JULIANA DA MOTA PAIVA

INFLUÊNCIA DE SUBSTÂNCIAS DO CIGARRO NO CRESCIMENTO PLANCTÔNICO E NA FORMAÇÃO DE BIOFILME DE *Fusobacterium nucleatum* E *Streptococcus sanguinis*

Dissertação apresentada à Universidade Guarulhos para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Área de Concentração: Periodontia

Orientadora: Profa. Dra. Luciene Cristina de Figueiredo

Co-Orientadora: Prof. Dra. Magda Feres

Guarulhos

2015

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Bibliotecas Fernando Gay da Fonseca

P146i

Paiva, Juliana da Mota
Influência de substâncias do cigarro no crescimento planctônico e na formação de biofilme de Fusobacterium nucleatum E Streptococcus sanguinis/ Juliana da Mota Paiva. -- 2015.
44 f.; 31 cm.

Orientadora: Profa. Dra. Luciene Cristina de Figueiredo

Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Centro de Pós Graduação e Pesquisa, Universidade Guarulhos, Guarulhos, SP, 2015.

1. Biofilme 2. Nicotina 3. Cotinina 4. Extrato da fumaça de cigarro 5. Crescimento bacteriano I. Título II. Figueiredo, Luciene Cristina de, (Orientadora). III. Universidade Guarulhos.

CDD. 617.6

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de MESTRADO, intitulada "INFLUÊNCIA DE SUBSTÂNCIAS DO CIGARRO NO FENÓTIPO PLANCTÔNICO E NA FORMAÇÃO DE BIOFILME DE *FUSOBACTERIUM NUCLEATUM* E *STREPTOCOCCUS SANGUINIS*" em sessão pública realizada em 07 de maio de 2015, considerou a candidata JULIANA DA MOTA PAIVA aprovada.

COMISSÃO EXAMINADORA:

1. Profa. Dra. Luciene Cristina de Figueiredo (UnG)_____

2. Profa. Dra. Priscila Larcher Longo (USP)_____

3. Profa. Dra. Poliana Mendes Duarte (UnG)_____

Guarulhos, 07 de maio de 2015.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me guiar, abençoando e iluminando meus caminhos.

À minha querida família, minha mãe e meu pai, pela dedicação, incentivo e amor incondicional, sempre me apoiando em todas as etapas da minha vida, meus irmãos, pelo companheirismo, amizade, carinho e por estarem presentes nos bons e maus momentos da minha vida e Gustavo, pelo apoio nos momentos de dificuldade e compreensão pelos momentos de ausência.

À minha orientadora, professora Luciene Cristina de Figueiredo pela oportunidade de realizar este trabalho, pelos ensinamentos e conselhos, pela paciência, pela atenção e valiosa orientação.

Ao professor Marcelo Faveri, sempre disposto a ajudar. Seus ensinamentos e contribuições foram importantíssimos para a conclusão deste trabalho.

À Prof. Dra. Marcia P. Alves Mayer por me receber em seu laboratório e ceder parte do seu tempo à dedicação desta pesquisa.

À Dra. Priscila Larcher Longo pela maneira que compartilhou seus conhecimentos e me guiou na execução desse projeto.

Aos professores da UnG que contribuíram dividindo seus conhecimentos, permitindo a finalização deste projeto.

Aos colegas da turma e aos colegas da USP pela paciência, pelos materiais e troca de experiências, tanto profissionais quanto pessoais, tornando prazeroso o convívio durante todo o curso.

Aos funcionários da UnG e do ICB 2 pela sua ajuda, generosidade e prestatividade.

Enfim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a concretização deste trabalho, meu MUITO OBRIGADA!

A morte de um homem começa no instante
em que ele desiste de aprender"

Albino Teixeira

RESUMO

A periodontite crônica é uma doença infecto-inflamatória causada principalmente por bactérias que estimulam a resposta imune do hospedeiro, causando assim uma destruição progressiva do periodonto de sustentação. O fumo é um importante fator de risco para a doença periodontal. O objetivo desse estudo foi avaliar o crescimento planctônico e a formação do biofilme das espécies individuais *Fusobacterium nucleatum* e *Streptococcus sanguinis*, bem como a associação das duas espécies quando expostas a um meio de cultura com nicotina, cotinina ou extrato da fumaça do cigarro (EFC). Para tal finalidade, foi feito o estabelecimento das condições de cultivo e curva de crescimento de *S. sanguinis* e do *F. nucleatum* em meio BHI. Logo em seguida, houve a padronização da curva crescimento do *S. sanguinis* e do *F. nucleatum* em meios BHI acrescido de extrato da fumaça do cigarro, cotinina ou nicotina e, foi realizada a viabilidade celular do *S. sanguinis* e *F. nucleatum* em todos os meios testados. As mensurações foram realizadas por meio de espectrofotômetro e contagem de unidades formadoras de colônias. A formação do biofilme das duas espécies foi avaliada em modelos mono e duo-espécie. A avaliação do crescimento planctônico das espécies, bem como da formação de biofilme foi caracterizada pela avaliação no espectrofotômetro. Os resultados não demonstraram diferenças no crescimento planctônico das espécies nos meios testados e o meio não influenciou na viabilidade celular do *S. sanguinis* e do *F. nucleatum*. Após 24 h não houve diferença na formação dos biofilmes. Em 48h observou-se o maior nível para o crescimento em biofilme de *F. nucleatum* no meio BHI puro quando comparado com os diferentes meios de cultura ($p < 0,05$). Conclui-se que a nicotina, cotinina e o extrato da fumaça do cigarro não influenciaram de modo expressivo o crescimento de *S. sanguinis* e *F. nucleatum.*

Palavras chaves: Biofilme, Nicotina, Cotinina, Extrato da fumaça de cigarro, Crescimento bacteriano.

ABSTRACT

Chronic periodontitis is an infectious inflammatory disease primarily caused by bacteria that stimulates the host immune response, thereby causing a progressive destruction of the supporting periodontium. Smoking is an important risk factor for periodontal disease. The aim of this study was evaluate the planktonic growth and biofilm formation of individual species *Fusobacterium nucleatum* and *Streptococcus sanguinis*, and the association of the two species when exposed to a culture medium with nicotine, cotinine or cigarette smoke extract (CSE). For this purpose, the establishment of culture conditions and growth curve of *S. sanguinis* and *F. nucleatum* in BHI medium was determined. Just then, there was the standardization of the growth curve of *S. sanguinis* and *F. nucleatum* in BHI + cigarette smoke extract, cotinine or nicotine medium and cell viability of *S. sanguinis* and *F. nucleatum* was held in all tested media. The measurements were made by means of a spectrophotometer and counting colony forming units. The biofilm formation of both species was evaluated in single and dual-species models. The assessment of planktonic growth of the species, as well as the biofilm formation was characterized by evaluating in the spectrophotometer. The results showed no differences in planktonic growth of the species in the tested media and the medium had no effect on cell viability of *S. sanguinis* and *F. nucleatum*. After 24 hours there was no difference in the biofilm formation. In 48 hours there was a statistically significant increase in the *F. nucleatum* biofilm growth in the media BHI pure when compared to the different culture media. It is concluded that nicotine, cotinine and cigarette smoke extract did not affect expressively the growth of *S. sanguinis* and *F. nucleatum*.

Key words: Biofilm, Nicotine, Cotinine, Cigarette smoke extract, Bacterial growth.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01	Aparato utilizado para a confecção do meio BHI + EFC.....	22
Figura 02	Curva de crescimento da amostra de *S. sanguinis*.....	29
Figura 03	Representação gráfica do crescimento da amostra de *S. sanguinis* cultivada em BHI, BHI + EFC, BHI + Nicotina e BHI + Cotinina em relação ao tempo.....	29
Figura 04	Curva de crescimento da amostra de *F. nucleatum*.....	30
Figura 05	Representação gráfica do crescimento da amostra de *F. nucleatum* cultivada em BHI, BHI + EFC, BHI + Nicotina e BHI + Cotinina em relação ao tempo.....	30
Figura 06	Contagem de unidades formadoras de colônias de *S. sanguinis* expostos aos diferentes meios de cultura.....	31
Figura 07	Contagem de unidades formadoras de colônias de *F. nucleatum* expostos aos diferentes meios de cultura.....	31
Figura 08	Níveis de absorbância do crescimento em biofilme de *S. sanguinis*, *F. nucleatum* e da associação das duas espécies em 24 horas, expostos aos diferentes meios de cultura.....	32
Figura 09	Níveis de absorbância do crescimento em biofilme de *S. sanguinis*, *F. nucleatum* e da associação das duas espécies em 48 horas, expostos aos diferentes meios de cultura.....	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Disposição das amostras na placa de 96 poços..... 26

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO..... 11

1.1 Etiologia da doença periodontal..... 12

1.2 Tabagismo e doença periodontal..... 15

2. PROPOSIÇÃO..... 19

3. MATERIAIS E MÉTODOS..... 20

3.1 Estabelecimento das condições de cultivo e curva de crescimento de *S. sanguinis*..... 20

3.2 Estabelecimento das condições de cultivo e curva de crescimento de *F. nucleatum*..... 21

3.3 Padronização da curva de crescimento de *S. sanguinis* e *F. nucleatum* em BHI acrescido de extrato de fumaça de cigarro (EFC)..... 22

3.4 Padronização da curva de crescimento de *S. sanguinis* em BHI acrescido de EFC (BHI + EFC)..... 23

3.5 Padronização da curva de crescimento de *F. nucleatum* em BHI acrescido de EFC (BHI + EFC)..... 23

3.6 Padronização da curva de crescimento de *S. sanguinis* e *F. nucleatum* em BHI acrescido de cotinina e nicotina..... 24

3.7 Viabilidade celular do *S. sanguinis* e *F. nucleatum* em BHI, BHI + EFC 1:8; BHI + cotinina 1µg/mL e BHI + nicotina 1µg/mL..... 25

3.8 Avaliação da formação do biofilme mono-espécie e duo-espécie..... 25

3.8.1 Preparo das placas de formação de biofilme..... 25

3.8.2 Análise da formação de biofilme..... 27

3.9 Análise estatística..... 27

4. RESULTADOS..... 28

4.1 Curvas de crescimento para o *S. sanguinis*..... 28

4.2 Curvas de crescimento para o *F. nucleatum*..... 28

4.3 Análise da contagem de unidades formadoras de colônias para *S. sanguinis* e *F. nucleatum*..... 31

4.4 Avaliação da formação do biofilme..... 32

5. DISCUSSÃO..... 34

6. CONCLUSÃO..... 38

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 39

1 INTRODUÇÃO

As doenças periodontais são doenças infecto-inflamatórias causadas por microrganismos presentes no ambiente bucal e estima-se que a cavidade bucal possa ser colonizada por aproximadamente 700 espécies bacterianas. Essas bactérias normalmente possuem uma relação de equilíbrio com o hospedeiro. Porém, quando o equilibrio é rompido, um subgrupo de espécies bacterianas com propriedades de destruição periodontal pode aumentar em número, causando um desequilíbrio nessa relação (Baek et al., 2012). Esse desequilíbrio na microbiota oral, também conhecido como disbiose, leva a uma série de doenças bucais. As comunidades microbianas disbióticas demostram interações de sinergismo para aumentar a proteção contra as defesas do hospedeiro, para adquirir nutrientes e manter o ambiente favorável ao seu desenvolvimento (Yost et al., 2015).

A periodontite crônica (PC) é uma doença infecto-inflamatória causada principalmente por bactérias Gram-negativas presentes no biofilme bucal que estimulam a resposta imune do hospedeiro, causando assim uma destruição progressiva do periodonto de sustentação. O principal objetivo da terapia periodontal é a redução dos níveis das bactérias patogênicas e consequentemente uma recolonização pelas espécies bacterianas benéficas, reestabelecendo assim um equilíbrio entre a resposta imune do hospedeiro e a presença bacteriana (Lindhe et al., 2010).

Apesar de ainda não estar claro o papel de todas as espécies bacterianas no desenvolvimento da doença periodontal, algumas espécies são consideradas como patógenos principais (ex. *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* e *Tannerella forsythia)*. No entanto, outras espécies, como *Streptococcus constellatus, Campylobacter rectus, Campylobacter showae, Campylobacter gracilis, Prevotella intermedia, Eubacterium nodatum, Prevotella nigrescens, Peptostreptococcus micra, Fusobacterium nucleatum e Fusobacterium periodonticum* desempenham um importante papel no estabelecimento e na progressão da doença, tornando o meio mais favorável ao aparecimento dos principais periodontopatógenos (Socransky et al., 1998).

Semelhante a outras doenças infecciosas, alguns fatores podem agravar a progressão da doença periodontal. Um importante fator de risco para a doença

periodontal é o tabagismo. Kim et al. (2004) descreveram que indivíduos tabagistas possuem de 2,0 a 8,0 vezes mais probabilidade de desenvolver a doença quando comparados com indivíduos não-tabagistas. Além disso, indivíduos tabagistas com doença periodontal apresentam maior perda óssea, maior perda de inserção clínica, bolsas periodontais mais profundas e menos sangramento gengival quando comparado com indivíduos não tabagistas (Lindhe et al., 2010). O fumo parece afetar os tecidos bucais pela alteração do calibre dos vasos sanguíneos (Mirbod et al., 2001); na resposta inflamatória (Rezavandi et al., 2002), na resposta imune, na alteração da homeostase e do processo de reparo (Typton; Dabbous, 1995; Checci et al., 1999) e pela alteração do ecossistema bucal, como por exemplo, fatores bióticos e abióticos (Umeda et al., 1998). Porém, a relação entre o cigarro e seus componentes e a microbiota subgengival ainda não é clara e há poucos estudos associando os efeitos diretos e indiretos da nicotina, da cotinina e da fumaça do cigarro nas bactérias periodontais patogênicas.

1.1 Etiologia da doença periodontal

O biofilme dental é constituído principalmente por depósitos bacterianos específicos e compostos salivares. Esses microorganismos são apontados como os principais causadores das doenças bucais como a cárie, a doença periodontal e as estomatites (Rosan; Lamont, 2000). O início e a progressão da doença periodontal acontecem devido a alterações na sucessão bacteriana e nas características do biofilme dental. Os primeiros colonizadores do biofilme são predominantemente microrganismos anaeróbios facultativos Gram-positivos, como as espécies do gênero *Streptococcus*. Eles são adsorvidos nas superfícies recobertas pela película adquirida do esmalte. Após a colonização inicial, bastonetes Gram-positivos, como os *Actinomyces* spp., começam a surgir e superam em número os *Streptococcus*. Essa colonização inicial é responsável pelo suporte estrutural do biofilme e favorece a chegada de outras espécies bacterianas (Mager et al., 2003; Socransky e Haffajee 2005). Receptores específicos nas superfícies dos cocos e dos bastonetes permitem a aderência de microrganismos que não conseguem se aderir diretamente à película adquirida como a *P. intermedia*, *Prevotella loescheii*, espécies de *Capnocytophaga*, *F. nucleatum* e *Veillonela.* Na sucessão ecológica do biofilme há uma alteração do meio aeróbio, para um meio altamente privado de oxigênio, com a predominância de

microrganismos Gram-negativos anaeróbios. Como resultado, há o surgimento de uma formação complexa de espécies bacterianas inter-relacionadas (Socransky et al., 1998). O acúmulo do biofilme na margem gengival leva a uma reação inflamatória nos tecidos gengivais e a disponibilidade de sangue e de componentes do fluido crevicular cervical favorece o aparecimento de espécies Gram-negativas com maior potencial patogênico.

No biofilme subgengival, há um acúmulo de microrganismos adjacentes ao material cuticular que recobre a superfície dentária e que compreendem os cocos Gram-positivos e Gram-negativos, bastonetes e organismos filamentosos. As espiroquetas e microrganismos flagelados são mais comuns na região apical do biofilme e se aderem frouxamente à parede de tecido mole da bolsa periodontal. Essas bactérias localizadas subgengivalmente tem a capacidade de colonizar os túbulos dentinários e favorecer uma nova colonização após o tratamento periodontal (Listegarten, 1976; Lindhe et al., 2010).

Essa característica mista da infecção periodontal foi estudada por Socransky et al. (1998). Foi observada uma associação não aleatória entre as bactérias presentes no biofilme e seis grupos microbianos foram reconhecidos e utilizados como um modelo de colonização subgengival. Os colonizadores primários são compostos pelos grupos das espécies de *Actinomyces*, pelo complexo amarelo (membros do gênero *Strepctococcus*), verde (espécies de *Capnocytophaga*, *A. actinomycetemcomitans*, *Eikenella corrodens* e *Campylobacter concisus*) e roxo (*Veilonella parvula* e *Actinomyces odontolyticus*). Esse complexo precede a colonização das bactérias dos complexos laranja (*S. constellatus, C. rectus, C. showae, C. gracilis, P. intermedia, E. nodatum, P. nigrescens, P. micra, F. nucleatum e F. periodonticum*) e vermelho (*P. gingivalis*, *T. denticola* e *T. forsythia*), que são as espécies consideradas como principais agentes etiológicos da doença periodontal.

No entanto, apesar dos complexos laranja e vermelho estarem intimamente relacionados ao início e progressão da doença periodontal, de acordo com a hipótese ecológica da placa (Marsh, 1991), a baixa proporção de bactérias benéficas também desempenha um papel importante no processo de doença. Essas bactérias podem ocupar um nicho que serviria de abrigo para as bactérias patogênicas e assim, inibir alguns patógenos através do metabolismo antagônico ou por inativação direta (Quirynen et al., 2001). Alguns *Streptococcus,* membros do

complexo amarelo têm demonstrado serem capazes de realizar esse papel, sendo assim, candidatos a fatores de proteção contra a periodontite.

O estudo de Stingu et al. (2008) analisou a prevalência dos *Streptococcus* orais em indivíduos com periodontite agressiva e indivíduos saudáveis, e relatou que somente o *Streptococcus sanguinis* demonstrou diferenças nas taxas de colonização entre os grupos, estando associado com a saúde periodontal. Já foi demonstrado previamente, que o *S. sanguinis* é uma bactéria benéfica na prevenção da cárie dentária, tendo uma relação de antagonismo com o *Streptococcus mutans* (Caufield et al., 2000; Kreth et al., 2005). Em relação à doença periodontal, alguns estudos têm relatado que o *S. sanguinis* é capaz de inibir o crescimento da *T. forsythia, P. intermedia* BS6 e *A. actinomycetemcomitans in vitro* (Hillman; Socransky, 1982; Hillman et al., 1985).

Várias espécies bacterianas têm sido identificadas como possíveis patógenos da doença periodontal, porém ainda não é claro o papel de todas elas no desenvolvimento da doença. Uma das bactérias mais estudadas relacionadas à doença periodontal é a *F. nucleatum*. Ela pertence à família Bacteroidaceae e é um microorganismo dominante no periodonto. O *F. nucleatum* é um bastonete fusiforme, anaeróbio, Gram-negativo que faz parte da microbiota subgengival (Lindhe et al., 2010). É considerada a espécie anaeróbica, Gram-negativa mais prevalente nos estágios tardios da doença e tem sido considerado um possível patógeno da doença periodontal (Socransky; Haffajee 2002). Alguns autores (Papapanou et al., 2000; Colombo et al., 2002; Socransky et al., 2002) relataram que a presença do *F. nucleatum* está associada principalmente a indivíduos apresentando periodontite e abcessos periodontais, e seus níveis foram reduzidos após a terapia periodontal (Haffajee et al., 2006).

Por ser um colonizador intermediário do biofilme dental e uma das primeiras espécies Gram-negativas a se estabilizarem, desempenham um importante papel nas interações entre as espécies Gram-positivas e Gram-negativas, contribuindo para o aparecimento de outras espécies anaeróbias (Kolenbrander, 2000 e Kolenbrander et al., 2002). Além disso, outros fatores de virulência dessa espécie contribuem para a importância do *F. nucletaum* na progressão da doença periodontal.

O papel do *F. nucleatum* nas doenças periodontais ainda não está completamente elucidado e há uma dúvida em classificar essa bactéria como um

microrganismo comensal devido ao seu baixo poder em induzir a resposta imune do hospedeiro e apresentar uma alta suscetibilidade às citocinas (β-defensinas, LL-37) e à fagocitose, ou periodontopatogênico, pois tem capacidade de induzir resposta inflamatória pela regulação positiva de citocinas pró-inflamatórias e das metaloproteinases. Han et al. (2000) demonstraram *in vitro* que houve um aumento na produção de interleucina (IL)-8 pelas células epiteliais expostas à essa espécie, sugerindo um potencial desses bastonetes de invasão celular. Além disso, é um dos maiores indutores de colagenase 3, uma potente matriz de metaloproteinase, a nível de mRNA, pelas células epiteliais. Isso sugere que o *F. nucleatum* ativa múltiplos sinalizadores celulares que estimulam a expressão da colagenase 3 e aumenta a migração e sobrevivência das células epiteliais infectadas (Uitto et al., 2005). Outros estudos (Sheikhi et al., 2000; Jewet et al., 2001; Bachrach et al., 2004) demonstraram que a espécie é capaz de induzir a morte celular por apoptose em células mononucleares e polimorfonucleares (PMN), induzir a liberação de citocinas, elastase e radicais livres de leucócitos e secretar uma protease serina 65KDa. Essa protease, capaz de degradar proteínas nativas, participa ativamente do processo de nutrição e patogenicidade dessa bactéria. A degradação da matriz extracelular contribui para o dano ao tecido periodontal e a degradação da imunoglobulina (Ig) A auxilia na invasão do sistema imune do hospedeiro pelo microrganismo.

1.2 Tabagismo e doença periodontal

O tabagismo é um reconhecido fator de risco para o desenvolvimento da doença periodontal e compromete a resposta do paciente ao tratamento (Kim et al., 2004; Johnson; Hill, 2004). Muitas hipóteses têm sido levantadas a respeito do uso do tabaco na doença periodontal. Acredita-se que o tabaco pode afetar tanto os patógenos quanto o seu habitat, além de interferir na capacidade do hospedeiro em controlar a infecção pela diminuição na resposta imune local e sistêmica. Alguns estudos (Faveri et al., 2014; Ardais et al., 2014) relataram que após a terapia periodontal ambos os grupos (tabagistas e não tabagistas) apresentam melhoras clínicas, porém indivíduos fumantes apresentam menores índices de ganho de inserção clínica e maiores profundidades de sondagem quando comparados com indivíduos não fumantes após a terapia. Nociti et al. (2015), em uma revisão de literatura, relatam ainda, evidências de que indivíduos fumantes possuem maior

tendência a desenvolver doença periodontal severa, apresentam maiores índices de perda óssea e perda dentária, maior tendência à recessão gengival e formação de bolsa periodontal e menor nível de inserção clínica do que indivíduos não fumantes. Além das alterações clínicas, alguns estudos (Haffajee e Socransky, 2001; Camelo-Castillo et al. 2015) relatam que haja diferença entre a microbiota de fumantes e não fumantes. Camelo-Castillo et al. (2015) relataram que além de uma comunidade microbiana distinta entre indivíduos tabagistas e não tabagistas, há entre os indivíduos fumantes uma menor diversidade dessa comunidade. Além disso, Haffajee e Socransky (2001) relataram que a presença de espécies membros do complexo vermelho e laranja eram mais prevalentes em indivíduos tabagistas do que em indivíduos não tabagistas. Shchipkova et al. (2010) e Faveri et al. (2014) identificaram diferenças significantes entre a microbiota de indivíduos tabagistas e não tabagistas, com alteração na prevalência das espécies para cada grupo. Outros estudos, no entanto, não demonstraram diferenças entre a microbiota de fumantes e não fumantes (Stoltenberg et al., 1993; Apatzidou et al., 2005 e Cruz et al., 2006). Apesar dessa relação ser bastante estudada, o resultado ainda é controverso (Palmer et al., 2005).

O tratamento periodontal mais utilizado atualmente é a raspagem e o alisamento radicular, sendo este considerado o padrão ouro para o tratamento da doença periodontal. No entanto, uma parcela dos indivíduos tratados não consegue obter uma melhora clínica e microbiológica suficiente para manter os resultados alcançados com a terapia por um longo prazo, com isso, outras formas coadjuvantes de terapia, como os antibióticos, têm sido utilizadas para potencializar os efeitos do tratamento periodontal (Silva et al., 2011). Matarazzo et al. (2008) fizeram uma avaliação do tratamento periodontal com ou sem o uso adjunto de antibióticos sistêmicos em indivíduos tabagistas e relataram que após 3 meses de tratamento houve uma redução significante das bactérias do complexo vermelho e um aumento na proporção das espécies do complexo azul e roxo, com melhores resultados para o grupo que recebeu tratamento com raspagem e alisamento radicular junto com a utilização de antibióticos sistêmicos. Um achado interessante foi que a proporção das espécies do complexo laranja não foi afetada por nenhum tipo de terapia e ainda apresentou um pequeno aumento após os 3 meses. Mesmo com o uso auxiliar dos antibióticos, estudos demonstram que a resposta do tabagista ao tratamento

periodontal, tanto clinicamente quanto microbiologicamente são menos favoráveis em relação aos indivíduos não tabagistas (Faveri et al., 2014).

Em relação a fumaça do cigarro, sabe-se que está é uma mistura complexa de substâncias, com mais de 4.000 constituintes, incluindo monóxido de carbono, cianeto de hidrogênio, radicais oxidantes reativos, um alto número de carcinogênicos e a principal molécula psicoativa, a nicotina (Benowitz, 1996). A nicotina, junto com a cotinina, um dos mais importantes metabólitos da nicotina, têm sido apontadas como contribuintes na progressão da doença periodontal, modulando a resposta inflamatória por diferentes mecanismos (Coggo et al., 2009). Os fumantes apresentam um maior número de leucócitos na circulação sistêmica, porém menos células conseguem migrar para o sulco/bolsa gengival (Sørensen et al., 2004). As elevadas concentrações de nicotina também provocam uma inibição direta das funções defensivas dos neutrófilos e monócitos-macrófagos, com fagocitose anormal dos PMN (Pabst et al., 1995). É sugerido que a nicotina e a cotinina aumentem o poder de agressão das toxinas extracelulares das bactérias Gram-negativas e Gram-positivas (Sayers et al., 1995) e altere a função dos fibroblastos (James et al., 1999). Além disso, tem sido relatado que a colonização bacteriana das células epiteliais pode ser favorecida pelos constituintes do cigarro (El Ahmer et al., 1999).

Apenas um estudo (Coggo et al., 2008) comparou os efeitos diretos e indiretos da nicotina, da cotinina e da cafeína sobre a espécie bacteriana *F. nucleatum*, que desempenha um papel fundamental nas interações entre as espécies Gram-positivas e Gram-negativas, favorecendo a progressão da doença. Nesse estudo foi avaliada a capacidade de algumas espécies (*S. gordonii, P. gingivalis* e *F. nucleatum*) em metabolizar as substâncias nicotina, cotinina e cafeína. Porém, o estudo não identificou alteração significante no crescimento dessas espécies na presença dessas substâncias. Considerando espécies benéficas, como o *S. sanguinis*, observa-se situação semelhante pois poucas investigações focaram nesse contexto. Bardell (1981) relatou que não houve alteração no padrão de crescimento do *S. sanguinis* quando exposto à fumaça do cigarro, enquanto Zonuz et al. (2008) demostraram que as espécies bacterianas *S. mutans* e *S. sanguinis* apresentaram um crescimento acelerado quando expostas à fumaça do cigarro e ao dióxido de carbono. Logo, a relação entre o cigarro e seus componentes e a microbiota subgengival ainda não é clara e há poucos estudos associando os efeitos

diretos e indiretos da nicotina, da cotinina e da fumaça do cigarro nas bactérias periodontais. Devido à grande prevalência da periodontite crônica na população, além do considerável número de indivíduos tabagistas, principalmente com idade superior aos 30 anos, torna-se de suma importância um maior entendimento da relação entre a periodontite crônica e este importante fator de risco. Além disso, pouco se sabe sobre a influência do cigarro e seus componentes sobre os microrganismos que compõem a microbiota subgengival.

2 PROPOSIÇÃO

O objetivo desse estudo é avaliar o crescimento planctônico e a formação do biofilme das espécies individuais *Fusobacterium nucleatum* e *Streptococcus sanguinis*, bem como a associação das duas espécies quando expostas a um meio de cultura com nicotina, cotinina ou extrato da fumaça do cigarro.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Estabelecimento das condições de cultivo e curva de crescimento de *S. sanguinis*

A cepa bacteriana da amostra congelada a -80ºC de *S. sanguinis* SK36 (ATCC BAA1455) foi obtida do estoque da bacterioteca do Laboratório de Microbiologia Oral do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Após o completo descongelamento, 50µL da amostra foram semeados em placa de Ágar Brain Heart Infusion (BHI) (Becton, Dickinson and Co, Sparks, MD, USA) e esta foi incubada à 37ºC em ambiente suplementado com 10% de CO_2 por 24 horas. Após o período de incubação, uma alçada das colônias formadas foi transferida para 20mL de caldo BHI enriquecido com hemina (5 mg/mL) e menadione (0,5 mg/mL) e este foi incubado *overnight* no mesmo ambiente.

Após o período de incubação, a cultura foi ajustada no espectrofotômetro (Genesys 10S Vis, Thermo Scientific) para absorbância de 1Å com o comprimento de onda de 600nm. A cultura ajustada foi diluída 1:10 em caldo BHI enriquecido com hemina e menadione e depois foi transferida para tubos estéreis em alíquotas de 2mL.

Os tubos então, foram incubados estaticamente em ambiente anaeróbio, à 37ºC e a cada hora foi medida a absorbância de dois tubos da cultura. Para a mensuração no espectrofotômetro, 1 mL da amostra contida nos tubos foi transferido para cuvetas para construção e análise da curva de crescimento da amostra. Após esse procedimento as amostras utilizadas eram descartadas. Os valores médios das absorbâncias foram avaliados a partir do momento inicial de incubação (0h) até 6 horas.

Esse procedimento foi realizado por 6 vezes até se obter reprodutibilidade dos resultados obtidos.

3.2 Estabelecimento das condições de cultivo e curva de crescimento de *F. nucleatum*

A cepa bacteriana da amostra congelada a -80ºC de *F. nucleatum* (ATCC 25586) foi obtida do estoque da bacterioteca do Laboratório de Microbiologia Oral do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Após o completo descongelamento, 50µL da amostra foram semeados em placa de Ágar Sangue e esta foi incubada à 37ºC em ambiente anaeróbio (5% CO_2, 10% H e 85% N) por 72 horas. Após o período de incubação, para o primeiro ensaio, uma alçada das colônias formadas foi transferida para um tubo contendo 20mL de caldo BHI enriquecido com hemina (5 mg/mL) e menadione (0,5 mg/mL) e este foi incubado durante 24 horas no mesmo ambiente. Após 12 horas, uma nova alçada de colônias foi transferida para um segundo tubo, também contendo 20mL de caldo BHI suplementado com hemina e menadione para a realização do segundo ensaio. Este também ficou incubado durante o perídodo de 24 horas em ambiente anaeróbio antes de ser utilizado.

Após o período de incubação, a cultura foi ajustada no espectrofotômetro para absorbância de 1Å com o comprimento de onda de 600nm. A cultura ajustada foi diluída 1:10 em caldo BHI enriquecido com hemina e menadione e depois foi transferida para tubos estéreis em alíquotas de 2mL. Os tubos então, foram incubados estaticamente em ambiente anaeróbio, à 37ºC e a cada quatro horas foi medida a absorbância de dois tubos da cultura. Para a mensuração no espectrofotômetro, 1 mL da amostra contida nos tubos foi transferido para cuvetas para construção e análise da curva de crescimento da amostra. Após esse procedimento as amostras utilizadas eram descartadas. Os valores médios das absorbâncias foram avaliados a partir do momento inicial de incubação (0h) até 48 horas.

A curva de crescimento para a espécie do *F. nucleatum* foi repetida por 7 vezes para alcançar reprodutibilidade nos resultados.

3.3 Padronização da curva crescimento *S. sanguinis* e *F. nucleatum* em BHI acrescido de extrato da fumaça do cigarro (EFC)

O EFC foi obtido de acordo com a metodologia descrita por Bernhard et al. (2004), para o estudo de células eucarióticas, onde foi utilizado 2 cigarros para 8mL de meio. No presente estudo, foi utilizada a mesma metodologia com algumas modificações. O preparo do meio BHI com EFC foi realizado utilizando um sistema com uma bomba a vácuo, onde os componentes solúveis presentes na fumaça do cigarro foram incorporados ao meio de cultura pela passagem da fumaça no meio líquido (Figura 01). Foi preparado, dentro de um Kitasato, 800 mL de caldo BHI. Vaselina foi esterilizada para acoplar a rolha e a pipeta, e o meio BHI foi esterilizado por autoclavação no próprio Kitasato. As mangueiras de borracha e a rolha foram desinfetadas com álcool etílico a 70%. Uma ponteira estéril de 1mL foi colocada na ponta da mangueira para que o cigarro pudesse ser acoplado ao sistema. A ponta do cigarro foi retirada com pinça estéril e foi colocado um Becker para recolher as cinzas do cigarro. Foi utilizado o cigarro de marca comercial brasileira (Hollywood Original - 10mg alcatrão, 0.8mg nicotina e 10mg monóxido de carbono). Entre a retirada de um cigarro e o acoplamento de outro, o sistema foi desligado e, após a passagem de EFC pelo meio esse foi autoclavado.

Após a autoclavagem, o meio BHI acrescido do EFC foi aliquotado em tubos estéreis contendo 10 mL e então, os tubos foram congelados em estoque para garantir a extada concentração dos agentes presentes na fumaça do cigarro. Os tubos congelados do mesmo lote foram utilizados em todos os ensaios.

Figura 01: Aparato utilizado para a confecção do meio BHI + EFC

3.4 Padronização da curva crescimento do *S. sanguinis* em BHI acrescido de EFC (BHI + EFC)

Foi realizada uma curva de crescimento com a cultura de *S. sanguinis* cultivada em meio BHI e meio BHI acrescido de extrato da fumaça de cigarro (BHI + EFC). O meio BHI + EFC foi utilizado na diluição de 1:8 (1 parte de EFC para 7 partes de BHI) de acordo com um estudo prévio de Pereira et al. (2014), que demostrou que nessa concentração, o *S. sanguinis* apresentava um crescimento semelhante ao meio BHI. Após a diluição, o meio BHI + EFC 1:8 era novamente autoclavado para eliminar riscos de contaminação externa proveniente das substâncias do cigarro.

Para a construção da curva de crescimento, inicialmente realizou-se o crescimento da bactéria em meio BHI, conforme descrito no item 3.1. Porém, após o ajuste da absorbância (1Å), 4 mL da cultura em meio BHI foi transferida para um tubo estéril e este foi levado à centrífuga (4ºC, 5000rpm, 1min) para a formação de um *pellet*. O sobrenadante foi removido e houve a substituição do meio BHI pelo meio BHI + EFC 1:8. Após completa diluição do *pellet*, a cultura foi diluída 1:10 em caldo BHI + EFC 1:8 enriquecido com hemina e menadione e depois foi transferida para tubos estéreis em alíquotas de 2mL. Os tubos então, foram incubados estaticamente em ambiente anaeróbio, à 37ºC e a cada hora foi medida a absorbância de dois tubos da cultura. Para a mensuração no espectrofotômetro, 1 mL da amostra contida nos tubos foi transferido para cuvetas para construção e análise da curva de crescimento da amostra. Após esse procedimento as amostras utilizadas eram descartadas. Os valores médios das absorbâncias foram avaliados a partir do momento inicial de incubação (0h) até 6 horas.

3.5 Padronização da curva crescimento do *F. nucleatum* em BHI acrescido de EFC (BHI + EFC)

Para determinação da concentração a ser usada com o *F. nucleatum,* foram feitas uma série de diluições (1:2; 1:4; 1:8; 1:10 e 1:20) do meio BHI + EFC e foi realizada uma curva de crescimento reduzida com todas as diluições. Devido a proximidade dos resultados com as concentrações 1:8, 1:10 e 1:20, decidiu-se utilizar a concentração de 1:8. Após o preparo da diluição, o meio BHI + EFC foi

novamente autoclavado e seguiu-se o mesmo processo descrito para o item 3.4. Após todos os ajustes, a curva foi realizada conforme descrito no item 3.2.

3.6 Padronização da curva crescimento *S. sanguinis* e *F. nucleatum* em BHI acrescido de cotinina e nicotina

A determinação da concentração de nicotina e cotinina a ser usada foi baseada em um estudo de Baek at al. (2012), onde a concentração de 1µg/mL foi a que apresentou um comportamento mais semelhante ao crescimento bacteriano em meio BHI. As substâncias testadas foram obtidas da Sigma Chemical Co. (Poole, UK). A cotinina e a nicotina foram diluídas em etanol 99% e armazenadas em ambiente refrigerado.

Para a realização da curva de crescimento do *F. nucleatum* e do *S. sanguinis,* as duas culturas foram cultivadas, separadamente, em meio BHI conforme descrito anteriormente e o ensaio para cada espécie foi feito de maneira independente. Após o ajuste da absorbância (1Å), 8mL da cultura em meio BHI foi transferida para dois tubos estéreis (4 mL cada) e estes foram levados à centrífuga (4ºC, 5000rpm, 1min) para a formação de um *pellet*. O sobrenadante foi removido e houve a substituição do meio BHI pelo meio BHI + cotinina 1µg/mL e BHI + nicotina 1µg/mL. Após completa diluição dos *pellets*, as culturas foram diluídas 1:10 em caldo BHI + cotinina 1µg/mL e BHI + nicotina 1µg/mL enriquecido com hemina e menadione e depois foi transferida para tubos estéreis em alíquotas de 2mL Os tubos então, foram incubados estaticamente em ambiente anaeróbio, à 37ºC.

Para a cultura de *F. nucleatum*, a absorbância foi medida a cada 4 horas e para a cultura de *S. sanguinis*, foi medida a cada hora. A medida foi feita em dois tubos da cultura. Para a mensuração no espectrofotômetro, 1 mL da amostra contida nos tubos foi transferida para cuvetas para construção e análise da curva de crescimento da amostra. Após esse procedimento as amostras utilizadas eram descartadas.

3.7 Viabilidade celular do *S. sanguinis* e *F. nucleatum* em BHI, BHI + EFC 1:8; BHI + cotinina 1µg/mL e BHI + nicotina 1µg/mL

A viabilidade celular das culturas de *S. sanguinis* e *F. nucleatum* em BHI, BHI + EFC 1:8; BHI + cotinina 1µg/mL e BHI + nicotina 1µg/mL foi realizada pela semeadura de uma gota da cultura em triplicata de uma alíquota (25µL) em ágar BHI para o *S. sanguinis* e ágar sangue para o *F. nucleatum* e contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) após incubação. O procedimento foi realizado em todos os tempos da curva de crescimento para cada espécie.

3.8 Avaliação da formação do biofilme mono-espécie e duo-espécie

3.8.1 Preparo das placas de formação de biofilme

Os biofilmes mono-espécies foram feitos de acordo com o protocolo utilizado por Redanz et al. (2012) e Seneviratne et al. (2014) com algumas modificações. As espécies bacterianas *F. nucleatum* e *S. sanguinis* foram suspensas em 10mL de meio BHI enriquecido com hemina e menadione por um periodo de incubação de 30h e 12h respectivamente. A cultura do *F. nucleatum* foi incubada à 37ºC em ambiente anaeróbio (5% CO_2, 10% H e 85% N) e a cultura do *S. sanguinis* foi incubada à 37ºC em ambiente suplementado com 10% de CO_2.

Após o período de incubação, a cultura foi ajustada no espectrofotômetro para absorbância de 1Å com o comprimento de onda de 600nm. Após ajuste, as duas culturas foram diluídas 1:10 em novo meio BHI enriquecido com hemina e menadione e foram incubadas em ambiente anaeróbio (5% CO_2, 10% H e 85% N) à 37ºC durante um perído de 20h para o *F. nucleatum* e de 2h para o *S. sanguinis.* Assim, após esse período, as culturas possuíam aproximadamente 0,6Å para o *F. nucleatum* e 0,750Å para o *S. sanguinis.* Quando a absorbância estava fora desse valor, um ajuste era realizado.

Após o ajuste de absorbância, foi realizado o ajuste para o valor de UFC por mL. Todas as amostras deveriam conter uma concentração de 10^8 células/mL. Após todos os ajustes, foi feito um tubo contendo 16mL de cada amostra (*F. nucleatum* e *S. sanguinis)*. O conteúdo de cada tubo foi aliquotado em 4 tubos com 4mL de cada amostra de bactéria. Os 8 tubos (4 contendo *F. nucleatum* e 4

contendo *S. sanguinis)* foram levados à centrífuga (4ºC, 5000rpm, 5min) para a formação de *pelle*t. O sobrenadante foi removido e houve a substituição do meio BHI pelo meio BHI; BHI + EFC 1:8; BHI + cotinina 1µg/mL e BHI + nicotina 1µg/mL.

Para o preparo do desenvolvimento do biofilme, foram pipetadas 100µL de cada amostra em uma placa de 96 poços de fundo chato de poliestireno (Coming Inc.), conforme Tabela 1.

Tabela 1. Disposição das amostras na placa de 96 poços

	Espécies bacterianas									Controle		
	F. nucleatum			*S. sanguinis*			*F. nucleatum* + *S. sanguinis*					
	1	**2**	**3**	**1**	**2**	**3**	**1**	**2**	**3**	**1**	**2**	**3**
A	BHI + *F. nucleatum*			BHI + *S. sanguinis*			BHI + *F. nucleatum* + *S. sanguinis*			BHI controle		
B	BHI + EFC 1:8 + *F. nucleatum*			BHI + EFC 1:8 + *S. sanguinis*			BHI + EFC 1:8 + *F. nucleatum* + *S. sanguinis*			BHI + EFC 1:8 controle		
C	BHI + Nicotina + *F. nucleatum*			BHI + Nicotina + *S. sanguinis*			BHI + Nicotina + *F. nucleatum* + *S. sanguinis*			BHI + Nicotina controle		
D	BHI + Cotinina + *F. nucleatum*			BHI + Cotinina + *S. sanguinis*			BHI + Cotinina + *F. nucleatum* + *S. sanguinis*			BHI + Cotinina controle		
A	BHI + *F. nucleatum*			BHI + *S. sanguinis*			BHI + *F. nucleatum* + *S. sanguinis*			BHI controle		
B	BHI + EFC 1:8 + *F. nucleatum*			BHI + EFC 1:8 + *S. sanguinis*			BHI + EFC 1:8 + *F. nucleatum* + *S. sanguinis*			BHI + EFC 1:8 controle		
C	BHI + Nicotina + *F. nucleatum*			BHI + Nicotina + *S. sanguinis*			BHI + Nicotina + *F. nucleatum* + *S. sanguinis*			BHI + Nicotina controle		
D	BHI + Cotinina + *F. nucleatum*			BHI + Cotinina + *S. sanguinis*			BHI + Cotinina + *F. nucleatum* + *S. sanguinis*			BHI + Cotinina controle		

Após o preparo de 2 placas idênticas, estas foram incubadas estaticamente à 37ºC em ambiente anaeróbio (5% CO_2, 10% H e 85% N) durante um período de 24 e 48 horas.

3.8.2 Análise da formação do biofilme

Após o perído de incubação de 24 horas, as duas placas foram removidas do ambiente anaeróbio. Em uma das placas foi removido 50 µL de meio e foi acrescentado a mesma quantidade de meio novo. Esta placa voltou para a câmara anaeróbia para permanecer por mais 24 horas. A segunda placa, foi levada para o leitor (BioRad, Model 680 Microplate Reader) com o comprimento de onda de 490nm.

Após registro da leitura, a placa foi vertida para a remoção do sobrenadante e foi corada com 100µL de safranina 0,4% durante 15 minutos. Após o período, os poços foram lavados 3 vezes com 100µL de água destilada. Após a remoção da água destilada, foi acrescentado em cada poço, 100µL de etanol 95% e este permaneceu durante 15 minutos antes da próxima leitura. A última leitura foi realizada com o comprimento de onda de 595nm. O mesmo procedimento foi realizado com a outra placa após as 48 horas de incubação.

Para a análise dos dados dos biofilmes foi utilizada a razão entre as absorbâncias medidas em 490nm e 595nm nos tempos de incubação de 24 horas ou 48 horas.

3.9 Análise estatística

A análise estatística dos valores das absorbâncias das curvas de crescimento das bactérias nos diferentes meios, bem como da avaliação da formação do biofilme foram analisadas pelos testes ANOVA two-way e post hoc Tukey, considerando os fatores “tempo” e “diferentes meios de cultura”. Todas as análises foram realizadas considerando-se um nível de significância de 5%.

4 RESULTADOS

4.1 Curvas de crescimento para o *S. sanguinis*

Os valores médios das duplicatas das absorbâncias medidas a 600nm nos diferentes tempos de incubação e diferentes meios de cultura para a espécie bacteriana *S. sanguinis* estão apresentados na Tabela 2. A partir desses valores foi construída a curva de crescimento (Figura 02).

A análise estatística dos dados (Figura 03) mostrou que houve diferença significativa entre os tempos de cultivo, com valores de absorbâncias superiores nos tempos próximos a 4h - 6 h. As amostras cultivadas em BHI + EFC 1:8, BHI + nicotina e BHI + cotinina à 1µg/mL apresentaram crescimento semelhante ao cultivo com BHI.

4.2 Curvas de crescimento para o *F. nucleatum*

Para o *F. nucleatum*, os valores médios das duplicatas das absorbâncias medidas a 600nm nos diferentes tempos de incubação e diferentes meios estão apresentados na Tabela 3. A partir desses valores foi construída a curva de crescimento (Figura 04).

A análise estatística dos dados (Figura 05) demonstrou que até o tempo de 8h, todas as amostras apresentaram crescimentos semelhantes. A partir do tempo aproximado de 24h houve uma diferença nos valores de absorbância e no padrão crescimento das amostras comparados aos tempos iniciais, ou seja, houve diferença significativa entre os tempos de cultivo, com valores de absorbâncias superiores nos tempos 24h - 48h. As amostras cultivadas em BHI + EFC, nicotina e cotinina à 1µg/mL apresentaram crescimento semelhante ao cultivo com BHI.

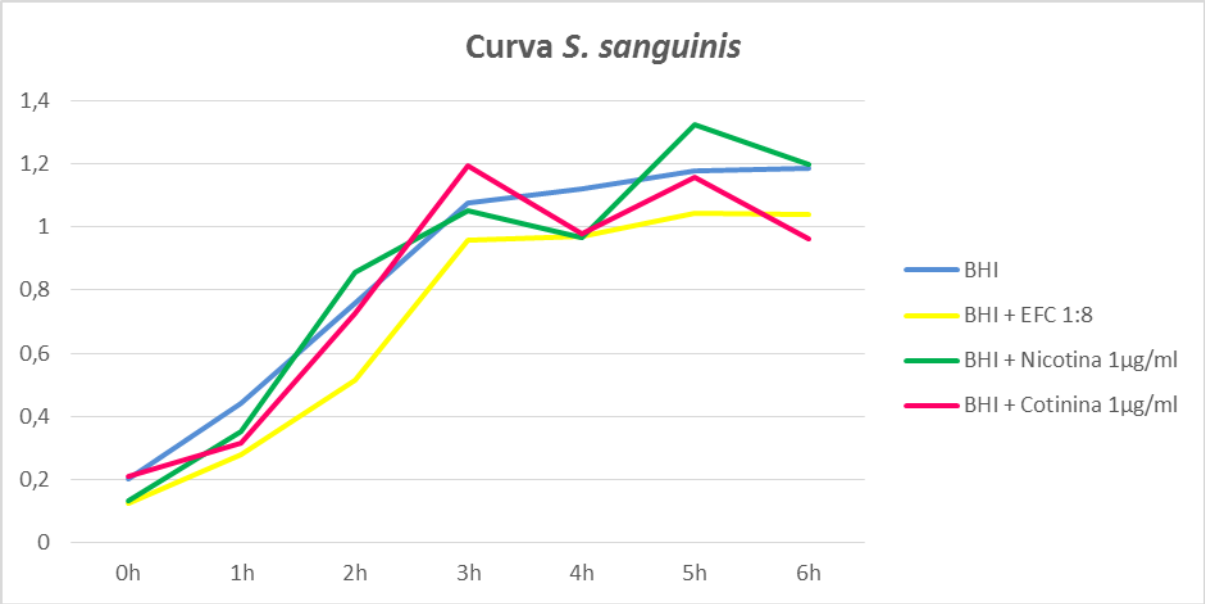

Figura 02: Curva de crescimento da amostra de *S. sanguinis*

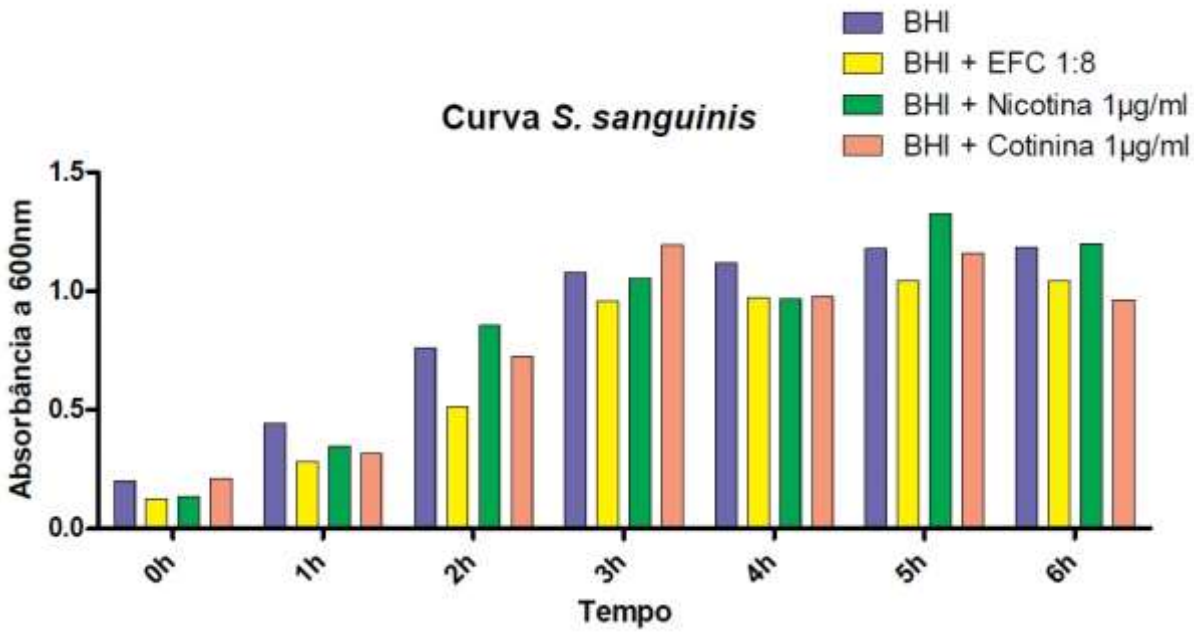

Figura 03: Representação gráfica do crescimento da amostra de *S. sanguinis* cultivada em BHI, BHI + EFC, BHI + Nicotina e BHI + Cotinina em relação ao tempo (ANOVA two way, p<0,0001).

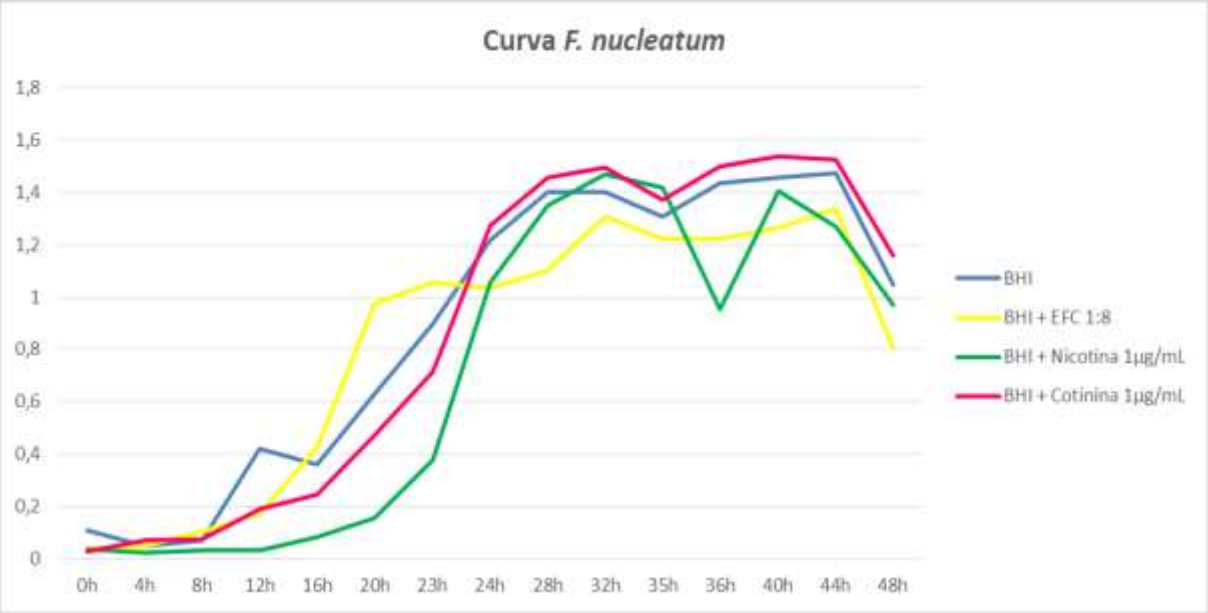

Figura 04: Curva de crescimento da amostra de *F. nucleatum.*

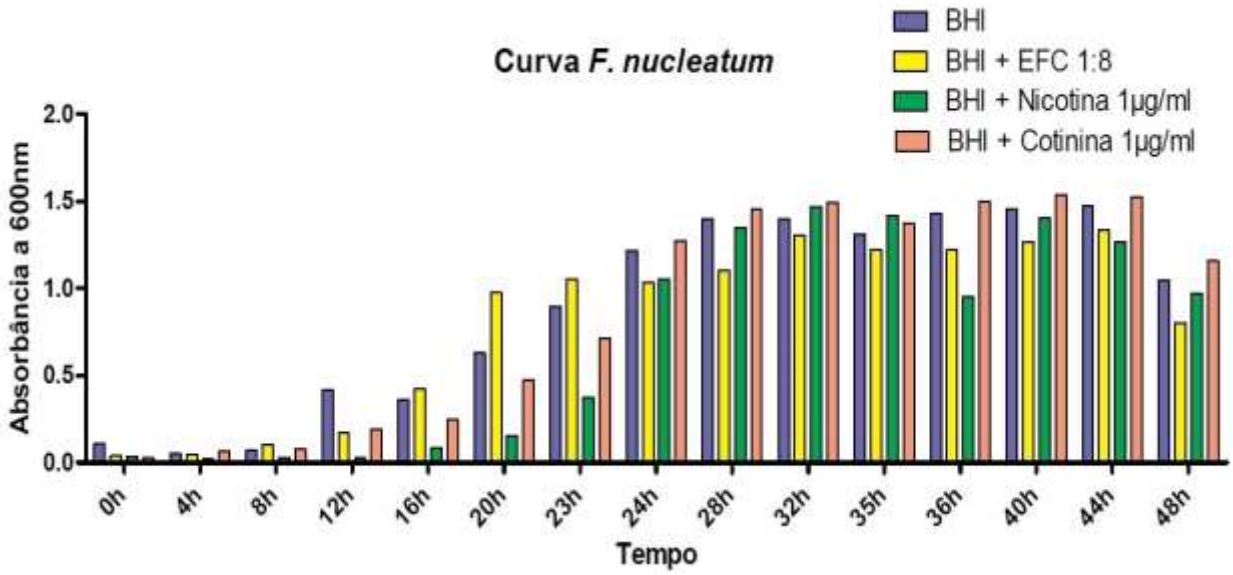

Figura 05: Representação gráfica do crescimento da amostra de *F. nucleatum* cultivada em BHI, BHI + EFC, BHI + Nicotina e BHI + Cotinina em relação ao tempo (ANOVA two-way, p<0,0001).

4.3 Análise da contagem de unidades formadoras de colônias para *S. sanguinis* e *F. nucleatum*

As Figuras 06 e 07 apresentam, respectivamente, a análise dos dados referentes à contagem de unidades formadoras de colônias para o crescimento de *S. sanguinis* e *F. nucleatum* nos diferentes tempos e meios de cultura.

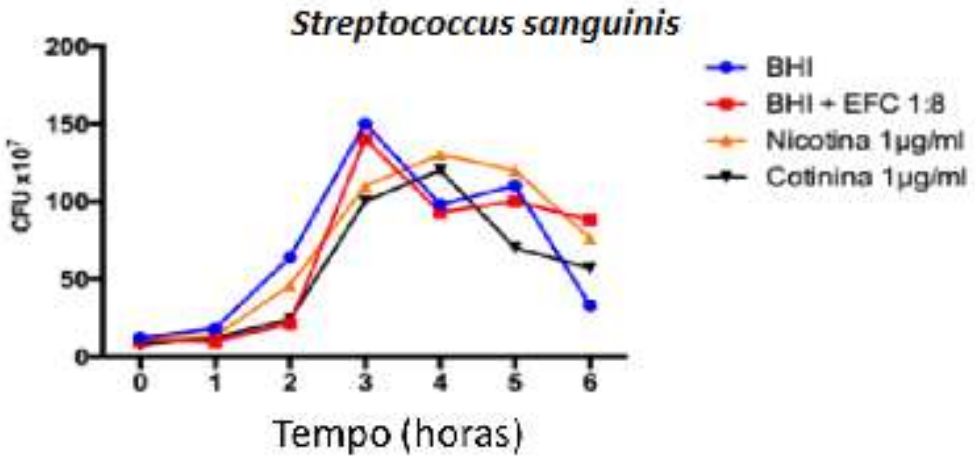

Figura 06: Contagem de unidades formadoras de colônias de *S. sanguinis* expostos aos diferentes meios de cultura.

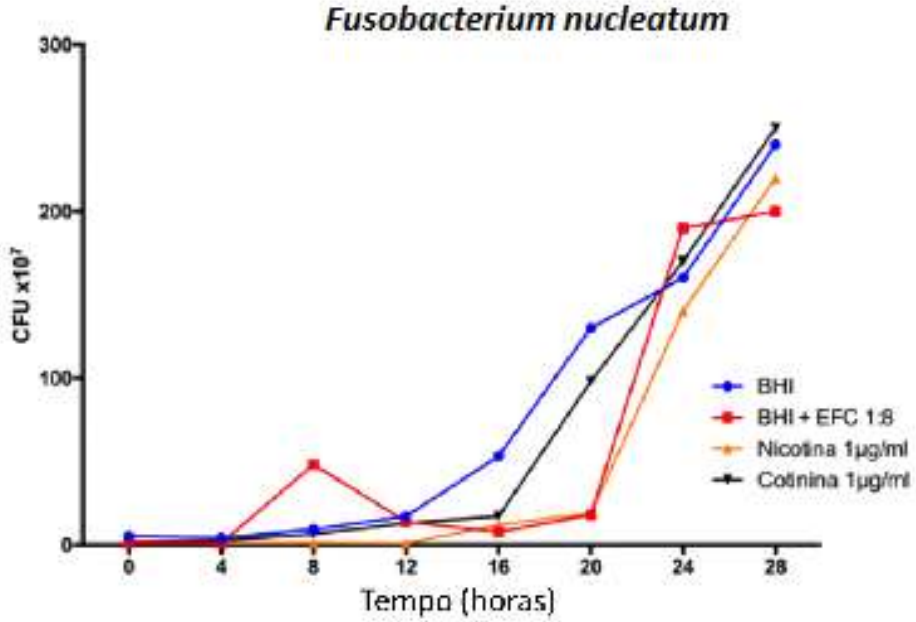

Figura 07: Contagem de unidades formadoras de colônias de *F. nucleatum* expostos aos diferentes meios de cultura.

A análise estatística dos dados (ANOVA two-way) demonstrou que o “tempo” foi o único fator responsável por interações estatisticamente significativas ($p<0,05$). Nenhuma interação foi associada aos fatores “diferentes meios de cultura”.

4.4 Avaliação da formação de biofilme

As Figuras 08 e 09 apresentam, respectivamente, a análise dos dados dos biofilmes referentes à razão entre as absorbâncias medidas em 490nm e 595nm nos tempos de incubação de 24 horas ou 48 horas, nos diferentes meios de cultura, para as espécies bacterianas *S. sanguinis* e *F. nucleatum* avaliadas individualmente ou associadas.

Após 24 horas de incubação, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes (ANOVA two-way) entre os níveis de absorbância detectados nos diferentes meios de cultura a partir do crescimento em biofilme de *S. sanguinis*, *F. nucleatum* ou para o biofilme formado pela associação das duas espécies (Figura 08).

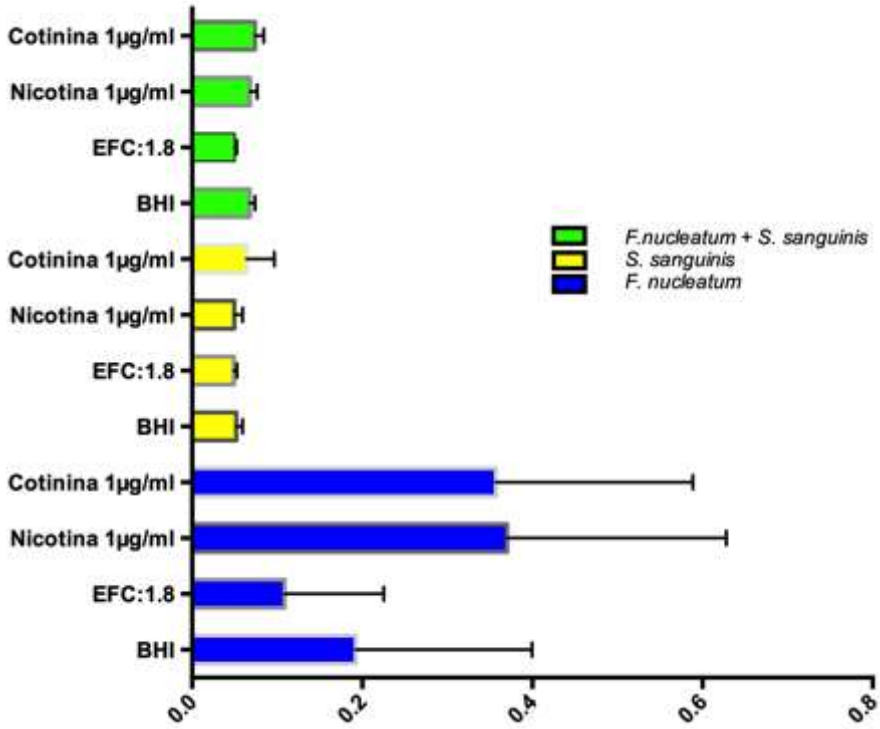

Figura 08: Níveis de absorbância do crescimento em biofilme de *S. sanguinis*, *F. nucleatum* e da associação das duas espécies em 24 horas, expostos à diferentes meios de cultura.

Quando o tempo de 48 horas foi analisado, observou-se diferenças estatisticamente significantes (ANOVA two-way) entre os níveis de absorbância detectados nos diferentes meios de cultura apenas para o crescimento em biofilme de *F. nucleatum*. Os maiores valores de absorbância foram encontrados para o meio de cultura BHI, seguidos dos valores de cotinina e nicotina. Os valores de absorbância em meio BHI + EFC foram inferiores ao BHI, porém não-diferentes dos valores de cotinina e nicotina (Figura 9).

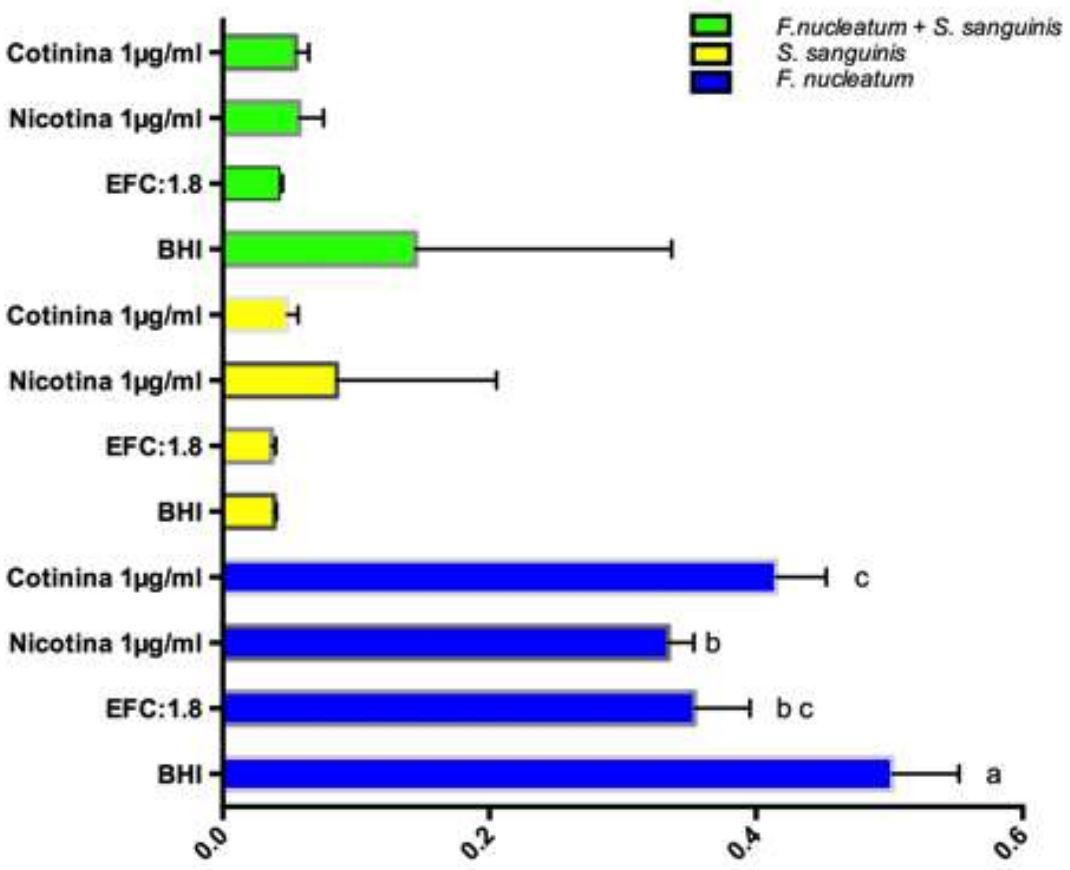

Figura 09: Níveis de absorbância do crescimento em biofilme de *S. sanguinis*, *F. nucleatum* e da associação das duas espécies em 48 horas, expostos aos diferentes meios de cultura.

5 DISCUSSÃO

Alguns estudos clínicos a microbiológicos com indivíduos tabagistas (Matarazzo et al., 2008; Faveri et al., 2014) têm demonstrado que as espécies bacterianas do complexo laranja (principalmente espécies de *Fusobacterium ssp*.), mesmo após o tratamento periodontal com utilização adjunta de antibióticos, continuam em altas proporções no biofilme subgengival. De modo geral, os autores sugerem que isto poderia ser um fator contribuinte para a recidiva da periodontite nesses pacientes a longo prazo.

Apesar desses resultados indicarem que o cigarro e seus componentes influenciam a redução dessas espécies, o presente estudo demonstrou que as substâncias nicotina, cotinina e extrato da fumaça de cigarro não alteraram significativamente o padrão de crescimento das espécies testadas. Esse achado é similar aos de Coggo et al. (2008) que avaliaram os efeitos da nicotina, cotinina e cafeína no crescimento planctônico das espécies bacterianas *F. nucleatum*, *P. gingivalis* e *S. gordonii* nas concentrações de 0,4; 1,5; 6,25; 25, 100 e 400µg/L. Resultados similares também foram observados por Teughes et al. (2005). Os autores avaliaram a viabilidade bacteriana das espécies *A. actinomycetemcomitans* e *P. gingivalis* expostas a diferentes concentrações de nicotina e cotinina em diferentes tempos. Os autores concluíram que nenhuma das substâncias alterou de forma significativa o crescimento planctônico e a viabilidade bacteriana dessas espécies.

Alguns estudos relataram que essas substâncias podem interferir na viabilidade de algumas espécies bacterianas. Pavia et al. (2000) mostraram que a nicotina em concentrações de 100 a 250 µg/mL pode causar inibição no crescimento de algumas espécies como o *Mycobacterium phlei, Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans*. No entanto, as espécies *Staphylococcus aureus* e *Borrelia burgdorferi* não foram afetadas pela exposição à nicotina. Outro estudo (Bardell, 1981) avaliou a viabilidade bacteriana de algumas espécies após a exposição à fumaça do cigarro e os autores relataram que as espécies *Branhamella catarrhalis* e *Neisseria perflava* apresentaram o crescimento reduzido após a exposição à fumaça do cigarro, e após 3 horas de exposição não havia nenhuma bactéria viável. Já as espécies *Streptococcus mitis, Streptococcus salivarius* e *S.*

sanguinis foram menos susceptíveis à ação deletéria da fumaça e não apresentaram diferença estatisticamente significante em suas viabilidades quando comparadas às espécies não expostas. No presente estudo, foram avaliadas somente as espécies *F. nucleatum* e *S. sanguinis* e apesar de ter sido observada uma relação dependente da espécie, não houve alteração significante na viabilidade celular dos microrganismos testados.

Em contrapartida, no estudo de Zonuz et al. (2008), avaliando-se as espécies bacterianas *S. mutans* e *S. sanguinis* nos meios de cultura com dióxido de carbono e com fumaça de cigarro em diferentes concentrações de nicotina (0,1mg; 0,8mg e 1mg), relataram que houve um crescimento acelerado dessas espécies quando comparado com um meio em ar atmosférico após 48h. No entanto, nesse estudo, o crescimento bacteriano foi avaliado por meio de medições nos diâmetros das colônias formadas em placas de Ágar Sangue, tornando difícil a comparação com os nossos resultados.

Há alguns estudos relatando que a nicotina pode interferir no crescimento bacteriano de maneira dose-dependente. Baek et al. (2012) utilizaram um protocolo de exposição única da nicotina nas concentrações de (1, 2, 4, e 8 mg/L). Os autores observaram que o crescimento da *P. gingivalis* 381 exposta à nicotina era reduzido de modo estatisticamente significante à medida que aumentava a concentração de nicotina quando comparado ao padrão de crescimento normal. Porém, as bactérias que eram pré-expostas à nicotina, mostraram uma tendência de aumento na taxa de crescimento. Apesar de haver um aumento na taxa de crescimento em todas as concentrações, quando a *P. gingivalis* foi pré-exposta nas concentrações de nicotina de 4 e 8mg/L, houve uma duplicação na taxa de crescimento quando comparada com a *P. gingivalis* não exposta. Os autores discutem que a *P. gingivalis* é capaz de se adaptar, durante o tempo, à exposição à nicotina e desenvolver uma tolerância ao seu efeito inibitório. Além disso, é esperado que em exposição crônica, a nicotina poderia melhorar a capacidade da célula bacteriana para lidar com a subsequente exposição à nicotina. O presente estudo avaliou as espécies com um protocolo de exposição única, mas também foi possível observar que maiores concentrações de fumaça de cigarro causavam uma diminuição no padrão de crescimento das espécies avaliadas. Talvez nossos resultados para os ensaios de *F. nucleatum* e nicotina/cotinina não demonstraram maior taxa de crescimento pelo fato da bactéria ter sido submetida a uma única exposição ao agente.

Coggo et al. (2008) avaliaram a formação de biofilme mono-espécie (*F. nucleatum*, *P. gingivalis* e *S. gordonii)* e dual-espécies (*S. gordonii- F. nucleatum* e *F. nucleatum-P. gingivalis)* expostos à nicotina, cotinina e cafeína em uma concentração de 400µg/mL após 48h e não demonstraram qualquer alteração estatisticamente significante entre os meios de cultura testados. Em relação à espécie bacteriana *F. nucleatum*, nossos achados não são suportados por Coggo et al. (2008), pois houve uma redução estatisticamente significante de crescimento para os meios com EFC, cotinina e nicotina após 48h. Vale destacar que, devido às diferenças na metodologia, entre os dois estudos, em relação ao método de formação de biofilme e as concentrações das substâncias utilizadas, a comparação entre eles torna-se difícil.

A quantidade de nicotina e cotinina utilizada nesse experimento foi baseada em achados anteriores (McGuire et al., 1989; Baek et al., 2012), onde relataram que a concentração média de cotinina na saliva é de 0,4±0,2 mg/L e no fluido crevicular é de 2,5±2,4 mg/L, estando de acordo com os níveis fisiológicos destas substâncias e sendo adequadas para avaliação de seus efeitos nas bactérias. Outros estudos (Sayers et al.,1999; Theughels et al., 2005) usaram concentrações mais altas destas substâncias para induzirem efeitos celulares, variando de 10 µg/mL a 800ng/mL.

Apesar da comparação entre os nossos resultados e os estudos disponíveis na literatura ser difícil devido às diferenças nas metodologias, nas substâncias e nas concentrações utilizadas e nas espécies de microrganismos testadas, outro ponto importante a ser considerado é o fato das bactérias se encontrarem em um biofilme dental nos indivíduos.

Biofilmes são complexos ecossistemas microbiológicos embebidos em uma matriz de polímeros orgânicos aderidos à uma superfície (Costerton et al., 1995). Na cavidade bucal, os biofilmes são marcados pelas estreitas relações entre os microrganismos, demonstrando complexas interações tanto sinérgicas, quanto antagônicas (Duran-Pinedo et al., 2014). É importante considerar que neste estudo apenas duas espécies bacterianas foram avaliadas, o que torna restrita a comparação com um biofilme bucal e, consequentemente impossibilita a extrapolação desses resultados para a prática clínica.

Assim, novos estudos laboratoriais são necessários a fim de se conseguir ampliar os conhecimentos relacionados à ecologia e ao metabolismo microbiano de determinadas espécies bucais.

6 CONCLUSÃO

Com base nos dados obtidos é possível concluir que a exposição à nicotina, cotinina ou extrato da fumaça do cigarro não influenciou de modo expressivo o crescimento planctônico e nem a viabilidade celular das espécies *S. sanguinis* e *F. nucleatum*. Após 48h, o meio BHI puro permitiu o crescimento mais expressivo do *F. nucleatum* em biofilme quando comparado aos outros meios de cultura.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Apatzidou DA, Riggio MP, Kinane DF. Impact of smoking on the clinical, microbiological and immunological parameters of adult patients with periodontitis. J Clin Periodontol. 2005 Sep; 32(9):973-83.

Ardais R, Mário TG, Boligon J, Kantorski KZ, Moreira CH. The effect of smoking on bleeding on probing after nonsurgical periodontal therapy: a quasi-experimental study. Braz Oral Res. 2014 Jan-Feb; 28(1):1-7.

Bachrach G, Rosen G, Bellalou M, Naor R, Sela MN. Identification of a *Fusobacterium nucleatum* 65 kDa serine protease. Oral Microbiology & Immunity. 2004; 19:155-159.

Baek O, Zhu W, Kim CH, Lee SW. Effects of Nicotine on the Growth and Protein Expression of *Porphyromonas gingivalis.* The Journal of Microbiology. 2012; 50:143-148.

Bardell D. Viability of six species of normal oropharyngeal bacteria after exposure to cigarette smoke in vitro. MICROBIOS. 1981; 32(127):7-13.

Benowitz NL. Pharmacology of nicotine: addiction and therapeutics. Annual Reviews in Pharmacology and Toxicology. 1996; 36:597-613.

Bernhard D, Huckb CW, Jakschitzb T, Pfistera G, Hendersona B, Bonnb GK, Wicka G. Development and evaluation of an in vitro model for the analysis of cigarette smoke effects on cultured cells and tissues. Journal of Pharmacological and Toxicological Methods. 2004; 50:45– 51.

Camelo-Castillo AJ, Mira A, Pico A, Nibali L, Henderson B, Donos N, Tomás I. Subgingival microbiota in health compared to periodontitis and the influence of smoking. Frontiers in Microbiology. 2015; 6(119):1-12.

Caufield PW, Dasanayake AP, Li Y, Pan Y, Hsu Y, Hardin M. Natural history of Streptococcus sanguinis in the oral cavity of infants: evidence for a discrete window of infectivity. Infect Immun. 2000; 68:4018–4023.

Checchi L, Ciapetti G, Monaco G, Ori G. The effects of nicotine and age on replication and viability of human gingival fibroblasts in vitro. J Clin Periodontol. 1999 Oct; 26(10):636-42.

Coggo K, Montan MF, Bergamaschi CC, Andrade ED, Rosalen PL, Groppo FC. In vitro evaluation of the effect of nicotine, cotinine and caffeine on oral microorganism. Can J Microbiol. 2008; 54:501-508.

Coggo K, Calvi BM, Mariano FS, Franco GCN, Gonçalves RB, Groppo FC. The effects of nicotine and cotinine on *Porphyromonas gingivalis* colonisation of epithelial cells. Arch Oral Biol. 2009; 54:1061–1067.

Colombo A, Teles RP, Torres MC, Rosalem W, Mendes MC, Souto RM, Uzeda M. Subgingival microbiota of Brazilians with untreated chronic periodontitis. J Periodontol. 2002; 73:360-369.

Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM. Microbial Biofilms. Annual Review of Microbiology 1995; 49: 711-745.

Cruz SEB, Sirotto TO, Mendes JAV, Rocha M, Raffaelli MP, Feres M, Matarazzo F. Contagem e prevalência de microrganismos patogênicos e benéficos em indivíduos tabagistas com doença periodontal crônica. Rev. Dental Press Periodontia Implantol. 2009; 3(4):101-110.

Duran-Pinedo AE, Baker VD, Frias-Lopez J. The Periodontal Pathogen Porphyromonas gingivalis Induces Expression of Transposases and Cell Death of Streptococcus mitis in a Biofilm Model. Infect. Immun. 2014; 82(8):3374.

El Ahmer OR, Essery SD, Saadi AT, Raza MW, Ogilvie MM, Weir DM, et al. The effect of cigarette smoke on adherence of respiratory pathogens to buccal epithelial cells. FEMS Immunol Med Microbiol 1999; 23:27–36.

Faveri M, Rebello A, de Oliveira Dias R, Borges-Junior I, Duarte PM, Figueiredo LC, Feres M. Clinical and microbiologic effects of adjunctive metronidazole plus amoxicillin in the treatment of generalized chronic periodontitis: smokers versus non-smokers. J Periodontol. 2014 Apr; 85(4):581-91.

Haffajee, A. D. and Socransky, S. S. Relationship of cigarette smoking to the subgingival microbiota. J Clin Periodontol. 2001; 28: 377–388.

Haffajee AD, Teles RP, Socransky SS. The effect of periodontal therapy on the composition of the subgingival microbiota. Periodontol 2000. 2006; 43:7-12.

Han YW, Shi W, Huang GT, Kinder Haake S, Park NH, Kuramitsu H, Genco RJ. Interactions between periodontal bacteria and human oral epithelial cells: Fusobacterium nucleatum adheres to and invade epithelial cells. Infect Immun. 2000; 68:140-146.

Hillman JD, Socransky SS. Bacteria interference in the oral ecology of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and its relationship to human periodontosis. Arch Oral Biol. 1982; 27: 75–77.

Hillman JD, Socransky SS, Shivers M. The relationships between streptococcal species and periodontopathic bacteria in human dental plaque. Arch Oral Biol. 1985; 30: 791–795.

James JA, Sayers NM, Drucker DB, Hull PS. Effects of tobacco products on the attachment and growth of periodontal ligament fibroblasts. J Periodontol. 1999; 70:518–5.

Jewet A, Hume WR, Le H, Huynh TN, Han YW, Cheng G, Shi W. Induction of apoptotic cell death in peripheral blood mononuclear and polymorphonuclear cells by oral bacterium, *Fusobacterium nucleatum*. Infect Immun. 2001; 68:1893-1898.

Johnson GK, Hill M. Cigarette smoking and the periodontal patient. J Periodontol. 2004;75:196–209.

Kim JS, Park JY, Chung WY, Choi MA, Cho KS, Park KK. Polymorphisms in genes coding for enzymes metabolizing smoking-derived substances and the risk of periodontitis. J Clin Periodontol. 2004 Nov; 31(11):959-64.

Kolenbrander PE. Oral microbial communities: biofilms, interactions, and genetic systems. Annual reviews of Microbiology. 2000; 54:413-437.

Kolembrander PE, Andersen RN, Blehert DS, Egland PG, Foster JS, Palmer RJ Jr. Communication among oral bacteria. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 2002; 66:486–505.

Kreth J, Merritt J, Shi W, Qi F. Competition and coexistence between *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis* in the dental biofilm. J Bacteriol 2005; 187:7193–7203.

Lindhe J, Lang N, Karring T. Tratado de Periodontia Clínica e Implantologia Oral. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

Listegarten MA. Structure of surface coatings on teeth. A review. J Periodontol. 1976 Mar; 47(3):139-47.

Mager DL, Haffajee AD, Socransky SS. Effects of periodontitis and smoking on the microbiota of oral mucous membranes and saliva in systemically healthy subjects. J. Clin Periodontol. 2003; 30:1031-1037.

Matarazzo F, Figueiredo LC, Cruz SEB, Faveri M, Feres M. Clinical and microbiological benefits of systemic metronidazole and amoxicillin in the treatment of smokers with chronicperiodontitis:arandomized placebo-controlled study. J Clin Periodontol 2008; 35:885–896.

Marsh PD. Sugar, fluoride, pH and microbial homeostasis in dental plaque. Proc Finn Dent. 1991; 87:515–525.

McGuire, J.R., McQuade, M.J., Rossmann, J.A., Garnick, J.J., Sutherland, D.E., Scheidt, M.J., and Van Dyke, T.E. Cotinine in saliva and gingival crevicular fluid of smokers with periodontal disease. J. Periodontol. 1989; 60:176–181.

Mirbod SM, Ahing SI, Pruthi VK. Immunohistochemical study of vestibular gingival blood vessel density and internal circumference in smokers and non-smokers. J Periodontol. 2001 Oct; 72(10):1318-23.

Nociti Jr FH, Casati MZ, Duarte PM. Current perspective of the impact of smoking on the progression and treatment of periodontitis. Periodontol 2000. 2015; 67(1): 187–210.

Pabst MJ, Pabst KM, Collier JA, Coleman TC, Lemons-Prince ML, Godat MS, Waring MB, Babu JP.Inhibition of neutrophil and monocyte defensive functions by nicotine. J Periodontol. 1995; 66:1047-1055.

Palmer RM, Wilson RF, Hasan AS Scott DA. Mechanisms of action of environmental factors – tobacco smoking. J Clin Periodontol. 2005; 32:180-195.

Papapanou PN, Neiderud AM, Papadimitriou A, Sandros J, Dahlén G. "Checkerboard" assessments of periodontal microbiota and serum antibody responses: a case-control study. J Periodontol. 2000 Jun; 71(6):885-97.

Pavia CS, Pierre A, Nowakowski J. Antimicrobial activity of nicotine against a spectrum of bacterial and fungal pathogens. J Med Microbiol. 2000 Jul; 49(7):675-6.

Pereira PGB, Mayer MPA, Longo PL. Efeito do fumo sobre crescimento, viabilidade celular, formação de biofilme e expressão gênica de *Streptococcus sanguinis*. Relatório Parcial de Bolsa de Iniciação Científica apresentado a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo. 2014.

Quirynen M, DeSoete M, Dierickx K, van Steenberghe D. The intra-oral translocation of periodontal pathogens jeopardises the outcome of periodontal therapy. A review of the literature. J Clin Periodontol. 2001; 28:499–507.

Redanz S, Standar K, Podbielski A, Kreikemeyer B. Heterologous Expression of *sahH* Reveals That Biofilm Formation Is Autoinducer-2-independent in *Streptococcussanguinis* but Is Associated with an Intact Activated Methionine Cycle. J. Biol. Chem. 2012; 287:36111-36122.

Rezavandi K, Palmer RM, Odell EW, Scott DA, Wilson RF. Expression of ICAM-1 and E-selectin in gingival tissues of smokers and non-smokers with periodontitis. J Oral Pathol Med. 2002 Jan;31(1):59-64.

Rosan B, Lamont R J. Dental plaque formation. Microbes and Infection. 2000; 2:1599-1607.

Sayers NM, Drucker DB, Morris JA, Telford DR. Effect of nicotine on bacterial toxins associated with SIDS. Arch Dis Child. 1995; 73:549-51.

Sayers NM, James JA, Drucker DB, Blinkhorn AS. Possible Potentiation of Toxins From *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, and *Porphyromonas gingivalis* by Cotinine. J. Periodontol. 1999; 70(11):1269-1275.

Seneviratne CJ, Leung KCF, Wong CH, Lee SF, Li X, Leung PC, Lau CBS, Wat E, Jin L. Nanoparticle-Encapsulated Chlorhexidine against Oral Bacterial Biofilms. Plos One. 2014; 9(8):e103234.

Shchipkova AY, Nagaraja HN, Kumar PS. Subgingival Microbial Profiles of Smokers with Periodontitis. J Dent Res. 2010; 89(11):1247-1253.

Sheikhi M, Gustafsson A, Jarstrand C. Cytokine, elastase and oxygen radical release by *Fusobacterium nucleatum*-activated leukocytes: a possible pathogenic factor for periodontitis. J Clin Periodontol. 2000; 27:758-762.

Silva MP, Feres M, Sirotto TA, Soares GM, Mendes JA, Faveri M, Figueiredo LC. Clinical and microbiological benefits of metronidazole alone or with amoxicillin as adjuncts in the treatment of chronic periodontitis: a randomized placebo-controlled clinical trial. J Clin Periodontol. 2011 Sep; 38(9):828-37.

Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. J Clin Periodontol. 1998 Feb; 25(2):134-44.

Socransky, SS, Haffajee, AD. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. Periodontol 2000. 2002; 28:12-55.

Socransky SS, Smith C, Haffajee AD. Subgingival microbial profiles in refractory periodontal disease. J Clin Periodontol. 2002; 29:260-268.

Socransky SS, Haffajee AD. Periodontal microbial ecology. Periodontol 2000. 2005; 38:135-187.

Sørensen LT, Nielsen HB, Kharazmi A, Gottrup F. Effect of smoking and abstention on oxidative burst and reactivity of neutrophils and monocytes. Surgery. 2004; 136:1047-1053.

Stingu CS, Eschrich K, Rodloff AC, Schaumann R, Jentsch H. Periodontitis is associated with a loss of colonization by *Streptococcus sanguinis*. Journal of Medical Microbiology. 2008; 57:495–499.

Stoltenberg JL, Osborn JB, Pihlstrom BL, Herzberg MC, Aeppli DM, Wolff LF, Fischer GE. Association between cigarette smoking, bacterial pathogens, and periodontal status. J Periodontol. 1993; 64: 1225-30.

Teughels W, Van Eldere J, van Steenberghe D, Cassiman JJ, Fives-Taylor P, Quirynen M. Influence of nicotine and cotinine on epithelial colonization by periodontopathogens. J Periodontol. 2005 Aug; 76(8):1315-22.

Tipton DA, Dabbous MK. Effects of nicotine on proliferation and extracellular matrix production of human gingival fibroblasts in vitro. J Periodontol. 1995 Dec; 66(12):1056-64.

Uitto VJ, Baillie D, Wu Q, Gendron R, Grenier D, Putnins EE, Kanervo A, Firth JD. *Fusobacterium nucleatum* increases collagenase 3 production and migration of epithelial cells. Infect Immun. 2005; 73:1171-1179.

Umeda M, Chen C, Bakker I, Contreras A, Morrison JL, Slots J. Risk indicators for harboring periodontal pathogens. J Periodontol. 1998 Oct; 69(10):1111-8.

Yost S, Duran-Pinedo AE, Teles R, Krishnan K, Frias-Lopez J. Functional signatures of oral dysbiosis during periodontitis progression revealed by microbial metatranscriptome analysis. Genome Medicine. 2015; 7:27.

Zonuz, AT; Rahmati, A; Mortazavi, H; Khashabi, E; Farahani, RM. Effect of cigarette smoke exposure on growth of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguis*: an in vitro study. Nic Tob Res. 2008; 10(1):63-7.