

VALIDAÇÃO DE MODELO ANIMAL PARA OBTENÇÃO DE CÁRIE EM DENTINA

Renata Leone Liguori¹*, Beatriz Marques¹, Maria Eugênia Zanata¹, Fernanda Kabadayan¹, Cintia Helena Coury Saraceni¹ (Professora Doutora)¹

1. Universidade Paulista - UNIP

Resumo

O objetivo deste estudo foi validar um modelo animal para o desenvolvimento de cárie com comprometimento de dentina. Foram utilizados 3 fêmeas e 1 macho, ratos Wistar adultos, preparados para reprodução. Após os períodos de prenhez e desmame, os filhotes foram divididos em quatro grupos (n=6): Controle (GC): dieta normal; Dieta Cariogênica (GD); *S. Mutans* (GM): dieta normal + *S. Mutans*; *S. Mutans* e Dieta cariogênica (GMD). A presença e quantificação da bactéria biofilme foi confirmada por meio de PCR-*real time*. Ao final de 4 semanas, foram atribuídos os escores de cárie, seguida de eutanásia. As mandíbulas foram analisadas em microscopia eletrônica de varredura (MEV). Os resultados mostraram ausência de *S. Mutans* em GC e GD, com diferença estatística para GM e GMD (p<0.05). O grupo GMD apresentou escores compatíveis com cárie em dentina e a análise em MEV mostrou imagens compatíveis com os escores atribuídos. O modelo proposto foi eficaz na reprodução de cárie em dentina.

Autorização legal: CEUA 094/17

Palavras-chave: Dieta Cariogênica; *S. Mutans*; PCR “*real time*”

Apoio financeiro: PIBIC/CNPq

Trabalho selecionado para a JNIC: UNIP

Introdução

A cárie é uma doença de alto impacto, comumente diagnosticada na clínica Odontológica (BELSTROM et al., 2017) e pode ser considerada infecciosa e multifatorial, com capacidade para comprometer as estruturas vitais de esmalte e dentina. Este fator faz com que seja difícil seu controle e, em razão disso, grande é sua expressividade, ainda que medidas de prevenção, diagnóstico e tratamento sejam propostos e amplamente estudados na literatura (COSTALONGA; HERZBERG, 2014; LAW et al., 2007; SICCA et al., 2016).

Esse processo patológico causa a destruição dos tecidos dentais e pode trazer complicações locais e gerais (BELSTROM et al., 2017; SICCA et al., 2016). Mesmo após longos anos de pesquisas, os mecanismos de controle não foram completamente elucidados. Existe um consenso de que a presença de placa bacteriana é um dos fatores necessários, no entanto, sua presença apenas não é suficiente para que lesões de cárie se desenvolvam (COSTALONGA; HERZBERG, 2014; KLEIN et al., 2015).

Sua formação tem início com a instalação do biofilme na estrutura dental. O desequilíbrio provocado pelas alterações na microbiota oral contribui para a doença (COSTALONGA; HERZBERG, 2014; MOYNIHAN, 2016). O processo de desmineralização da estrutura dental promove o acúmulo de produtos ácidos formados pela dieta. Este fator altera o pH salivar e torna o ambiente bucal propício para que microrganismos específicos, como o *Streptococcus do tipo mutans* (SM), se instalem e desenvolvam a doença cárie.

Uma vez que há vários pontos a serem elucidados a respeito da cárie e, ainda, métodos preventivos e curativos necessitem ser testados em condições biológicas, modelos animais que desenvolvam cárie poderiam permitir variáveis de resposta e auxiliar no estudo de abordagens terapêuticas para essa doença. Culp et al. (2005) propuseram modelo animal para indução de cárie em ratos geneticamente modificados, porém, sem precisão quanto à quantificação de *S. Mutans* ou controle sistêmico dos animais, dificultando a reprodutibilidade.

Esse estudo se propôs a apresentar um modelo animal que fosse preciso, facilmente reprodutível e que pudesse ser utilizado em futuros estudos sobre técnicas preventivas e abordagens terapêuticas para a cárie.

Metodologia

Foram utilizados 4 ratos, 3 fêmeas e 1 macho, Wistar (*Rattus norvegicus*) adultos, com 6 a 9 semanas de vida, pesando aproximadamente 250g e 350g, respectivamente. Após o período de adaptação ao biotério, o rato macho foi colocado na caixa moradia das fêmeas para reprodução, onde permaneceu até o dia GD19. Constatada a prenhez, cada fêmea foi realocada em uma nova caixa moradia, onde pariu e permaneceu com os filhotes até o desmame. O peso e a glicemia dos animais foram monitorados semanalmente durante todo o período do experimento.

Após o desmame em 21 dias (PND21), os filhotes, independente do sexo, foram realocados em gaiolas, divididos em quatro grupos (n=6):

Grupo Controle (GC): alimentação normal e água ad libitum.

Grupo Dieta Cariogênica (GD): dieta cariogênica (56% de sacarose) e água com 10% de sacarose ad libitum por 4 semanas (Culp et al. 2005).

Grupo *S. Mutans* (GM): dieta normal e inoculação de *S. Mutans*.

Grupo *S. Mutans* e dieta cariogênica (GMD): dieta cariogênica e inoculação de *S. Mutans*.

Previamente à inoculação de *S. Mutans* e após o desmame (PND21), foram realizadas coletas da cavidade oral de todos os animais, por meio de SWABs, para verificação da flora nativa a fim de se, confirmar a ausência de SM (Culp et al. 2005). Os animais dos grupos GM e GMD foram inoculados por 3 dias consecutivos (PND 22-24) com *S. Mutans* (ATCC 10231), na concentração de 108 UFC/ml, por meio de SWAB na cavidade oral (Culp et al. 2005). Após 5 dias da inoculação inicial, novas coletas das cavidades orais dos animais foram realizadas, para comprovação da presença de *S. Mutans*.

A avaliação microbiológica foi feita por meio da reação de polimerase em cadeia (PCR) do tipo "real time". Esse teste permitiu a detecção quantitativa do *S. mutans*. Para tanto, foram realizados os seguintes passos: extração do DNA; PCR-real time (desenho dos primers; otimização das reações; reações de qPCR).

Após 4 semanas, foram atribuídos os escores de cárie, baseados no ICDAS (International Caries Detection & Assesment System), método indicado para o diagnóstico do estágio de desenvolvimento das lesões de cárie em molares. Para a atribuição dos escores, foram selecionados dois examinadores, que foram calibrados até que fosse atingido índice Kappa $\geq 85\%$.

Constatadas lesões com envolvimento em dentina (escores 4 e 5), o experimento foi finalizado, com a eutanásia dos animais por meio de câmara de CO₂.

Os escores de cárie foram submetidos à análise estatística por meio de teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e os dados relativos à quantificação de *S. Mutans*, foram submetidos à ANOVA.

Após a eutanásia, amostras de mandíbulas foram isoladas para análise em microscopia eletrônica de Varredura (MEV). Os espécimes foram estocados em cloramina a 5% e, posteriormente, submetidos à desidratação crescente por acetona, seguido de cobertura com ouro-paládio com espessura de $\pm 15\text{nm}$ (Suptter Coater MED-020 - Bal-Tec). Após esses procedimentos, os espécimes foram observados em MEV. (JEOL - JSM - 6510, USA).

Resultados e Discussão

Quantificação e identificação de *S. Mutans*:

Os resultados da análise microbiológica para os grupos inoculados estão descritos na tabela 1.

Antes da inoculação não foi detectada presença de *S. Mutans* em nenhum animal.

Os resultados indicaram ausência de *S. Mutans* nos grupos Controle (GC) e Dieta (GD) e diferença estatística na quantificação do *S. Mutans* entre esses grupos e os grupos SM (GM e GMD) ($p < 0.05$). Não houve diferença estatística entre os grupos SM (GM e GMD) ($p > 0.05$).

Tabela 1 – Quantidade (média \pm DP) de SM no biofilme oral para todos os grupos

Grupos				
	GC Controle	GD Dieta cariogênica	GM <i>S. Mutans</i>	GMD <i>S. Mutans</i> +dieta cariogênica
Sm (log [])	0 a	0 a	3.62 \pm 0.39 b	3.20 \pm 1.69 b

Diferentes letras indicam diferenças estatísticas. Houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos pelo teste ANOVA ($\alpha=0,05$). Fonte: acervo da autora

Diagnóstico de cárie:

Os escores (medianas) foram atribuídos por dois avaliadores, após calibração e obtenção de teste Kappa $\geq 85\%$ e constam na Tabela 2.

Tabela 2 – Mediana dos escores atribuídos segundo ICDAS

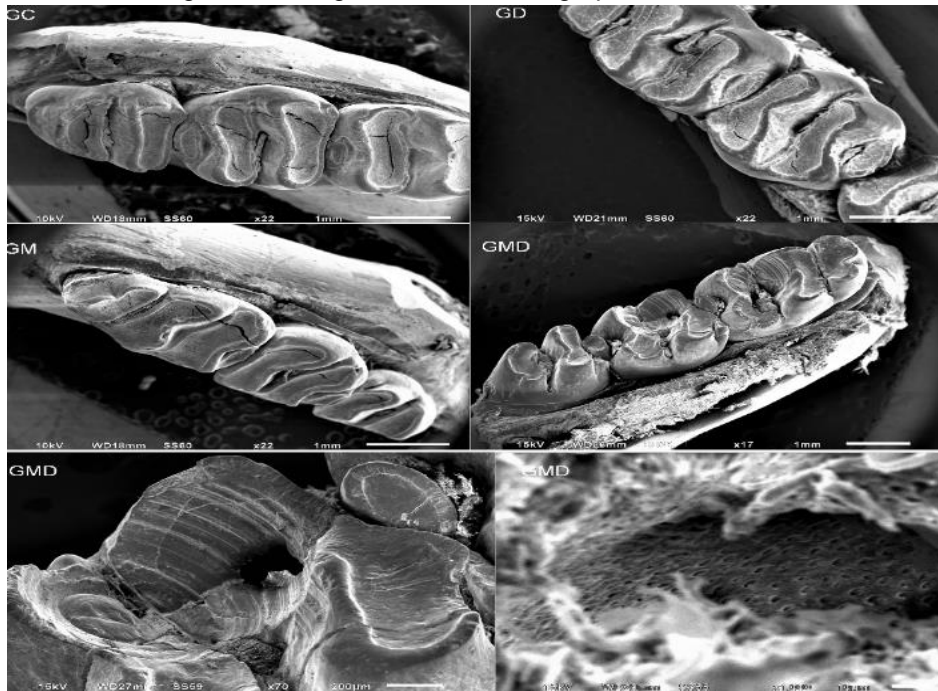
Grupos				
	GC Controle	GD Dieta cariogênica	GM <i>S. Mutans</i>	GMD <i>S. Mutans</i> +dieta cariogênica
	0 a	0 a	0 a	4,5 (4-5) b

Diferentes letras indicam diferenças estatísticas. Houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos pelo teste de Kruskal-Wallis ($\alpha=0,05$). Fonte: acervo da autora

Análise em Microscopia Eletrônica de Varredura:

Os elementos dentais do grupo GMD mostraram perda significativa de esmalte com exposição de dentina, compatível com o escore atribuído segundo ICDAS. Os elementos dentais dos demais grupos apresentaram desgastes dentro da normalidade para o padrão de roedores.

Figura 1 – Imagens em MEV dos grupos GC, GD, GM e GMD



A proposta desse estudo foi validar um modelo de cárie em ratos replicável e passível de ser utilizado para futuros estudos sobre esse tema.

Culp et al. (2005) propuseram um modelo animal para indução de cárie a partir do qual esse estudo foi delineado. A dieta cariogênica utilizada pelos autores apresentou porcentagens maiores de sacarose que o presente estudo. A intenção foi de diminuir a quantidade de açúcar ingerido pelos animais, a fim de minimizar possíveis alterações de peso e/ou metabólicas, como o diabetes mellitus, que pudessem inviabilizar a validação ao longo do tempo. Os autores não referem em seu estudo qualquer monitoramento das condições sistêmicas dos animais. Em nosso estudo, o peso e a glicemia de todos os animais foram monitorados semanalmente e com as porcentagens de sacarose propostas, não houve qualquer alteração sistêmica nos animais. Este dado confirma a reprodutibilidade segura do modelo proposto.

Outro fator que diferencia nosso modelo daquele proposto pelos autores acima citados, foi o método utilizado para diagnóstico das lesões. Culp et al. (2005) basearam sua análise no índice proposto por Keyes (1958), modificado por Larson (1981) e em nosso estudo, os escores foram atribuídos segundo o ICDAS (International Caries Detection & Assessment System). Esse método, proposto por Ismail et al. (2007), é um dos mais utilizados tanto para diagnóstico e planejamento do tratamento da doença cárie e é largamente utilizado para estudos de epidemiologia e clínico. Segundo Braga et al. (2009), reproduz com fidelidade comparável a outros métodos consagrados, o estágio do desenvolvimento e de atividade das lesões cariosas. O método consiste numa inspeção visual que visa avaliar a profundidade e/ou atividade das lesões de cárie, por meio de escores que propiciam maior precisão e confiabilidade ao exame clínico.

Nossos resultados apontaram para lesões com escores 4 ou 5 para o grupo GMD, o que sugere lesão de cárie ativa, sem grande cavitação. Esse resultado permite-nos validar o método proposto.

Outro aspecto inovador nesse estudo, foi o método utilizado para detecção e quantificação do *S. Mutans*, através da reação de polimerase em cadeia (PCR) do tipo "real time".

Zhan et al. (2012) e Culp et al. (2005) utilizaram métodos menos precisos para identificação de *S. Mutans*, sem contudo quantificá-los.

Nossos resultados apontam sucesso na inoculação do *S. Mutans*, com os grupos GM e GMD apresentando quantidades estatisticamente semelhantes da bactéria. Numa proposta de validação de método, esse dado permite-nos certificar que a forma de inoculação por meio de SWAB foi eficaz e padronizada.

Outro aspecto a ser considerado é a confirmação da teoria proposta por Fejerskov e Manji (1990), que afirma que a interação dos fatores dieta cariogênica, hospedeiro, tempo e bactéria são fatores determinantes para o desenvolvimento de lesões cariosas.

A análise qualitativa em microscopia eletrônica de varredura mostrou elementos dentais com grau de destruição compatíveis com o escore atribuído pelos examinadores, com ligeira cavitação em dentina.

Diante dos fatores acima citados, consideramos que nosso modelo foi validado com sucesso, com resultados que permitem reprodutibilidade e confiabilidade para subsidiar futuros estudos sobre cárie.

Conclusões

O modelo proposto foi capaz de reproduzir com confiabilidade e precisão lesões de cárie com

comprometimento de dentina em ratos e é passível de ser replicado para futuros estudos sobre o tema.

Referências bibliográficas

- BELSTROM, D et al. Salivary microbiota in individuals with different levels of caries experience. **Journal of oral microbiology**, v. 9, n. 1, p. 1270614, 2017.
- BRAGA, M. M, MENDES F. M.; GIMENEZ, T.; EKSTRAND, K. R. O uso do ICDAS para diagnóstico e planejamento do tratamento da doença cárie. **Pro-odonto prevenção**, v.5, n.4, p9-55, 2012.
- BRAGA, M. M.; OLIVEIRA, L. B.; BONINI, G. A. V. C.; BÖNECCKER, M.; MENDES, F. M. Feasibility of the International Caries Detection and Assessment System (ICDAS-II) in Epidemiological Surveys and Comparability with Standard World Health Organization Criteria. **Caries Res.**, v. 43, p. 245–249, 2009
- CATALÁN, M. A. et al. Elevated incidence of dental caries in a mouse model of cystic fibrosis. **PloS one**, v. 6, n. 1, p. e16549, 2011.
- COSTALONGA, M; HERZBERG, M. C. The oral microbiome and the immunobiology of periodontal disease and caries. **Immunology letters**, v. 162, n. 2, p. 22-38, 2014.
- CULP, D. J. et al. A mouse caries model and evaluation of Aqp5–/–knockout mice. **Caries research**, v. 39, n. 6, p. 448-454, 2005
- FEJERSKOV, O.; MANJI, F. Risk assessment in dental caries. **Risk Assessment in Dentistry. Chapel Hill, University of North Carolina Dental Ecology**, p. 215-217, 1990.
- ISMAIL, A. I.; SHON, W.; TELLEZ, M.; AMAYA, A.; SEN, A.; HASSIN, H.; PITTS, N. B. The international caries detection an assessment system (ICDAS): an integrated system for measuring dental caries. **Community Dent Oral Epidemiol**, v. 35, p. 170–178, 2007.
- KLEIN, M. I. et al. Streptococcus mutans-derived extracellular matrix in cariogenic oral biofilms. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 5, p. 10, 2015.
- LAW, V.; SEOW, W. K.; TOWNSEND, G. Factors influencing oral colonization of mutans streptococci in young children. **Australian dental journal**, v. 52, n. 2, p. 93-100, 2007.
- LÓPEZ-LÓPEZ, Arantxa et al. Health-associated niche inhabitants as oral probiotics: the case of Streptococcus dentisani. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 379, 2017.
- MOYNIHAN, Paula. Sugars and Dental Caries: Evidence for Setting a Recommended Threshold for Intake–. **Advances in Nutrition**, v. 7, n. 1, p. 149-156, 2016.
- SICCA, C. et al. Prevention of dental caries: A review of effective treatments. **Journal of clinical and experimental dentistry**, v. 8, n. 5, p. e604, 2016.
- SKUCHA-NOWAK, M. et al. Natural and Controlled Demineralization for Study Purposes in Minimally Invasive Dentistry. **Advances in clinical and experimental medicine: official organ Wroclaw Medical University**, v. 24, n. 5, p. 891-898, 2015.
- STRUŻYCKA, Izabela. The oral microbiome in dental caries. **Pol J Microbiol**, v. 63, n. 2, p. 127-135, 2014.
- ZHAN, L et al. Factors related to maternal transmission of mutans streptococci in high-risk children-pilot study. **Pediatric dentistry**, v. 34, n. 4, p. 86E-91E, 2012.
- ZHANG, C et al. Saliva in the diagnosis of diseases. **International journal of oral science**, v. 8, n. 3, p. 133, 2016.