UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

RAQUEL ZANIN MIDENA

**Suscetibilidade antimicrobiana e protocolo de purificação de RNA para
análise de expressão gênica de isolados clínicos de *Fusobacterium nucleatum***

BAURU
2015

RAQUEL ZANIN MIDENA

**Suscetibilidade antimicrobiana e protocolo de purificação de RNA para
análise de expressão gênica de isolados clínicos de *Fusobacterium nucleatum***

Tese apresentada a Faculdade de Odontologia de Bauru da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências no Programa de Ciências
Odontológicas Aplicadas, na área de concentração
Endodontia.

Orientador: Profa. Dra. Flaviana Bombarda de Andrade

Versão corrigida

BAURU
2015

M584s Midena, Raquel Zanin
Suscetibilidade antimicrobiana e protocolo de purificação de RNA para análise de expressão gênica de isolados clínicos de *Fusobacterium nucleatum* / Raquel Zanin Midena. – Bauru, 2015.
95 p. : il. ; 31cm.

Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo

Orientador: Profa. Dra. Flaviana Bombarda de Andrade

Nota: A versão original desta tese encontra-se disponível no Serviço de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Odontologia de Bauru – FOB/USP.

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação/tese, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura:

Data:

Comitê de Ética da FOB-USP
Protocolo nº: 85623
Data: 28/08/2012

DEDICATÓRIA

À **Deus** por tudo de especial que me foi concedido e pela benção de ter tudo que me faz feliz.
Por todas as oportunidades, saúde e amizades e por me fazer forte nos momentos de fraqueza.

Aos meus pais **Natal e Elza** e às minhas irmãs **Renata e Juliana** que são minhas maiores alegrias. Por tudo que aprendi com vocês, por estarem sempre ao meu lado me incentivando a crescer cada vez mais e estendendo a mão sempre que preciso. Amo vocês incondicionalmente!

Ao meu marido **Camilo** que com toda sua paciência me apoiou e me entendeu nos momentos difíceis. Por compartilhar das alegrias. Por todo amor e dedicação que tem por mim e por sermos “um”. Te Amo!

À minha avó materna, **Josefa**, por todo amor que tem por mim. Por sempre me colocar em suas orações pedindo sempre o melhor e agradecendo a cada conquista. Aos meus avós paternos, **Sérgio e Conceição** pelo carinho que sempre tiveram comigo e pelas palavras de incentivo. Muito obrigada por tudo!

AGRADECIMENTOS

À ***Deus*** pela vida abençoada que me deste, pela família maravilhosa que tenho, por meu marido, meus amigos e minha saúde. Agradeço pelas pessoas que colocou em meu caminho, que foram fundamentais na minha vida pessoal e formação profissional. Obrigada por sempre estar ao meu lado, me guiando e protegendo. Muito obrigada **Senhor!**

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, ***Prof.^a Dr.^a Flaviana Bombarda de Andrade***, pela orientação, paciência, amizade e confiança. Obrigada por me apresentar ao mundo da Microbiologia. Sua paixão pelos “bichinhos” é contagiante! Obrigada por todos os ensinamentos e ajuda durante esse trabalho e por sempre me incentivar a não desistir!

Ao ***Prof. Dr. Marco Antonio Hungaro Duarte***, obrigada pelo incentivo, pelos ensinamentos, por todo o apoio e por sempre estar disposto a ajudar. Lembro-me das aulas de Endodontia da graduação ministradas com paixão e foi lá que decidi ser Endodontista.

Aos queridos professores da disciplina de Endodontia, por todo o apoio no Mestrado e Doutorado. A convivência com cada um de vocês é especial e inspiradora. ***Prof. Dr. Clovis Monteiro Bramante, Prof. Dr. Ivaldo Gomes de Moraes, Prof. Dr. Norberti Bernardinelli, Prof. Dr. Roberto Brandão Garcia, Prof. Dr. Rodrigo Ricci Vivan.***

Aos queridos amigos pós-graduandos da Endodontia, obrigada pela amizade, pelas conversas e desabafos. Obrigada por sempre torcerem por mim.

Em especial agradeço a minha turma de Doutorado por todos esses anos de convivência e amizade. ***Bruno Cavallini Cavenago, Paloma Minotti Bonfante, Marina Angelica Marciano, Aldo Del-Carpio Perochena e Marcelo Hass, Clarissa Teles.***

Agradeço também aos demais colegas de departamento pela convivência harmoniosa e pela amizade. ***Layla Vasconcelos, Murilo Alcalde, Samuel Fernandes, Thais Pereira, Savio Brandelero, Bruno piazza, Denise oda, Francine Cesario Jussaro Duque Rafaela Fernandes, Bruno Guimarães, Marcela Milanezi, Pablo Amoroso Talita Tartari, Fernanda Fernandes e Lincoln Fruchi.***

A querida ***Amanda Maliza***, amiga da graduação, especialização e pós-graduação. Obrigada por sua amizade e por sempre estar por perto. Obrigada pelas conversas, risadas e desabafos. É muito bom saber que sempre posso contar com você.

Aos funcionários do Departamento de Endodontia, **Edimauro de Andrade**, **Suely Betio** e **Andressa Laureano**. Muito obrigada por sempre estarem dispostos a ajudar, pela convivência harmoniosa.

Ao **Prof. Dr. Paulo Henrique Weckwerth**, por todos os ensinamentos e pela ajuda durante os experimentos. Obrigada pelas conversas, conselhos e amizade.

Ao **Prof. Dr. Rafael Nobrega Stipp** pela ajuda com os experimentos e por tudo que aprendi com você. A oportunidade de realizar os experimentos no laboratório de Microbiologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (UNICAMP) foi fundamental para o andamento do trabalho e para meu crescimento como pesquisadora.

Ao **Prof. Dr. Carlos Ferreira dos Santos** por abrir as portas do laboratório de Farmacologia da FOB-USP para que parte deste trabalho fosse realizado.

Ao **Thiago José Dionísio**, técnico do Laboratório de Farmacologia da FOB-USP, por toda paciência, dedicação e ensinamentos. Obrigada por sempre estar disposto a ajudar.

A pós-doutoranda **Ana Carolina Morandini**, Obrigada por compartilhar seus conhecimentos e por estar disposta a ajudar sempre que precisei.

A **Prof.ª Dr.ª Marcia Pinto Alves Mayer** e a pós-doutoranda **Priscila Longo** do ICB da Universidade de São Paulo pelo desenho das sequências de pares de *primers* utilizados no início do trabalho.

A **Marcia Graeff**, do Centro Integrado de Pesquisa, por fazer as imagens de microscopia Confocal de varredura a Laser dos trabalhos de iniciação científica que participei. A convivência com você sempre foi muito agradável.

Aos funcionários do Centro Integrado de Pesquisas da FOB-USP **Marcelo Milanda** e **Rafaela Alvarce Alves** pela ajuda com os experimentos e por ajudar sempre.

A **Eliene Bim Bahia**, cirurgiã-dentista do setor de Triagem da FOB-USP por toda a ajuda com a seleção de pacientes participantes da pesquisa.

Ao **Prof. Dr. Osny Ferreira Junior** e aos cirurgiões-dentistas da Clínica de Urgência da FOB-USP **Mauro Corotti** e **Érika Ulian Kuriki**, por permitir e ajudar com a seleção de pacientes participantes da pesquisa.

A **Patricia S. Rosa**, do Instituto Lauro de Souza Lima, por ceder o sangue de carneiro para utilização a confecção dos meios de cultura.

A amiga **Gabriela Cristina de Oliveira** doutoranda da Odontopediatria, por dividir comigo não só a casa em Bauru, mas por compartilhar dos momentos bons e ruins da pós-graduação. Obrigada pelas conversas, por me ouvir nos momentos mais difíceis e obrigada principalmente pela amizade.

Ao **José Burgos Ponce** doutorando da Patologia, pela amizade e pela troca de conhecimentos. Obrigada também pela ajuda com as coletas dos pacientes.

Agradeço a minha sogra **Virgínia Mesquita** e ao meu sogro **Walter Mesquita** por torcerem por mim e por cuidar do **Camilo** quando não estou em Jaú.

Agradeço também meus cunhados **Melina** e **Gabriel Roncada**, **Walter Mesquita Filho** e **Rafael Bigarelli** por toda ajuda e torcida.

Agradeço a toda minha família por entender minha ausência em alguns momentos e por torcerem por mim, mesmo longe.

E a todos que de uma forma ou outra contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho.

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

À Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo por meio de sua atual Diretora ***Prof.^a Dr.^a Maria Aparecida de Andrade Moreira Machado.***

À Comissão de Pós-graduação, na pessoa do ***Prof. Dr. Guilherme dos Reis Pereira Janson.***

Ao Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Endodontia, ***Prof. Dr. Marco Antonio Húngaro Duarte***

À ***Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)*** pela concessão de bolsa de estudos para a realização do trabalho.

“Tantas coisas extraordinárias tinham acontecido nas últimas horas, que Alice estava começando a acreditar que poucas coisas eram verdadeiramente impossíveis.”

Lewis Carroll

RESUMO

Fusobacterium nucleatum é uma espécie bacteriana Gram-negativa, anaeróbia estrita e uma das espécies frequentemente encontradas nas infecções primárias do sistema de canais radiculares. Esta espécie tem grande importância na formação de biofilmes por ser uma ponte de união entre espécies que não são capazes de interagir. Os micro-organismos constituintes de biofilmes trocam material genético, aumentando a tolerância dos mesmos e é quase impossível um isolado clínico ter os genes totalmente iguais à cepa padrão de coleções de cultura como da ATCC (American Type Culture Collection). O presente estudo investigou a espécie bacteriana anaeróbia *Fusobacterium nucleatum* isolada de canais radiculares, comparando-a com sua cepa de referência. Foi feita a comparação da suscetibilidade microbiana *in vitro* por meio de cultura microbiológica pelo método do E-test, com as cepas em crescimento planctônico e em biofilme. Também foi definido um protocolo de Purificação de RNA para esta espécie em ambas as condições de crescimento. As cepas clínicas de *F. nucleatum* foram isoladas por meio da cultura microbiológica de 23 pacientes que apresentavam dentes com infecção primária e periodontite apical visível em radiografia. Foi feito isolamento e identificação da espécie por série bioquímica com testes comerciais (Sistema Api, Bio-Mérieux, França) e PCR convencional, sendo no total 4 isolados clínicos investigados. Foi verificada a suscetibilidade antimicrobiana dos seguintes antibióticos: Amoxicilina, Amoxicilina + ácido clavulânico, Ampicilina, Azitromicina, Clindamicina, Eritromicina e Metronidazol. O protocolo para purificação de RNA foi feito com microesferas de zircônia, dispositivo “bead beater”, kit comercial RNeasy (Qiagen) e transcrição para DNA complementar (cDNA). A qualidade da purificação foi testada quanto a sua capacidade de amplificação pela reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) utilizando primer para o gene 16s RNA específico para *F. nucleatum*. Todas as cepas testadas foram 100% suscetíveis a Amoxicilina + ácido clavulânico, Ampicilina, Azitromicina, Clindamicina e Metronidazol. Ambos os tipos de crescimento bacteriano demonstraram resistência somente à eritromicina. O protocolo proposto para a purificação do RNA de *F. nucleatum* dos isolados em crescimento planctônico e em biofilme foi eficaz. A média do rendimento do RNA das amostras para as bactérias em crescimento planctônico foi de 514,2 ng/μL (DP ± 397,7) e para as amostras em biofilme foi de 377,1 ng/μL (DP± 144,1). Os valores encontrados sugerem uma boa qualidade de RNA, livre de contaminação por proteínas. Todas as cepas de *Fusobacterium nucleatum* isoladas de canais radiculares, assim como a cepa ATCC foram suscetíveis aos antibióticos testados, com exceção do antibiótico eritromicina em ambos os tipos de crescimento bacteriano. As bactérias em biofilme apresentaram aumento na

tolerância frente aos agentes antimicrobianos, com diferença estatística. O protocolo estabelecido para a purificação do RNA de cepas de *Fusobacterium nucleatum* cultivadas em fase planctônica e em biofilmes teve êxito com amplificação por qPCR.

Palavras-chave: *Fusobacterium nucleatum*. Antibiótico. PCR em tempo real.

ABSTRACT

Antimicrobial susceptibility and RNA purification protocol for gene expression analysis of clinical isolates of *Fusobacterium nucleatum*

Fusobacterium nucleatum is a Gram-negative bacterial species, strict anaerobic and one of the species often found in primary infection of the root canal system. This species has great importance in biofilm formation to be a union bridge between species which are not able to act alone. The constituent microorganisms of the biofilm exchange each other genetic material, increasing the strength of them. It is almost impossible for a clinical isolate have genes totally equal to a standard strain, such as strains of culture collections like ATCC (American Type Culture Collection). The present study investigated anaerobic bacterial species *Fusobacterium nucleatum* isolated from root canals, comparing them to the ATCC strain. The microbial *in vitro* susceptibility of biofilm and planktonic growth of the strains was compared by means of microbiological culture and the E-test method, with the antibiotics Amoxicillin, Amoxicillin + clavulanic acid, Ampicillin, Azithromycin, Clindamycin, Erythromycin and Metronidazole.. Also, a RNA Purification protocol for the strains under the same growth conditions was defined. Clinical isolates were obtained by microbiological samples of patients with teeth with pulp necrosis and apical periodontitis visible on radiographs. The species isolation and identification were performed using commercial biochemical tests (Sistema Api, Bio-Mérieux, France) and conventional PCR, obtaining four clinical isolates. The protocol for RNA purification was done with zirconia beads, bead beater device and commercial kit RNeasy (Qiagen) and transcribed into complementary DNA (cDNA). The quality of purification was tested for its ability of amplification by real time polymerase chain reaction (qPCR) using primer for the gene 16s RNA specific for *F. nucleatum*. All tested strains were 100% susceptible to amoxicillin + clavulanic acid, ampicillin, azithromycin, clindamycin and metronidazole. Both types of bacterial growth showed resistance to Erythromycin. Bacteria in biofilm showed a decrease in susceptibility to all antibiotics, but without statistical difference. The protocol proposed for the purification of RNA of *F. nucleatum* was effective, in the planktonic and the biofilm growth. The average yield of RNA samples for bacteria in planktonic growth was 514.2 ng / μ L (SD $\pm$ 397.7) and the samples in biofilm was 377.1 ng / μ L (SD $\pm$ 144.1). These found values suggest a good quality of RNA, free of protein contamination. The established protocol for the purification of the RNA of the *Fusobacterium nucleatum* strains, grown in biofilm and planktonic phase, had successfully amplified by qPCR.

Key words: *Fusobacterium*. Real Time PCR. Antibiotic.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** A - Placa mãe com colônias microbianas; B – Análise das colônias em lupa estereoscópica para diferenciação de morfologia e separação das colônias; C – Novo plaqueamento para obtenção de cultura pura..... 43
- Figura 2:** A – bacilo Gram negativo; B – cocobacilo Gram negativo; C – bacilo Gram positivo 44
- Figura 3:** A –Kit de identificação RapID 32A , reagentes; B – Resultado após 4 horas de incubação. 44
- Figura 4:** A – Fita do E-test em placa inoculada com *F. nucleatum*. B- Halo de inibição formado após 48 horas de incubação em anaerobiose a 37°C, mostrando o ponto de intersecção (seta) entre o halo de inibição bacteriana e a fita de E-test..... 48
- Figura 5:** A - Colônia de *F. nucleatum*; B - Coloração de Gram; C e D: resultado do teste de identificação Rapid ID 32A após 4 horas..... 57
- Figura 6:** Imagens das bandas relativas à amplificação do fragmento correspondente ao gene 16S de *Fusobacterium nucleatum* por meio de reação em cadeia da polimerase e eletroforese em gel de agarose..... 58
- Figura 7:** Representação gráfica da média de suscetibilidade das cepas na forma planctônica e em biofilme frente aos agentes antimicrobianos testados. Os valores de tolerância aos agentes antimicrobianos testados para as cepas em crescimento em biofilme foram seis vezes maiores. PL: Planctônico; BF: Biofilme. 60
- Figura 8:** Representação gráfica da média e desvio padrão da suscetibilidade das cepas na forma planctônica frente aos agentes antimicrobianos testados. 60
- Figura 9:** Representação gráfica da média e desvio padrão da suscetibilidade das cepas em biofilme frente aos agentes antimicrobianos testados..... 61
-
-

Figura 10: Gráfico de amplificação do PCR quantitativo em tempo real. Amostras positivas contendo cDNA apresentaram CT entre 12 e 14 ciclos em intensidade 0.3 de fluorescência, para as bactérias em crescimento planctônico.....	62
Figura 11 A e B: Gráficos de amplificação do PCR quantitativo em tempo real. Amostras positivas contendo cDNA apresentaram CT entre 11 e 15 ciclos em intensidade 0.3 de fluorescência, para as amostras obtidas de biofilme.....	63
Figura 12: Representação gráfica dos valores de CT encontrados após amplificação do PCR quantitativo em tempo real para as amostras em crescimento planctônico e em biofilme.....	63
Figura 13: Gráfico de amplificação do PCR quantitativo em tempo real. Amostras controles sem transcriptase reversa mostrando fluorescência sinal comum e ausência de amplificação de DNA genômico.	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Valores interpretativos dos pontos de corte para determinação da suscetibilidade dos micro-organismos aos agentes antimicrobianos testados de acordo com a metodologia estabelecida	49
Tabela 2:	<i>Par de primer</i> utilizado na reações de PCR para confirmação de <i>Fusobacterium nucleatum</i>	51
Tabela 3:	Características clínicas, radiográficas e achados microbiológicos dos 23 dentes utilizados no estudo.....	55
Tabela 4:	Micro-organismos isolados e identificados com o Kit RapiID 32 A dos canais radiculares.....	56
Tabela 5:	Valores de intervalo das CIMs dos antibioticos encontradas para a ATCC e para as cepas isoladas dos canais radiculares e sua suscetibilidade frente aos agentes antimicrobianos.....	59
Tabela 6:	Mediana, valores máximo e mínimo das CIMs dos agentes antimicrobianos frente as cepas testadas. Letras minúsculas iguais representam ausência de diferença estatística entre os agentes antimicrobianos testados, nas linhas.	59

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

LPS	lipopolissacarídeo
RNA	ácido ribonucléico
DNA	ácido desoxirribonucléico
cDNA	ácido desoxirribonucléico complementar
Ca(OH) ₂	Hidróxido de Cálcio
PCR	reação em cadeia da polimerase
rRNA	ácido ribonucleico ribossômico
CIM	concentração inibitória mínima
qPCR	reação em cadeia da polimerase em tempo real
NaOCl	hipoclorito de sódio
RTF	Fluido de Transporte Reduzido
RCM	Reinforced Clostridial Medium
UFCs	unidades formadoras de colônias
BHI	Brain Heart Infusion agar
μL	microlitros
μg	microgramas
nm	nanômetros
ATCC	American Type Culture Collection
TSB	Trypticase soy broth
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
DNase	Desoxirribonuclease
RNase	Ribonuclease
CT	cycle threshold
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
°C	graus Celsius

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO DE LITERATURA	23
2.1	Infecção do canal radicular.....	25
2.2	Biofilmes	27
2.3	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	29
2.4	Uso de antibióticos na Endodontia.....	31
2.5	Análise molecular.....	32
3	PROPOSIÇÃO	35
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	39
4.1	Seleção dos indivíduos	41
4.2	Coleta das amostras	41
4.3	Inoculação e incubação	42
4.4	Isolamento e identificação.....	42
4.5	Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	44
4.5.1	Purificação do DNA	45
4.5.2	PCR	45
4.6	Estoque dos isolados	46
4.7	Biofilmes	46
4.8	Teste de suscetibilidade antimicrobiana por <i>E-test</i>	47
4.9	Protocolo para Purificação de RNA de <i>Fusobacterium nucleatum</i>	49
4.9.1	Preparo e número das amostras	49
4.9.2	Purificação do RNA total	50
4.9.3	Conversão do RNA para Cdna	50
4.9.4	PCR quantitativo em tempo real	51
4.10	Análise estatística	51

5	RESULTADOS.....	53
5.1	Coleta das amostras	55
5.2	Teste de suscetibilidade antimicrobiana - <i>E-test</i>	58
5.3	Purificação do RNA de <i>Fusobacterium nucleatum</i>	61
5.3.1	Quantidade e qualidade da purificação do RNA	61
6	DISCUSSÃO	65
7	CONCLUSÕES	73
	REFERÊNCIAS	77
	ANEXOS	89

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

A microbiota envolvida nas necroses pulpare e abscessos apicais é mista e dominada por bactérias anaeróbias (SIQUEIRA; RÔÇAS, 2009a). O interior dos canais radiculares possui condições específicas que favorecem o crescimento de certas espécies microbianas (MOLLER *et al.*, 1981; SUNDQVIST, 1992b).

Pela dificuldade da cultura de micro-organismos sensíveis e de crescimento lento, a biologia molecular tem ajudado bastante na identificação de micro-organismos não cultiváveis. Segundo Siqueira e Rôças (2008), nos abscessos endodônticos, 40% das espécies encontradas por biologia molecular são de filotipos não cultiváveis. No entanto, os mesmo autores encontraram que muitas espécies cultiváveis estavam entre as mais frequentes detectadas pela metodologia do “checkerboard” em casos de abscessos apicais agudos. As espécies mais prevalentes eram *Fusobacterium nucleatum*, *Parvimonas micra* e *Porphyromonas endodontalis*. Estudos anteriores envolvendo apenas cultura isolaram estas espécies dos abscessos endodônticos (VAN WINKELHOFF; CARLEE; DE GRAAFF, 1985; GOMES; LILLEY; DRUCKER, 1996a; SUNDQVIST, 1992b; FERREIRA *et al.*, 2006), mas estudos moleculares também as detectaram em alta prevalência (SAKAMOTO *et al.*, 2006; BLOME *et al.*, 2008; SIQUEIRA, J.F., JR.; ROCAS, 2009b; MONTAGNER; GOMES; KUMAR, 2010), embora considerem que nas técnicas moleculares é possível detectar uma diversidade maior de espécies (MUNSON *et al.*, 2002).

O *Fusobacterium nucleatum* é um micro-organismo anaeróbio Gram-negativo, com extrema importância no desenvolvimento do biofilme dentário, sendo uma ponte de união entre espécies que não são capazes de interagir (KOLENBRANDER, 1989; AMANO, 2010). É isolado em cultura microbiológica em 48% dos casos de dentes infectados (SUNDQVIST, 1994) e detectado em 100% dos canais com infecção primária utilizando a metodologia do “checkerboard” (DE SOUZA *et al.*, 2005). Esta espécie também demonstra resistência aos procedimentos biomecânicos em estudos clínicos (BYSTROM; CLAEISSON; SUNDQVIST, 1985; SJOGREN *et al.*, 1991; GOMES; LILLEY; DRUCKER, 1996a), e, desta forma é objeto de testes antimicrobianos de substâncias utilizadas nos canais radiculares (FERREIRA *et al.*, 2007).

Normalmente, os estudos em microbiologia endodôntica focam na identificação das espécies encontradas nos canais radiculares (FOUAD *et al.*, 2002), encontrando o predomínio

de bactérias anaeróbias ou focam em experimentos antimicrobianos utilizando micro-organismos facultativos por possuírem um cultivo mais fácil e executável (DU *et al.*, 2014). O comportamento dos micro-organismos anaeróbios dos canais radiculares não tem sido muito descrito.

Reconhecendo o ambiente anaeróbio do sistema de canais radiculares, o fato de que o espessamento de biofilmes leva também à anaerobiose e que, a limitação de oxigênio pode aumentar a resistência dos biofilmes aos agentes antimicrobianos, estudos adicionais são necessários para verificar a suscetibilidade antimicrobiana de biofilmes cultivados em condições anaeróbias (DUNAVANT *et al.*, 2006). Sabe-se que a idade e a maturidade de um biofilme influenciam a tolerância aos agentes antimicrobianos, então um biofilme que cresce por um longo período - característica dos anaeróbios - deve ser avaliado. Segundo os mesmos autores, *Enterococcus faecalis* se multiplica rapidamente nas formas planctônicas ou em biofilme, mas um ambiente anaeróbio provavelmente simularia melhor as condições dos canais radiculares *in vivo*.

A utilização da biologia molecular pode esclarecer mecanismos de patogenicidade de diferentes micro-organismos através da investigação dos seus genes e é bastante utilizada principalmente em trabalhos na Cariologia com *Streptococcus mutans* (PIERALISI *et al.*, 2010; STIPP *et al.*, 2008). Na Endodontia, fatores de virulência de *Enterococcus faecalis* também são investigados (WANG *et al.*, 2011).

O *F. nucleatum* pode produzir beta-lactamase (VOHA *et al.*, 2006), aumentando sua resistência aos antibióticos beta-lactâmicos, como a penicilina (FOSSE *et al.*, 1999; OKAMOTO *et al.*, 2000). Goldstein *et al.* (1999), mostraram que a eritromicina e outros macrolídeos não são efetivos contra *F. nucleatum*. Gomes *et al.* (2011) realizaram um estudo para investigar a suscetibilidade de algumas espécies anaeróbias frente a antibióticos frequentemente prescritos em Endodontia em determinados períodos de tempo. Observaram que com o decorrer dos anos, houve um aumento na resistência para a benzilpenicilina e clindamicina. Em relação a eritromicina foi observado que houve um decréscimo na eficácia e frente a amoxicilina e a amoxicilina + clavulanato de potássio o *F. nucleatum* se mostrou resistente.

O maior conhecimento da microbiota endodôntica pode elucidar mecanismos patológicos das doenças relacionadas aos canais radiculares e direcionar as melhores condutas de tratamento. Sabe-se que os micro-organismos associam-se em forma de biofilme aderidos às paredes dos canais (RICUCCI *et al.*, 2009) e a simulação dos mesmos pode contribuir para esse maior conhecimento.

Antibióticos podem ser empregados como adjuvante na terapia endodôntica em pacientes que apresentam sinais e sintomas de disseminação sistêmica do processo infeccioso. Porém, seu uso contínuo e indiscriminado tem proporcionado o desenvolvimento de resistência dos micro-organismos. Assim, torna-se imprescindível a realização periódica de testes laboratoriais para detectar e monitorar a suscetibilidade desses micro-organismos (GOMES *et al.*, 2011). A determinação dos padrões de suscetibilidade do *Fusobacterium nucleatum* frente aos antimicrobianos frequentemente prescritos em Endodontia é importante visto que é um dos principais micro-organismos presente na infecção endodôntica. Além disso, não há na literatura estudos que mostrem a eficácia dos antibióticos quando testados frente as cepas em crescimento na forma de biofilme.

A pesquisa com anaeróbios isolados dos canais radiculares pode contribuir no entendimento do desenvolvimento da microbiota endodôntica e como atuar frente a alguns fatores de virulência das espécies. Menos pesquisado do que *E. faecalis*, especialmente em biologia molecular, o anaeróbio *Fusobacterium nucleatum*, faz parte do aumento do biofilme dentário, quando este já está espesso suficiente para criar as condições de anaerobiose.

Para isso o desenvolvimento de um protocolo para purificação de RNA e transcrição para cDNA é bastante importante, visto que na literatura não há um protocolo definido. A partir dessa definição será possível iniciar estudos em nível de expressão gênica para esta espécie e entender melhor seu comportamento no interior dos canais radiculares.

2 Revisão da Literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Infecção do canal radicular

Em condições normais, o complexo dentino-pulpar é estéril e isolado da microbiota oral. As estruturas de revestimento dentais (esmalte e cimento) atuam como uma barreira contra o ingresso dos micro-organismos à cavidade pulpar. Quando essas estruturas são perdidas, seja por cárie, traumatismos ou doença periodontal, a polpa passa a ficar desprotegida e pode evoluir para um quadro de necrose, possibilitando a entrada dos micro-organismos via túbulos dentinários ou pela exposição do tecido pulpar à cavidade oral. Restaurações deficientes e anacorese são outras vias de entrada para os micro-organismos as estruturas endodônticas (GROSSMAN, 1967; GOMES, *et al.*, 2004).

Quando o canal radicular apresenta sua polpa em estado necrótico, se torna facilmente contaminada, pois o sistema de defesa do hospedeiro não tem capacidade de atuar de forma efetiva em seu interior e passa a atuar apenas em uma área restrita a região apical, o que faz com que as bactérias não sejam combatidas pelo sistema imune (HAAPASALO, 1993).

As bactérias presentes nos canais radiculares contaminados incluem um restrito grupo de espécies comparados com a microbiota oral total (ADLER; GROSSMAN; FASMAN, 1967; SUNDQVIST, 1994). O interior dos canais radiculares possui condições específicas que favorecem o crescimento de certas espécies microbianas. A disponibilidade de nutrientes, a baixa tensão de oxigênio em canais radiculares com necrose pulpar e interações bacterianas são determinantes ecológicos importantes (SUNDQVIST, 1992a) e a presença desses micro-organismos presentes nas infecções endodônticas vem sendo estudada há bastante tempo.

O primeiro pesquisador a observar micro-organismos nos canais radiculares foi Miller (1894), que analisou amostras obtidas do interior dos canais radiculares em microscópio óptico e encontrou células bacterianas em três morfologias diferentes: cocos, bacilos e espiroquetas. Morfologicamente a microbiota endodôntica se mostrou diferente nos três terços do canal e ainda sugeriu que a presença de bactérias no interior dos canais são a causa da periodontite apical. Aproximadamente setenta anos após este estudo, (KAKEHASHI; STANLEY; FITZGERALD, 1965) confirmaram suas suposições. Em seu estudo, avaliaram a resposta de polpas dentárias de ratos convencionais e *germ free* quando estas foram expostas ao meio bucal. Nos ratos convencionais, foi possível observar, histologicamente, que houve

necrose do tecido pulpar e ocorrência de lesão periapical enquanto que nos ratos livres de micro-organismos, a polpa se manteve viável com uma resposta inflamatória mínima e em alguns casos foi possível observar reparação da dentina, formando uma barreira protegendo novamente o tecido do meio bucal. Moller *et al.*, (1981), realizaram um estudo que mostrou, também, que os micro-organismos são a principal causa da periodontite apical e puderam concluir que a ausência dos micro-organismos corrobora para a cura tecidual.

De acordo com Siqueira (2002), a infecção endodôntica pode ser classificada segundo sua localização anatômica, podendo ser interna e externa, e ainda em relação ao tempo que esses micro-organismos estão estabelecidos no interior do canal radicular (primária, secundária ou persistente). A composição da microbiota pode variar dependendo dos diferentes tipos de infecção e formas da periodontite apical (SIQUEIRA e RÔÇAS, 2008).

Existe uma diferença das características da composição da microbiota dos canais radiculares de dentes com necrose pulpar (infecção primária) e de dentes tratados endodonticamente que apresentam insucesso (infecção secundária/persistente). Em infecções primárias, a microbiota é mista e formada por micro-organismos Gram-negativos e Gram-positivos, principalmente anaeróbios, com no máximo dez espécies diferentes por canal radicular. Já nos casos de insucesso do tratamento endodôntico, os autores observaram a predominância de micro-organismos anaeróbios facultativos e Gram-positivos, com uma média de uma ou duas espécies por canal radicular. As interações entre diferentes grupos bacterianos permitem o estabelecimento de uma patologia, dificilmente encontrada quando os mesmos micro-organismos estão isolados. Uma correlação parece existir entre o tamanho da lesão periapical e o número de espécies bacterianas e células presentes no canal radicular. Assim, os dentes com grandes lesões geralmente abrigam mais espécies bacterianas e têm uma maior densidade de bactérias em seus canais radiculares que dentes com lesões pequenas (GOMES *et al.*, 2004; SIQUEIRA, 2002; SUNDQVIST, 1992a; SUNDQVIST, FIGDOR, 2003; SIQUEIRA *et al.*, 2007). Estudos sobre a dinâmica das infecções do canal radicular têm mostrado que as proporções relativas de micro-organismos anaeróbios e células bacterianas aumentam com o tempo e que as bactérias anaeróbias facultativas estão em menor número, quando os canais foram infectados por três meses ou mais (FABRICIUS *et al.*, 1982).

A estrutura da microbiota em casos sintomáticos e assintomáticos difere significativamente. Casos, sintomático apresentam um maior número de espécies que casos assintomáticos (SAKAMOTO *et al.*, 2006; SIQUEIRA; RÔÇAS; ROSADO, 2004).

Lana *et al.* (2001), determinaram as espécies microbianas envolvidas nas infecções endodônticas através de técnica de cultura e avaliaram a eficácia da terapia instituída para eliminar o processo infeccioso do sistema de canais radiculares. Neste estudo, 31 canais com necrose pulpar foram analisados micro biologicamente antes e após o preparo biomecânico. A microbiota presente nos canais radiculares com necrose deste estudo foi predominantemente anaeróbia mista. Os gêneros bacterianos mais frequentemente isolados e identificados antes do tratamento endodôntico foram *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Clostridium* e *Peptostreptococcus*. *F. nucleatum* foi a espécie mais isolada após a abertura coronária. Mesmo após a instrumentação e a utilização de hidróxido de cálcio (Ca(OH)₂), anaeróbios facultativos foram detectados em dois canais radiculares e leveduras em três. Ao final do tratamento endodôntico, micro-organismos foram isolados de 7 canais.

Diferentes técnicas moleculares para a identificação bacteriana de infecções endodônticas vem sendo amplamente utilizadas. SIQUEIRA *et al.* (2001) utilizaram a técnica de hibridização DNA-DNA para examinar a microbiota de abscesso perirradicular agudo de origem endodôntica. As espécies mais comumente encontradas foram: *Bacteroides forsythus* (29,6% dos casos); *Porphyromonas gingivalis* (29,6%); *Streptococcus constellatus* (25,9%), *Prevotella intermedia* (22,2%), *Prevotella nigrescens* (22,2%), *Fusobacterium periodonticum* (18,5%), *Fusobacterium nucleatum* (18,5%) e *Eikenella corrodens* (18,5%). A técnica de identificação pela amplificação do gene 16s RNA através da reação em cadeia da polimerase (PCR), também auxilia no conhecimento da microbiota das infecções endodônticas (BAUMGARTNER *et al.*, 2004).

Fouad *et al.* (2002) determinaram a presença de 10 micro-organismos encontrados em 24 canais radiculares com necrose pulpar e lesão periapical através de PCR utilizando primer universal específico para cada gênero ou espécie, além de correlacionar a sua associação com sintomas clínicos. Dos 10 micro-organismos pesquisados, os mais identificados foram *F. nucleatum*, *P. micros*, *Streptococcus*, e *P. nigrescens*. *Streptococcus*, *F. nucleatum*, e *P. gingivalis* foram associados a sintomatologia.

2.2 Biofilmes

Os micro-organismos e seus produtos são considerados a principal causa das doenças pulpares e periapicais (KAKEHASHI; STANLEY; FITZGERALD, 1965), e podem aderir nas paredes do canal formando biofilmes (NAIR *et al.*, 1990; RICUCCI *et al.*, 2009). Biofilme

pode ser definido como uma comunidade de micro-organismos aderidos a uma superfície, embebidos em uma matriz extracelular de polissacarídeos. Esta forma organizacional dos micro-organismos em biofilme lhes confere resistência, devido à dificuldade da penetração de agentes químicos e fatores de defesa do hospedeiro na massa do biofilme, além da troca genética de fatores de virulência. De acordo com este conceito, os biofilmes só são totalmente removidos por meios físicos ou mecânicos (COSTERTON, 1999).

As bactérias em biofilme diferem muito no fenótipo, quando comparadas em sua forma planctônica, e são menos suscetíveis aos antimicrobianos (COSTERTON, 1999). As infecções de biofilme são difíceis de serem erradicadas com antimicrobianos e tem sido relatado um aumento de 100 a 1000 vezes na tolerância aos antibióticos em biofilmes quando comparados com células planctônicas (CERI et al., 1999)

Existem pelo menos quatro mecanismos elucidados que conferem resistência às células que vivem em biofilmes (DUNAVANT *et al.*, 2006): 1) O primeiro seria a barreira de matriz extracelular, impedindo a entrada de antimicrobianos; 2) estas células multiplicam mais devagar do que as planctônicas, pela própria depleção de nutrientes, que as força a permanecer em um estado estacionário ou dormente, tendo como consequência a entrada de antimicrobianos de modo também mais lento; 3) o metabolismo é todo alterado, como por exemplo, a diminuição de oxigênio, promovendo nichos totalmente anaeróbios em profundidade; e 4) se forma uma sub-população de micro-organismos persistentes, que eram apenas uma pequena fração dos micro-organismos originais neste sítio, mas depois, pela seleção, se constituem em uma população em um estado fenotípico altamente resistente à ação dos agentes antimicrobianos. O modo protegido de crescimento dos biofilmes permite a sobrevivência em ambientes não favoráveis.

Na Endodontia, os biofilmes têm sido amplamente estudados para a avaliação da ação antimicrobiana de soluções irrigadoras (OZOK *et al.*, 2007; DEL CARPIO-PEROCHENA et al., 2011) e curativos de demora (ORDINOLA-ZAPATA *et al.*, 2015). A simulação dos biofilmes *in vitro* contribui para um maior conhecimento de seu modo de ação e ajuda a encontrar soluções para sua eliminação.

Muitos substratos são utilizados para sua formação: membrana de celulose sobre meio de cultura, blocos de dentina bovina, hidroxiapatita, guta-percha, superfície de placa de poliestireno (SENA *et al.*, 2006; GUERREIRO-TANOMARU *et al.*, 2013; OZOK *et al.*, 2007; PITTS *et al.*, 2003; Ozok *et al.*, (2007) compararam a suscetibilidade de biofilmes das espécies *Fusobacterium nucleatum* e *Peptostreptococcus micros*, associadas ou não, a diferentes concentrações de hipoclorito de sódio. O crescimento dos biofilmes foi feito em

placas de poliestireno de 96 poços por 24 horas e 96 horas. Após o tratamento, foi observado que os biofilmes formados com as duas espécies foram mais resistentes que quando formados em espécie única e que quanto maior o tempo, mais resistentes.

Em relação resistência aos antimicrobianos, quando utilizados para tratar infecções com biofilme, normalmente reverte os sintomas causados por células planctônicas liberados do biofilme, mas não consegue eliminar os biofilmes. Por esta razão infecções de biofilme mostram sintomas recorrentes após ciclos de terapia de antibiótico até que a população sésil seja removida mecanicamente do corpo (APARNA; YADAV, 2008).

A resistência adquirida de um antibiótico depende de sua presença e pode ser específico ou não para um determinado antimicrobiano. Um dos mecanismos não específico mais conhecido é a regulação de bombas de efluxo. Alguns estudos revelaram a expressão diferencial de vários genes de resistência aos antibióticos em biofilme em comparação com o crescimento planctônico. Além disso, os fenótipos produzidos por mecanismos de resistência podem diferir significativamente em crescimentos diferentes. A estrutura do biofilme permite a transferência horizontal de genes eficaz entre as bactérias, o que desempenha um papel importante no desenvolvimento de resistência a antibióticos. (BAGGE *et al.*, 2004; MACIA *et al.*, 2011; MULET *et al.*, 2011; WHITELEY *et al.*, 2001)

2.3 *Fusobacterium nucleatum*

Fusobacterium nucleatum é uma espécie bacteriana Gram-negativa, anaeróbia estrita, imóvel e não esporulante, que é normalmente isolada da cavidade oral. Embora sejam conhecidas até sete espécies de fusobactérias, *F. nucleatum* é uma das espécies mais comuns isoladas das infecções humanas (JACINTO *et al.*, 2008).

Das espécies predominantes em canais radiculares, *F. nucleatum* demonstra ter uma elevada capacidade de co-agregação *in vitro* com muitas das bactérias orais (SUNDQVIST, G., 1992b). Estudos para identificar a microbiota de canais radiculares infectados através de técnicas moleculares, mostram que a espécie *Fusobacterium nucleatum* é uma das mais prevalentes (JUNG *et al.*, 2000). Fouad *et al.* (2002) relataram que o *F. nucleatum* foi o micro-organismo mais identificado em canais com polpa necrótica por identificação através de gene 16s rRNA específico para esta espécie. Estudos de identificação através da cultura microbiológica das infecções dos canais radiculares também indicam que o *F. nucleatum* está

entre as espécies mais prevalentes e seu frequente isolamento sugere um papel patogênico (GOMES *et al.*, 2004).

Estudos mostram que *F. nucleatum* está associado com casos sintomáticos (SAKAMOTO, *et al* 2006; SIQUEIRA; RÔÇAS; ROSADO, 2004), assintomáticos (RÔÇAS; SIQUEIRA, 2008; SIQUEIRA *et al.*, 2007) e também à presença de edema (SIQUEIRA; RÔÇAS, 2013).

Lana *et al.* (2001), encontraram que *F. nucleatum* foi a espécie mais isolada após a abertura coronária em dentes com necrose pulpar e está fortemente associado a presença de *Peptostreptococcus* sp. Essas associações microbianas desempenham um papel importante na regulação da composição microbiana da cavidade oral. Gomes *et al.* (2004) relataram que o gênero *Fusobacterium* foi associado com sinais e sintomas específicos de origem endodôntica tais como dor, sensibilidade à percussão, canais úmidos, e a presença de exsudato purulento.

SIQUEIRA *et al.* (2007), identificou bactérias cultiváveis de canais com infecção primária crônica, pelo sequenciamento do gene 16s rRNA. A espécie mais frequentemente identificada foi o *F. nucelatum*, sendo isolada de cinco canais em um total de 30. *Fusobacterium nucleatum* também pode ser encontrado em casos de lesão persistente (RÔÇAS; SIQUEIRA, 2012) e pode ser resistente ao preparo biomecânico (PAIVA *et al.*, 2013).

F. nucleatum está diretamente associado às lesões periapicais. Rôças *et al.*, (2010) identificaram algumas espécies bacterianas, nos seguimentos apical e médio de canais radiculares contaminados, utilizando segmentos de raiz pulverizados e método molecular de identificação. Dezesete dentes extraídos com as lesões periapicais anexas foram utilizados e foram seccionados em dois fragmentos (apical e médio). Esses fragmentos foram congelados e moídos para a purificação do DNA. Após a amplificação do DNA, 28 espécies foram encontradas. *F. nucleatum* foi mais encontrado no seguimento apical que médio o que sugere correlação com a periodontite apical.

F. nucleatum também é bastante estudado na Periodontia por ser associado a doença periodontal. Também está fortemente associado à formação de biofilme, por ter uma capacidade de co-agregação com outras espécies. Em 2002, Kapatral *et al.*, apresentaram a sequencia genômica e análise metabólica do *F. nucleatum* e seus respectivos relatos de fatores de adesão e resistência. Esta espécie apresenta alguns genes estudados na literatura referentes à capacidade de adesão a alguns micro-organismos como o RadD, com aderência predominante a Gram-positivos e o FomA, que é responsável pela aderência a Gram-negativos (AMANO, 2010). Além desses fatores de adesão, os autores relatam sobre a

resistência a alguns antibióticos, como a eritromicina, que segundo Goldstein *et al.* (1999) é devido a presença de uma proteína de efluxo de macrolídeos e também que a resistência as penicilinas, que está relacionada à presença de beta-Lactamase (VOHA, *et al.*, 2006).

2.4 Uso de antibióticos na Endodontia

O uso de antibióticos associados ao tratamento endodôntico convencional, pode permitir uma melhora em quadros em que há envolvimento sistêmico como em casos de abscessos periapicais agudos acompanhados de dor, febre e mal estar geral (WYNN; BERGMAN, 1994; ANDRADE; SOUZA-FILHO, 2006). Além disso, antibióticos são prescritos também para pacientes com risco de desenvolvimento de endocardite bacteriana como um complemento à terapia endodôntica, sendo utilizado em regime profilático (ABBOTT; HUME; PEARMAN, 1990; GRAD, 1997).

A seleção adequada de um antibiótico para o tratamento de uma infecção é muito importante e se faz necessário o conhecimento da microbiota comum à infecção a ser tratada, além das características do hospedeiro que vai receber o tratamento e os aspectos básicos da farmacologia do antibiótico a ser utilizado (ROCHA, 2002). Na Odontologia, os principais grupos de antibióticos prescritos são as penicilinas, cefalosporinas, macrolídeos, tetraciclina e lincosaminas (GROPPO *et al.*, 2006).

No Brasil, a amoxicilina tem sido usada como primeira escolha de drogas em infecções orais para pacientes sem alergias as penicilinas. É rapidamente absorvido pelo organismo mantém os níveis sanguíneos prolongados, o que permite maiores intervalos entre as doses (JACINTO, *et al.*, 2008).

Por estar associada à periodontite apical tanto crônica quanto aguda, *F. nucleatum* tem sido alvo de teste de suscetibilidade antimicrobiana. Além disso, a resistência cada vez maior de bactérias anaeróbias a alguns antibióticos justifica a necessidade do monitoramento dos padrões de suscetibilidade por meio de testes. Assim, é recomendado o monitoramento periódico de possíveis alterações na tolerância aos antibióticos de micro-organismos presentes no canal radicular (GOMES, *et al.*, 2011; SOUSA, *et al.*, 2013).

O *E-test* consiste em uma fita plástica de 50 mm de comprimento e 3mm de largura, que contém em um lado um gradiente de concentração de antibiótico, e do outro, uma escala numérica que indica a concentração do medicamento. A fita é colocada sobre uma placa de ágar, previamente inoculada com a bactéria a ser estudada, propiciando a difusão de um

gradiente de antibiótico. Após o período de incubação, uma zona elíptica de inibição é formada; o ponto de interseção da borda da zona de inibição com a escala numérica da fita, referente à concentração da droga representam a concentração inibitória mínima (CIM). A fita do *E-test* pode detectar uma CIM que varia de 0,016 a 256 µg/ml, com um total de 29 diferentes concentrações, que são agrupadas de duas em duas, representando 15 níveis de diluição (CITRON *et al.*, 1991)

Jacinto *et al.* (2008), avaliaram a frequência, interações bacterianas e a suscetibilidade antimicrobiana de *F. nucleatum* e *F. necrophorum* isolados de infecções primárias e de 110 canais estudados, o *F. nucleatum* foi encontrado em 38 destes. Nos dentes em que foi isolado, nove espécies foram isoladas em média e as espécies mais comuns associadas com o *F. nucleatum* foram *Prevotella spp.*, *Peptostreptococcus spp.*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella oralis*, *P. micros*, *Eubacterium spp.*, *Bifidobacterium spp.*, *Clostridium spp.*, *Gemella morbillorum*. Em relação à suscetibilidade antimicrobiana avaliada pelo método E-test, o *F. nucleatum* se mostrou 100% sensível a amoxicilina, amoxicilina + clavulanato de potássio e cefaclor. O antibiótico que apresentou maior resistência bacteriana foi a eritromicina.

Sousa *et al.* (2013), também avaliaram a suscetibilidade do *F. nucleatum* e outras espécies anaeróbias isoladas de abscesso periapical pelo método E-test. Assim como nos estudos anteriores o *F. nucleatum* mostrou ser resistente a eritromicina, porém apresentou resistência também a azitromicina.

Além de determinar as espécies microbianas envolvidas nas infecções endodônticas, Lana *et al.* (2001), avaliaram a eficácia da terapia instituída para eliminar o processo infeccioso do sistema de canais radiculares. Avaliaram também a suscetibilidade antimicrobiana desses micro-organismos frente a antibióticos prescritos com frequência na odontologia: penicilina G, amoxicilina, metronidazol, tetraciclina e eritromicina. Frente a esses agentes antimicrobianos, *F. nucleatum* mostrou resistência apenas para a eritromicina, sendo sensível aos demais.

2.5 Análise molecular

A reação da cadeia em polimerase (PCR) convencional permite a identificação rápida de espécies microbianas cultiváveis ou incultiváveis com grande especificidade e sensibilidade. Porém, essa detecção mostra apenas a ausência ou a presença e não a quantidade do micro-organismo alvo. Outra limitação da PCR convencional, é que não é

possível diferenciar se os micro-organismos estão viváveis ou não viáveis (SIQUEIRA; RÔÇAS, 2005).

A PCR quantitativa em tempo real (qPCR) é uma variante da PCR convencional, sendo uma ferramenta bastante sensível e confiável para a detecção e quantificação de ácidos nucleicos (HEID *et al.*, 1996). É caracterizado pela medição contínua de produtos de amplificação ao longo da reação por meio de um sinal fluorescente, que a cada ciclo de amplificação permite que os produtos possam ser detectados e medidos em tempo real (BELGRADER *et al.*, 1999).

VIANNA *et al.* (2006) avaliaram *in vivo*, o grau da redução bacteriana após preparo químico-mecânico de dentes humanos com necrose pulpar utilizando hipoclorito de sódio e clorexidina. A avaliação da redução bacteriana foi realizada por PCR quantitativo em tempo real e também por cultura microbiana. A carga bacteriana foi reduzida em ambos os grupos. Quando se utilizou a quantificação por qPCR, a redução bacteriana foi superior quando comparada com a técnica da cultura.

A PCR em tempo real quantitativa (qPCR) também pode avaliar a expressão gênica de determinados fatores de virulência das espécies, através da purificação de RNA e posterior transcrição para DNA complementar (cDNA), possibilitando a amplificação do fragmento alvo. Assim, é possível avaliar se aquela cepa bacteriana não apenas possui um gene para um fator de virulência específico, mas também se o está expressando ao se multiplicar, através da informação transmitida via RNA mensageiro. KAPLAN *et al.* (2014) avaliaram a expressão gênica de um novo gene de *F. nucleatum* responsável pela adesão às bactérias Gram-positivas. Os resultados mostraram que quanto maior a expressão menor é a interação bacteriana e o oposto também é verdadeiro. Além disso, a presença de outro gene de adesão RadD, pode ser dependente de sua expressão o que facilita a interação entre as espécies.

Dessa forma, é pertinente o estudo e a padronização dos experimentos para realização da qPCR, buscando não só identificar as espécies, mas também avaliar seus fatores de virulência.

3 Proposição

3 PROPOSIÇÃO

- Comparar a suscetibilidade antimicrobiana a diferentes antibióticos de cepas de *Fusobacterium nucleatum* isoladas de canais radiculares e sua ATCC cultivadas em fase planctônica e em biofilmes.
- Definir um protocolo para purificação de RNA de cepas de *Fusobacterium nucleatum* cultivadas em fase planctônica e em biofilmes.

4 Material e Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

Previamente ao início do estudo, o projeto de pesquisa foi submetido à apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP – Número do parecer: 85623), sendo aprovado em 29/08/2012 (Anexo 1).

4.1 Seleção dos indivíduos

Foram selecionados 23 pacientes que compareceram nas clínicas de Graduação e Pós Graduação em Endodontia da Faculdade de Odontologia de Bauru – Universidade de São Paulo (FOB-USP), apresentando infecção primária e periodontite apical. Os pacientes assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido elaborado de acordo com as normas do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da FOB-USP (Anexo 2).

Para serem incluídos na pesquisa, os pacientes não poderiam ter feito uso de antibióticos num período de três meses, para não interferir na microbiota dos canais radiculares e também não poderiam ter sofrido atendimento prévio. Da mesma forma, casos de impossibilidade de isolamento absoluto, impossibilidade de introdução do cone de papel no canal radicular até as proximidades do comprimento aparente do dente na radiografia, e exposição direta da câmara pulpar ou do canal radicular ao meio bucal impossibilitaram a participação do indivíduo na pesquisa.

4.2 Coleta das amostras

Para a coleta da amostra do canal radicular, a região de interesse foi anestesiada localmente. O dente envolvido recebeu profilaxia coronária e foi isolado com lençol de borracha. Previamente a cada abertura coronária, foi feita a descontaminação do campo operatório, sobre o isolamento absoluto, com *swabs* esterilizados umedecidos em água oxigenada a 30% (v/v), depois em NaOCl (hipoclorito de sódio) 5,25% por 30 segundos cada, havendo a neutralização subsequente destes fármacos com tiosulfato de sódio a 5% (PINHEIRO *et al.*, 2003; FERREIRA *et al.*, 2006). A abertura coronária foi feita com alta rotação e irrigação com soro fisiológico esterilizado. As coletas foram realizadas nestes dentes

após a abertura coronária e antes da neutralização do conteúdo séptico tóxico do canal. As amostras dos canais radiculares foram coletadas utilizando-se dois cones de papel esterilizados de calibre 20. Os cones de papel foram introduzidos próximo ao comprimento total do canal radicular determinado na radiografia pré-operatória, permanecendo em posição por 1 minuto. Quando os canais radiculares estavam secos, os mesmos eram umedecidos com soro fisiológico, com o objetivo de assegurar uma amostra viável. Ao serem retirados do canal, os cones eram introduzidos sequencialmente em microtubos com capacidade de 1,5 mL, contendo 1,0mL de meio de transporte RTF (Fluido de Transporte Reduzido; (SYED; LOESCHE, 1972).

Esta amostra foi imediatamente transportada para o laboratório de Microbiologia da Endodontia da FOB para processamento, que ocorreu imediatamente após o término do procedimento clínico, garantindo a viabilidade celular necessária para a recuperação dos micro-organismos através da técnica de cultura microbiana.

4.3 Inoculação e incubação

Os microtubos contendo as amostras foram levados para o laboratório de Microbiologia da Endodontia da FOB para processamento microbiológico. A partir deste conteúdo, foram realizadas diluições seriadas em meio de cultura líquido RCM (Reinforced Clostridial Medium, Difco, EUA) pré-reduzido, acrescido de Hemina a 5 µg/mL e Menadiona a 0.5 µg/mL. Das diluições 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} foram semeados 100µL em placas pré-reduzidas de ágar RCM (Difco) acrescido de Hemina a 5 µg/mL, Menadiona a 0.5 µg/mL e 5% de sangue desfibrinado de carneiro. As placas foram levadas para cabine de anaerobiose na presença de 80% de N₂, 10% de H₂ e 10% de CO₂ a 37°C, por 7 dias.

4.4 Isolamento e identificação

Após a incubação, cada placa foi examinada em lupa estereoscópica em aumento de três vezes. As unidades formadoras de colônias (UFCs) foram contadas e os diferentes tipos de colônias foram diferenciados e cultivados, com o objetivo de obtenção de culturas puras das espécies (figura 1A-C).

Figura 1: A - Placa mãe com colônias microbianas; B – Análise das colônias em lupa estereoscópica para diferenciação de morfologia e separação das colônias; C – Novo plaqueamento para obtenção de cultura pura.

A diferenciação das colônias foi realizada de acordo com suas características macroscópicas no ágar, o que é facilitado pela adição de sangue, observando-se: tamanho, cor, forma, textura, elevação, borda, superfície, consistência, opacidade e hemólise (nenhuma, hemólise parcial ou hemólise completa).

As colônias bacterianas foram isoladas em uma placa contendo BHI (Brain Heart Infusion agar, Difco, EUA) com 5% de sangue desfibrinado de carneiro e outra em RCM (Difco) acrescido de Hemina a 5 µg/mL, Menadiona a 0,5 µg/mL e 5% de sangue desfibrinado de carneiro. As placas foram testadas quanto ao seu requerimento gasoso, colocando-se a placa de BHI (Difco) na estufa bacteriológica e a placa de RCM (Difco) na cabine de anaerobiose; observando em qual condição gasosa houve crescimento bacteriano. As espécies que cresceram somente em incubação anaeróbia foram consideradas anaeróbias estritas, após verificar crescimento negativo na estufa. As espécies que cresceram nas duas condições foram consideradas anaeróbias facultativas.

A morfologia bacteriana microscópica foi obtida a partir de colônias puras após cada incubação, através da coloração de Gram (Figura 2). Os isolados que apresentaram a morfologia de bacilo Gram-negativo foram submetidos ao método de identificação comercial. Foi utilizado o RapID 32A (BioMérieux S.A., Marcy-l'Etoile, França) para os bastonetes Gram-negativos e Gram-positivos, anaeróbios obrigatórios. Esse método possui reagentes que evidenciam, pela mudança de cor, em determinados períodos, as exigências nutricionais e compostos específicos produzidos pelas bactérias (Figura 3). O kit fornece gabaritos para finalizar a identificação que pode ser verificada através do site: <https://apiweb.biomerieux.com/servlet/>, com acesso através de chave-senha adquirida junto à empresa.

Figura 2: A – bacilo Gram negativo; B – cocobacilo Gram negativo; C – bacilo Gram positivo

Figura 3: A – Kit de identificação RapID 32A , reagentes; B – Resultado após 4 horas de incubação.

As amostras que apresentaram resultado favorável para *Fusobacterium nucleatum* utilizando o Kit RapID 32A (BioMérieux), foram submetidas a análise por PCR convencional para confirmação da espécie através da amplificação do 16s rRNA específico para *Fusobacterium nucleatum*.

4.5 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Os procedimentos para a confirmação da espécie através da PCR foram realizados no laboratório de Farmacologia da Faculdade de Odontologia de Bauru – USP, com a colaboração do Prof. Dr. Carlos Ferreira dos Santos e do técnico Thiago José Dionísio.

4.5.1 Purificação do DNA

Foi utilizado o QIAamp DNA Mini kit (Qiagen, Hilden, Alemanha) para a purificação do DNA com seus respectivos reagentes. Foi pipetado 1 mL da cultura em um microtubo e centrifugado por 5 minutos a 5.000 x g. O sobrenadante foi descartado e em cada amostra adicionado 180µL de tampão *ATL* e 20 µL de proteinase K. Os tubos foram agitados por um minuto e incubados a 56°C em banho-maria por duas horas. Após esse período foi adicionado 200µL de tampão *AL*, agitação por 15 segundos e incubação a temperatura de 70°C por 10 minutos em banho-maria. Foi adicionado 200µL de etanol. Todo o conteúdo do microtubo foi transferido para as colunas de purificação contendo microfiltro de sílica fornecidas pelo fabricante. As colunas foram centrifugadas a 6000 x g por um minuto. O tubo de coleta contendo o líquido filtrado foi descartado e trocado por um novo. O DNA microbiano permaneceu aderido ao filtro de sílica para lavagens adicionais com os tampões *AW1* e *AW2*. Foi adicionado 500µL de tampão *AW1* e as colunas foram centrifugadas a 6000xg por 1 minuto. O tubo de coleta foi descartado e trocado por um novo. A segunda lavagem foi feita com 500µL de tampão *AW2* e as colunas foram centrifugadas a 17000 x g por 3 minutos. A eluição do DNA foi obtida através da adição de 100µL do tampão *AE*, que foi mantido em contato com o mesmo por 1 minuto, antes da centrifugação final a 6000 x g por 1 minuto, quando se obteve o DNA microbiano purificado. O DNA foi quantificado em espectrofotômetro (NanoDrop 2000, Thermo Scientific, Wilmington, EUA).

4.5.2 PCR

A sequência dos *primers* para o gene 16s rRNA utilizada para a confirmação dos isolados encontrados de *F. nucleatum*, por PCR, foi descrita por Baumgartner *et al.* (2004), *Foward* (F) - AGGGCATCCTAGAATTATG; *Reverse* (R) - GGGACACTGAAACATCTCTGTCTCA, resultando em amplificação de fragmento contendo 817 pares de base.

A mistura para o PCR para cada amostra, continha 0,4µL dos *primers Foward* e *Reverse*, 0,5 µL de dNTPs, 0,75 µL de MgCl₂, 0,4 µL de Taq DNA polimerase, 2,5µL de Buffer 10x e 4µL de amostra de DNA em um volume final de 18,2 µL. A reação de PCR foi conduzida em um termociclador (Applied Biosystems®, Veriti® Thermal Cycler, Foster City, CA, EUA) com os seguintes parâmetros: desnaturação inicial por 1 minuto a 94°C, seguido por 35 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 60°C e 90 segundos a 72°C; extensão final a

72°C por 10 minutos. O produto do PCR foi observado utilizando iluminação ultravioleta após eletroforese em gel de agarose a 1% contendo brometo de etídio. O tamanho do amplicon foi analisado em comparação com um marcador de bandas (100bp DNA Ladder, Invitrogen, Waltham, MA, EUA). O controle positivo foi feito com o DNA da cepa ATCC e o negativo com água destilada.

4.6 Estoque dos isolados

Após a identificação e confirmação por PCR, os isolados foram estocados para os testes seguintes. O estoque dos isolados foi feito em 10% de leite desnatado (Molico, Nestlé, São Paulo, Brasil), esterilizado com controle de pressão e temperatura (120°C por 14 minutos). Cada estoque foi feito com 3 partes de cultura em meio RCM (Difco) líquido de *F. nucleatum* para uma parte de leite desnatado esterilizado e congelados em freezer a -80°C.

4.7 Biofilmes

As condições de crescimento e formação dos biofilmes da cepa ATCC (255860) e de 4 isolados clínicos de *Fusobacterium nucleatum* foram realizados com base na metodologia proposta por (OZOK *et al.*, 2007).

Foram semeados 10µL de cultura congelada das bactérias (ATCC e isolados) em placas de ágar sangue RCM (Difco) acrescido de Hemina a 5 µg/mL, Menadiona a 0.5 µg/mL. Após 4 dias de incubação, uma ou duas colônias destas placas foram inoculadas em caldo BHI (Difco) enriquecido com TSB (tripticase soy broth, Difco, EUA), extrato de levedura (Difco, EUA), Hemina a 5 µg/mL e Menadiona a 0.5 µg/mL e incubados *overnight*. Em cada poço de uma placa de poliestireno de 24 poços (Corning Incorporated, Pittston, PA, EUA) foi pipetado 900µL de meio limpo que foi inoculado com 100µL da cultura *overnight*, permanecendo 05 dias. Durante este período o meio foi trocado a cada dois dias. Em cada placa, um poço foi preenchido com meio esterilizado sem inoculação para verificar a esterilidade durante a experimentação (controle negativo). Para confirmar a ligação das bactérias sobre o poliestireno, controles de biofilme foram cultivados e verificados por leituras de absorbância de luz em espectrofotômetro em microplacas com comprimento de onda de 540nm, com cristal violeta.

Os biofilmes formados de todas as cepas foram utilizados em dois experimentos subsequentes: teste de suscetibilidade a antibióticos e extração e purificação de RNA.

Decorrido o período de incubação, o meio de cultura foi removido dos poços e foram lavados com 1mL de solução salina esterilizada para a remoção das bactérias não aderidas. Os poços foram novamente preenchidos com 1mL desta solução e cada biofilme foi recolhido com o auxílio da ponta de uma pipeta por movimentos de raspagem da superfície da placa.

Para a utilização no teste de suscetibilidade antimicrobiana, o biofilme recolhido foi transferido para um tubo contendo caldo RCM (Difco) para a padronização em escala McFarland 1 e posterior plaqueamento.

Para o protocolo de purificação de RNA, o conteúdo de cada poço foi transferido para microtubos com rosca e centrifugados por a 11.000 x g por 1 minuto a 4°C para a precipitação das células bacterianas. O sobrenadante foi removido e congelado em freezer -80°C para posterior purificação de RNA.

4.8 Teste de suscetibilidade antimicrobiana por E-test

Foi realizado o teste de suscetibilidade antimicrobiana da ATCC e de 4 isolados clínicos de *F. nucleatum* na sua forma planctônica e em biofilme através do E-test (BioMérieux S.A., Marcy-I'Etoile, France). Os antimicrobianos utilizados foram: Amoxicilina, Amoxicilina + ácido clavulânico, Ampicilina, Azitromicina, Clindamicina, Eritromicina e Metronidazol.

As colônias foram suspensas em caldo BHI, TSB acrescido de extrato de levedura (Difco), Hemina a 5 µg/mL, Menadiona a 0.5 µg/mL até atingir uma densidade correspondente ao padrão de turbidez 1.0 da escala McFarland, que foi verificada em espectrofotômetro (Bel Photonics do Brasil Ltda, Osasco, SP, Brasil) com comprimento de onda de 540nm.

As bactérias subcultivadas a partir dos biofilmes de cada isolado também foram testadas frente ao E-test.

Placas contendo ágar RCM (Difco) acrescido de Hemina a 5 µg/mL, Menadiona a 0.5 µg/mL e 5% de sangue desfibrinado de carneiro foram utilizadas para a subcultura da cepa. A semeadura foi feita, em toda a extensão da placa, uniformemente, com o auxílio de um *swab* esterilizado, encharcado com a suspensão bacteriana.

Após a secagem das placas (10 a 15 minutos), as fitas do E-test foram colocadas em placas separadas, com auxílio de uma pinça esterilizada, de modo a ficar centralizado e com a alta concentração inibitória mínima (CIM) próxima da borda da placa. O experimento foi realizado em duplicata e em câmara de fluxo laminar.

As placas foram incubadas em cabine de anaerobiose na presença de 80% de N₂, 10% de H₂ e 10% de CO₂ a 37°C por 48 horas. Os valores das concentrações inibitórias mínimas (CIMs) foram determinados pela leitura do ponto de intersecção entre o halo de inibição em forma de elipse e a fita do E-test (figura 4).

De acordo com as recomendações do fabricante, a interpretação dos valores das CIMs do E-test em diferentes categorias de sensibilidade foi realizada seguindo o guia de interpretação do CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) (Tabela1).

Figura 4: A – Fita do E-test em placa inoculada com *F. nucleatum*. B- Halo de inibição formado após 48 horas de incubação em anaerobiose a 37°C, mostrando o ponto de intersecção (seta) entre o halo de inibição bacteriana e a fita de E-test.

Tabela 1: Valores interpretativos dos pontos de corte para determinação da suscetibilidade dos micro-organismos aos agentes antimicrobianos testados de acordo com a metodologia estabelecida

Agentes Antimicrobianos	CIM		Referência
	S	R	
AM	$\leq 0,5$	$2 \geq$	CLSI 2012
AC	≤ 4	$16 \geq$	CLSI 2007
XL	≤ 1	$8 \geq$	CLSI 2007
AZ	< 2	-	van Winkelhoff et al., 2005.
CM	≤ 2	$8 \geq$	CLSI 2012
EM	< 4	-	van Winkelhoff et al., 2005.
MZ	≤ 8	$32 \geq$	CLSI 2012

S = suscetível; R = resistente; AM = Ampicilina; AC = amoxicilina; XL = amoxicilina + ácido clavulânico; AZ = azitromicina; CM = clindamicina; EM = eritromicina; MZ = metronidazol.

4.9 Protocolo para Purificação de RNA de *Fusobacterium nucleatum*

Os procedimentos para a definição do protocolo foram realizados no laboratório de Microbiologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP, com a colaboração do Prof. Dr. Rafael Nóbrega Stipp.

4.9.1 Preparo e número das amostras

Previamente ao início dos procedimentos de purificação do RNA foi feito o preparo das amostras.

As amostras em crescimento planctônico foram obtidas de uma cultura de aproximadamente 12 horas. Vinte mL de cultura foi transferida para tubos Falcon (Corning, Pittston, PA, EUA) de 50mL e centrifugados a 6.000 x g por 5 minutos a 4°C para a precipitação das bactérias. O sobrenadante foi removido e o precipitado formado foi diluído em 1mL de solução salina esterilizada. Essa solução foi transferida para um microtubo com tampa de rosca e foi centrifugado a 11.000 x g por 1minuto a 4°C para a formação de um novo precipitado. O sobrenadante foi novamente descartado e as células bacterianas foram congeladas a -80°C. Para cada cepa, foram congeladas três amostras.

Para as amostras em biofilme, após o período de crescimento, o meio de cultura de cada poço da placa de poliestireno foi removido e lavado com solução salina esterilizada. Um mL de solução salina foi colocado dentro do poço e o biofilme aderido no fundo da placa foi removido com o auxílio da ponteira da pipeta. O conteúdo foi aspirado e transferido para microtubos com tampa de rosca e centrifugados a 11.000 x g por 1minuto a 4°C, para

precipitação das células bacterianas. O sobrenadante foi removido e as células congeladas a -80°C. Em biofilme, para cada cepa, foram congeladas 6 amostras.

4.9.2 Purificação do RNA total

O precipitado de células bacterianas armazenados nos microtubos com rosca foram retirados do freezer e adicionado 0,16g de microesferas de zircônia (0,1mm de diâmetro – Biospec, Bartlesville, EUA) e 220µL de TE 0,01M (Sigma-Aldrich, Ontario, Canada) para a lise bacteriana em *bead-beater* (Mini Bead-beater 8, Biospec-products, Bartlesville, EUA) por dois ciclos de 30 segundos.

A seguir foi adicionado 850µL de RLT/beta-mercaptanol agitando no vórtex por 30 segundos. Foi realizada centrifugação a 11000 x g por 2 minutos a 4 °C e o sobrenadante foi transferido para microtubo contendo etanol puro. A solução resultante foi transferida para colunas (Quiagen's RNeasy on-column DNase I (2,7 U DNase/10µg RNA) e o processo de purificação prosseguiu com a adição de 350 µL de RW1 e centrifugação a 11000 x g, por 30 segundos à 4°C. Para a digestão do DNA genômico presente na amostra foi colocado DNase (RNase-Free DNase Set, Quiagen, Hilden, Alemanha) na coluna e incubados por 15 minutos à temperatura ambiente. Após o período de incubação, nova lavagem com RW1 foi feita e duas centrifugações seguidas com 500 µL RPE foram realizadas (11000 x g, a 4 °C por 30 segundos). O RNA foi recuperado e ressuspendido em água livre de DNase e RNase (Quiagen). A quantidade e a qualidade da purificação do RNA de cada amostra foram medidas em aparelho Nanodrop (NanoDrop 2000, Thermo Scientific, EUA). A leitura foi feita considerando a quantidade de RNA em ng/µL e os valores 260/280 que estima a quantidade de proteínas presente no produto final, indicando a qualidade do RNA purificado.

4.9.3 Conversão do RNA para cDNA

A transcrição do cDNA foi feita utilizando o Kit IScript cDNA Syntesis (BioRad, Hercules, California, EUA). As reações de transcriptase reversa foram preparadas de acordo com a instrução do fabricante contendo 4µL de IScript, 500ng de RNA da amostra e 7,04µL água livre de DNase e RNase e incubados a 25°C por 5 minutos, 42°C por 30 minutos e 85°C por 5 minutos. Para a verificação da ausência de contaminação por DNA genômico da amostra, foi preparada uma reação adicional com ausência de IScrit (transcriptase reversa).

4.9.4 PCR quantitativo em tempo real

A amplificação das amostras de cDNA foram testadas para confirmar a conversão. As reações de PCR quantitativo foram realizadas em um aparelho StepOne Real-Time PCR System (Life Technologies, Carlsbad, CA, Estados Unidos). A mistura para a reação foi feita com 5µL da solução Power SYBR® Green Master Mix (Life Technologies, Carlsbad, CA, Estados Unidos), 0,6 µL do primer *Foward* (F)/*Reverse* (R) 16s RNA, 2,5µL de água, 0,15µL de Taq polimerase, 0,75 µL de Magnésio. Foi pipetado 9µL dessa mistura e 1 µL de cDNA de cada amostra, totalizando 10µL por poço de uma placa de 46 poços (MicroAmp® Fast Optical 48-Wee Reaction Plate (0,1mL), Applied Biosystems). O gene 16s RNA de *F. nucleatum* foi utilizado como gene de referência (KAPLAN et al., 2014) (tabela 2)

As condições de ciclagem foram: 95°C por 5 minutos, 40 ciclos de 95°C por 15, 57°C por 15 segundos e 72°C por 25 segundos.

Tabela 2: *Par de primer* utilizado na reações de PCR para confirmação de *Fusobacterium nucleatum*.

16S rRNA	Par de primer (5'-3')	Referência
<i>F. nucleatum</i>	<i>F</i> TTGGACAATGGACCGAGAGT <i>R</i> GCCGTCACCTTCTTCTGTTGG	Kaplan et al, 2014

4.10 Análise estatística

Para a análise estatística do teste de suscetibilidade antimicrobiana, o Teste de Kruskal-Wallis foi empregado para verificar a diferença entre a efetividade dos agentes antimicrobianos em relação às cepas testadas e para a verificação da diferença entre as cepas independente do antibiótico testado.

O Teste de Mann Whitney foi empregado para verificar diferença entre a sensibilidade das cepas em crescimento planctônico e em biofilme frente aos antibióticos testados.

Em relação ao protocolo de purificação do RNA de *F. nucleatum*, foi feita uma análise descritiva dos resultados encontrados.

5 Resultados

5 RESULTADOS

5.1 Coleta das amostras

Características clínicas Isolamento e identificação dos micro-organismos

Foram selecionados 23 pacientes que apresentavam dentes com necrose pulpar e lesão periapical visível na radiografia. As seguintes características clínicas estavam presentes nos casos estudados: dor a palpação (5/23), dor a percussão (8/23), exudato (3/23), edema (1/23), fístula (4/23). Em relação ao tamanho da rarefação óssea vista radiograficamente, em 14 dos 23 casos, apresentava-se com mais de 3mm. Os dados dos achados clínicos podem ser vistos na tabela 3. Dos 23 casos, oito canais não apresentaram crescimento bacteriano (34,78%); um canal apresentou apenas uma cepa (4,34%); dois canais apresentaram duas cepas bacterianas (8,69%); 12 canais apresentaram três cepas ou mais (52,17%).

Tabela 3: Características clínicas, radiográficas e achados microbiológicos dos 23 dentes utilizados no estudo.

Paciente	DP	DPV	EX	TM	ED	FIS	Crescimento	Fn
1	S	S	S	S	S	N	S	S
2	N	N	N	N	N	N	S	S
3	N	N	N	N	N	N	S	N
4	N	N	N	S	N	N	N	N
5	S	S	N	S	N	N	S	N
6	S	S	N	N	N	S	S	N
7	N	S	N	S	N	N	S	N
8	N	S	N	S	N	S	N	N
9	S	S	S	S	N	N	S	N
10	S	S	S	S	N	N	S	N
11	N	N	N	S	N	N	N	N
12	N	N	N	S	N	S	S	S
13	N	S	N	S	N	N	S	S
14	N	N	N	S	N	N	N	N
15	N	N	N	N	N	N	S	N
16	N	N	N	N	N	N	N	N
17	N	N	N	S	N	N	N	N
18	N	N	N	S	N	N	S	S
19	N	N	N	N	N	N	S	N
20	N	N	N	S	N	S	S	S
21	N	N	N	N	N	N	N	N
22	N	N	N	N	N	N	N	N
23	N	N	N	N	N	N	S	N

DP: dor a palpação; DPV: dor a percussão vertical; EX: exudato; TM: tamanho da lesão maior que 3mm; ED: edema; FIS: fístula; Fn: *Fusobacterium nucleatum*; S: sim; N: não

Cepas com comportamento anaeróbio estrito passaram por isolamento e identificação por teste bioquímico. Doze espécies foram identificadas, incluindo *Fusobacterium nucleatum*. As diferentes cepas identificadas estão descritas na tabela 4.

Tabela 4: Micro-organismos isolados e identificados com o Kit RapiID 32 A dos canais radiculares.

Espécies microbianas (de interesse) identificadas	Nº de dentes
<i>Prevotella oralis</i>	3
<i>Anaerococcus prevotii</i>	1
<i>Micromonas micros</i>	2
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	6
<i>Prevotella intermedia</i>	1
<i>Porphyromonas endodontalis</i>	1
<i>Gemella morbillorum</i>	1
<i>Clostridium sporogenes</i>	1
<i>Bacteroides ureolyticus</i>	1
<i>Eubacterium limosum</i>	1
<i>Propionibacterium granulosum</i>	1
<i>Clostridium difficile</i>	2

A espécie *F. nucleatum* foi encontrada em 6 canais (26,08%) e foram identificadas através da morfologia da colônia, coloração de Gram e teste bioquímico (figura 5). Porém duas cepas foram perdidas quando estocadas, sendo quatro isolados utilizados nos experimentos.

Figura 5: A - Colônia de *F. nucleatum*; B - Coloração de Gram; C e D: resultado do teste de identificação Rapid ID 32A após 4 horas.

A confirmação da espécie foi feita através de PCR convencional utilizando primer 16s (BAUMGARTNER *et al.*, 2004). As cepas isoladas foram identificadas com referência ao número da coleta em que foi encontrada: 12, 13, 18 e 20 (figura 6).

Figura 6: Imagens das bandas relativas à amplificação do fragmento correspondente ao gene 16S de *Fusobacterium nucleatum* por meio de reação em cadeia da polimerase e eletroforese em gel de agarose.

5.2 Teste de suscetibilidade antimicrobiana - E-test

Cinco cepas de *Fusobacterium nucleatum* (uma ATCC e 4 isolados clínicos) foram testadas quanto a suscetibilidade antimicrobiana a antibióticos. Todas as cepas foram testadas em crescimento planctônico e em biofilme.

Em relação à suscetibilidade aos agentes antimicrobianos independente da forma de crescimento (planctônico ou biofilme), pode-se observar níveis de resistência para a eritromicina em ambos os grupos. Os demais antimicrobianos testados se mostraram efetivos frente às cepas. Os dados do perfil de suscetibilidade dos micro-organismos aos agentes antimicrobianos estão demonstrados na tabela 5.

Tabela 5: Valores de intervalo das CIMs dos antibióticos encontradas para a ATCC e para as cepas isoladas dos canais radiculares e sua suscetibilidade frente aos agentes antimicrobianos.

Agentes Antimicrobianos	Planctônico						Biofilme			
	Intervalo CIM (µg/ml)	Suscetibilidade				Intervalo CIM (µg/ml)	Suscetibilidade			
		S		R			S		R	
		n	%	n	%		n	%	n	%
AM	0,016-0,047	5	100%	-	-	0,023-0,43	5	100%	-	-
AC	0,016-0,047	5	100%	-	-	0,023-0,064	5	100%	-	-
XL	0,016-0,094	5	100%	-	-	0,032-0,094	5	100%	-	-
AZ	0,023-0,50	5	100%	-	-	0,125-0,50	5	100%	-	-
CM	0,016-0,016	5	100%	-	-	0,016-0,016	5	100%	-	-
EM	0,75-32	1	20%	4	80%	1,5-256	0	0%	5	100%
MZ	0,016-0,094	5	100%	-	-	0,016-0,064	5	100%	-	-

S = suscetível; R = resistente; AM = Ampicilina; AC = amoxicilina; XL = amoxicilina + ácido clavulânico; AZ = azitromicina; CM = clindamicina; EM = eritromicina; MZ = metronidazol.

A tabela 6 mostra os valores das medianas dos valores das CIMs encontradas para os agentes antimicrobianos testados frente às diferentes formas de crescimento bacteriano e sua diferença estatística. Em relação ao modo de crescimento das cepas, houve diferença estatística entre as bactérias em crescimento planctônico ou em biofilme, com valores de tolerância seis vezes maior para o crescimento em biofilme (Figura7).

Tabela 6: Mediana, valores máximo e mínimo das CIMs dos agentes antimicrobianos frente as cepas testadas. Letras minúsculas iguais nas linhas representam ausência de diferença estatística entre os agentes antimicrobianos testados.

Agentes antimicrobianos							
	AM	AC	XL	AZ	CM	EM	MZ
Planctônico	0,032 ^{a,b} (0,016-0,047)	0,0395 ^{a,b} (0,016-0,047)	0,047 ^{a,b} (0,016-0,094)	0,125 ^{b,d} (0,023-0,5)	0,016 ^a (0,016-0,016)	4 ^{c,d} (0,75-32)	0,016 ^a (0,016-0,094)
Biofilme	0,0395 ^{a,c} (0,016-0,43)	0,047 ^{a,c} (0,023-0,064)	0,0555 ^{a,d} (0,032-0,094)	0,19 ^{a,b} (0,125-0,5)	0,016 ^c (0,016-0,016)	6 ^b (4-256)	0,016 ^{c,d} (0,016-0,064)

Significante para $P < 0,05$ – Kruskal-Wallis e Dunn

AM = Ampicilina; AC = amoxicilina; XL = amoxicilina + ácido clavulânico; AZ = azitromicina; CM = clindamicina; EM = eritromicina; MZ = metronidazol.

Figura 7: Representação gráfica da média de suscetibilidade das cepas na forma planctônica e em biofilme frente aos agentes antimicrobianos testados. Os valores de tolerância aos agentes antimicrobianos testados para as cepas em crescimento em biofilme foram seis vezes maiores. PL: Planctônico; BF: Biofilme

Em relação às cepas testadas, os menores valores de suscetibilidade foram encontrados para a cepa ATCC quando comparada com as cepas isoladas dos canais radiculares. Tanto na forma planctônica de crescimento quanto em biofilme, o isolado 13 foi a cepa que mostrou maior tolerância frente aos antibióticos (Figura 8).

Suscetibilidade das cepas em crescimento Planctônico

Figura 8: Representação gráfica da média e desvio padrão da suscetibilidade das cepas na forma planctônica frente aos agentes antimicrobianos testados.

Figura 9: Representação gráfica da média e desvio padrão da suscetibilidade das cepas em biofilme frente aos agentes antimicrobianos testados.

5.3 Purificação do RNA de *Fusobacterium nucleatum*

5.3.1 Quantidade e qualidade da purificação do RNA

O rendimento do RNA das amostras variou de 108,8 ng/µl a 1239,9 ng/µl, com uma média de 514,2 ng/µl (DP ± 397,7) para as bactérias em crescimento planctônico. Para as amostras de biofilme, o rendimento variou de 130,6 ng/µl a 725,7ng/µl, com uma média de 377,1 ng/µl (DP± 144,1). Amostras com maior quantidade de células renderam maior quantidade de RNA.

Em relação à qualidade, o RNA purificado das amostras em crescimento planctônico apresentou razão 260/280 variando de 2,2 a 2,25 e média de 2,22 (DP±0,02) e razão 260/230 variando de 0,75 a 2,68 e média de 2,28 (DP±0,55). Para as amostras obtidas de biofilme, a razão 280/260, variou de 2,14 a 2,39, com média de 2,22 (DP±0,04) e a razão 260/230 variou de 0,39 a 2,67 com média de 1,84 (DP±0,64). Esses valores sugerem uma boa qualidade de RNA, livre de contaminação por proteínas.

5.3.2 PCR quantitativo em tempo real (qPCR)

Os valores de “cycle threshold” (CT) indicam o limiar de detecção frente ao número de ciclos de amplificação. Para as bactérias em crescimento planctônico, os valores de CT em fluorescência de 0.3 unidades, foram de 12 a 14 ciclos (média 13.04, DP±0.1) (figura 10). Para as amostras obtidas de biofilme, do CT variou de 11 a 15 (média 13.51, DP±0.1) (figuras 11 A e B). Na representação gráfica (figura 12), é possível observar a distribuição dos valores de CT para as amostras planctônicas e em biofilme.

Figura 10: Gráfico de amplificação do PCR quantitativo em tempo real. Amostras positivas contendo cDNA apresentaram CT entre 12 e 14 ciclos em intensidade 0.3 de fluorescência, para as bactérias em crescimento planctônico.

Figura 11 A e B: Gráficos de amplificação do PCR quantitativo em tempo real. Amostras positivas contendo cDNA apresentaram CT entre 11 e 15 ciclos em intensidade 0.3 de fluorescência, para as amostras obtidas de biofilme.

Figura 12: Representação gráfica dos valores de CT encontrados após amplificação do PCR quantitativo em tempo real para as amostras em crescimento planctônico e em biofilme.

Apenas duas amostras apresentaram contaminação com DNA (12.3 B e 20.5 B), o que mostra que tratamento com DNase (RNase-Free DNase Set, Quiagen) realizado durante o processo de purificação do RNA foi suficiente para remover traços de DNA contaminante das amostras. O restante das amostras não apresentaram contaminação mostrando apenas uma fluorescência sinal comum durante a amplificação (Figura 13).

Figura 13: Gráfico de amplificação do PCR quantitativo em tempo real. Amostras controles sem transcriptase reversa mostrando fluorescência sinal comum e ausência de amplificação de DNA genômico.

6 Discussão

6 DISCUSSÃO

O método da cultura possibilita a identificação de uma grande variedade de espécies, determinação da suscetibilidade aos antibióticos e o estudo da fisiologia celular microbiana (SIQUEIRA; RÔÇAS, 2005). Além disso, a associação da cultura a métodos moleculares é bastante importante, já que uma de suas maiores contribuições é a determinação da presença de micro-organismos viáveis nas amostras, o que não é facilmente realizado através do emprego isolado de métodos moleculares de diagnóstico, que estudam o gene 16S rRNA.

Por outro lado, a investigação dos perfis genéticos bacterianos é fundamental. Montagner; Gomes; Kumar (2010) assumem que casos endodônticos com sintomatologia apresentam um maior número de espécies bacterianas, ou se apresentarem menor número de espécies haverá maior diversidade genética entre as mesmas. Desta forma, a grande variabilidade genética dentro de uma espécie e esta dentro de um sítio infeccioso, deve ser investigada. Fatores de virulência bacterianos podem nortear a conduta de tratamento, como por exemplo, a indicação de determinado antibiótico.

Este trabalho se propôs avaliar a suscetibilidade antimicrobiana em cultura e padronizar um protocolo para a purificação de RNA para análises moleculares de fatores de virulência, desta forma, associando futuramente ambas as metodologias, onde temos o micro-organismo viável em cultura desempenhando seu metabolismo e a expressão gênica dos mesmos, que permitem sua sobrevivência.

A infecção endodôntica é mista e predominantemente anaeróbia e a presença ou ausência de sintomatologia está associada às características específicas da composição microbiana (SAKAMOTO *et al.*, 2006).

Dos 23 dentes estudados, 15 dentes apresentaram micro-organismos viáveis. Alguns dentes apresentaram culturas negativas (34,78%) apesar do emprego de meios de transporte e cultura pré-reduzidos, não significa a ausência total de micro-organismos dos canais estudados. Em estudos anteriores, Lana *et al.* (2001) obtiveram crescimento bacteriano de 87,1% dos canais analisados, apresentando dentes com cultura negativa. A técnica de coleta e cultura utilizada neste estudo para o isolamento de bactérias sensíveis ao oxigênio é frequentemente utilizada e se mostra bastante efetiva (GOMES; LILLEY; DRUCKER, 1996b; PINHEIRO *et al.*, 2003; GOMES *et al.*, 2004; FERREIRA *et al.*, 2006), porém é possível que alguns micro-organismos tenham se perdido durante a coleta e o processamento microbiológico. O meio de transporte utilizado no estudo foi o Fluido de transporte reduzido

(RTF), descrito em 1972 por (SYED; LOESCHE, 1972). Em seu estudo foi o que mais recuperou anaeróbios estritos de bolsa periodontal e hoje ainda utilizado para técnicas de isolamento por cultura (SIQUEIRA, *et al.*, 2007).

As cepas que apresentaram comportamento anaeróbio estrito foram submetidas ao teste de identificação bioquímica Rapid ID 32 A (Biomérieux França) e 13 espécies foram identificadas (*Prevotella oralis*, *Anaerococcus prevotii*, *Micromonas micros*, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas endodontalis*, *Gemella morbillorum*, *Clostridium sporogenes*, *Bacteroides ureolyticus*, *Eubacterium limosum*, *Propionibacterium granulosum*, *Clostridium difficile*). Esses achados corroboram com dados descritos na literatura, tanto em trabalhos que utilizaram cultura (LANA *et al.*, 2001) quanto os que utilizaram técnicas moleculares de identificação (BAUMGARTNER *et al.*, 2004; FOUAD *et al.*, 2002; SIQUEIRA *et al.*, 2001). Porém, a microbiota pode variar de acordo com a localidade em que vive o que pode justificar a diferença de achados em alguns estudos (BAUMGARTNER *et al.*, 2004; RÔÇAS *et al.*, 2006; SIQUEIRA *et al.*, 2005).

Fusobacterium nucleatum tem sido frequentemente encontrado nas infecções dos canais radiculares e em muitos estudos figura entre as principais bactérias identificadas e isoladas de infecções primárias, tanto de casos sintomáticos como dos assintomáticos (JUNG *et al.*, 2000; SUNDQVIST, 1992b; GOMES *et al.*, 2004; RÔÇAS; SIQUEIRA, 2008).

Dos 23 dentes estudados, *F. nucleatum* foi encontrado em 6 canais (26,08%). Esse número está próximo de alguns estudos e difere de outros descritos na literatura. No estudo de (MORAES *et al.*, 2002), a incidência de *F. nucleatum* nas infecções dos canais radiculares avaliada por PCR, cultura e hibridização DNA-DNA foi de 15,4%, 15,4% e 10% respectivamente. A combinação de todos os métodos sugere que pode ser detectado em aproximadamente 31% dos casos. Jacinto *et al.* (2008), isolaram *F. nucleatum* em 34% dos casos de dentes sintomáticos através da cultura. Apesar de próximos, os resultados de estudos feitos a partir da cultura do conteúdo dos canais radiculares podem variar de forma significativa, devido a variações de metodologia e a reduzida sensibilidade das técnicas de cultura (FOUAD *et al.*, 2002).

No presente estudo, 4 isolados de *F. nucleatum* foram identificados de casos assintomáticos e apenas dois casos foram isolados de pacientes que apresentavam sintomatologia dolorosa. Como o número de isolados de *F. nucleatum* foi pequeno e a seleção dos pacientes incluiu situações diversas, ou seja, um número maior de pacientes sem sintomatologia dolorosa, não foi possível fazer uma correlação com esses achados, mesmo sendo todos os casos de infecção endodôntica primária. Porém é possível afirmar que

Fusobacterium nucleatum pode ser associado tanto em casos sintomáticos como nos assintomáticos, corroborando com diversos estudos (SAKAMOTO *et al.*, 2006; SIQUEIRA; RÔÇAS; ROSADO, 2004; RÔÇAS; SIQUEIRA, 2008; SIQUEIRA *et al.*, 2007).

As espécies anaeróbias isoladas e identificadas no presente estudo estão associadas a presença do *F. nucleatum* (LANA *et al.*, 2001; SIQUEIRA *et al.*, 2001; BAUMGARTNER *et al.*, 2004; JACINTO *et al.*, 2008). Gomes *et al.*, (2004), investigaram a microbiota de canais radiculares com infecção primária e encontraram que *F. nucleatum* está entre as espécies mais isoladas e encontraram correlação positiva com as espécies do gênero *Peptostreptococcus*, e *Porphyromonas* em casos de história prévia de dor, percussão vertical e canais úmidos. Essas associações conferem um grande valor na patogenicidade dessas espécies.

Sabendo que a infecção no interior dos canais radiculares ocorre em biofilmes aderidos nas paredes e que este estado oferece uma resistência maior aos agentes antimicrobianos, o estudo dessas cepas com esse tipo de crescimento é válido (RICUCCI *et al.*, 2009). O modo protegido de crescimento dos biofilmes permite a sobrevivência em ambientes não favoráveis. As bactérias em um ambiente como esse, diferem muito no fenótipo quando comparadas com os seus homólogos planctônicos, e são muito menos suscetíveis aos antimicrobianos (COSTERTON, 1999).

Para o crescimento do biofilme, foram utilizadas placas de poliestireno de 24 poços, sendo o fundo o substrato para aderência bacteriana (OZOK *et al.*, 2007; PITTS *et al.*, 2003). O crescimento do biofilme em placas de poliestireno está estabelecido na literatura, e as bactérias podem aderir ao mesmo. As principais vantagens desse método são a facilidade, rapidez e reprodutibilidade. Porém a desvantagem é a ausência da relação entre biomassa e a viabilidade do biofilme (MACIA; ROJO-MOLINERO; OLIVER, 2014), dados estes obtidos através de microscopia confocal de varredura a laser (MCVL), o que não foi possível neste caso devido ao crescimento diretamente no poço da placa.

O período de crescimento em biofilme adotado no presente estudo foi de 5 dias, com trocas do meio de cultura a cada 48 horas para providenciar nutrição e a remoção de células mortas. O período foi determinado em estudo piloto, realizado com diferentes substratos, onde através de MCVL a viabilidade e a espessura foram mensuradas.

Como esta espécie pode ser isolada tanto de casos assintomáticos como de casos sintomáticos, incluindo abscessos com envolvimento sistêmico, a avaliação da suscetibilidade antimicrobiana frente a diferentes antibióticos prescritos na odontologia se faz necessária. Além disso, como a contaminação do canal radicular se dá na forma de biofilme, suas células

foram testadas para verificar se há um aumento da resistência quando comparado com o crescimento planctônico.

O *E-test* é um método simples e confiável recomendado pelo CLSI (Clinical and Laboratory Standard Institute) para testes de suscetibilidade antimicrobiana de isolados bacterianos. Baseia-se na difusão de um gradiente exponencial contínuo de agentes antimicrobianos a partir de uma tira de plástico (KHEMALEELAKUL; BAUMGARTNER; PRUKSAKORN, 2002). De acordo com Bolmström, (1993), o teste de suscetibilidade comercial *E-test* foi desenvolvido combinando a conveniência e praticidade do método do disco com a habilidade de determinar a concentração inibitória mínima (CIM). Os resultados obtidos através do *E-test* permitem verificar a menor concentração capaz de inibir o crescimento das cepas e também demonstram o intervalo de variação dos valores máximos e mínimos de CIM para cada cepa. Além disso, é possível comparar os resultados com estudos prévios e verificar se há diminuição da sensibilidade aos agentes antimicrobianos.

No presente estudo foram testadas 5 cepas (uma ATCC e 4 isoladas) de *F. nucleatum* quanto a sua suscetibilidade frente a agentes antimicrobianos em crescimento planctônico ou biofilme. Os resultados indicam que todas as cepas testadas foram suscetíveis à maioria dos antibióticos testados, apresentando resistência apenas para a Eritromicina, independente de sua forma de crescimento.

É possível notar um aumento na resistência para as cepas em biofilme. Em crescimento planctônico, 4 cepas foram resistentes à eritromicina (as de número 12, 13, 18 20) enquanto que em biofilme, todas as cepas apresentaram resistência a eritromicina.

Das cepas testadas, em crescimento planctônico, a cepa 13 se apresentou mais tolerante aos antibióticos que as demais e quando em biofilme, manteve os mesmos padrões. Quando observado às características clínicas, a cepa 13 apresentou ausência de dor, lesão maior que 3mm e presença de fístula.

Na comparação por tipo de crescimento, foi observada a diminuição da suscetibilidade para as cepas em biofilme, com diferença estatística. O aumento da tolerância quando em biofilme já era esperado devido ao modo protegido de crescimento dos biofilmes que permite a sobrevivência em ambientes não favoráveis.

Os resultados de trabalhos anteriores confirmam os achados para a resistência. Lana *et al.* (2001) e Jacinto *et al.* (2008), também encontraram resistência a eritromicina para o *F. nucleatum*. Já Sousa *et al.* (2013), além de encontrar resultados de resistência para a eritromicina, a azitromicina também se mostrou ineficaz para algumas cepas de *F. nucleatum*.

No presente trabalho, nenhuma cepa mostrou resistência a azitromicina em ambos os tipos de crescimento.

A eritromicina tem sido prescrita para pacientes com alergia a penicilinas. Entretanto, eritromicina não é efetiva frente ao *F. nucleatum*. Essa resistência pode estar relacionada a presença da proteína de efluxo macrolídeo (GOLDSTEIN et al., 1999). Clindamicina também está indicada em caso de pacientes alérgicos as penicilinas. Os resultados mostraram que a clindamicina foi altamente eficaz frente ao *F. nucleatum* e esses resultados são semelhantes aos encontrados por (GOMES et al., 2011).

No Brasil, a amoxicilina tem sido usada como droga de primeira escolha em infecções orais para pacientes sem alergias (GOMES et al., 2011). É rapidamente absorvida pelo organismo e mantém os níveis sanguíneos prolongados, o que permite maiores intervalos entre as doses (JACINTO et al., 2008). A amoxicilina é uma penicilina e alguns autores mostram que *F. nucleatum* pode apresentar resistência as penicilinas por produzir beta-lactamase (VOHA et al., 2006), porém no presente trabalho nenhuma cepa testada apresentou resistência e a CIM encontrada estava bem abaixo do ponto de corte. Amoxicilina + clavulanato de potássio tem sido indicado em casos onde houve a resistência ao tratamento utilizando apenas amoxicilina, e mostrou bons resultados frente às cepas testadas.

Metronidazol tem mostrado ser efetivo frente a anaeróbios, e estudos mostram que a sua combinação com a amoxicilina é mais efetiva comparando com seu uso isolado Kuriyama et al., (2007) e Khemaleelakul; Baumgartner; Pruksakorn (2002) reportaram que 12% das cepas anaeróbias foram resistentes ao metronidazol, porém no presente estudo este antibiótico se mostrou efetivo com 100% de suscetibilidade.

Segundo van Winkelhoff et al. (2005), variações entre os resultados descritos em diferentes estudos podem estar relacionadas à metodologia empregada, época de sua realização, localização geográfica ou o número de amostras estudadas. Apesar do limitado número de cepas analisadas nessa pesquisa, os resultados demonstram uma diferença nas características de suscetibilidade dos isolados. Esses dados de resistência aos antibióticos podem ser comparados em nível molecular através da expressão gênica de fatores de virulência dos micro-organismos.

A detecção da presença do gene relacionado por si só (PCR convencional), pode não corresponder a sua atividade, pois vários fatores são capazes de regular sua expressão (MADIGAN et al., 2004). Desta forma, a pesquisa da expressão gênica é importante e a padronização de seu desempenho por meio de qPCR se faz necessária. A definição de um protocolo para a purificação do RNA para posterior uso nesse tipo de análise é muito

importante, pois experimentos em qPCR necessitam de ácidos nucleicos de qualidade. A qualidade da reação do qPCR para expressão gênica está diretamente ligada a qualidade e quantidade de RNA purificado e transcrito. Geralmente os artigos publicados com enfoque em análise de expressão gênica a partir de amostras de RNA não são claros em relação à metodologia de purificação utilizada (KAPLAN, et al 20014; WANG *et al*, 2011).

Existem várias maneiras para a purificação de RNA que se baseiam no sistema para a lise da parede bacteriana. No presente estudo, foi definido um protocolo para a purificação de RNA de cepas de *F.nucleatum* para utilização em qPCR para expressão gênica. A fase da purificação do RNA foi feita através de aparelho *bead-beater* e uso de micro esferas de zircônia para rompimento da parede celular e exposição do material genético. A purificação foi feita com kit comercial e reação de qPCR para confirmar o sucesso do protocolo.

A qualidade das amostras de RNA apresentaram qualidade aceitável, dentro dos valores para a razão 280/260 acima de 2.0. Esses valores variaram entre as amostras e também entre o tipo de crescimento bacteriano, porém essa variação se deve a quantidade inicial de células bacterianas por amostra.

Inicialmente, são poucos os isolados, mas ao investigar as características moleculares, este número aumenta bastante. Como cada cepa foi pesquisada também em biofilme, ressalta-se que uma única amostra de biofilme não é suficiente. Dentro desta forma de vida, as interações genéticas são inúmeras e a aquisição dos fatores de virulência acontece. Desta forma, realizou-se a sextuplicata de cada isolado em biofilme e a triplicata para cada isolado em fase planctônica para purificação do RNA e futura avaliação em biologia molecular.

Após a extração e purificação do RNA foi feita a conversão para cDNA e as reações de qPCR foram feitas. Com os resultados da reação foi possível ver que o protocolo utilizado promoveu valores de CT (ciclo de *threshold*) aceitáveis e todas as amostras foram amplificadas.

Sendo assim, o protocolo estabelecido de extração e purificação do RNA das cepas de *F. nucleatum* assim como a transcrição para DNA complementar (cDNA) tiveram êxito. As amostras armazenadas possibilitarão as análises da expressão dos fatores de virulência em futuro próximo, relacionando sua presença com os resultados obtidos na cultura microbiana, quanto à suscetibilidade aos antibióticos e adesão às superfícies, contribuindo sobremaneira para direcionamento da terapêutica adotada no tratamento endodôntico.

7 Conclusões

7 CONCLUSÕES

- Todas as cepas de *Fusobacterium nucleatum* isoladas de canais radiculares, assim como a cepa ATCC (padrão) são suscetíveis aos antibióticos testados, com exceção do antibiótico eritromicina.
 - As cepas testadas na forma de biofilme foram ligeiramente mais tolerantes aos antibióticos do estudo, com diferença estatística.
 - O protocolo estabelecido para purificação de RNA de cepas de *Fusobacterium nucleatum* cultivadas em fase planctônica e em biofilmes teve êxito, comprovado pela amplificação do gene 16s RNA específico para esta espécie em qPCR.
-

Referências

REFERÊNCIAS

Abbott PV, Hume WR, Pearman JW. Antibiotics and endodontics. *Aust Dent J*. 1990;35(1):50-60.

Adler BA, Grossman L, Fasman GD. Single-stranded oligomers and polymers of cytidylic and 2'-deoxycytidylic acids: comparative optical rotatory studies. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1967;57(2):423-30.

Andrade ED, Souza-Filho FJ. Protocolos Farmacológicos em Endodontia. In: Andrade ED, organizador. *Terapêutica Medicamentosa em Odontologia*. 2. ed. São Paulo: Artes Médicas; 2006. p. 169-178

Amano A. Bacterial adhesins to host components in periodontitis. *Periodontol* 2000. 2010;52(1):12-37.

Aparna MS, Yadav S. Biofilms: microbes and disease. *Braz J Infect Dis*. 2008;12(6):526-30.

Bagge N, Hentzer M, Andersen JB, Ciofu O, Givskov M, Hoiby N. Dynamics and spatial distribution of beta-lactamase expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48(4):1168-74.

Baumgartner JC, Siqueira JF, Jr., Xia T, Rocas IN. Geographical differences in bacteria detected in endodontic infections using polymerase chain reaction. *J Endod*. 2004;30(3):141-4.

Belgrader P, Benett W, Hadley D, Richards J, Stratton P, Mariella R, Jr., et al. PCR detection of bacteria in seven minutes. *Science*. 1999;284(5413):449-50.

Blome B, Braun A, Sobarzo V, Jepsen S. Molecular identification and quantification of bacteria from endodontic infections using real-time polymerase chain reaction. *Oral Microbiol Immunol*. 2008;23(5):384-90.

Bystrom A, Claesson R, Sundqvist G. The antibacterial effect of camphorated paramonochlorophenol, camphorated phenol and calcium hydroxide in the treatment of infected root canals. *Endod Dent Traumatol*. 1985;1(5):170-5.

Ceri H, Olson ME, Stremick C, Read RR, Morck D, Buret A. The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. *J Clin Microbiol.* 1999;37(6):1771-6.

Citron DM, Ostovari MI, Karlsson A, Goldstein EJ. Evaluation of the E test for susceptibility testing of anaerobic bacteria. *J Clin Microbiol.* 1991;29(10):2197-203.

Costerton JW. Introduction to biofilm. *Int J Antimicrob Agents.* 1999;11(3-4):217-21; discussion 37-9.

de Souza CA, Teles RP, Souto R, Chaves MA, Colombo AP. Endodontic therapy associated with calcium hydroxide as an intracanal dressing: microbiologic evaluation by the checkerboard DNA-DNA hybridization technique. *J Endod.* 2005;31(2):79-83.

Del Carpio-Perochena AE, Bramante CM, Duarte MA, Cavenago BC, Villas-Boas MH, Graeff MS, et al. Biofilm dissolution and cleaning ability of different irrigant solutions on intraorally infected dentin. *J Endod.* 2011;37(8):1134-8.

Du T, Wang Z, Shen Y, Ma J, Cao Y, Haapasalo M. Effect of long-term exposure to endodontic disinfecting solutions on young and old *Enterococcus faecalis* biofilms in dentin canals. *J Endod.* 2014;40(4):509-14.

Dunavant TR, Regan JD, Glickman GN, Solomon ES, Honeyman AL. Comparative evaluation of endodontic irrigants against *Enterococcus faecalis* biofilms. *J Endod.* 2006;32(6):527-31.

Fabricius L, Dahlen G, Holm SE, Moller AJ. Influence of combinations of oral bacteria on periapical tissues of monkeys. *Scand J Dent Res.* 1982;90(3):200-6.

Ferreira FB, Campos Rabang HR, Pinheiro ET, Gade-Neto CR, Zaia AA, Ferraz CC, et al. Root canal microbiota of dogs' teeth with periapical lesions induced by two different methods. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006;102(4):564-70.

Ferreira FB, Torres SA, Rosa OP, Ferreira CM, Garcia RB, Marcucci MC, et al. Antimicrobial effect of propolis and other substances against selected endodontic pathogens. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2007;104(5):709-16.

Fosse T, Madinier I, Hitzig C, Charbit Y. Prevalence of beta-lactamase-producing strains among 149 anaerobic gram-negative rods isolated from periodontal pockets. *Oral Microbiol Immunol.* 1999;14(6):352-7.

Fouad AF, Barry J, Caimano M, Clawson M, Zhu Q, Carver R, et al. PCR-based identification of bacteria associated with endodontic infections. *J Clin Microbiol.* 2002;40(9):3223-31.

Goldstein EJ, Citron DM, Merriam CV, Warren Y, Tyrrell K. Activities of telithromycin (HMR 3647, RU 66647) compared to those of erythromycin, azithromycin, clarithromycin, roxithromycin, and other antimicrobial agents against unusual anaerobes. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999;43(11):2801-5.

Gomes BP, Endo MS, Martinho FC. Comparison of endotoxin levels found in primary and secondary endodontic infections. *J Endod.* 2012;38(8):1082-6.

Gomes BP, Jacinto RC, Montagner F, Sousa EL, Ferraz CC. Analysis of the antimicrobial susceptibility of anaerobic bacteria isolated from endodontic infections in Brazil during a period of nine years. *J Endod.* 2011;37(8):1058-62.

Gomes BP, Lilley JD, Drucker DB. Variations in the susceptibilities of components of the endodontic microflora to biomechanical procedures. *Int Endod J.* 1996a;29(4):235-41.

Gomes BP, Lilley JD, Drucker DB. Clinical significance of dental root canal microflora. *J Dent.* 1996b;24(1-2):47-55.

Gomes BP, Pinheiro ET, Gade-Neto CR, Sousa EL, Ferraz CC, Zaia AA, et al. Microbiological examination of infected dental root canals. *Oral Microbiol Immunol.* 2004;19(2):71-6.

Grad HA. Antibiotics in endodontics: therapeutic considerations. *Alpha Omegan.* 1997;90(4):64-72.

Groppi FC, Del Fiol FS, Andrade ED. Profilaxia e tratamento das infecções bacterianas. In: Andrade ED (organizador). *Terapêutica Medicamentosa em Odontologia*. 2. ed. São Paulo: Artes Médicas; 2006. p. 61-93.

Grossman LI. Origin of microorganisms in traumatized, pulpless, sound teeth. *J Dent Res.* 1967;46(3):551-3.

Guerreiro-Tanomaru JM, de Faria-Junior NB, Duarte MA, Ordinola-Zapata R, Graeff MS, Tanomaru-Filho M. Comparative analysis of *Enterococcus faecalis* biofilm formation on different substrates. *J Endod.* 2013;39(3):346-50.

Haapasalo M. Black-pigmented gram-negative anaerobes in endodontic infections. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 1993;6(2-3):213-7.

Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res.* 1996;6(10):986-94.

Jacinto RC, Montagner F, Signoretti FG, Almeida GC, Gomes BP. Frequency, microbial interactions, and antimicrobial susceptibility of *Fusobacterium nucleatum* and *Fusobacterium necrophorum* isolated from primary endodontic infections. *J Endod.* 2008;34(12):1451-6.

Jung IY, Choi BK, Kum KY, Roh BD, Lee SJ, Lee CY, et al. Molecular epidemiology and association of putative pathogens in root canal infection. *J Endod.* 2000;26(10):599-604.

Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The Effects of Surgical Exposures of Dental Pulps in Germ-Free and Conventional Laboratory Rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1965;20:340-9.

Kapatral V, Anderson I, Ivanova N, Reznik G, Los T, Lykidis A, et al. Genome sequence and analysis of the oral bacterium *Fusobacterium nucleatum* strain ATCC 25586. *J Bacteriol.* 2002;184(7):2005-18.

Kaplan A, Kaplan CW, He X, McHardy I, Shi W, Lux R. Characterization of *aid1*, a novel gene involved in *Fusobacterium nucleatum* interspecies interactions. *Microb Ecol.* 2014;68(2):379-87.

Khemaleelakul S, Baumgartner JC, Pruksakorn S. Identification of bacteria in acute endodontic infections and their antimicrobial susceptibility. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2002;94(6):746-55.

Kolenbrander PE. Surface recognition among oral bacteria: multigeneric coaggregations and their mediators. *Crit Rev Microbiol.* 1989;17(2):137-59.

Kuriyama T, Williams DW, Yanagisawa M, Iwahara K, Shimizu C, Nakagawa K, et al. Antimicrobial susceptibility of 800 anaerobic isolates from patients with dentoalveolar infection to 13 oral antibiotics. *Oral Microbiol Immunol.* 2007;22(4):285-8.

Lana MA, Ribeiro-Sobrinho AP, Stehling R, Garcia GD, Silva BK, Hamdan JS, et al. Microorganisms isolated from root canals presenting necrotic pulp and their drug susceptibility in vitro. *Oral Microbiol Immunol.* 2001;16(2):100-5.

Macia MD, Perez JL, Molin S, Oliver A. Dynamics of mutator and antibiotic-resistant populations in a pharmacokinetic/pharmacodynamic model of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm treatment. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55(11):5230-7.

Macia MD, Rojo-Molinero E, Oliver A. Antimicrobial susceptibility testing in biofilm-growing bacteria. *Clin Microbiol Infect*. 2014;20(10):981-90.

Moller AJ, Fabricius L, Dahlen G, Ohman AE, Heyden G. Influence on periapical tissues of indigenous oral bacteria and necrotic pulp tissue in monkeys. *Scand J Dent Res*. 1981;89(6):475-84.

Miller WD. An introduction to the study of the bacteriopathology of the dental pulp. *Dent Cosmos* 1894;36:505-27

Montagner F, Gomes BP, Kumar PS. Molecular fingerprinting reveals the presence of unique communities associated with paired samples of root canals and acute apical abscesses. *J Endod*. 2010;36(9):1475-9.

Moraes SR, Siqueira JF, Jr., Colombo AP, Rocas IN, Ferreira MC, Domingues RM. Comparison of the effectiveness of bacterial culture, 16S rDNA directed polymerase chain reaction, and checkerboard DNA-dNA hybridization for detection of *Fusobacterium nucleatum* in endodontic infections. *J Endod*. 2002;28(2):86-9.

Mulet X, Moya B, Juan C, Macia MD, Perez JL, Blazquez J, et al. Antagonistic interactions of *Pseudomonas aeruginosa* antibiotic resistance mechanisms in planktonic but not biofilm growth. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55(10):4560-8.

Munson MA, Pitt-Ford T, Chong B, Weightman A, Wade WG. Molecular and cultural analysis of the microflora associated with endodontic infections. *J Dent Res*. 2002;81(11):761-6.

Nair PN, Sjogren U, Krey G, Kahnberg KE, Sundqvist G. Intraradicular bacteria and fungi in root-filled, asymptomatic human teeth with therapy-resistant periapical lesions: a long-term light and electron microscopic follow-up study. *J Endod*. 1990;16(12):580-8.

Okamoto AC, Gaetti-Jardim E, Jr., Cai S, Avila-Campos MJ. Influence of antimicrobial subinhibitory concentrations on hemolytic activity and bacteriocin-like substances in oral *Fusobacterium nucleatum*. *New Microbiol*. 2000;23(2):137-42.

Ordinola-Zapata R, Bramante CM, García-Godoy F, Moldauer BI, Minotti PG, Terci LIAGL, et al. The effect of radiopacifiers agents on pH, calcium release, radiopacity, and antimicrobial properties of different calcium hydroxide dressings. *Microsc Res Tech*. 2015.

Ozok AR, Wu MK, Luppens SB, Wesselink PR. Comparison of growth and susceptibility to sodium hypochlorite of mono- and dual-species biofilms of *Fusobacterium nucleatum* and *Peptostreptococcus (micromonas) micros*. *J Endod*. 2007;33(7):819-22.

Paiva SS, Siqueira JF, Jr., Rocas IN, Carmo FL, Leite DC, Ferreira DC, et al. Molecular microbiological evaluation of passive ultrasonic activation as a supplementary disinfecting step: a clinical study. *J Endod*. 2013;39(2):190-4.

Pieralisi FJ, Rodrigues MR, Segura VG, Maciel SM, Ferreira FB, Garcia JE, et al. Genotypic Diversity of *Streptococcus mutans* in Caries-Free and Caries-Active Preschool Children. *Int J Dent*. 2010;2010:824976.

Pinheiro ET, Gomes BP, Ferraz CC, Teixeira FB, Zaia AA, Souza Filho FJ. Evaluation of root canal microorganisms isolated from teeth with endodontic failure and their antimicrobial susceptibility. *Oral Microbiol Immunol*. 2003;18(2):100-3.

Pitts B, Hamilton MA, Zilver N, Stewart PS. A microtiter-plate screening method for biofilm disinfection and removal. *J Microbiol Methods*. 2003;54(2):269-76.

Ricucci D, Siqueira JF, Jr., Bate AL, Pitt Ford TR. Histologic investigation of root canal-treated teeth with apical periodontitis: a retrospective study from twenty-four patients. *J Endod*. 2009;35(4):493-502.

Rocas IN, Alves FR, Santos AL, Rosado AS, Siqueira JF, Jr. Apical root canal microbiota as determined by reverse-capture checkerboard analysis of cryogenically ground root samples from teeth with apical periodontitis. *J Endod*. 2010;36(10):1617-21.

Rocas IN, Baumgartner JC, Xia T, Siqueira JF, Jr. Prevalence of selected bacterial named species and uncultivated phylotypes in endodontic abscesses from two geographic locations. *J Endod*. 2006;32(12):1135-8.

Rocas IN, Siqueira JF, Jr. Root canal microbiota of teeth with chronic apical periodontitis. *J Clin Microbiol*. 2008;46(11):3599-606.

Rocas IN, Siqueira JF, Jr. Characterization of microbiota of root canal-treated teeth with posttreatment disease. *J Clin Microbiol*. 2012;50(5):1721-4.

Rocha H. Normas para a seleção de antibióticos para uso clínico. In: Silva P (organizador). Farmacologia. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 2002. p. 960-967.

Sakamoto M, Rocas IN, Siqueira JF, Jr., Benno Y. Molecular analysis of bacteria in asymptomatic and symptomatic endodontic infections. *Oral Microbiol Immunol.* 2006;21(2):112-22.

Sena NT, Gomes BP, Vianna ME, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CC, et al. In vitro antimicrobial activity of sodium hypochlorite and chlorhexidine against selected single-species biofilms. *Int Endod J.* 2006;39(11):878-85.

Siqueira JF, Jr. Endodontic infections: concepts, paradigms, and perspectives. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2002;94(3):281-93.

Siqueira JF, Jr., Rocas IN. Exploiting molecular methods to explore endodontic infections: Part 1--current molecular technologies for microbiological diagnosis. *J Endod.* 2005;31(6):411-23.

Siqueira JF, Jr., Rocas IN. Diversity of endodontic microbiota revisited. *J Dent Res.* 2009a;88(11):969-81.

Siqueira Jr, JF, Rôças, IN. Update on endodontic microbiology: candidate pathogens and patterns of colonization. *ENDO (Lond Engl)* 2008;2(1)7-20

Siqueira JF, Jr., Rocas IN. The microbiota of acute apical abscesses. *J Dent Res.* 2009b;88(1):61-5.

Siqueira JF, Jr., Rocas IN. Microbiology and treatment of acute apical abscesses. *Clin Microbiol Rev.* 2013;26(2):255-73.

Siqueira JF, Jr., Rocas IN, Paiva SS, Magalhaes KM, Guimaraes-Pinto T. Cultivable bacteria in infected root canals as identified by 16S rRNA gene sequencing. *Oral Microbiol Immunol.* 2007;22(4):266-71.

Siqueira JF, Jr., Rocas IN, Rosado AS. Investigation of bacterial communities associated with asymptomatic and symptomatic endodontic infections by denaturing gradient gel electrophoresis fingerprinting approach. *Oral Microbiol Immunol.* 2004;19(6):363-70.

Siqueira JF, Jr., Rocas IN, Souto R, Uzeda M, Colombo AP. Microbiological evaluation of acute periradicular abscesses by DNA-DNA hybridization. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2001;92(4):451-7.

Siqueira JF, Jung IY, Rocas IN, Lee CY. Differences in prevalence of selected bacterial species in primary endodontic infections from two distinct geographic locations. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2005;99(5):641-7.

Sjogren U, Figdor D, Spangberg L, Sundqvist G. The antimicrobial effect of calcium hydroxide as a short-term intracanal dressing. *Int Endod J.* 1991;24(3):119-25.

Sousa EL, Gomes BP, Jacinto RC, Zaia AA, Ferraz CC. Microbiological profile and antimicrobial susceptibility pattern of infected root canals associated with periapical abscesses. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2013;32(4):573-80.

Stipp RN, Goncalves RB, Hofling JF, Smith DJ, Mattos-Graner RO. Transcriptional analysis of *gtfB*, *gtfC*, and *gbpB* and their putative response regulators in several isolates of *Streptococcus mutans*. *Oral Microbiol Immunol.* 2008;23(6):466-73.

Sundqvist G. Ecology of the root canal flora. *J Endod.* 1992a;18(9):427-30.

Sundqvist G. Associations between microbial species in dental root canal infections. *Oral Microbiol Immunol.* 1992b;7(5):257-62.

Sundqvist G. Taxonomy, ecology, and pathogenicity of the root canal flora. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1994;78(4):522-30.

Sundqvist G, Figdor D. Life as an endodontic pathogen. Ecological differences between the untreated and root-filled root canals. *Endod Topics* 2003;6:3–28

Syed SA, Loesche WJ. Survival of human dental plaque flora in various transport media. *Appl Microbiol.* 1972;24(4):638-44.

van Winkelhoff AJ, Carlee AW, de Graaff J. *Bacteroides endodontalis* and other black-pigmented *Bacteroides* species in odontogenic abscesses. *Infect Immun.* 1985;49(3):494-7.

van Winkelhoff AJ, Herrera D, Oteo A, Sanz M. Antimicrobial profiles of periodontal pathogens isolated from periodontitis patients in The Netherlands and Spain. *J Clin Periodontol.* 2005;32(8):893-8.

Vianna ME, Horz HP, Gomes BP, Conrads G. In vivo evaluation of microbial reduction after chemo-mechanical preparation of human root canals containing necrotic pulp tissue. *Int Endod J*. 2006;39(6):484-92.

Voha C, Docquier JD, Rossolini GM, Fosse T. Genetic and biochemical characterization of FUS-1 (OXA-85), a narrow-spectrum class D beta-lactamase from *Fusobacterium nucleatum* subsp. *polymorphum*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;50(8):2673-9.

Wang L, Dong M, Zheng J, Song Q, Yin W, Li J, et al. Relationship of biofilm formation and *gelE* gene expression in *Enterococcus faecalis* recovered from root canals in patients requiring endodontic retreatment. *J Endod*. 2011;37(5):631-6.

Whiteley M, Bangera MG, Bumgarner RE, Parsek MR, Teitzel GM, Lory S, et al. Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nature*. 2001;413(6858):860-4.

Wynn RL, Bergman SA. Antibiotics and their use in the treatment of orofacial infections, Part I. *Gen Dent*. 1994;42(5):398, 400, 2.

Anexos

ANEXO A – Aprovação Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE BAURU-

PROJETO DE PESQUISA

Título: Expressão gênica de fatores de virulência de isolados clínicos de *Fusobacterium nucleatum***Área Temática:****Versão:** 1**CAAE:** 03228112.4.0000.5417**Pesquisador:** Raquel Zanin Midera**Instituição:** Faculdade de Odontologia de Bauru-USP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Número do Parecer: 85623**Data da Relatoria:** 29/08/2012**Apresentação do Projeto:**

Título: Expressão gênica de fatores de virulência de isolados clínicos de *Fusobacterium nucleatum*
O projeto tem uma apresentação bastante detalhada, faz parte de duas propostas aprovadas, uma da CAPES (Projeto multiusuário com a finalidade de aquisição de equipamento para Microbiologia) e outra da FAPESP (Projeto de estudo de fatores de adesão e biofilmes de m.o. de canais radiculares). Será parcialmente desenvolvido em parceria com o Prof. Carlos F. dos Santos (etapa da biologia molecular).

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar a expressão gênica de fatores de adesão e de resistência de *Fusobacterium nucleatum* isolados de canais radiculares, na forma planctônica ou organizados em biofilme, em comparação com a cepa padrão da ATCC.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não há riscos previsíveis associados à pesquisa. O sujeito da pesquisa será beneficiado com o tratamento endodôntico.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de um trabalho investigativo envolvendo tecnologia em biologia molecular, que permitirá avanços no conhecimento de um determinado micorganismo participante da microbiota endodôntica e de seu comportamento, que propiciará melhores modelos de estudo antimicrobianos para uso futuro, além do maior conhecimento da sua virulência.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados todos os documentos obrigatórios. Contudo, com relação ao relatório e ao projeto, existem pontos discordantes que devem ser revistos e corrigidos, conforme descrição detalhada nos campos abaixo.

Recomendações:

Recomendações: São feitas algumas sugestões aos autores:

- 1- preencher todos os tópicos corretamente: na apresentação do projeto há alguns tópicos sem preenchimento, como acrônimo do Título; Expansão do Acrônimo do Título; no Tópico Desenho do Estudo/Apoio Financeiro: Desenho do Estudo; no Tópico Condições de saúde ou problemas e no Tópico Desfeitos Gerais/Específico para as Condições de saúde; haverá grupos placebo ou sem intervenção; se haverá washout;
- 2- não coincidem as palavras chaves do Projeto(6) e a colocada no relatório (1), que aliás não consta

Endereço: DOUTOR OCTAVIO PINHEIRO BRISOLLA 75 QUADRA II**Bairro:** VILA NOVA CIDADE UNIVERSITÁRIA **CEP:** 17.012-901**UF:** SP **Município:** BAURU**Telefone:** (14)3235-8358**Fax:** (14)3235-8358**E-mail:** mferret@fob.usp.br

**FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE BAURU-**

na relação do projeto;

3- não aparece no texto do projeto os critérios de Inclusão/exclusão e, no relatório não aparece critérios de exclusão. Portanto surgiu a DÚVIDA: se o paciente estivesse tomando antibiótico, ainda assim ele seria incluído na pesquisa, visto que um dos objetivos específicos é testar a resistência bacteriana contra alguns antibióticos?

4-Cronograma: corrigir as datas em função das pendências apontadas acima. Ele só consta no Relatório;

5-a descrição do orçamento só aparece no Relatório e não no projeto;

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Este é um projeto de relevância indiscutível na endodontia, com possibilidades de contribuir significativamente para o conhecimento de aspectos da resistência e virulência de um dos microrganismos mais frequentes nos canais radiculares infectados. Algumas falhas no entanto foram identificadas e, merecem uma reavaliação dos autores:

1-tópicos sem preenchimento;

2-palavras chaves não coincidentes entre relatório e projeto;

3-rever os critérios de Inclusão/exclusão;

4-corrigir o cronograma.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O CEP considerou o projeto aprovado.

BAURU, 30 de Agosto de 2012

Assinado por:
Maria Teresa Atta

Endereço: DOUTOR OCTAVIO PINHEIRO BRISOLLA 75 QUADRA II
Bairro: VILA NOVA CIDADE UNIVERSITARIA CEP: 17.012-901
UF: SP Município: BAURU
Telefone: (14)3235-8358 Fax: (14)3235-8358 E-mail: inf@fob.usp.br

ANEXO 2: Termo de consentimento livre e esclarecido

**Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru****Departamento de Dentística, Endodontia e Materiais Odontológicos**
Disciplina de Endodontia **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO****Projeto: Expressão gênica de fatores de virulência de isolados clínicos de
*Fusobacterium nucleatum***

Este trabalho tem o objetivo de estudar as bactérias encontradas nos dentes que precisam do tratamento de canal. Descobrir estas bactérias, elas serão estudadas em laboratório, para conhecer como elas se instalam nos dentes e qual o melhor método de combatê-las. As bactérias serão retiradas de canais radiculares dos dentes de pacientes adultos. Serão realizados:

- Exame da boca para verificar as condições de seus dentes,
- Tratamento de canal,
- Coletas de material do canal durante o tratamento.

O sujeito da pesquisa será beneficiado com o tratamento de canal, realizado normalmente na clínica de Endodontia. A coleta do conteúdo do canal (por exemplo, o pus) será feita com um pedaço de papel especial esterilizado introduzido no canal, sendo um processo indolor. Esta coleta levará apenas alguns minutos (aproximadamente 5 minutos) e não interferirá em nada no andamento do tratamento. Será realizada uma única coleta em cada paciente.

Caso o paciente sinta dor, não será devido a esta coleta, mas sim pelo fato do dente já se encontrar contaminado e inflamado. O desconforto pode ocorrer independentemente de se realizar a coleta.

O paciente tem toda a liberdade de pedir esclarecimentos sobre a metodologia antes e durante a pesquisa, podendo ou não concordar em participar. O tratamento de canal será o mesmo, caso o paciente não aceite ceder o material de dentro do canal para a pesquisa, ou seja, não haverá prejuízo ao seu tratamento, o qual prosseguirá normalmente.

Universidade de São Paulo Faculdade de Odontologia de Bauru

Departamento de Dentística, Endodontia e Materiais Odontológicos

Disciplina de Endodontia

O tratamento endodôntico (tratamento de canal de rotina) será realizado na clínica de Endodontia da Faculdade de Odontologia de Bauru – USP. Todos os procedimentos descritos já foram amplamente utilizados nas clínicas e em pesquisas científicas. Não haverá gastos adicionais, e os pesquisadores garantem não haver riscos ou desconforto de qualquer natureza para os participantes, além de responderem pelo caráter confidencial das informações. Os dados da pesquisa serão divulgados sem a nominação dos pacientes e os pesquisadores comprometem-se a fornecer aos entrevistados todas as informações obtidas durante a pesquisa, através do telefone 97027738 (Raquel).

Não há riscos previsíveis associados à pesquisa, e, portanto não há previsão de indenização ou reparação de danos.

Qualquer denúncia ou reclamação deverá ser endereçada ao comitê de ética em pesquisa (CEP) da FOB-USP através do telefone 3235-8356 (Maristela) ou no endereço da Faculdade de Odontologia de Bauru, acima descrito.

Pelo presente instrumento que atende às exigências legais, o Sr. (a) _____, portador da cédula de identidade _____, após leitura minuciosa das informações constantes neste **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**, devidamente explicada pelos profissionais em seus mínimos detalhes, ciente dos serviços e procedimentos aos quais será submetido, não restando quaisquer dúvidas a respeito do lido e explicado, firma seu **CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO** concordando em participar da pesquisa proposta.

Fica claro que o sujeito da pesquisa ou seu representante legal, pode a qualquer momento retirar seu **CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO** e deixar de participar

Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-901 – C.P. 73

e-mail: srbettio@fob.usp.br – Fone (0xx14) 3235-8344

<http://www.fob.usp.br>

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru

Departamento de Dentística, Endodontia e Materiais Odontológicos
Disciplina de Endodontia

desta pesquisa e ciente de que todas as informações prestadas tornar-se-ão confidenciais e guardadas por força de sigilo profissional (Art. 9º do Código de Ética Odontológica).

Por estarem de acordo assinam o presente termo.

Bauru-SP, _____ de _____ de _____.

Assinatura do Sujeito da Pesquisa

Raquel Zanin Midena
Pesquisadora/Doutoranda FOB-USP