodontics, including tests for antimicrobial substances and surface treatments of dental implants.

The experimental model used here was appropriate for the assessment of biofilm growth at 24 and 48 hours.

Acknowledgments

We thank Titanium Fix for gently providing the titanium specimens and the Laboratory of Microbiology of the Dental School of Universidade Federal de Pelotas for allowing the use of its facilities and equipment, without which the experiment could not have been performed