

EXTRAÇÃO DE RNA DE AMOSTRAS CLÍNICAS DE DENTINA CARIADA

Rup AG¹, Corralo DJ², Parolo CCF¹, Do T³, Cardoso AC¹; Maltz M¹

¹ Faculdade de Odontologia – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

² Faculdade de Odontologia – Universidade de Passo Fundo

³ School of Dentistry – University of Leeds, Reino Unido



INTRODUÇÃO

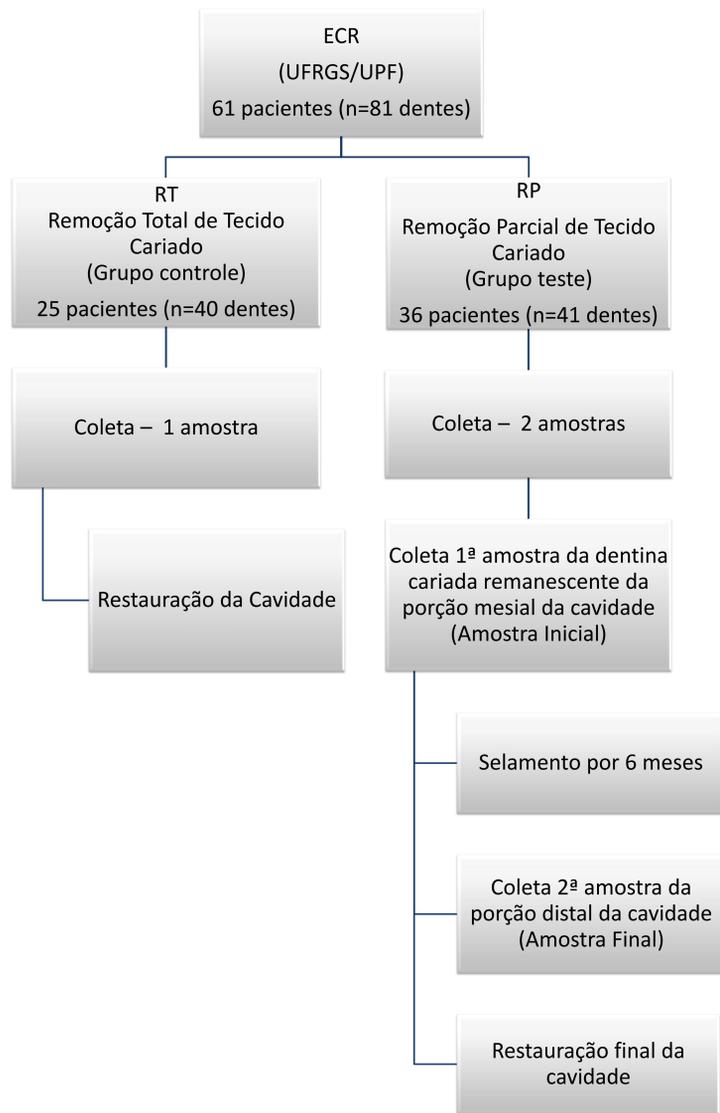
O estudo da expressão gênica de micro-organismos remanescentes após a remoção da dentina cariada em um tratamento restaurador permite compreender as modificações nas interações entre a comunidade microbiana relacionadas a este tratamento

OBJETIVO

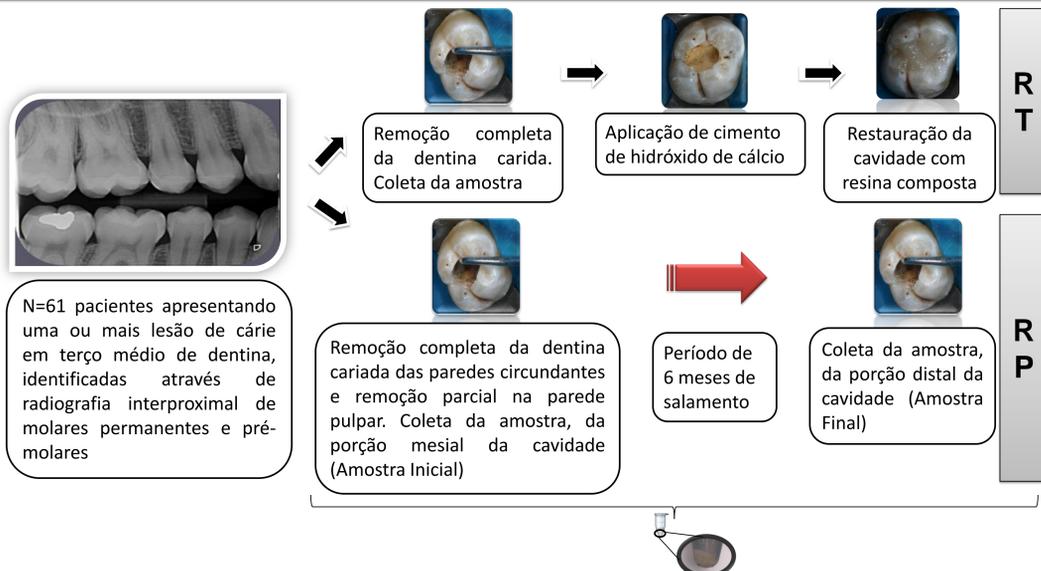
Avaliar as modificações na composição e na expressão gênica da microbiota metabolicamente ativa da dentina em lesões de cárie, antes e depois de dois tipos de tratamentos: convencional - com remoção total da dentina cariada (grupo controle - RT) - versus conservador - com remoção parcial da dentina cariada (grupo teste - RP).

METODOLOGIA

DESENHO DO ESTUDO



COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS



Foram coletadas 81 amostras e armazenadas e microtubos contendo 1 mL de solução estabilizadora de RNA mantido a temperatura ambiente por um período máximo de 48 hora, então centrifugados a 10.000rpm durante um minuto e o pellet armazenado a -80°C

Foi extraído o RNA microbiano e realizado o preparo das bibliotecas genômicas para o sequenciamento por NGS (Next Generation Sequencing) (sequenciador Illumina HiSeq3000)

AGRADECIMENTOS



RESULTADOS

Tabela 1 - Concentração total de RNA (ng/100µL) por amostras de dentina cariada dos grupos teste (RP) nos diferentes tempos de tratamento (I= inicial; F=final), e do grupo controle (RT), no tempo inicial (I=inicial).

Amostras	Concentração de RNA (ng/100µL)			Amostras	Concentração de RNA (ng/100µL)		
	RP		RT		RP		RT
	I	F	I		I	F	I
1	22,51	38,67	0	22	0	perdido	0
2	10,95	perdido	0	23	0	perdido	10,35
3	9,57	73,7	0	24	0	0	0
4	0	25,74	10,19	25	0	perdido	0
5	4,43	5,38	0	26	0	16,08	16,39
6	7,62	0	0	27	0	0	0
7	45,5	7,75	0	28	0	0,77	0
8	3,51	0	0	29	20,42	perdido	12,3
9	2,92	33,43	0	30	19,92	27,2	97,09
10	9,2	23,39	0	31	0	1,67	0
11	10,21	0	8,34	32	0	0	0
12	0	31,38	0	33	19,35	0	33,17
13	42,54	8,6	1	34	0	10,94	0
14	1,39	0	12,34	35	26,84	0	6,27
15	2,18	17,28	8,26	36	2,46	0	0
16	0	0	0	37	0	44,46	0
17	1,52	perdido	8,33	38	0	88,37	32,19
18	6,29	14,68	0	39	0	0	8,81
19	8,92	perdido	13,01	40	10,91	perdido	-
20	1,93	2,58	7,61	41	6,9	perdido	0
21	0	0	0				

Para a obtenção de bibliotecas genômicas com qualidade para sequenciamento, o total do RNA da amostra deve ser aproximado ou superior a 50 ngRNA/100uL. Por esse motivo as diferentes amostras foram agrupadas.

Tabela 2 - Agrupamento das amostras do grupo teste (n=4) e grupo controle (n=3)

Pools	Amostras de dentina cariada	
	RP	RT
	I e F	I
1	1, 2, 4, 6, 10, 17, 18, 19, 26, 41	4, 11, 13, 14, 15, 17, 19, 23, 26, 35
2	3, 8, 11, 16, 20, 31, 34, 45, 36, 38, 40	13, 14, 26, 29, 30
3	5, 12, 13, 14, 15, 28, 29, 30, 33, 37	20, 33, 38, 39
4	7,9	-

Tabela 3 - Concentração total de RNA (ng/100µL) por pools das amostras de dentina cariada dos grupos teste (remoção parc RP) nos diferentes tempos de tratamento (I= inicial; F=final), e do grupo controle (remoção total da dentina cariada, RT), no tempo inicial (I=inicial) usadas para o preparo das bibliotecas genômicas.

Pools	Concentração total de RNA (ng/100µL) por pool		
	RP		RT
	I	F	I
1	73,91	118,56	81,84
2	55,86	167,89	139,32
3	87,85	110,28	81,78
4	48,42	41,18	-

Tabela 4 - Validação da qualidade das bibliotecas genômicas com Agilent D1000 ScreenTape (Agilent Technologies, Inc.) obtida dos pools das amostras de dentina cariada dos grupos teste (RP) nos diferentes tempos de tratamento (I= inicial; F=final), e do grupo controle (RT), no tempo inicial (I=inicial). Bibliotecas genômicas com boa qualidade deveriam ter um pico maior do que 269 pares de base (≥269pb).

Pools	Pico das bibliotecas genômicas (pares de base)		
	RP		RT
	I	F	I
1	≤ 269	≤ 269	≤ 269
2	≤ 269	≤ 269	≥ 269
3	≥ 269	≤ 269	≤ 269
4	≤ 269	≤ 269	-

CONCLUSÃO

✓As quantidades de RNA recuperadas das amostras de dentina se apresentam muito reduzidas.

✓É preciso avaliar novos métodos de extração de RNA em amostras clínicas de dentina que permitam produção de bibliotecas genômicas passíveis de sequenciamento que permitam a comparação das duas terapias.