

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

LUDMILA COUTINHO MORAES

ABORDAGEM METAGENÔMICA DE PROCARIOTOS E PRESENÇA DE GENES
DE RESISTÊNCIA A AGENTE ANTIMICROBIANOS EM SALIVA, BIOFILME
SUPRAGENGIVAL E CANAIS RADICULARES COM INFECÇÕES AGUDAS

PORTO ALEGRE
2016

LUDMILA COUTINHO MORAES

ABORDAGEM METAGENÔMICA DE PROCARIOTOS E PRESENÇA DE GENES
DE RESISTÊNCIA A AGENTE ANTIMICROBIANOS EM SALIVA, BIOFILME
SUPRAGENGIVAL E CANAIS RADICULARES COM INFECÇÕES AGUDAS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Odontologia, área de concentração em Clínica Odontológica/Endodontia.

Linha de pesquisa: Epidemiologia, Etiopatogenia e Repercussão das Doenças da Cavidade Bucal e Estruturas Anexas.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Montagner

PORTO ALEGRE
2016

CIP - Catalogação na Publicação

Moraes, Ludmila Coutinho

Abordagem metagenômica de procariotos e presença de genes de resistência a agente antimicrobianos em saliva, biofilme supragengival e canais radiculares com infecções agudas / Ludmila Coutinho Moraes. -- 2016.

96 f.

Orientador: Francisco Montagner.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Odontologia, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Porto Alegre, BR-RS, 2016.

1. Resistência a medicamentos. 2. Ecologia. 3. Saliva. 4. Placa dental. 5. Canal radicular. I. Montagner, Francisco, orient. II. Título.

LUDMILA COUTINHO MORAES

ABORDAGEM METAGENÔMICA DE PROCARIOTOS E PRESENÇA DE GENES
DE RESISTÊNCIA A AGENTE ANTIMICROBIANOS EM SALIVA, BIOFILME
SUPRAGENGIVAL E CANAIS RADICULARES COM INFECÇÕES AGUDAS

Tese apresentada ao Programa de Pós- Graduação em
Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do
Sul como requisito parcial para a obtenção do título de
Doutor em Odontologia, área de concentração em
Clínica Odontológica/ Endodontia.

Banca Examinadora

Profa. Dra. Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes

Profa. Dra. Clarissa Cavalcanti Fatturi Parolo

Prof. Dr. Marcus Vinicius Reis Só

Prof. Dr. Francisco Montagner (Orientador)

Porto Alegre, 05 de dezembro de 2016.

Dedico este trabalho...

*Aos meus amados pais **Márcio e Eliany**,
com todo amor e gratidão!*

*E à minha filhinha **Liz**,
“I live only for your happiness”*

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Agradeço...

Acima de tudo, agradeço a **Deus** por ser sempre tão maravilhoso comigo e iluminar minha vida!

Minha **família**, que mesmo à distância em grande parte desta jornada, se manteve perto, me apoiando, incentivando e torcendo!

Ao meu irmão **Márcio Jr.** e minha cunhada **Maria Tereza**, padrinhos da minha pequena e grandes parceiros, com quem posso sempre contar!

À minha sócia e grande amiga **Karla Sado**, pessoa que admiro e considero muito! Foi muito importante durante todo este período!

Às minhas queridas amigas do Mestrado, grande presente que o Sul me deu! **Alessandra Vaucher, Aline Justo, Carolina Hoppe e Eloisa Assmann**, as Endogirls! Vocês foram com certeza a parte mais alegre da minha história nesta cidade!

À querida **Pauline Lang**, minha metade científica. Amiga e parceira sempre muito disposta a ajudar! Muito obrigada! Este trabalho também é seu!

E finalmente ao meu orientador Prof. **Francisco Montagner**. Difícil colocar em poucas linhas o que foi esta caminhada ao seu lado, ainda mais não sendo boa com palavras. Certamente, foi mais longa e mais feliz do que eu inicialmente imaginei. Ter chegado até este momento tendo tido como orientador um professor tão competente e admirável foi uma honra! “Se você pode sonhar, você pode realizar”(Walt Disney). Muito obrigada por me fazer acreditar que era possível e hoje chegarmos aqui!

Agradecimentos

À Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, na pessoa do diretor Prof. Dr. Pantelis Varvaki Rados e ao coordenador do Programa de Pós-Graduação em Odontologia Prof. Dr. Cassiano Kuchenbecker Rösing.

Aos professores de Endodontia da Faculdade de Odontologia da UFRGS: Fabiana Grecca, João Ferlini Filho, Patrícia Kopper Mora, Regis Burmeister dos Santos, Renata Grazziotin, Simone Bonato Luisi e Marcus Vinícius Reis Só. Grupo unido e sempre solícitos a qualquer momento para ajudar os alunos!

À querida Profa. Dra. Maria Beatriz Cardoso Ferreira, pessoa única, grande professora e amiga! Incansável estudiosa que com muito carinho estimula seus alunos a serem sempre melhores.

Ao prof. Marcus Só (novamente), meu orientador no Mestrado, que sempre se manteve próximo e interessado na minha trajetória, me encorajando sempre com palavras amáveis!

Ao Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Oral (LABIM). Agradeço a Profa. Dra Marisa Maltz por disponibilizar o laboratório para a realização de grande parte deste estudo. Agradeço, ainda, a Prof. Dra. Clarissa Cavalcanti Fatturi Parolo e Luisa Mercado pelo auxílio e esclarecimento de várias dúvidas que tive.

Ao Laboratório da Patologia da UFRGS e a Profa. Dra. Fernanda Visioli, que oportunizou o uso do laboratório e esteve sempre muito disponível a qualquer questionamento. Muito obrigada!

À Prof. Dra. Adriana Giongo Borges e Prof. Dr. Luiz Gustavo Borges pela primorosa análise de parte dos dados deste estudo.

À Profa Paula da Fonte Sanches do Centro Estadual de Educação Tecnológica Paula Souza (CEETEPS, Piracicaba Brasil) pela assessoria na análise de dados.

Ao Laboratório Helixxa - Genomics Service Provider (Paulínia, SP), nas pessoas de Fabio O. Morais e Silva e Felipe Nóbrega pelo auxílio técnico no preparo das bibliotecas e sequenciamento NGS para metagenômica.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa durante o período de realização deste doutorado.

Aos meus colegas de Doutorado, em especial, as que ingressaram junto comigo em 2013: Letícia Mestieri, Ivana Zaccara, Fernanda Busanelo e, novamente, Pauline Lang. Foram muitos momentos que vivemos juntas que guardarei sempre com muito carinho e saudade!

Às minhas queridas amigas Adriana Corsetti, Denise Dubina e Roberta Ávila. Pessoas muito especiais que tornaram minha temporada em Porto Alegre muito mais leve. Muitas histórias e risadas marcaram esta época. À vocês, meu eterno carinho!

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram
para a concretização deste trabalho.

LISTA DE ABREVIATURAS

S	Saliva
BS	Biofilme supragengival
CR	Canal radicular
G1	Grupo 1
G2	Grupo 2
OTU	Unidade taxonômica operacional
UPMGA	Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean
PCR	Polymerase Chain Reaction
NGS	Next-Generation Sequencing
SAR	Sequenciamento de Alto Rendimento
SE	Single-end
PE	Paired-end
QIIME	Quantitative Insights Into Microbial Ecology

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Curva de rarefação mostrando o número observado de OTUs (nível de similaridade de 97%), considerando-se o grupo das amostras (A) ou de acordo com o sítio avaliado (B) (Software PRINSEQ – Schmieder & Edwards, 2011). Pág. 37
- Figura 2** Abundância relativa de OTUs presentes em amostras de saliva, biofilme supragengival e canal radicular em pacientes que não utilizaram ou utilizaram antibiótico previamente ao atendimento odontológico de urgência, considerando o filo a que pertencem. Pág. 40
- Figura 3** Medidas de α -diversidade, considerando-se a mediana das medidas para cada um dos dez passos de rarefação. Letras maiúsculas indicam diferença entre amostras de um mesmo ecossistema, pertencentes a grupos diferentes (Teste U de Mann-Whitney, $P < 0,05$). Letras minúsculas diferentes indicam diferença entre S, BS e CR em um mesmo grupo (Teste de Friedman, post hoc de Dunn, $P < 0,05$). Pág. 44
- Figura 4** Medidas de beta-diversidade: análise de coordenadas principais para as amostras, com método de agrupamento UPGMA, com jackknifing, e método de comparação UniFrac com peso. Representação dos três eixos principais (PC1, PC2, PC3). G1 = sem antibiótico; G2 = com antibiótico; S = saliva; BS = biofilme supragengival; CR = canal radicular. Pág. 48
- Figura 5** Dendograma representativo do perfil da presença de genes de resistência a agentes antimicrobianos em amostras dos grupos G1 e G2. Método de agrupamento UPMGA, com distância Euclidiana. Coeficiente de correlação cofenético = 0,8171. Pág. 50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Estudos que utilizaram SAR para caracterização de infecções endodônticas agudas.	Pág. 21
Tabela 2	Sequências de nucleotídeos, temperaturas específicas e referências para a realização das etapas da reação de PCR.	Pág. 33
Tabela 3	Dados demográficos correspondentes aos pacientes que participaram do estudo.	Pág. 35
Tabela 4	Controle de qualidade dos dados gerados por meio de sequenciamento MiSeq Illumina.	Pág. 36
Tabela 5	Número de OTUs identificados em cada nível taxonômico.	Pág. 38
Tabela 6	Percentual de OTUs presentes em amostras de saliva, biofilme supragengival e canal radicular em pacientes que não utilizaram ou utilizaram antibiótico previamente ao atendimento odontológico de urgência, considerando o filo a que pertencem.	Pág. 39
Tabela 7	Abundância relativa em porcentagem de OTUs presentes em amostras de saliva, biofilme supragengival e canal radicular em pacientes que não utilizaram ou utilizaram antibiótico previamente ao atendimento odontológico de urgência, considerando o gênero a que pertencem.	Pág. 42
Tabela 8	Frequência de detecção dos genes de resistência a agentes antimicrobianos em amostras dependendo do uso prévio ou não de agentes antimicrobianos.	Pág. 49

RESUMO

O objetivo do presente estudo clínico foi compreender o efeito do uso prévio de agentes antimicrobianos na diversidade e a estrutura do microbioma procariótico de saliva, biofilme supragengival e canal radicular de dentes com infecção endodôntica aguda. Realizaram-se coletas microbiológicas de saliva (S), biofilme supragengival (BS) e canal radicular (CR) de pacientes que não utilizaram antibióticos (G1: n=6) e de pacientes que utilizaram antibióticos (G2: n=6). Para a caracterização das comunidades de procariotos por meio de sequenciamento de alto rendimento, foram produzidos *pools* de seis amostras para cada um dos sítios. A região hipervariável V3-V4 do gene 16S rRNA foi amplificada e a plataforma Illumina MiSeq foi empregada para análise das sequências geradas. Foram determinadas a presença e abundância relativa das unidades taxonômicas operacionais (OTUs) em cada amostra. Procedeu-se a análise de alfa-diversidade para cada amostra, considerando-se as métricas de Simpson, dominância, estimativa de riqueza de Chao-1 e o Índice de Shannon. Os valores obtidos foram comparados por meio de testes estatísticos. Para a análise dos índices de beta-diversidade, empregou-se o método de agrupamento UPGMA, com *jackknifing* e método de comparação UniFrac com peso. A representação gráfica tridimensional da beta-diversidade foi realizada por meio de análise de coordenadas principais. A técnica de PCR gene específico foi empregada para determinar a presença de genes relacionados à resistência bacteriana para agentes beta-lactâmicos (*blaTEM*, *blaZ*, *ampC*, *mecA*), macrolídeos (*ermB*, *ermC*, *mefA*), tetraciclinas (*tetM*, *tetQ*, *tetW*), lincosamidas (*lnuB*, *lsaB*) e vancomicina (*vanA*, *vanD*, *vanE*). A similaridade para a presença/ausência de genes de resistência nas amostras de S, BS e CR em G1 e G2 foi determinada por meio de coeficiente de agrupamento, utilizando-se o método UPGMA com distância Euclidiana. Todos os pacientes apresentavam infecção endodôntica aguda, caracterizada pela presença de dor espontânea, necrose pulpar e dor à percussão vertical. Aumento de volume foi observado em 8/12 pacientes. Os pacientes do Grupo 2 utilizaram beta-lactâmicos previamente à consulta (amoxicilina = 5; cefalexina = 1). Há predomínio de integrantes do domínio Bactéria em todas S, BS e CR. Archaea pertencentes ao gênero *Methanobrevibacter* foram encontradas apenas em amostras de CR, constituindo menos de 1% do total de OTUs (G1-CR = 0,319%; G2-CR = 0,014%). Há predomínio de bactérias dos filos Firmicutes e Bacteroidetes em amostras de S, BS e CR. Há redução intensa no percentual de OTUs pertencentes ao Filo Firmicutes em amostras de saliva, quando antibiótico foi utilizado (G1-S = 75,371; G2-S = 35,242). Comportamento oposto ocorreu neste ecossistema para integrantes do Filo Bacteroidetes (G1-S = 12,657; G2-S = 33,947). Tanto em G1 quanto em G2, bactérias do gênero *Streptococcus* predominam em amostras de S e BS. Em canais radiculares, maiores percentuais de OTUs foram observados para os gêneros *Porphyromonas* e *Prevotella*. As métricas de alfa-diversidade indicam que o uso prévio de antimicrobiano parece oportunizar o estabelecimento de espécies antes menos abundantes, especialmente em saliva (dominância: G1-S>G2-S; índice de Shanon: G1-S<G2-S; índice de Simpson: G1-S<G2-S; índice de Chao-1: G1-S<G2-S). A análise de beta-diversidade mostra proximidade entre G1-BS e G2-BS; há distanciamento entre G1-S e G2-S. As amostras G1-CR e G2-CR estão mais distantes de S e BS, sugerindo maior seleção imposta pelo ecossistema do CR aos procariotos. Os genes de resistência mais frequentemente detectados foram *tetM*, *tetQ*, *tetM*, *ermB* e *mefA*. Não foram

detectados genes *vanA*, *vanD*, *vanE*, *blaZ*, *mecA*, *InuB* e *ermC*. O gene *ermB* foi frequentemente detectado em amostras de S, BS e CR em ambos os grupos. Em pacientes que não utilizaram antibiótico, o gene *tetM* e o gene *tetQ* foram detectados simultaneamente em S, BS e CR (*tetM* = 4/6; *tetQ* = 3/6). A análise multivariada não demonstrou nível de agrupamento alto entre amostras de um mesmo paciente, de um mesmo ecossistema, ou de um mesmo grupo. A partir dos resultados do presente estudo, observou-se que a utilização de agente antimicrobiano beta-lactâmico parece alterar parâmetros composicionais de comunidades de procaríotos na cavidade bucal. Entretanto, particularidades relativas a cada ecossistema podem modular a extensão deste efeito, parecendo ser mais intensos em amostras de S do que em BS e CR.

PALAVRAS-CHAVE: antibacterianos, boca, saliva, placa dental, cavidade pulpar, ecologia, resistência a medicamentos.

ABSTRACT

The present clinical study aimed to assess the effect of antibiotics over the diversity and structure in prokaryotic communities of saliva, supragingival biofilm and root canal of teeth with acute primary infections. Samples of saliva (S), supragingival biofilm (BS) and root canal of teeth with acute primary infections (CR) were collected from patients, and were grouped according with the previous use of antibiotic (G1 = no antibiotics; G2 = antibiotics). Pooled samples for each community were evaluated. DNA sequencing was performed with MiSeq (Illumina). The V3-V4 hypervariable region from the 16S rRNA gene was amplified. The presence and relative abundance of the operational taxonomic units (OTUs) was determined for each sample. Alpha-diversity analysis was performed with the Simpson's index, dominance, Chao-1 richness index and Shannon's index. Statistical analysis was carried out to compare their values for each community. Beta-diversity was computed through UPGMA clustering and jackknifing. The principal coordinate analysis employed weighted UniFrac. Gene-specific PCR was employed to detect resistance genes to lactamics (*blaTEM*, *blaZ*, *ampC*, *mecA*), macrolides (*ermB*, *ermC*, *mefA*), tetracyclines (*tetM*, *tetQ*, *tetW*), lincosamides (*InuB*, *IsaB*) e vancomycin (*vanA*, *vanD*, *vanE*). The UPGA clustering analysis with Euclidean distance was applied to investigate the existence of similar groups of samples. A dendrogram was constructed to show the arrangement of the sample groups produced by clustering. All the patients had primary acute endodontic infections, with spontaneous pain, pulp necrosis and tenderness on percussion. Swelling was observed for 8 out of 12 patients. Patients from G2 had lactamics before the urgency appointment (amoxicillin = 5; cephalexin = 1). Bacteria were predominant in S, BS and CR samples. Archaea belonging to the genus *Methanobrevibacter* were only detected in RC samples and comprised less than 1% of all the OTUs (G1-CR = 0.319%; G2-CR = 0.014%). The great majority of the detected OTUs in S, BS, and CR belonged to the phyla Firmicutes and Bacteroidetes. Reduction in the percentage of Firmicutes was observed in G2-S (G1-S = 75.371%; G2-S = 35.242%). A distinct behavior was demonstrated by the Bacteroidetes (G1-S = 12.657%; G2-S = 33.947%). Components belonging to the genus *Streptococcus* were predominant in S and BS, for both G1 and G2. CR harbored high percentage of species belonging to the genus *Porphyromonas* and *Prevotella*. The alpha-diversity indexes demonstrated that the G2-S had an increase in low abundant species (dominance: G1-S > G2-S; Shanon index: G1-S < G2-S; Simpson index: G1-S < G2-S; Chao-1 index: G1-S < G2-S). Beta-diversity showed that G1-BS and G2-BS had close spatial distribution. G1-CR and G2-CR were more distant from S and BS samples. The RC may promote a most intense species selection, due to environmental conditions. The most frequently detected genes associated with resistance to antibiotics were *tetM*, *tetQ*, *tetM*, *ermB*, and *mefA*. The genes *vanA*, *vanD*, *vanE*, *blaZ*, *mecA*, *InuB*, and *ermC* were not detected in the samples. The gene *ermB* was frequently detected in S, BS and CR samples. In patients from G1, *tetM* and *tetQ* were detected simultaneously in all the three environments (*tetM* = 4/6; *tetQ* = 3/6). There was no clustering behavior for samples belonging to different environments in the same patients and between the same environment samples from different groups. An overall analysis from the data allows for suggesting that the use of lactamic agents may alter compositional parameters from prokaryotic communities in the oral cavity to different extents. Specific environmental characteristics from each site may modulate the effect that seemed to be more intense for S than for BS and CR.

KEY-WORDS: anti-bacterial agents, mouth, saliva, dental plaque, dental pulp cavity, ecology, drug resistance.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	Pág. 01
2	REVISÃO DE LITERATURA	Pág. 03
2.1	Infecções Endodônticas Agudas: Conceito e Abordagem Terapêutica	Pág. 03
2.2	O Microbioma Oral e a Infecção Endodôntica Aguda	Pág. 07
2.3	Técnicas de Sequenciamento de Alto Rendimento: Conceitos e Achados	Pág. 18
3	OBJETIVOS.....	Pág. 23
4	MATERIAL E MÉTODO	Pág. 24
4.1	Seleção dos Participantes	Pág. 24
4.2	Coleta das Amostras	Pág. 26
4.3	Isolamento do DNA Microbiano das Amostras e PCR	Pág. 28
4.4	Sequenciamento de Alto Rendimento Illumina-Miseq	Pág. 29
4.5	Detecção da Presença de Genes de Resistência a Antibióticos	Pág. 31
5	RESULTADOS	Pág. 35
5.1	Dados Demográficos	Pág. 35
5.2	Análise das Comunidades de Procariotos	Pág. 36
5.3	Detecção de genes de resistência a agentes antimicrobianos	Pág. 49
6	DISCUSSÃO	Pág. 51
6.1	Aspectos Metodológicos e Análise de Dados	Pág. 51
6.2	Composição e diversidade procariótica em amostras de S, BS e CR	Pág. 56
6.3	Detecção de genes de resistência a agentes antimicrobianos em Saliva, Biofilme supragengival e Canal Radicular	Pág. 61
7	CONCLUSÃO	Pág. 65
	REFERÊNCIAS	Pág. 67
	APÊNDICE	Pág. 80

1 INTRODUÇÃO

A cavidade oral abriga um grande número de microrganismos organizados em comunidades altamente complexas, interagindo entre si e com o hospedeiro. Essas interações incluem coagregação física, sinalização química, transferência de informação genética, estímulo do sistema imunológico, complementação metabólica, sinergismo, entre outros. Estas interações contribuem para que o efeito da comunidade microbiana seja maior do que a das espécies individuais que a formam. Torna-se necessário o uso de abordagens holísticas, por meio de metagenômica, para estudar a ecologia microbiana de diferentes sítios da boca, em condições de saúde e doença (Zaura & Mira, 2015).

A maioria das espécies residentes da cavidade oral são comensais, mas podem se tornar patogênicas em respostas a mudanças no ambiente ou outros gatilhos, incluindo a qualidade da higiene pessoal de um indivíduo. Esta microbiota é, desta forma, a fonte de patógenos para cárie dentária e infecções endodônticas (Avila et al., 2009).

O esmalte, a dentina e cimento protegem a polpa dental contra agressões microbianas. Quando essas barreiras são invadidas, a polpa torna-se inflamada, necrosa e é colonizada. Duas condições clínicas podem estar associadas à primeira infecção do sistema de canais radiculares: presença de sintomatologia dolorosa espontânea ou ausência de sintomatologia dolorosa (Lopes & Siqueira, 2004). Clinicamente, elas são representadas por processos apicais agudos e crônicos, respectivamente. As dores associadas à necrose e aos processos apicais agudos representam grande parte dos motivos pelos quais os pacientes procuram o atendimento odontológico (Estrela et al., 2001; De Paula et al., 2014).

O tratamento das infecções de origem endodôntica consiste na desinfecção local do sistema de canais radiculares por meio da terapia endodôntica e, quando possível, a drenagem cirúrgica da coleção purulenta. Agentes antimicrobianos podem ser usados como uma medida complementar para o controle de infecções agudas. Entretanto, o uso excessivo e abusivo de antibióticos pode promover a seleção de patógenos resistentes e permitir sua emergência e disseminação (Meyer et al., 2013). Não raro, é possível receber pacientes em uso

desses agentes previamente à consulta, seja por automedicação ou por prescrição prévia (De Paula et al., 2014).

Os ambientes orais têm características heterogêneas (nutrientes, disponibilidade de oxigênio, pH) que podem exercer pressão seletiva produzindo diferentes perfis de comunidades microbianas e seleção de espécies. Estes fatores podem modular também a presença de componentes específicos de virulência, tais como genes de resistência a antimicrobianos (Siqueira & Rôças, 2009; Moraes et al., 2015b). Devido à propagação da resistência bacteriana, a exposição humana aos antibióticos recebe atenção crescente. Zaura et al. (2015) analisaram os efeitos de variados antibióticos em microbiomas de adultos saudáveis. A composição do microbioma salivar permaneceu inesperadamente estável, enquanto que os antibióticos afetaram negativamente o microbioma fecal. Não obstante, a exposição a diferentes antibióticos favoreceu a presença de elementos relacionados à resistência antibiótica. Os autores sugerem ainda que o microbioma da cavidade bucal apresenta resiliência, refletida na maior capacidade de recuperação após o efeito de um agente modificante externo.

Tradicionalmente, estudos microbiológicos em Endodontia excluem amostras de pacientes que fizeram uso de antibiótico prévio à consulta. Um aspecto importante que não é comumente investigado é o impacto dos antibióticos administrados sistematicamente no microbioma em diferentes nichos orais. O presente estudo buscou caracterizar a microbiota de ambientes representativos da cavidade oral, por meio de tecnologia de sequenciamento de alto rendimento e testá-los quanto à presença de genes de resistência a antibióticos, comparando grupos de pacientes que fizeram uso ou não de agentes antimicrobianos previamente ao atendimento.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Infecções Endodônticas Agudas: Conceito e Abordagem Terapêutica

A infecção endodôntica se desenvolve em canais radiculares de dentes desprovidos de polpa, após a necrose, seja como consequência de cárie, trauma dentário ou após a remoção do tecido pulpar para tratamento endodôntico. Nas infecções endodônticas agudas, as bactérias e seus subprodutos localizados no interior do sistema de canais radiculares com necrose invadem os tecidos perirradiculares e têm potencial para se difundir para outros espaços anatômicos da cabeça e pescoço. Origina-se assim um abscesso apical agudo, que é um processo inflamatório difuso com formação de pus (Siqueira & Rôças, 2013).

Um abscesso consiste em uma coleção de pus em uma cavidade formada por liquefação de tecidos. Os termos abscesso dentário, abscesso dentoalveolar e abscesso odontogênico são frequentemente usados para descrever abscessos formados nos tecidos que circundam o dente. A causa pode ser uma infecção endodôntica (abscesso apical agudo) ou uma infecção periodontal (abscesso periodontal). O abscesso apical agudo é a forma mais comum de abscessos dentários (Siqueira & Rôças, 2013).

Em revisão de literatura, Gutmann et al. (2009) relataram que as alterações periapicais agudas associadas à necrose pulpar são a periodontite apical aguda e o abscesso apical agudo. De acordo com os autores, a periodontite apical aguda é uma inflamação apical, caracterizada por dor, necrose pulpar e sensibilidade à percussão ou durante o ato de ocluir. O dente portador de abscesso apical agudo apresenta-se com dor intensa espontânea e necrose pulpar. A presença de edema não é mandatória e, se presente, localiza-se na área muco-gengival ou em planos e espaços fasciais. A dor à percussão vertical é intensa e o dente pode apresentar graus variáveis de mobilidade.

O tratamento das infecções endodônticas tem sido fundamentalmente baseado na eliminação inespecífica dos microrganismos intrarradiculares através da terapia endodôntica. Sob a perspectiva microbiológica, o objetivo é causar perturbações significativas no ecossistema, afetando comunidades microbianas e

comprometendo de algum modo a sua sobrevivência. Por exemplo, a erradicação de elementos-chave pode levar a um desastre ecológico para a comunidade. Esta acabaria sucumbindo pela morte ou diminuição drástica dos membros restantes (Siqueira & Rôças, 2009).

O manejo clínico de uma infecção endodôntica aguda envolve debridamento do sistema de canais radiculares e drenagem local, sempre que possível. Em situações específicas, os antibióticos podem ser prescritos como medida complementar em casos onde há envolvimento sistêmico (manifestando febre, mal-estar e linfadenopatia), comprometimento local amplo (celulite, edema difuso, trismo) ou em pacientes que apresentam maior risco de infecção secundária resultante de bacteremia (Siqueira & Rôças, 2013).

O termo “antimicrobiano” é usado para produtos químicos que são produzidos por bactérias e/ou antimicrobianos sintéticos produzidos num laboratório que matam ou inibem o crescimento de bactérias (Davies & Davies, 2010). Para Wannmacher & Ferreira (1999), a tomada de decisão quanto à indicação, seleção e modo de administração de um antibiótico deve considerar: achados clínicos que indiquem ou suportem o uso de antimicrobianos; agente causal da infecção; grupo de antimicrobiano a ser adotado; fatores do hospedeiro que indiquem regime especial de prescrição; via de prescrição; seguimento do tratamento; e, vantagens na utilização da associação de antimicrobianos.

Considerando-se a natureza da infecção endodôntica aguda, prefere-se empregar agentes antimicrobianos cujo espectro inclua as bactérias mais frequentemente detectadas (Siqueira & Rôças, 2013). Entretanto, se há múltiplos antimicrobianos capazes de eliminar os agentes da infecção, deve-se selecionar o melhor deles, segundo eficácia e segurança terapêuticas, comodidade de administração e menor custo (Wannmacher & Ferreira, 1999).

Flynn (2011) realizou uma revisão sistemática para determinar quais seriam os antibióticos de escolha para infecções odontogênicas e quanto tempo deve durar o tratamento. De acordo com os resultados obtidos, o autor pôde concluir que os antibióticos beta-lactâmicos têm um perfil de segurança excelente, contando que seja descartada a ocorrência reação alérgica por meio de história médica completa do paciente. Os custos da penicilina V e amoxicilina são baixos. A amoxicilina é ligeiramente menos dispendiosa do que a penicilina V e o seu regime

posológico é mais confortável, devido ao seu intervalo de dosagem mais longo. Em situações em que se observa alergia à penicilina, a clindamicina substitui os antibióticos beta-lactâmicos como o fármaco de escolha, por razões de segurança.

A resistência microbiana a antibióticos tornou-se um dos principais problemas de saúde pública do século XXI. Ela ameaça a prevenção e o tratamento efetivos de um número cada vez maior de infecções causadas por bactérias, parasitas, vírus e fungos, uma vez que não são mais sensíveis aos medicamentos. Ao longo dos últimos anos, e em vários níveis, bactérias responsáveis por infecções usuais ou mesmo severas têm desenvolvido rapidamente resistência a antibióticos que são disponibilizados no mercado. (Prestinaci et al., 2015).

Em 2014, a Organização Mundial da Saúde, indica em seu relatório que altas taxas de resistência microbiana têm sido observadas em todo o mundo. Assim, a OMS tem implementado medidas com o objetivo de desenvolver métodos padronizados de pesquisa para a obtenção de dados relativos à resistência a antibióticos em humanos. São incentivadas ainda estudos populacionais e de impacto econômico, que envolvam especialmente colaboração de centros de pesquisa em diferentes locais. (WHO, 2014).

A resistência bacteriana aos antibióticos pode ser classificada em natural (intrínseca) ou adquirida (cromossômica ou extracromossômica) (Silva, 2002). A resistência natural é aquela inerente à célula bacteriana, independente de sua exposição a um determinado antibiótico, determinada principalmente por dificuldade de permeabilidade das superfícies externas das células bacterianas. Já a resistência adquirida surge quando cepas originalmente sensíveis tornam-se resistentes após a exposição ao agente antimicrobiano, como resultado de uma alteração genética determinada por mutações ou aquisição de plasmídeos.

Para Roberts (2002), o desenvolvimento de resistência em bactérias se deve a mutações cromossômicas aleatórias, que levam a mudanças dos genes. Estas alterações cromossômicas podem ser transferidas para as células-filhas, durante a divisão celular, ou a outras bactérias, da mesma espécie ou estreitamente relacionadas, por meio de transformação e/ou de transdução.

Recentemente, Moraes et al. (2015b) agruparam, em uma revisão sistemática, estudos que avaliaram a presença de genes relacionados à resistência

bacteriana a agentes antimicrobianos por meio de técnicas moleculares em saliva, biofilme supragengival e canal radicular com infecção aguda. Trinta e três diferentes genes foram avaliados pelos estudos, estando associados à resistência aos beta-lactâmicos, macrolídeos, tetraciclina e vancomicina. Os genes *blaTEM*, *cfxA*, *tetW*, *tetM* e *ermC* foram frequentemente detectados em amostras orais. Embora a detecção de genes de resistência para antibióticos específicos não signifique necessariamente resistência aos antibióticos dos espécimes, indica um risco potencial para a expressão da proteína codificada. Este fato pode ser observado no estudo de Montagner et al (2014). Os autores detectaram o gene *cfxA/cfxA2*, associado à resistência a lactâmicos em 2 de 26 isolados de infecções endodônticas agudas. Porém, apenas uma cepa havia expressado esse gene como determinado através de métodos fenotípicos.

Lang et al. (2016) realizaram uma revisão sistemática e meta-análise para avaliar as taxas de resistência aos agentes antimicrobianos em estudos que isolaram bactérias de infecções endodônticas agudas de amostras clínicas. A maioria dos isolados foi suscetível aos agentes antimicrobianos que são frequentemente prescritos para o tratamento destas infecções. Contudo, havia uma ampla variação das taxas de resistência entre eles, sendo que variações foram observadas com o uso prévio ou não de antimicrobianos. As taxas mais baixas de resistência foram observadas para os antibióticos amoxicilina + ácido clavulânico e amoxicilina. As tetraciclina foram os antibióticos aos quais as bactérias estudadas demonstraram maiores taxas de resistência.

O uso de antibióticos parece alterar também as comunidades microbianas em sítios saudáveis do paciente. Zaura et al. (2015) relataram os efeitos de antibióticos amplamente prescritos (clindamicina, ciprofloxacina, amoxicilina e minoxicilina) no microbioma oral e do intestino. As fezes e a saliva foram coletadas imediatamente após a exposição e 1, 2, 4 e 12 meses após a administração de antibióticos ou placebo. O microbioma salivar mostrou-se significativamente mais robusto, enquanto que os antibióticos afetaram negativamente o microbioma fecal. Adicionalmente, a exposição a diferentes antibióticos aumentou a frequência de genes associados à resistência. Portanto, indivíduos saudáveis, expostos a um único tratamento com antibióticos, sofrem consideráveis mudanças microbianas e enriquecimento na resistência aos antibióticos nas fezes. A composição do

microbioma salivar permanece inesperadamente estável após uma semana. Assim, os autores salientam a necessidade da compreensão dos mecanismos associados a essa resiliência do microbioma oral, o que pode ser útil no combate à disbiose microbiana em outras partes do corpo.

Uma vez descritos os aspectos de diagnóstico da necrose pulpar associada às alterações apicais agudas, e as estratégias locais e sistêmicas para o seu tratamento, torna-se importante descrever a composição do microbioma oral e das infecções endodônticas agudas, presentes no sistema de canais radiculares.

2.2. O Microbioma Oral e a Infecção Endodôntica Aguda

Cada organismo vive em constante interação com o meio ambiente. As maiores e mais importantes interfaces entre o organismo humano e o meio ambiente são as superfícies cobertas com células epiteliais, sendo que as mucosas representam 300 m² de área e a pele representa 2 m² do corpo humano. Assim as principais vias de acesso de microrganismos são as mucosas dos tratos gastrointestinal, respiratório e urogenital. As interações das células humanas com microrganismos geralmente são fisiológicas e resultam da participação ativa de ambos. A coexistência evolucionária permitiu tanto aos microrganismos quanto ao sistema imune desenvolver mecanismos de diversificação e seleção de suas funções (Tlaskalová-Hogenová et al., 2004).

A partir de uma análise de sequências de ácidos nucleicos, a classificação filogenética dos indivíduos que constituem a vida no planeta Terra foi revista. Woese et al. (1990) propõem que se estabeleça um sistema formal de classificação dos organismos em três "domínios": Bacteria, Archaea, e Eukarya.

Considerando-se a abordagem filogenética, os domínios divergiram a partir de um ancestral comum ou de uma comunidade de organismos. Na árvore da vida, dois fatos são importantes: (1) todos os procariotos não exibem estreita relação filogenética e (2) as Archaea estão mais estreitamente relacionadas a Eukarya do que a Bacteria. Assim, a diversificação evolutiva seguiu em duas direções: uma

linhagem correspondente à Bacteria e outra linhagem que divergiu em procariotos, pertencentes ao domínio Archaea, e Eukarya, representando eucariotos (Madigan et al., 2010).

A classificação dos organismos é realizada por meio de aspectos fenotípicos associados à caracterização do material genético que está acondicionado na célula. Se o DNA dentro de uma célula não está separado do citoplasma, então essa célula é denominada de “procarioto”. Todos os procariotos conhecidos, tais como bactérias e Archaea, são unicelulares. Em contraste, se o DNA é separado do citoplasma pela membrana do núcleo, então essa célula é “eucariota”. Alguns eucariotos, como amebas, são entidades de vida livre, unicelulares. Outras células eucarióticas são parte de organismos multicelulares. Por exemplo, todas as plantas e animais são feitos de células eucarióticas (Silhavy et al., 2010). Integrantes do domínio Archaea se parecem com bactérias, pois são unicelulares e compartilham genes funcionais. Entretanto, Archaea também compartilham genes com eucariotos, além de ter muitos genes que são completamente únicos. (Albers & Meyer, 2011).

Procariotos são ubíquos, diversos e muito abundante, com o número total em $4-6 \times 10^{30}$ células (Whitman et al., 1998). Isso representa uma fonte inesgotável de microrganismos que podem interagir com os seres humanos (Isenberg, 1988).

Embora a presença de integrantes do domínio Archaea em humanos tenha sido relatada, ela parece ser drasticamente subestimada em comparação com a alta diversidade de táxons bacterianos. A partir de dados da literatura, Hugon et al. (2015) compilaram informações relativas a todas as espécies de procariotos cultivadas em amostras obtidas de diferentes ecossistemas de seres humanos, independentemente de terem sido ou não validadas ou de terem uma nomenclatura permanente. Foram listadas 2172 espécies, pertencentes a 12 diferentes filos do Domínio Bacteria (predominantemente Firmicutes, Proteobacteria, Actinobacteria e Bacteroidetes) e um táxon do Domínio Archaea.

Representantes de Archaea podem colonizar nichos variados no corpo humano, dispostos em comunidades complexas, especialmente nos intestinos e na cavidade oral (Matarazzo et al., 2012). Considerando a diversidade genética, o domínio Archaea inclui dois filos principais: Crenarchaeota (organismos dependentes de enxofre) e Euryarchaeota. O filo Euryarchaeota é composto por

Methanoarchaeota (Archaea produtoras de metano) e por halófilos extremos (Khelaifia & Drancourt, 2012). Os metanogênicos que habitam a microbiota humana são de difícil cultivo e somente seis Methanoarchaea foram isolados (*Methanobrevibacter smithii*, *M. oralis*, *M. arboriphilicus*, *M. millerae*, *Methanomassilicoccus luminyensis* e *Methanosphaera stadtmanae*). Em 2014, dois halofílicos foram isolados de amostras de fezes (*Haloferax alexandrinus* e *Haloferax massiliensis*) (Hugon et al., 2015). Embora sejam possivelmente simbioses, os metanógenos podem desempenhar um papel no estabelecimento de doenças da mucosa, favorecendo o crescimento de certos grupos bacterianos (Matarazzo et al., 2012).

Em recente revisão, Horz (2015) sugere que existem linhagens de Archaea ainda não detectadas devido a limitações nos métodos de identificação, à pequena concentração de células ou à baixa abundância. Não se sabe se esses organismos são meros transitórios ou membros importantes da chamada "biosfera rara", desempenhando provavelmente funções básicas dentro de um ecossistema.

Considerando-se a área de mucosas no trato gastrointestinal, a cavidade oral é a primeira via de acesso de microrganismos ao corpo humano. A cavidade oral humana contém uma série de diferentes habitats que são passíveis de colonização por microrganismos, incluindo os dentes, sulco gengival, língua, bochechas, palato duro e mole e amígdalas. O microbioma oral humano pode ser definido como todos os microrganismos que se encontram na cavidade oral humana e as suas extensões contíguas (Dewhirst et al., 2010). A cavidade oral abriga um dos mais diversos microbiomas no corpo humano. Cerca de metade das constituintes do microbioma oral não foram ainda cultivadas. O uso de métodos moleculares de diagnóstico que foram recentemente desenvolvidos ampliou e confirmou as informações acerca da composição e função do microbioma oral nas condições de saúde e de doença (Wade, 2013).

Em 2009, Zaura et al. avaliaram o perfil microbiano em diferentes nichos que integram o microbioma oral de pacientes saudáveis por meio de sequenciamento de alto rendimento. Os sítios estudados foram as superfícies dentárias, as bochechas, o palato duro, a língua e a saliva. Os taxa dominantes integram o domínio Bacteria e pertenceram aos filos Firmicutes (especialmente pertencentes ao gênero *Streptococcus*), Proteobacteria (com predominância de

organismos do gênero *Neisseria*), Actinobacteria (gêneros *Corynebacterium*, *Rothia*, e *Actinomyces*), Bacteroidetes (gênero *Prevotella*, *Capnocytophaga*, *Porphyromonas*) e Fusobacteria (gênero *Fusobacterium*). Observou-se que cada amostra abrigava em média 266 unidades taxonômicas operacionais (OTUs) ao nível de espécie, com valores mínimo de 123 OTUs e máximo de 326 OTUs. Há uma diferença na composição microbiana de amostras obtidas de nichos em área de mucosas daquelas coletados de superfícies duras do dente. Os autores afirmaram que as amostras colhidas da superfície dental abrigavam a maior diversidade de espécies. Os resultados indicam que há um núcleo de espécies comuns entre os indivíduos (*core microbiome*), que correspondeu a 66% dos *reads* (ou leituras) avaliados por meio de sequenciamento de alto rendimento. Assim, sugere-se que a maior parte das sequências detectadas em indivíduos saudáveis é idêntica, indicando que há um núcleo de espécies comum que integram o microbioma da cavidade oral em paciente saudáveis.

Em 2005, Rasiah et al. avaliaram estabilidade da comunidade bacteriana na saliva de um indivíduo ao longo de 7 anos, e compararam com amostras de saliva de 10 indivíduos diferentes. Observou-se uma relativa estabilidade da comunidade bacteriana ao longo de 7 anos, demonstrando valores de concordância superiores a 87% entre elas. Ao se comparar as amostras do doador àquelas de outros 10 participantes, havia uma maior concordância de composição, próxima a 66%. Ao cultivarem amostras de biofilme supragengival dos indivíduos em laboratório, os pesquisadores sugerem que houve uma maior variabilidade entre os indivíduos (52% concordância), causado provavelmente pelo aumento na diversidade de espécies detectadas com uma manutenção da organização durante o desenvolvimento da comunidade. Os resultados destacam que as condições ecológicas estabelecidas na cavidade bucal foram mantidas ao longo de 7 anos no ambiente bucal do doador de saliva. Deve-se considerar a possibilidade da ocorrência de flutuações transitórias na sua composição, mas que parecem retornar a um padrão.

Ao caracterizar os perfis microbianos em amostras de saliva, de placa supragengival e mucosa de voluntários saudáveis em diferentes idades e estágios de dentição, Xu et al (2015), sugerem que a cavidade oral de um mesmo indivíduo é um sistema ecológico altamente heterogêneo. Esses nichos distintos abrigam

comunidades microbianas significativamente diferentes, as quais demonstraram variação na estrutura filogenética microbiana com o envelhecimento. Além disso, apenas alguns táxons estavam presentes em todas as populações, indicando que a idade e o nicho oral são fatores que devem ser considerados na estruturação do núcleo comum do microbioma oral.

Ao avaliarem a composição microbiana de diferentes nichos da cavidade bucal, Simón-Soro et al (2013) indicaram ainda que existem diferenças consideráveis na estrutura das comunidades bacterianas, mesmo em áreas diferentes em um mesmo nicho, tais como as faces vestibular ou lingual da coroa dentária.

Os biofilmes orais são caracterizados como comunidades microbianas tridimensionais aderidas a uma superfície sólida como o esmalte dental, à superfície radicular, ou implantes, que estão envolvidos por uma matriz de polissacarídeos (Wood et al., 2000; Socransky & Haffajee, 2002).

Zijngel et al. (2010) avaliaram a arquitetura e dinâmica de formação de biofilmes supragengivais em amostras de dentes extraídos, por meio de FISH (*fluorescence in situ hybridization*). A estrutura do biofilme apresenta duas camadas, sendo que a primeira camada basal está aderida à superfície dental e a segunda camada é heterogênea e composta por diversos microrganismos. Diferentes padrões de colonização foram observados nas amostras: a) células de *Actinomyces* aderidas de forma perpendicular à superfície dental; b) mistura de *Actinomyces* sp. e cadeias de cocos, com orientação perpendicular à superfície dental; c) bactérias filamentosas, estreptococos e fungos; e, d) biofilme com predominância de estreptococos crescendo próximos à *Lactobacillus* spp.

Recentes estudos indicam que a composição microbiana no biofilme supragengival parece ser complexa, uma vez que é influenciada por fatores individuais, e depende do momento de maturação em que o biofilme se encontra. Quando se considera a possibilidade de comparação entre comunidades microbianas dos biofilmes supragengivais de diferentes indivíduos, o método de estudo e de análise dos dados pode influenciar o resultado.

Heller et al (2016) caracterizaram as flutuações encontradas em biofilmes supregengivais formados 0, 2, 4 e 6 horas após remoção profissional, em indivíduos

saudáveis. Ao empregar o método HOMIM (*Human Oral Microbe Identification Microarray*) que dispunha de 407 sondas diferentes, os autores observaram a presença de 92 espécies, sendo *Streptococcus* spp os mais frequentemente detectados em todos os momentos. Altas taxas de detecção foram observadas para *Haemophilus parainfluenzae*, *Gemella haemolysans*, *Slackia exigua*, e *Rothia* spp. Flutuações em sua abundância foram observadas para *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus mitis* bv. 2, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus cluster*, *Gemella haemolysans*, e *Stenotrophomonas maltophilia*.

Utter et al. (2016) analisaram dados já publicados para comparar a dinâmica do microbioma quanto a sua individualidade, estabilidade e variabilidade ao longo do tempo em amostras de biofilme supragengival coletadas em pacientes chineses ou ocidentais. Quando os autores consideraram o nível taxonômico “gênero”, cerca de 40 gêneros eram compartilhados entre os bancos de dados e correspondiam à grande maioria dos *reads*. Aproximadamente 17 gêneros de bactérias estavam presentes em cada indivíduo, nos diferentes momentos de coleta. A abundância relativa média se mantinha estável ao longo do tempo para amostras de um mesmo indivíduo. Ao serem comparadas amostras de diferentes pacientes, observou-se que a abundância de espécies de gêneros bacterianos permanecia estáveis entre eles para alguns gêneros (tais como *Fusobacterium*), enquanto que havia variações para outros gêneros (tais como *Prevotella* e *Neisseria*). Ao empregarem um método de análise de dados mais específico (*Minimum Entropy Decomposition*), os autores relatam que há uma maior distinção entre os perfis microbianos em cada indivíduo do que havia sido observado na análise prévia, indicando que cada paciente pode ter uma impressão digital relacionada ao seu microbioma. Ao longo do tempo, não houve variação significativa na proporção dos constituintes de cada grupo microbiano em um mesmo paciente.

O surgimento de doenças na cavidade bucal que estão associadas ao biofilme supragengival em um sítio deve ser considerado a partir da perspectiva de uma ruptura nos mecanismos de homeostase que são responsáveis pela manutenção de uma relação benéfica entre o microbioma residente e o hospedeiro (Marsh, 2010).

A cárie dental é uma doença crônica de progressão lenta na maioria dos indivíduos, sendo raramente autolimitante e podendo levar à destruição dos tecidos

dentários. Fatores microbianos, genéticos, imunológicos, comportamentais e ambientais, interagem para contribuir com seu início e desenvolvimento (Takahashi & Nyvad, 2008). Do ponto de vista bioquímico, diversos processos metabólicos ocorrem no biofilme dental como resultado da atividade microbiana. Isto produz rápidas alterações no pH da placa, tanto na presença quanto na ausência de nutrientes. Assim, as superfícies hígidas ou cariadas dos dentes que são cobertas por um biofilme podem sofrer breves perdas ou ganhos de mineral, dependendo do estado metabólico dos microrganismos (Newman et al., 1979). À medida que a cárie dentária progride em direção ao órgão pulpar, instalam-se processos inflamatórios com intensidades proporcionais. Ricucci et al (2014) demonstraram que em lesões de cárie extensas e profundas, mesmo sem direta exposição do tecido aos microrganismos, a polpa é acometida por um processo inflamatório intenso, que não é passível de resolução após medidas de tratamento conservador.

Roças et al (2016) avaliaram a composição microbiana, em lesões de cárie profundas, que atingiam a polpa, e que estavam associadas à pulpíte irreversível sintomática. O método empregado foi a plataforma Illumina MiSeq. Estavam presentes 14 filos e 101 gêneros compostos, por 706 OTUs diferentes. Os filos Firmicutes, Actinobacteria e Proteobacteria constituíram 98% das sequências descritas. Quanto aos gêneros, *Lactobacillus* foi responsável por 42,3% das sequências, seguido por *Olsenella* (13,7%), *Pseudoramibacter* (10,7%) e *Streptococcus* (5,5%). Metade das amostras foi fortemente dominada por *Lactobacillus*. Nas demais, os lactobacilos estavam em abundância muito baixa e os gêneros mais dominantes foram *Pseudoramibacter*, *Olsenella*, *Streptococcus* e *Stenotrophomonas*. A alta diversidade bacteriana ocorreu em lesões profundas de cárie dentinária associadas à pulpíte sintomática irreversível. Com exceção das espécies de *Lactobacillus*, a maioria dos taxa bacterianos altamente prevalentes e abundantes identificados neste estudo têm sido comumente detectados em canais radiculares infectados. Os táxons detectados podem ser os pioneiros na invasão da polpa para iniciar a infecção endodôntica.

Em estudo clássico, Kakehashi et al (1965) demonstraram que o acesso de microrganismos ao interior da cavidade pulpar de ratos, por meio de exposição intencional, foi capaz de gerar necrose pulpar e alteração nos tecidos periapicais.

De acordo com Haapasalo (1993), o canal radicular que contém polpa necrótica é passível de infecção, uma vez que o sistema imune do hospedeiro não consegue atuar em seu interior de forma efetiva, garantindo a proteção dos componentes das comunidades microbianas que o colonizam. Os microrganismos estão dispostos na luz do canal radicular e aderidos às paredes de dentina, colonizando os acidentes anatômicos presentes no sistema de canais radiculares e irregularidades (Nair, 1987).

O habitat natural dos microrganismos que estão presentes nas infecções endodônticas é a cavidade bucal. Entretanto, a singularidade do microambiente presente no interior do sistema de canais radiculares pode permitir que mesmo espécies transitórias, que não se estabelecem na boca, possam colonizá-lo. Assim, diferenças de concentração de oxigênio e de nutrientes fazem com que espécies microbianas que estão na cavidade bucal possam ter seu potencial de colonização estimulado ou reduzido. Özok et al. (2012) avaliaram as comunidades microbianas presentes em diferentes regiões do canal radicular infectado. O terço apical parece ser um nicho ecológico distinto, pois há uma microbiota mais diversa, composta por microrganismos anaeróbios estritos. Já o terço coronário abriga uma maior quantidade de microrganismos facultativos.

A infecção endodôntica aguda é causada por uma comunidade microbiana altamente virulenta, associada à presença de espécies virulentas ou a ocorrência de sinergismo entre as espécies (Siqueira & Rôças, 2009). Em infecções endodônticas agudas, as células microbianas encontram-se preferencialmente em estado planctônico, ou seja, dispersas na luz do canal radicular. Estes microrganismos apresentam elevada capacidade de invasão tecidual, que é favorecida pela reduzida resposta do hospedeiro à agressão (Siqueira & Rôças, 2009). A carga de microrganismos viáveis e o conteúdo de alguns fatores de virulência, tais como endotoxinas, é maior que aqueles observados em infecções endodônticas crônicas (Jacinto et al., 2005).

As interações bacterianas parecem ter papel decisivo para que estejam presentes os sinais e sintomas clínicos associados às infecções endodônticas agudas. Estas interações parecem ser complexas e ocorrer entre múltiplas espécies, caracterizando-se por associações positivas ou mesmo negativas (Gomes et al., 1994). Montagner et al (2010) sugeriram que há uma grande variabilidade

interindividual na composição e estrutura das comunidades microbianas em infecções endodônticas agudas, indicando que a sua etiologia é diferente. Cada paciente apresenta uma comunidade microbiana específica, que é capaz de originar uma doença com os mesmos sinais e sintomas clínicos.

As infecções endodônticas agudas são caracterizadas pela presença concomitante de microrganismos no interior do sistema de canais radiculares e nos tecidos periapicais. De acordo com Siqueira & Roças (2013), as espécies bacterianas encontradas pertencem a sete diferentes filos: Firmicutes (gêneros *Streptococcus*, *Dialister*, *Filifactor* e *Pseudoramibacter*), Bacteroidetes (gêneros *Porphyromonas*, *Prevotella* e *Tannerella*), Fusobacteria (gêneros *Fusobacterium* e *Leptotrichia*), Actinobacteria (gêneros *Actinomyces* e *Propionibacterium*), Spirochaetes (gênero *Treponema*), Synergistetes (gênero *Pyramidobacter* e alguns filotipos ainda não-cultivados), e Proteobacteria (gêneros *Campylobacter* e *Eikenella*). Independentemente do método de avaliação, observa-se um predomínio de OTUs pertencentes aos filos Firmicutes e Bacteroidetes, correspondendo a 70% das espécies. Por meio de análise de clones e sequenciamento, Nóbrega et al (2016) observaram ainda a presença de OTUs pertencentes ao filo Deinococcus-Thermus em infecções agudas. Bactérias do gênero *Deinococcus* haviam sido previamente identificadas em amostras de estômago humano e em infecções endodônticas crônicas, sugerindo a presença de um oitavo filo que possa participar de infecções agudas.

A presença de bactérias tem sido relatada em infecções no sistema de canais radiculares desde Miller (1894). Recentemente, estudos avaliaram a presença de procariotos extremófilos do Domínio Archaea em infecções no sistema de canais radiculares.

Siqueira et al. (2005) avaliaram a presença de Archaea em 96 amostras de infecções intrarradiculares primárias crônicas ou agudas, e também em infecções intrarradiculares secundárias/persistentes. Foram empregadas sondas de DNA universais para os domínios Bacteria e Archaea. Embora as bactérias estivessem presentes em todas as amostras, em nenhum caso foi detectado DNA de Archaea.

Considerando que alguns integrantes do Domínio Archaea são encontrados em conjunto com bactérias anaeróbias no sistema intestinal humano e nas bolsas periodontais, o objetivo do estudo de Vianna et al. (2005) foi avaliar a

presença de representantes do domínio Archaea em infecções endodônticas humanas. Amostras de 20 dentes unirradiculares portadores de infecções primárias assintomáticas foram avaliadas por meio de PCR quantitativo em tempo real. O produto da reação das amostras positivas foi sequenciado. Os resultados demonstraram que a comunidade Archaea era dominada pelo filotipo *Methanobrevibacter oralis*-like. Os componentes do Domínio Archaea representaram até 2,5% da comunidade procariótica total. Este achado demonstrou que Archaea podem estar intimamente relacionada com doenças infecciosas. O percentual relativo de sua presença suporta a hipótese de que os membros do domínio Archaea podem ter um papel como patógenos humanos.

Vickerman et al. (2007) realizaram a análise filogenética bacteriana e de Archaea de comunidades polimicrobianas em canais radiculares infectados de 20 pacientes sintomáticos e 14 assintomáticos. Por meio de PCR gene específico para o Domínio Archaea, foram obtidos *aplicons* em apenas duas amostras de canais radiculares, sendo uma associada à sintomatologia dolorosa espontânea e a outra não. Após a purificação e análise por meio de clonagem e sequenciamento, as sequências demonstraram ser 100% idênticas àquelas depositadas no GenBank por Lepp et al. (2004) e por Vianna et al (2006), representando o gênero (possivelmente da espécie *Methanobrevibacter oralis*).

Jiang et al. (2009) investigaram a presença de bactérias e Archaea em infecções endodônticas primárias e secundárias, por meio de PCR quantitativo em tempo real. Foram estudadas 77 amostras de canais radiculares de 77 pacientes chineses, 42 com infecção primária e 35 com infecção secundária. A frequência absoluta da detecção de bactérias em infecções primárias foi de 39/42 (93%) e em 30/35 (86%) dos casos de infecção secundária. Integrantes do domínio Archaea estiveram presentes em 16/42 (38%) de amostras de infecções primárias e em 6/35 (17%) de infecções secundárias. Integrantes de ambos os domínios foram encontrados em 73% e 45% dos casos de infecções endodônticas primárias e secundárias, respectivamente. Este estudo confirmou a presença de Archaea em infecções endodônticas e as associou à presença de sintomas clínicos. Os autores indicam que novos estudos devem ser conduzidos para que esta associação seja mais bem compreendida.

Os diferentes nichos e ecossistemas que constituem a cavidade bucal, seja em condições de saúde ou de doença, apresentam características únicas. Como demonstrado anteriormente, este ecossistema é a fonte de microrganismos para as infecções dentais, sejam elas associadas aos tecidos duros do dente e às estruturas de suporte. Amostras de saliva, biofilme supragengival e do canal radicular após a necrose pulpar abrigam um microbioma complexo que tem sido avaliado por meio de técnicas clássicas e modernas de identificação.

Embora o cultivo microbiano tenha permitido o isolamento e caracterização fenotípica das cepas, os métodos moleculares de diagnóstico expandiram e confirmaram os seus achados. Métodos moleculares como PCR, Nested-PCR, Multiplex-PCR e PCR em Tempo Real permitiram a detecção e a quantificação de microrganismos cultiváveis, de difícil e ainda não-cultivados (Siqueira & Rôças, 2005). O aspecto polimicrobiano das infecções endodônticas aventou a necessidade da introdução de técnicas qualitativas e quantitativas de ampla detecção tais como hibridização DNA-DNA, eletroforese em gel com gradiente de desnaturação, e análise de fragmentos terminais de restrição (Siqueira & Rôças, 2005). Recentemente, a adoção de técnicas de ampla caracterização do microbioma, associados a métodos robustos para compilação de dados ampliou a compreensão da dinâmica das comunidades microbianas presentes no ecossistema oral com uma profundidade nunca vista (Zaura, 2012). Ao se utilizar de métodos que não dependem de cultivo, a metagenômica busca avaliar de forma integrada a presença de espécies abundantes, pouco abundantes, cultivadas e ainda não cultivadas, permitindo determinar as propriedades destes indivíduos em comunidades microbianas (Riesenfeld et al., 2004; DeLong, 2002). Considerando-se estes aspectos, é necessário descrever as principais características dessas técnicas, a sua aplicação para a análise de amostras provenientes de sítios do microbioma oral e seus resultados.

2.3. Técnicas de Sequenciamento de Alto Rendimento: Conceitos e Achados

Com a introdução da técnica de sequenciamento de Sanger (1977), foi possível desvendar o primeiro genoma completo de um organismo. O seu

aprimoramento permitiu uma redução dos custos e também um aumento no número e diversidade de genomas caracterizados. Modificações na técnica maximizam o número de nucleotídeos sequenciados, reduzindo o tempo e gerando riqueza de dados que permitem a compreensão de fenótipos cada vez mais complexos (Zhang et al., 2011).

As tecnologias de sequenciamento de nova geração (*Next-generation sequencing*) ou de sequenciamento de alto rendimento (SAR) empregam plataformas que permitem a análise de milhares a milhões de moléculas de DNA simultaneamente. Estas ferramentas estão revolucionando diversas áreas da saúde humana, podendo ser empregadas para produção de medicamentos personalizados, diagnóstico de doenças genéticas e diagnósticos clínicos. O sequenciamento automatizado de DNA incorporou conceitos de química, engenharia, *software* e biologia molecular. Utilizam como base os conceitos de sequenciamento de Sanger e os expandiram, executando tarefas antes incompreensíveis (Mardis, 2013).

As técnicas atuais de SAR utilizam artifícios para executar milhões de reações de sequenciamento em uma superfície sólida. Ao contrário do sequenciamento convencional de Sanger, que lê a sequência após a síntese do DNA, o SAR detecta as sequências enquanto sintetiza DNA. O SAR consiste normalmente em dois passos: 1) gerar grupos de moléculas de DNA de cadeia simples idênticas em pequenos poços na superfície de célula de fluxo ou em microesferas por amplificação por PCR; 2) detectar os sinais emitidos a partir de cada cluster enquanto adiciona nucleotídeos. Embora o primeiro passo seja crucial para que as plataformas de SAR amplifiquem os sinais de cada adição de nucleotídeos em um nível detectável, existem tecnologias já disponíveis para contornar a etapa de agrupamento ao atingir sensibilidade suficientemente alta para detectar reações moleculares únicas. Cada abordagem de sequenciamento tem benefícios e inconvenientes (Shin et al., 2014).

O primeiro instrumento SAR desenvolvido foi a *454 Life Sciences sequencing systems* da Roche (<http://454.com>), e utiliza o princípio do pirosequenciamento (Margulies et al., 2005). Trata-se de um método de sequenciamento por síntese. O protocolo consiste em ligar os fragmentos de DNA em microesferas individuais em gotas aquosas separadas feitas através da criação de uma reação de PCR em emulsão de óleo. As gotículas atuam como

microrreatores separados em que são realizadas ampliações de DNA paralelas. Após a PCR, a emulsão é rompida para libertar as microesferas com o molde de DNA amplificado, que serão carregadas em uma placa plana com múltiplos poços utilizados como pequenos tubos de ensaio (*PicoTiterPlate*) contendo reagentes para o sequenciamento. Em cada ciclo, cada dNTP incorporado numa cadeia, ocorre uma cascata enzimática, resultando em um sinal de bioluminescência. Cada emissão de luz, detectada por uma câmara de dispositivo de carga acoplada (CCD), pode ser atribuída à incorporação de um ou mais dNTPs idênticos em cada microesfera. As imagens são processadas para produzir a informação da sequência.

Outro método de sequenciamento por síntese é a plataforma Illumina, comumente referida também como 'Solexa'. Ele tem suas origens no trabalho de Turcatti e colaboradores (Fedurco et al., 2006; Turcatti et al., 2008) e da fusão de quatro empresas: Solexa (Essex, Reino Unido), Lynx Therapeutics (Hayward, CA, EUA), Manteia Predictive Medicine (Coinsins, Suíça) e Illumina.

Illumina emprega nucleotídeos com terminação reversível e marcados com diferentes fluoróforos. A técnica consiste, inicialmente, em fragmentar aleatoriamente o DNA. Cada fragmento recebe dois tipos diferentes de adaptadores. Em seguida, os fragmentos são separados e fixados a uma superfície denominada *flow cell*. Esta superfície possui diversas *lanes*. Cada *lane* é revestida com dois tipos de oligonucleotídeos que são complementares aos adaptadores presentes em cada fragmento. As sequências são amplificadas por meio da chamada "*bridge amplification*" PCR. O fragmento fixado na placa dobra-se e liga-se ao segundo tipo de oligonucleotídeo fixo na placa. A polimerase gera uma fita complementar, formando uma "ponte" de fita dupla. A ponte é desnaturada, o que resulta em duas fitas simples. Esse processo é repetido diversas vezes, formando milhares de cópias em diversos clusters. Depois que os clusters estão formados, o sequenciamento por síntese é iniciado. Nesse método, a cada ciclo, quatro nucleotídeos fluorescentes competem para serem adicionados à cadeia que está sendo formada, mas apenas um nucleotídeo é incorporado de acordo com a sequência do molde. Depois da adição de cada nucleotídeo, os clusters são excitados por uma fonte de luz e um sinal fluorescente é emitido e capturado por uma câmera CCD (*Charged-Coupled Device*). O número de ciclos determina o comprimento da leitura (ou *read*). O

comprimento da onda e a intensidade do sinal determinam a base que foi incorporada. (Adessi et al., 2000; Fedurco et al., 2006).

Outra característica do sequenciador Illumina é a possibilidade de escolher entre sequenciamento *single-end* (SE) ou *paired-end* (PE). Para realizar o sequenciamento, o DNA é fragmentado e em seguida ligado a adaptadores. Se o sequenciamento for SE, significa que apenas uma extremidade do fragmento será sequenciado. Mas se for PE, as duas extremidades do mesmo fragmento são sequenciadas, originando dois *reads*. A Illumina possui diversos modelos de sequenciadores capazes de produzir uma quantidade variável de *reads*. O tamanho dos *reads* varia entre 50 bp (SE) até 2 x 250 bp (PE) e é possível produzir de 1 até 150 milhões de *reads*, em um tempo que varia de 6 horas até 12 dias.

Estudos utilizando essas tecnologias de sequenciamento de alto rendimento em amostras de canais radiculares com infecção aguda foram agrupados na **Tabela 1**.

. Estudos que utilizaram SAR para caracterização de infecções endodônticas agudas.

Objetivo(s)	Metodologia	Resultados	Concl
Investigar a diversidade bacteriana nas infecções endodônticas e por meio de SAR comparar os resultados com sequenciamento de Sanger	Pirossequenciamento e Sequenciamento de Sanger	a) Sanger e a pirossequenciamento produziram 8 x 13 filios, 10 x 22 classes, 11 x 43 ordens, 20 x 97 famílias e 25 x 179 gêneros, respectivamente. b) pirossequenciamento: filios mais abundantes: Bacteroidetes (59.44%), Firmicutes (19.92%), Actinobacteria (4.79%), Fusobacteria (3.49%), Proteobacteria (3.18%) c) Gêneros mais abundantes: <i>Prevotella</i> , <i>Tannerella</i> , <i>Parvimonas</i> , <i>Fusobacterium</i> e <i>Porphyromonas</i> .	Pirossequenciame avaliar a presenç com baixa abund radiculares infect diversidade bacte microflora endod anteriormente ina
Comparar a microbiota de dentes com infecção endodôntica aguda e crônica.	Pirossequenciamento	a) Filios mais frequentes nas infecções agudas: Firmicutes (52%/59%), Fusobacteria (17%); Bacteroidetes (13%); crônico: Firmicutes (59%), Fusobacteria (14%); Actinobacteria (10%). b) Gêneros mais abundantes agudo: <i>Fusobacterium</i> e <i>Parvimonas</i> . Crônico: <i>Phocaeicola</i> (12.5%), <i>Eubacterium</i> (12%) e <i>Pseudoramibacter</i> (10%). c) Os índices de diversidade e riqueza revelaram que as infecções agudas eram mais diversas do que as infecções crônicas.	Houve alta variaç nas comunidades; Muitas amostras agrupar de acord infecção (aguda e
Analisar amostras da cavidade oral, canal radicular infectado e abscesso periapical para estudar a transformação da microbiota da saúde à doença	Pirossequenciamento	a) A diversidade microbiana no canal radicular e nas amostras abscesso foram significativamente menores do que nas amostras orais. b) <i>Streptococcus</i> foi o gênero mais abundante na cavidade oral enquanto que <i>Prevotella</i> e <i>Fusobacterium</i> foram mais abundantes em amostras de canal radicular e abscesso.	As estruturas da microbiota de am radicular e absce semelhantes entr comparadas à mi cavidade bucal.
Investigar a composição e diversidade da população bacteriana que habitam ambas as infecções endodônticas primárias, persistentes, sintomáticos e assintomáticos.	Pirossequenciamento	a) Infecções primárias: - em média 10 filios, 50 gêneros e 112 filotipos de espécies por amostra; - maior diversidade em infecções sintomáticas do que em assintomáticas. b) Infecções persistentes: - 12 filios, 80 gêneros e 162 filotipos. - menor diversidade em infecções assintomáticas que sintomáticas c) Bacteroidetes foi o filo mais abundante em ambos os grupos.	Há uma elevada bacteriana nas in endodônticas. Su infecções persisti comunidades bac diversas do que i primárias.

Com o advento do SAR, os pesquisadores têm agora as ferramentas que permitem a caracterização do perfil dos microbiomas e metagenomas em amplitude sem precedentes. As principais vantagens dos SAR são o alto rendimento e o fato de que não há a necessidade de direcionamento para detecção de taxa específicos. As análises de comunidades baseadas nos princípios da ecologia permitirão aos pesquisadores compreender os mecanismos que favorecem a estabilidade ou o desequilíbrio do microbioma (Zaura, 2012).

Considerando a complexidade do microbioma oral, conforme descrito por técnicas de sequenciamento de alto rendimento, torna-se importante avaliar as modificações ocasionadas por antibióticos na composição microbiana e fatores de virulência de procariotos em saliva, biofilme supragengival e canal radicular com infecções endodônticas agudas.

3 OBJETIVOS

O objetivo geral do presente estudo foi compreender o efeito do uso prévio de agentes antimicrobianos na diversidade e a estrutura do microbioma procariótico de saliva, biofilme supragengival e canal radicular de dentes com infecção endodôntica aguda.

Os objetivos específicos foram:

- a) determinar a composição das comunidades procarióticas em amostras de saliva, biofilme supragengival e canal radicular de dentes com infecção endodôntica aguda por meio de sequenciamento de alto rendimento, quando do uso ou não de agente antimicrobiano prévio;
- b) Comparar parâmetros de diversidade intra-amostra (alfa-diversidade) em saliva, biofilme supragengival e canal radicular, considerando-se o uso ou não de agente antimicrobiano;
- c) Comparar a diversidade inter-amostras (beta-diversidade) de diferentes ecossistemas, considerando-se o uso ou não de agente antimicrobiano;
- d) Detectar a presença de genes de resistência a agentes antimicrobianos em amostras de saliva, biofilme supragengival e canal radicular, quando do uso ou não de agente antimicrobiano prévio à consulta; e,
- e) Estabelecer a relação de similaridade entre os perfis da presença de genes de resistência em amostras de saliva, biofilme supragengival e canal radicular por meio do método de Análise de Agrupamento, considerando o uso ou não de agente antimicrobiano prévio à consulta.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Pesquisa em Odontologia (COMPESQ-ODO) da Faculdade de Odontologia da UFRGS e pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, conforme emenda com Protocolo de Aprovação CAAE 08375712.1.0000.5347 (**Apêndice 1**). As amostras avaliadas neste estudo constituíram parte das amostras avaliadas no estudo de Moraes et al. (2015a) para a determinação da presença de espécies de *Prevotella* spp. e da presença do gene *cfxA/cfxA2*.

O estudo foi desenvolvido na Clínica de Especialização em Endodontia, no Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Oral da Faculdade de Odontologia da UFRGS, no Laboratório de Patologia da UFRGS e em parceria com o Laboratório Helixxa (Paulínia, SP, Brasil).

4.1 Seleção dos Participantes

De acordo com a literatura revisada, o número amostral de estudos que avaliaram pacientes com infecções endodônticas primárias variou entre n=7 (Li et al. 2010) a n=12 (Tzanetakis et al. 2015). Desta forma, foram selecionados para este estudo 12 pacientes adultos (> 18 anos) que compareceram ao setor de Clínica Odontológica da Faculdade de Odontologia, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Estes pacientes foram divididos em dois grupos, de acordo com os critérios de inclusão abaixo descritos:

- a) GRUPO I – integraram este grupo seis indivíduos que: não tinham patologias de ordem sistêmica tais como imunossupressão ou diabetes; não utilizaram medicamentos de forma crônica; não utilizaram antimicrobianos num período anterior mínimo de três meses; não eram portadores de próteses parciais removíveis ou prótese total; e, apresentavam-se com dentes com necrose pulpar, abscesso apical

agudo associado e com profundidade de sondagem periodontal menor ou igual a 3 mm.

- b) GRUPO II – integraram este grupo seis indivíduos que: não tinham patologias de ordem sistêmica tais como imunossupressão ou diabetes; não utilizaram medicamentos de forma crônica; utilizaram antimicrobianos antes do atendimento de urgência odontológica; não eram portadores de próteses parciais removíveis ou prótese total; e, apresentavam-se com dentes com necrose pulpar, abscesso apical agudo associado e com profundidade de sondagem periodontal menor ou igual a 3 mm.

Todos os pacientes assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido elaborado de acordo com as normas da Comissão de Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul antes de participar da pesquisa.

Em ficha clínica desenvolvida para o estudo foram anotados, para cada indivíduo: idade, sexo, presença de patologia que indique comprometimento sistêmico, condição pulpar, natureza da dor, profundidade da sondagem periodontal, mobilidade, sensibilidade à percussão horizontal e vertical, sensibilidade à palpação periapical, presença de edema dos tecidos apicais, história de antibioticoterapia prévia ou outra medicação e os achados radiográficos detectados na radiografia periapical de diagnóstico, obtida a partir da área em que a patologia se encontrava situada. Foram anotados os aspectos físicos do canal durante a coleta das amostras, tais como canal seco, presença de exsudato claro, purulento ou hemorrágico do canal radicular. Os aspectos clínicos do dente envolvido, tais como presença ou não de cáries e restaurações foram também registrados.

A participação do indivíduo na pesquisa foi impossibilitada quando não foi possível realizar isolamento absoluto do campo operatório, introduzir o cone de papel no canal radicular até as proximidades do comprimento aparente do dente na radiografia, ou nos casos em que houve exposição direta da câmara pulpar ou do canal radicular ao meio bucal.

4.2 Coleta das Amostras

Os métodos empregados foram descritos anteriormente por Rôças et al. (2006), Riggio et al. (2007), Montagner (2010), Papapostolou et al. (2011), Sreenivasan et al. (2011).

4.2.1 Coleta de Saliva

A saliva não-estimulada foi coletada em um tubo plástico do tipo Eppendorf previamente esterilizado, por 1 minuto (Papapostolou et al., 2011; Sreenivasan et al., 2011). Foram atribuídos códigos às amostras e as mesmas foram armazenadas em freezer, a -20°C .

4.2.2 Coleta de Biofilme Supragengival

Os sítios selecionados para a coleta foram isolados com roletes de algodão e levemente secos com jatos de ar. O biofilme supragengival foi coletado da coroa do elemento dental envolvido com a patologia endodôntica. Foram utilizados micropincéis esterilizados (DENTSPLY-Caulk, Milford, DE, USA), que foram imediatamente acondicionados em tubos plásticos do tipo “Eppendorf” esterilizados. Foram atribuídos códigos às amostras e as mesmas foram armazenadas em freezer, a -20°C . (Papapostolou et al., 2011)

4.2.3 Canal Radicular

Para a coleta da amostra do canal radicular, a região do elemento dental envolvido foi anestesiada localmente. Todos os contaminantes coronários tais como cáries e restaurações defeituosas foram removidos. O dente envolvido recebeu polimento coronário e foi isolado com lençol de borracha. A seguir, se aplicou o

selador de interfaces cianoacrilato (Super Bonder, Loctite, São Paulo, São Paulo, Brasil) para evitar infiltração de saliva e fluido gengival.

A antissepsia do campo operatório foi realizada com *swabs* esterilizados umedecidos inicialmente com água oxigenada 30 v/v, e depois com solução de hipoclorito de sódio 5,25% por 30 segundos cada. A neutralização destes compostos foi realizada com solução de tiosulfato de sódio 5% estéril (Möller, 1966). Amostras-controle foram coletadas do campo operatório para verificar a efetividade da desinfecção do mesmo, através de controle negativo por PCR do gene universal 16S rRNA.

Com a interrupção do fornecimento de água proveniente do equipo, a irrigação direcionada à ponta diamantada esférica estéril empregada em alta rotação foi realizada com soro fisiológico estéril. Após a confecção da cavidade de acesso com pontas diamantadas sem extremidade ativa, obteve-se completo acesso ao canal radicular. As amostras dos canais radiculares foram coletadas utilizando três cones de papel esterilizados de calibre 20 (Dentsply, Petrópolis, Rio de Janeiro). Em casos de dentes multirradiculares, as amostras foram coletadas do canal mais amplo.

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 foram umedecidos com soro fisiológico. Ao serem retirados do canal, os cones foram introduzidos sequencialmente em tubos plásticos do tipo "Eppendorf". Foram atribuídos códigos às amostras e as mesmas foram armazenadas em freezer, a -20°C.

Após a coleta das amostras dos canais radiculares, foi concluído o atendimento de urgência endodôntico, conforme preconizado pela Área de Endodontia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

4.3 Isolamento do DNA Microbiano das Amostras e PCR

Para o isolamento do DNA microbiano das amostras de saliva, biofilme supragengival e canal radicular foi empregado o conjunto para amostras contendo microrganismos e tecidos QIAamp DNA Micro Kit (QIAGEN, Valencia, Califórnia, EUA) de acordo com as recomendações do fabricante. Em cada amostra, foram adicionados 180 µl do tampão ATL e 20 µl da solução de Proteinase K. Em seguida os tubos foram agitados por 1 minuto e incubados em banho d'água a 56°C, por 30 minutos. Adicionou-se então 200 µl do tampão AL, e foi realizada nova agitação por 1 minuto, sendo os tubos posteriormente expostos à temperatura de 70°C por 10 minutos em banho d'água.

Para a remoção de impurezas e constituintes lipídicos, foram adicionados 200 µl de etanol. Todo o conteúdo do tubo foi transferido para as colunas de purificação contendo microfiltro de sílica, fornecidas pelo fabricante. As colunas foram centrifugadas a 8000 rpm em ultracentrífugas por 1 minuto. O conteúdo líquido no tubo de coleta da parte inferior da coluna foi removido. O DNA microbiano permaneceu aderido ao filtro de sílica para lavagens adicionais com tampões. Foram adicionados 500 µl da solução de lavagem AW1, com posterior centrifugação a 8000 rpm, por 1 minuto. O tampão de lavagem AW2 foi adicionado à parte superior do filtro e o mesmo foi novamente centrifugado (13000 rpm, 3 minutos). A eluição do DNA do microfiltro foi obtida através da adição de 100 µl do tampão AE, que foi mantido em contato com o mesmo por 3 minutos, antes da centrifugação final a 8000 rpm, por 1 minuto, quando se obtém o DNA microbiano purificado. O DNA microbiano purificado foi quantificado e o seu grau de pureza foi determinado em espectrofotometria (NanoDrop, Thermo Scientific, DE, EUA).

Foram produzidas amostras agrupadas ou *pools* de cada um dos sítios, considerando os grupos de estudo. A amostra agrupada resultaram da mistura de uma alíquota de 20 µL da amostra de um mesmo sítio de coleta de cada participante. Foi padronizada a concentração de 5ng/µL por amostra. Originaram-se então seis *pools* que foram denominadas: G1-S (pool de amostras de saliva do Grupo 1), G1-BS (pool de amostras de biofilme supragengival do Grupo 1), G1-CR (pool de amostras de canal radicular do Grupo 1), G2-S (pool de amostras de saliva do Grupo

2), G2-BS (pool de amostras de biofilme supragengival do Grupo 2), e G2-CR (pool de amostras de canal radicular do Grupo 2).

Para a reação de amplificação, foram utilizados sondas ou *primers* direcionados às regiões hipervariadas V3 e V4 do gene 16S rRNA (319F – 5' ACTCCTACGGGAGGCAGCAG 3'; 806R – 5' GGACTACHVGGGTWTCTAAT 3') (Fadrosh et al., 2014). Foram adicionadas aos *primers* uma sequência de adaptadores, conforme solicitado para o sequenciamento Illumina MiSeq. Para o *primer* 319F adicionou-se 5' CAAGCAGAAGACGGCA TACGAGATGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT 3' e para o *primer* 806R adicionou-se o adaptador 5' AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCG ATCT 3'. Foi realizada a reação de amplificação, seguida de purificação em kit, conforme protocolo do fabricante (Qiagen, Valencia, CA, EUA), sendo realizada a eluição com água esterilizada. A concentração final do produto de PCR foi quantificada.

4.4 Sequenciamento de Alto Rendimento Illumina-Miseq

O sequenciamento dos *reads* gerados foi realizado conforme protocolo para o sequenciador Illumina Miseq. Empregou-se o programa PRINSEQ (Schmieder & Edwans, 2011) para processamento das leituras das sequências, removendo-se bases de baixa qualidade e bases correspondentes ao oligonucleotídeos. Após a análise, permaneceram as sequências com comprimento superior a 100 pb e com *score phred* ≥ 30 (probabilidade de uma denominação de base incorreta considerada é de 1 em 1000).

Para o processamento e análise das sequências, utilizou-se o programa QIIME v.1.9.1 (Caporaso et al., 2010). A classificação das unidades taxonômicas operacionais (OTUs) foi determinada por meio do algoritmo UCLUST, com 97% de similaridade, utilizando-se como banco de dados para comparação o Greengenes 13.8 (DeSantis et al., 2006). Foram determinadas a presença e a abundância relativa das espécies em cada amostra.

Para a análise estatística da alfa diversidade, empregou-se o programa QIIME v.1.9.1 (Kuczynski et al., 2011). Para o cálculo da rarefação, considerou-se o menor número amostral de 100 OTUs e o maior número amostral de 10.000 OTUs. Os passos considerados para a análise na multirrarefação foram de 1.000 sequências, com total de 20 permutações. Foram calculados para cada amostra os valores de dominância, Índice de Shannon, diversidade de Simpson e estimativa de riqueza de Chao-1.

A comparação entre os valores obtidos para cada métrica, em um mesmo grupo, para amostras de saliva, biofilme supragengival e canal radicular (Exemplo: G1-S *versus* G1-BS *versus* G1-CR) foi realizada por meio do teste não paramétrico de Friedmann, com pós-teste de Dunn, com $\alpha = 5\%$. Testou-se a hipótese nula de que não há diferença entre determinada métrica para amostras de um mesmo grupo.

A comparação entre os valores de cada métrica, em diferentes grupos, mas em um mesmo sítio (exemplo: G1-S *versus* G2-S) foi realizada por meio do teste não-paramétrico U de Mann-Whitney, com $\alpha = 5\%$. Testou-se a hipótese nula de que não há diferença estatisticamente significativa entre amostras de um mesmo ecossistema em diferentes grupos.

Para análise estatística da beta diversidade das comunidades microbianas, utilizou-se o programa QIIME v.1.9 (Quantitative Insights Into Microbial Ecology) (Kuczynski et al., 2011). Empregou-se o método de agrupamento UPGMA considerando-se um total de 1000 sequências por amostra, estimando-se sua precisão por meio de *jackknifing*. O método de comparação entre as comunidades foi o método UniFrac com peso (*weighted-UniFrac*), que forneceu uma matriz de distâncias descrevendo as diferenças entre comunidades microbianas (Lozupone & Knight, 2005). Por meio da análise de coordenadas principais (PCoA) (Programa EMPeror) foi possível representar tridimensionalmente em gráfico a relação entre as amostras (Vázquez-Baeza et al., 2013). A porcentagem disposta ao lado de cada coordenada em seu respectivo eixo representa a contribuição para variação conferida por cada uma das coordenadas principais no posicionamento espacial de cada amostra. Empregou-se o teste não-paramétrico ANOSIM para comparar se há diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Para esta análise, as amostras foram agrupadas de acordo com dois tratamentos:

- a) Tratamento 1 – variável “sítio de coleta”, gerando a comparação de três grupos: saliva, biofilme supragengival e canal radicular.
- b) Tratamento 2 – variável “antibiótico”, gerando a comparação de dois grupos: sem uso de antibiótico ou com uso de antibiótico.

4.5 Detecção da Presença de Genes de Resistência a Antibióticos

A técnica de PCR gene específico foi empregada para determinar a presença de genes relacionados à resistência bacteriana (agentes beta-lactâmicos; macrolídeos; tetraciclina; lincosamidas) nas amostras. As sequências dos oligonucleotídeos e reações de PCR foram obtidas a partir de referências na literatura (Tabela 2).

As reações de PCR foram processadas em alíquotas de 12 µL por amostra: 8,6 µL de Taq PCR Master Mix Kit (Qiagen, Valencia, EUA); 0,2 µL de solução do *primer forward* (10 µM) (Invitrogen, São Paulo, Brasil); 0,2 µL de solução do *primer reverse* (10 µM) (Invitrogen, São Paulo, Brasil); 2 µL de CoralLoad Dye; e 1 µL da suspensão contendo o DNA isolado da amostra clínica.

A presença de amplicons específicos em cada amostra, para as sequências estudadas, foi verificada por meio de eletroforese em gel de agarose a 1% (Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil), em tampão Trisborato HCl, 10 vezes diluído (pH = 8,0), sendo corado com SybrGreen (4 µL, Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil). Para cada gel, foi adicionado um marcador de peso molecular de 100 bp (DNA Ladder, Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil). As condições para eletroforese foram 100 V, durante 45 minutos. Após este período, os géis corados com SybrGreen foram visualizados sob luz ultravioleta em transiluminador. Reações positivas foram determinadas por meio da presença de bandas que apresentaram o comprimento apropriado, de acordo com a Tabela 2.

Uma das reações de PCR positivas para a presença do gene foi purificada (PCR Purification Kit, Qiagen, Valencia, CA, EUA) conforme recomendações do fabricante. O produto purificado foi encaminhado para

sequenciamento, constituindo-se o controle positivo da amplificação da reação de PCR. Utilizou-se o método de sequenciamento de Sanger, por meio do equipamento (ABI-Prism 3500 Genetic Analyzer, Applied Biosystems) (ACTGene Análises Moleculares, Ludwig Biotecnologia LTDA, Porto Alegre, RS, Brasil).

Foi registrada a presença ou ausência da detecção de cada gene de resistência nas amostras individuais que constituíam cada grupo experimental e em seu respectivo ecossistema. Os dados foram dispostos em uma planilha de cálculo. Realizou-se análise multivariada de conglomerados, utilizando-se o programa Past 3 v.3.14 (Hammer et al., 2001) (Øyvind Hammer, Natural History Museum, University of Oslo). O método empregado foi uma adaptação do descrito por Montagner et al (2012) e Montagner (2010).

A determinação do grau de similaridade entre amostras de saliva, biofilme supragengival e canal radicular de ambos os grupos foi determinada em uma escala quantitativa, denominada de coeficiente de agrupamento, utilizando-se o método UPGMA e o cálculo da distância entre as amostras foi determinado por meio do método Euclidiano. Amostras com valores de distâncias zero ou próximo a zero formaram um grupo com alta similaridade e são conectadas apenas através de uma barra vertical, próximo ao zero, na escala do eixo das coordenadas. Amostras com distâncias maiores que zero demonstram maiores níveis de dissimilaridade, distanciando-se do ponto zero. Considerou-se o método de agrupamento adequado quando o coeficiente cofenético foi maior ou igual a 0,70. O coeficiente de correlação cofenético permite mensurar o grau de deformação provocado pela construção do dendograma (Vicini, 2005), o que poderia gerar um diagrama que representaria uma imagem distorcida da realidade dos dados.

. Sequências de nucleotídeos, temperaturas específicas e referências para a realização das etapas da reação

Nome do plasmídeo	Gene	Sequência de nucleotídeos	Condições de Reação			Fragmento	Referência
			Des. Inicial ^a	Ciclos ^b	Elong. Final ^c		
pSRV1	Gene 16SrRNA	5'TCCTACGGGAGGCAGCAGT3' 5'GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT3'	95°C – 2 min.	33 ciclos D: 94°C – 30seg. A: 60°C – 1 min E: 72°C – 2 min	72°C – 10 min.	466 pB	Nadkarni
	<i>blaTEM</i>	5'CCAATGCTTAATCAGTGAGG3' 5'ATGAGTATTCAACATTTCCG3'	95°C – 15 min.	30 ciclos D:94°C – 1min. A:55°C E:72°C-90 seg.	72°C-10 min.	858 pB	Call et al.
	<i>blaZ</i>	5'CAGTTCACATGCCAAAGAG3' 5'TACTACTCTTGCGGTTTC3'	95°C – 15 min.	30 ciclos D:94°C -60seg. A: 54°C E:72°C-90 seg.	72°C-10 min.	846 pB	Perreten
	<i>ampC</i>	5'-TAAACACCCACATATGTTCCG-3' 5'-ACTTACTTCAACTCGCGACG-3'	94°C – 4 min.	30 ciclos D:94°C – 1min. A:50°C – 1min. E:72°C – 2min	72°C – 10 min.	663 pB	Bou & Matfines
pSRV2	<i>mecA</i>	5'-AAA ATC GAT GGT AAA GGT TGG C-3' 5'-AGT TCT GCA GTA CCG GAT TTG C-3'	94°C – 2 min.	25:ciclos D:94°C – 15 min. A:55°C – 30min. E:72°C – 30 min.	72°C – 10 min.	533 pB	Trieu-Cuc
	<i>ermB</i>	5'GAA AAG GTA CTC AAC CAA ATA 3' 5'AGT AAC GGT ACT TAA ATT GTTT AC 3'	94°C – 2 min.	30 ciclos D: 94° C – 30 seg A: 52°C – 30seg. E: 72°C – 60 seg.	72°C – 60 seg.	639 pB	Reinert
	<i>ermC</i>	5'-AAT CGG CTC AGG AAA AGG-3' 5'-ATC GTC AAT TCC TGC ATG-3'	94°C – 5 min.	30 ciclos D:94°C 1min. A: 54°C E:72°C-1m30s.	72°C-7 min	562 pB	Perreten
pSRV3	<i>mefA</i>	5'TGT GCA TAT TTC TAT TAC G 3'	96°C – 3'	35 ciclos D: 96°C- 30 seg. A:57°C – 1min. E: 72°C – 2 min,	72°C-10 min.	Não disponível	Ojo et al.

^a Desnaturação inicial. ^b Ciclos – D: desnaturação; A: anelamento; E: extensão. ^c Elong. Final: alongamento final. Min.: minuto

. Sequências de nucleotídeos, temperaturas específicas e referências para a realização das etapas da reação).

e no	Gene	Sequência de nucleotídeos	Condições de Reação			Comprimento fragmento	Referênc
			Des. Inicial ^a	Ciclos ^b	Elong. Final ^c		
	<i>tetM</i>	5'GTGGACAAAGGTACAACGAG3' 5'CGGTAAGTTCGTACACAC3'	94°C – 5 min.	30 ciclos D:94°C – 1 min A:55°C – 1 min E:72°C-1 min	72°C -10 min.	406 pB	Ng <i>et al.</i> (2
	<i>tetQ</i>	5'TTATACTTCTCCGGCATCG3' 5'ATCGGTTGAGAAATGTCCAC3'	94°C – 5 min.	30 ciclos D:94°C – 1 min A:55°C – 1 min E:72°C-1 min	72°C-10 min.	904 pB	Ng <i>et al.</i> (2
	<i>tetW</i>	5'GAGAGCCTGCTATATGCCAGC3' 5'GGGCGTATCCACAATGTTAAC3'	94°C – 5 min.	30 ciclos D:94°C – 45 seg. A:64°C – 45 seg E:72°C-45 seg	72°C-10 min.	168 pB	Aminov <i>et al.</i>
	<i>InuB</i>	5'-CCTACCTATTGTTTGTGGAA-3' 5'-ATAACGTTACTCTCCTATTC-3'	94°C – 5 min.	35 ciclos D: 94°C – 45 min. A:54°C – 45 min. E: 72°C – 1 min.	72°C - 5 min.	944 pB	Bozdogan <i>et a</i>
	<i>IsaB</i>	5'-TGCCGAAGCCATGTACCGTCC-3' 5'-CGGTTAGACCAACCAGCCGAACG-3'	94°C – 3 min.	30 ciclos D:94°C – 1 min. A:56°C – 1 min. E:72°C – 1min.	72°C – 5 min.	396 pB	Gómez-Sanz (2010)
	<i>vanA</i>	5'ATGAATAGAATAAAAGTTGCAATAC3' 5'CCCTTTAACGCTAATACGAT3'	95°C – 15 min.	30 ciclos D:94°C – 1min. A:62°C E:72°C-90 seg.	72°C-5/10 min.	1.029 pB	Miele <i>et al.</i> (
	<i>vanD</i>	5'TGTGGGATGCGATATTTCAA3' 5'TCGACGCAAGTATCCGGTAA3'	95°C – 15 min.	30 ciclos D:94°C – 1 min. A:54°C E:72°C-90seg.	72°C-5/10 min.	500 pB	Depardieu <i>et al</i>
	<i>vanE</i>	5'TGTGGTATCGGAGCTGCAG3' 5'GTCGATTCTCGCTAATCC3'	95°C – 15 min.	30 ciclos D:94°C – 1min. A:52°C E:72°C-90 seg.	72°C-5/10 min.	513 pB	Fines <i>et al.</i> (

al: Desnaturação inicial. ^b Ciclos – D: desnaturação; A: anelamento; E: extensão. ^c Elong. Final: alongamento final. Min.: minutos; (

5 RESULTADOS

5.1 Dados Demográficos

Os dados demográficos relativos aos participantes do estudo estão descritos na **Tabela 3**. Dos 12 participantes, 9 eram do sexo feminino, e apresentavam idade variando entre 22 e 56 anos. Todos os dentes incluídos portavam necrose pulpar e sintomatologia dolorosa espontânea, sendo que destes, 8 demonstravam aumento de volume local associado. Os participantes do Grupo 2, utilizaram agentes antimicrobianos antes da consulta, sendo todos pertencentes ao grupo dos beta-lactâmicos (amoxicilina = 5; cefalexina = 1).

Tabela 3. Dados demográficos correspondentes aos pacientes que participaram do estudo.

	Grupo 1 (n=6)	Grupo 2 (n=6)
Sexo		
Masculino	3	0
Feminino	3	6
Idade		
Média	37,5	44,3
Mínima	22	40
Máxima	56	53
Dente		
Superior	4	4
Inferior	2	2
Anterior	4	0
Pré-molar	0	2
Molar	2	4
Edema	3	5
Mobilidade dental	2	2
Estado da coroa		
Cariada	0	3
Hígido	1	0
Restauração	3	2
Restauração defeituosa	0	1
Fratura coronária	2	0

5.2 Análise das Comunidades de Procariotos

5.2.1 Parâmetros de qualidade relacionados ao sequenciamento

Um total de 261.850 sequências passou pelo filtro de qualidade, correspondendo a 100% das sequências geradas pela Plataforma MiSeq Illumina, por meio de sequenciamento emparelhado. A média do comprimento dos fragmentos sequenciados foi de 409,95 pares de base. Os dados para cada amostra estão descritos na **Tabela 4**.

Tabela 4. Controle de qualidade dos dados gerados por meio de sequenciamento MiSeq Illumina.

	G1-S	G1-BS	G1-CR	G2-S	G2-BS	G2-CR
Número de sequências	38.490	43.291	45.753	44.549	49.956	39.811
Número de bases	15.835.541	17.767.173	18.725.458	18.291.834	20.498.004	16.239.432
Comprimento do fragmento	411,42	410,41	409,27	410,6	410,32	407,91
Sequências de boa qualidade	38.490	43.291	45.753	44.549	49.955	39.811
Bases de boa qualidade	15.833.270	17.766.574	18.722.593	18.289.722	20.492.178	16.238.862
Fragmentos de boa qualidade	411,36	410,4	409,21	410,55	410,21	407,9
Sequências de má qualidade	0	0	0	0	1	0

Na Figura 1 apresenta-se a curva obtida no teste de multirrarefação. Observa-se que se atinge platô com um número de 100 OTUs, quando se considera teste de multirrarefação para até 10.000 sequências, revelando uma boa cobertura da amostra, conforme demonstrado na **Figura 1**.

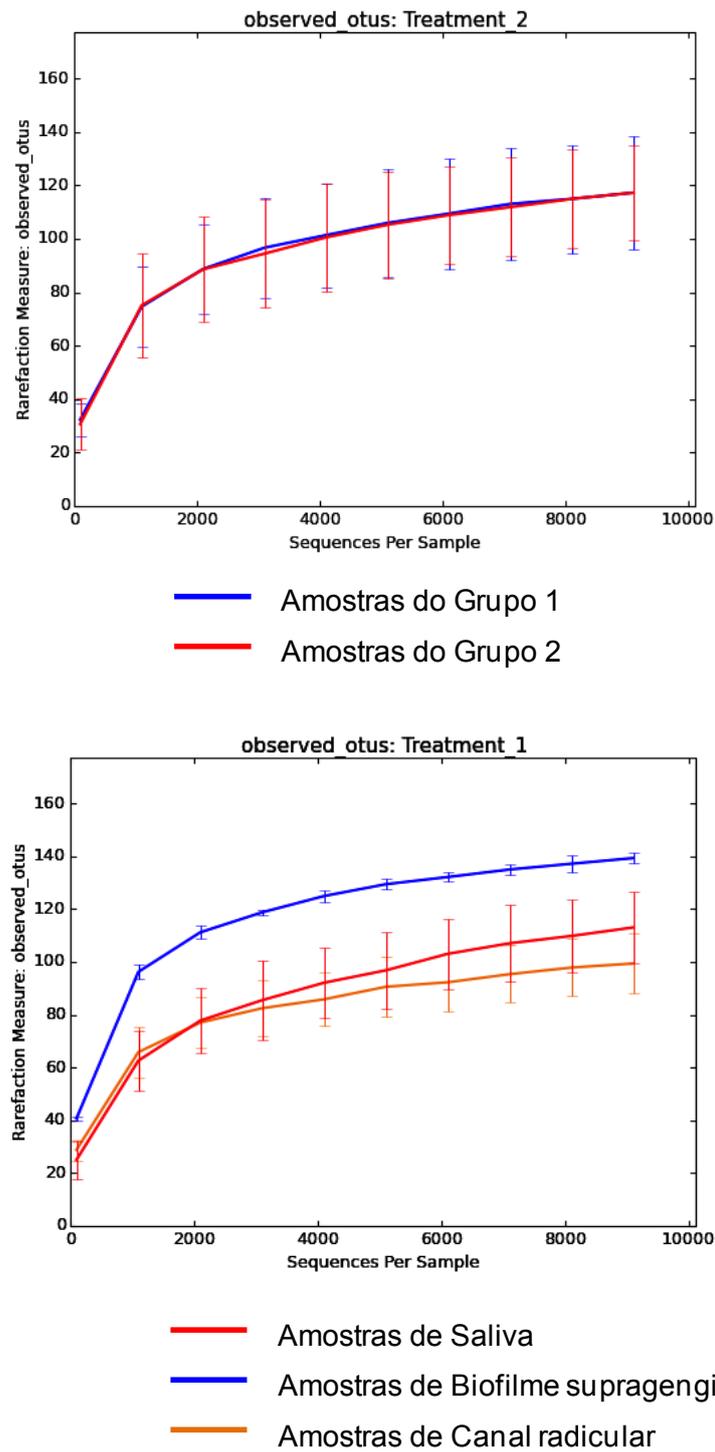


Figura 1. Curva de rarefação mostrando o número observado de OTUs (nível de similaridade de 97%), considerando-se o grupo das amostras (A) ou de acordo com o sítio avaliado (B) (Software PRINSEQ – Schmieder & Edwards, 2011).

5.2.2 Composição das comunidades procarióticas em saliva, biofilme supragengival e canal radicular

O número médio de leituras por amostra foi de 43.641,67 ($\pm 4.159,04$). O número de OTUs identificados em cada grupo, para cada nível taxonômico está descrito na **Tabela 5**.

Tabela 5. Número de OTUs identificados em cada nível taxonômico.

	G1-S	G1-BS	G1-CR	G2-S	G2-BS	G2-CR
Domínio	1	1	2	1	1	2
Filo	7	7	10	7	8	9
Classe	13	12	15	12	12	14
Ordem	21	17	18	21	18	17
Família	36	34	33	39	34	32
Gênero	55	55	57	65	60	55

Na **Tabela 6** e na **Figura 2**, estão descritos os dados relativos ao percentual de OTUs presentes em amostras de S, BS e CR em pacientes pertencentes ao Grupo 1 e ao Grupo 2.

Em amostras de S, BS e CR há um predomínio de espécies pertencentes ao domínio Bacteria. Os filios Firmicutes e Bacteroidetes são os que percentualmente mais contribuem para a constituição do microbioma das amostras de S, BS e CR. Observa-se que o uso de agentes antimicrobianos gerou um equilíbrio no número percentual de OTUs destes dois filios em amostras de S e BS, quando comparados aos pacientes que não utilizaram agentes antimicrobianos. Em amostras de saliva dos pacientes de G2, há um maior percentual no número de OTUs pertencentes aos filios Bacteroidetes, Proteobacteria, Actinobacteria, Fusobacteria, Spirochaetes, Synergistetes e outros. Entretanto, em amostras de canais radiculares dos pacientes do G2, observa-se a presença de uma maior proporção de bactérias pertencentes aos filios Bacteroidetes, Proteobacterias, Spirochaetes e outros filotipos.

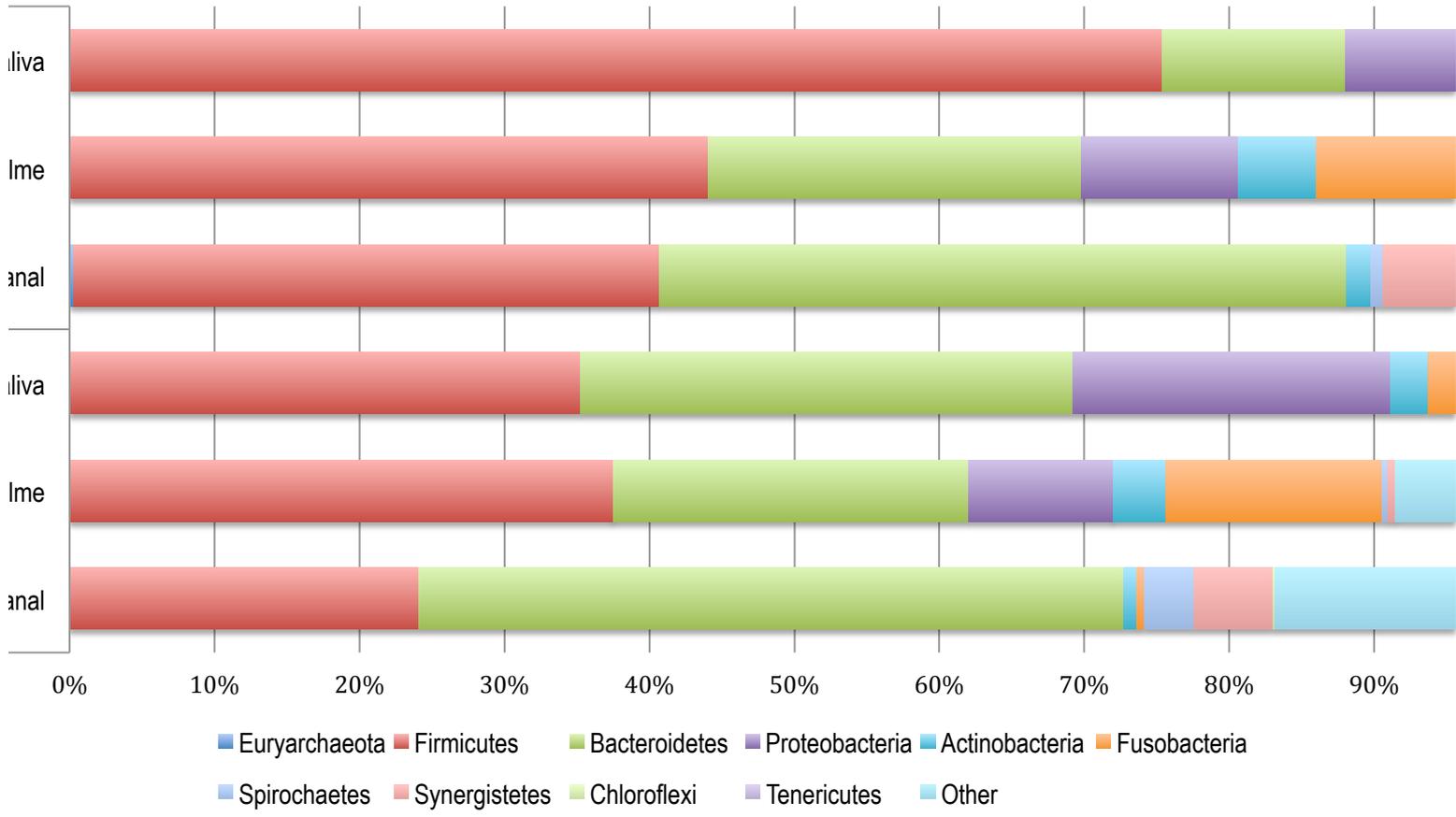
Apenas em amostras de CR detectaram-se integrantes do Domínio Archaea e do filo Euryarchaeota, correspondendo a percentuais inferiores a 1% do total de OTUs presentes.

Tabela 6. Percentual de OTUs presentes em amostras de saliva, biofilme supragengival e canal radicular em pacientes que não utilizaram ou utilizaram antibiótico previamente ao atendimento odontológico de urgência, considerando o filo a que pertencem.

Domínio	Filo	G1 (Sem Antibiótico)			G2 (Com Antibiótico)		
		S	BS	CR	S	BS	CR
Archaea	Euryarchaeota	0,000	0,000	0,319	0,000	0,000	0,014
	Firmicutes	75,371	44,082	40,354	35,242	37,491	24,049
	Bacteroidetes	12,657	25,735	47,433	33,947	24,539	48,623
	Proteobacteria	8,685	10,795	0,007	21,933	9,969	0,052
	Actinobacteria	1,671	5,378	1,628	2,577	3,619	0,901
Bacteria	Fusobacteria	0,350	11,260	0,049	2,129	14,924	0,535
	Spirochaetes	0,040	0,883	0,818	0,156	0,409	3,387
	Synergistetes	0,020	0,209	5,770	0,485	0,480	5,437
	Chloroflexi	0,000	0,000	0,011	0,000	0,000	0,174
	Tenericutes	0,000	0,000	0,035	0,000	0,004	0,000
	Outros	1,206	1,659	3,576	3,531	8,566	16,829

* S = saliva; BS = biofilme supragengival; CR = canal radicular.

Indância relativa de OTUs presentes em amostras de saliva, biofilme supragengival e canal radicular em pacientes que utilizaram antibiótico previamente ao atendimento odontológico de urgência, considerando o filo a que pertencem



Na **Tabela 7**, está descrita a abundância relativa em porcentagem de OTUs presentes, considerando-se o gênero ao qual pertencem. Observam-se proporções distintas nos percentuais de abundância de cada gênero bacteriano, considerando-se os ecossistemas e o uso de antibióticos.

Em amostras do Grupo 1, os gêneros mais abundantes foram:

- a) Saliva: *Streptococcus* (46,4%), *Veillonella* (20,8%), *Prevotella* (9,8%) e *Neisseria* (7,5%), *Enterococcus* (3,1%);
- b) Biofilme supragengival: *Streptococcus* (21,4%), *Fusobacterium* (9,4%), *Capnocytophaga* (9,1%), *Prevotella* (8,2%), *Corynebacterium* (4,2%);
- c) Canal radicular: *Porphyromonas* (16,0%), *Prevotella* (15,6%), *Parvimonas* (7,7%), *Firmicutes* ph2 (7,2%), *Pyramidobacter* (5,0%).

Em amostras do Grupo 2, os gêneros mais abundantes foram:

- a) Saliva: *Streptococcus* (18,0%), *Prevotella* (14,4%), *Veillonella* (10,7%), *Porphyromonas* (10,0%) e *Sphingomonas* (3,2%);
- b) Biofilme supragengival: *Streptococcus* (22,3%), *Fusobacterium* (8,9%), *Prevotella* (6,8%), *Capnocytophaga* (7,9%), *Porphyromonas* (4,2%);
- c) Canal radicular: *Porphyromonas* (23,3%), *Prevotella* (12,3%), *Streptococcus* (5,6%), *Proteobacteria* TG5 (4,4%), outros gêneros (16,829%).

Tabela 7. Abundância relativa em porcentagem de OTUs presentes em amostras de saliva, biofilme supragengival e canal radicular em pacientes que não utilizaram ou utilizaram antibiótico previamente ao atendimento odontológico de urgência, considerando o gênero a que pertencem.

Grupo Taxonômico		G1 (Sem Antibiótico)			G2 (Com Antibiótico)		
Filo	Gênero	S	BS	CR	S	BS	CR
Euryarchaeota	<i>Methanobrevibacter</i>	0,000	0,000	0,319	0,000	0,000	0,014
Actinobacteria	<i>Actinomyces</i>	0,705	1,008	0,140	1,739	0,923	0,009
	<i>Atopobium</i>	0,810	0,017	0,253	0,695	0,042	0,699
	<i>Brevibacterium</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	<i>Corynebacterium</i>	0,080	4,268	0,000	0,021	2,604	0,000
	<i>Rothia</i>	0,065	0,006	0,000	0,111	0,000	0,000
	<i>Scardovia</i>	0,010	0,000	0,007	0,000	0,000	0,000
	<i>Slackia</i>	0,000	0,011	0,004	0,000	0,000	0,089
	Outros	0,025	0,408	16,246	3,202	0,312	9,017
Bacteroidetes	<i>Bacteroides</i>	0,000	0,006	0,379	1,899	0,025	0,225
	<i>Capnocytophaga</i>	0,375	9,165	0,000	0,185	7,976	0,009
	<i>Paludibacter</i>	0,270	0,515	0,004	0,649	1,711	0,052
	<i>Porphyromonas</i>	1,411	2,938	16,060	10,095	4,205	23,397
	<i>Prevotella</i>	9,830	8,254	15,695	14,419	6,838	12,372
	<i>SHD-231</i>	0,000	0,000	0,011	0,000	0,000	0,174
	<i>Shingobacterium</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	<i>Tannerella</i>	0,040	0,968	0,011	0,160	2,625	3,261
Outros	0,705	3,549	0,263	3,350	0,897	0,394	
Chloriflexi	Outros	0,005	0,000	0,147	0,000	0,000	0,000
Firmicutes	<i>Acidaminococcus</i>	0,000	0,000	0,004	0,033	0,067	0,009
	<i>Anaerococcus</i>	0,000	0,000	0,386	0,000	0,000	0,000
	<i>Butyrivibrio</i>	0,000	0,000	0,326	0,000	0,000	0,000
	<i>Catonella</i>	0,025	0,142	0,014	0,008	0,038	0,000
	<i>Dialister</i>	0,075	0,572	5,380	0,070	0,240	1,698
	<i>Enterococcus</i>	3,192	1,438	0,014	1,204	0,834	0,009
	<i>Eubacterium</i>	0,000	0,000	0,891	0,008	0,185	1,895
	<i>Filifactor</i>	0,045	0,108	1,232	0,189	0,025	0,131
	<i>Fusobacterium</i>	0,135	9,488	0,039	0,917	8,979	0,530
	<i>Gemella</i>	1,586	2,944	0,456	1,640	1,976	0,005
	<i>Lactobacillus</i>	0,000	0,000	0,081	0,012	0,000	0,474
	<i>Megasphaera</i>	0,000	0,170	0,011	0,119	0,312	3,176
	<i>Mogibacterium</i>	0,005	0,000	1,081	0,008	0,034	0,202
	<i>Moryella</i>	0,005	0,000	1,846	0,008	0,004	3,659
	<i>Oribacterium</i>	0,395	0,402	0,256	0,374	0,257	0,023
<i>Parvimonas</i>	0,180	0,781	7,725	0,518	0,552	0,549	
<i>Peptococcus</i>	0,020	0,311	0,298	0,004	0,013	0,005	
<i>Peptoniphilus</i>	0,000	0,000	1,253	0,000	0,004	0,000	

Tabela 7. Abundância relativa em porcentagem de OTUs presentes em amostras de saliva, biofilme supragengival e canal radicular em pacientes que não utilizaram ou utilizaram antibiótico previamente ao atendimento odontológico de urgência, considerando o gênero a que pertencem (continuação).

Grupo Taxonômico		G1 (Sem Antibiótico)			G2 (Com Antibiótico)		
Filo	Gênero	S	BS	CR	S	BS	CR
Firmicutes	<i>Peptostreptococcus</i>	0,430	0,549	1,881	0,427	0,312	1,802
	<i>ph2</i>	0,005	0,011	7,282	0,012	0,000	0,000
	<i>Ruminococcus</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,394
	<i>Schwartzia</i>	0,000	0,147	0,207	0,021	0,295	0,117
	<i>Selenomonas</i>	0,025	2,655	0,007	0,049	2,857	0,099
	<i>Sharpea</i>	0,005	0,011	0,449	0,000	0,000	0,145
	<i>Shuttleworthia</i>	0,010	0,000	0,084	0,021	0,055	0,211
	<i>Streptococcus</i>	46,436	21,477	0,512	18,044	22,365	5,602
	<i>Veillonella</i>	20,806	8,616	0,098	10,716	3,105	0,056
	<i>WAL_1855D</i>	0,000	0,000	4,001	0,000	0,000	0,005
	Outros	2,121	3,748	4,429	1,755	3,961	3,781
Fusobacteria	<i>Caulobacter</i>	0,370	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	<i>Leptotrichia</i>	0,140	1,721	0,011	1,114	5,945	0,005
	Outros	0,075	0,051	0,000	0,099	0,000	0,000
Proteobacteria	<i>Aggregatibacter</i>	0,030	0,255	0,000	0,312	1,601	0,005
	<i>Bradyrhizobium</i>	0,010	0,000	0,000	0,029	0,000	0,000
	<i>Cardiobacterium</i>	0,005	0,345	0,000	0,004	0,451	0,000
	<i>Haemophilus</i>	0,220	0,753	0,004	0,427	2,073	0,009
	<i>Hydrogenophilus</i>	0,000	0,006	0,000	0,021	0,013	0,009
	<i>Jonquetella</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	<i>Kingella</i>	0,005	0,170	0,000	0,000	0,320	0,000
	<i>Lautropia</i>	0,035	1,647	0,000	0,304	0,661	0,000
	<i>Mycoplasma</i>	0,000	0,000	0,035	0,000	0,004	0,000
	<i>Neisseria</i>	7,574	2,485	0,000	2,705	1,508	0,009
	<i>Propionivibrio</i>	0,000	0,023	0,000	0,000	0,042	0,000
	<i>Pseudomonas</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	<i>Pyramidobacter</i>	0,005	0,006	5,022	0,390	0,008	1,013
	<i>Ralstonia</i>	0,000	0,000	0,000	0,781	0,000	0,000
	<i>Sphaerochaeta</i>	0,000	0,000	0,000	0,016	0,013	2,102
	<i>Sphingomonas</i>	0,000	0,000	0,000	3,239	0,000	0,000
	<i>Stenotrophomonas</i>	0,005	0,000	0,000	0,004	0,000	0,000
	<i>TG5</i>	0,015	0,204	0,748	0,095	0,472	4,424
	<i>Treponema</i>	0,040	0,883	0,818	0,140	0,396	1,285
Outros	0,430	5,112	0,004	14,107	3,299	0,019	
Outros	1,206	1,659	3,576	3,531	8,566	16,829	

5.2.3 Avaliação da alfa diversidade das comunidades procarióticas

Os valores de Dominância, Índice de Shannon, diversidade de Simpson e estimativa de riqueza de Chao-1 para as amostras dos Grupos 1 e 2 estão representados na **Figura 3**.

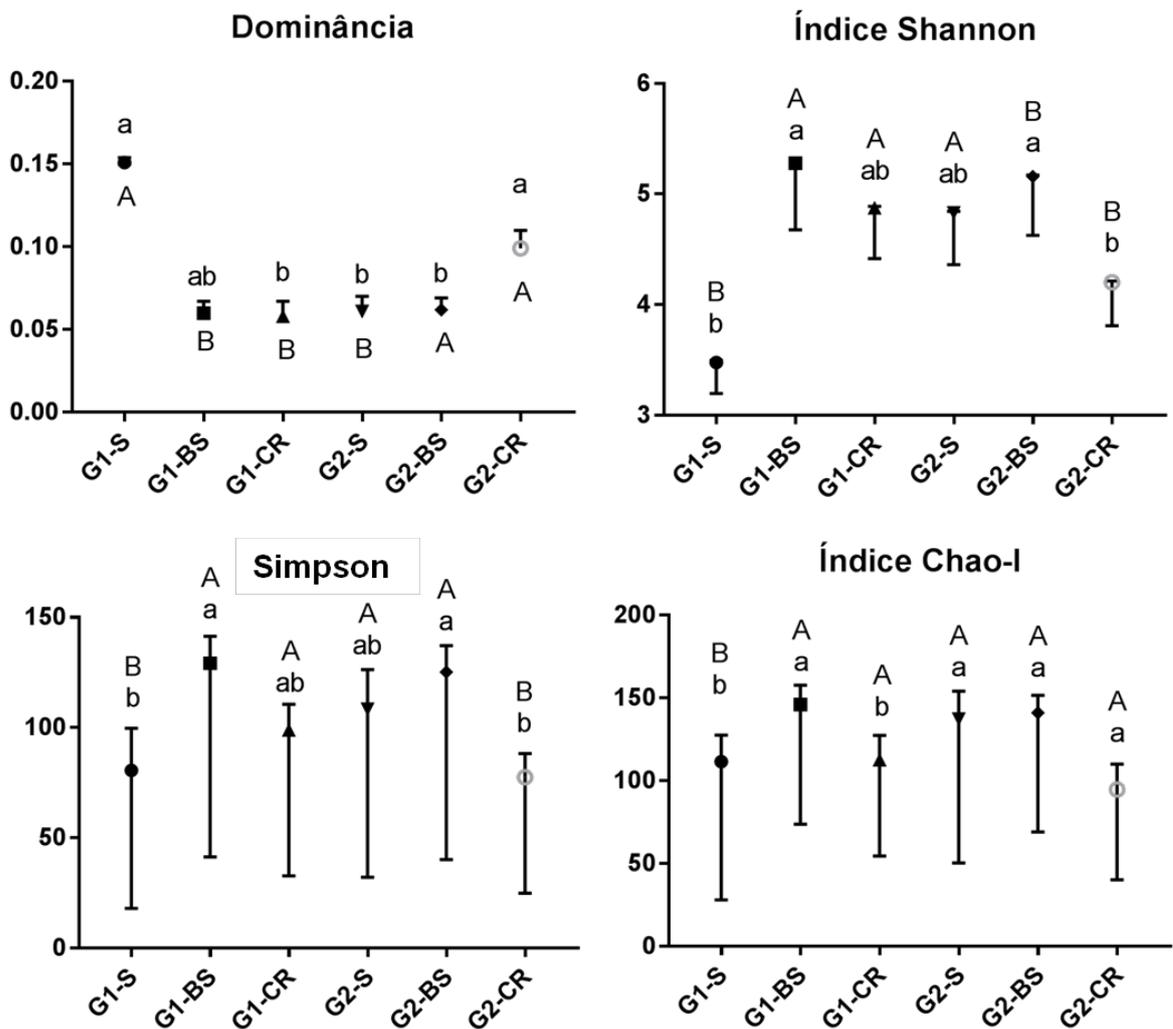


Figura 3. Medidas de α -diversidade, considerando-se a mediana das medidas para cada um dos dez passos de rarefação. Letras maiúsculas indicam diferença entre amostras de um mesmo ecossistema, pertencentes a grupos diferentes (Teste U de Mann-Whitney, $P < 0,05$). Letras minúsculas diferentes indicam diferença entre S, BS e CR em um mesmo grupo (Teste de Friedman, post hoc de Dunn, $P < 0,05$).

Considerando-se a Dominância, pode-se inferir que:

- Em G1-S há uma maior dominância do que em G1-BS e G1-CR (Teste de Friedmann, $P < 0.05$);
- Em G2-CR há uma maior dominância que em G2-BS e G2-S, quando comparados com CR (Teste de Friedmann, $P < 0.05$);
- A dominância em G1-S é maior que em G2-S (Teste U de Mann-Whitney, $P < 0.05$).
- Não há diferença entre a dominância em G1-BS e G2-BS (Teste U de Mann-Whitney, $P > 0.05$);
- A dominância é maior em G2-CR do que em G1-CR (Teste U de Mann-Whitney, $P < 0.05$).

Quando não se fez uso de antimicrobiano antes da coleta, há uma menor diversidade de OTUs em S do que em BS e em CR. Já quando se utilizou agente antimicrobiano antes da coleta, há uma maior diversidade de OTUs nas amostras de CR do que em S e BS.

Os resultados sugerem que há uma diversidade maior de OTUs nas amostras de CR em G1 do que em G2. Em saliva, há uma maior diversidade de OTUs para G2 do que em G1.

O Índice de Shannon demonstra que:

- Em G1 e G2, há maiores valores para BS do que para CR e S (Teste de Friedmann, $P < 0,05$);
- Os valores para G2-S são maiores que para G1-S (Teste U de Mann-Whitney, $P < 0,05$).
- Os valores de diversidade para BS e CR são maiores no G1 que em G2 (Teste U de Mann-Whitney, $P < 0,05$).

Para o seu cálculo, o índice de Shannon considera o grau de uniformidade na abundância das espécies. O uso de agentes antimicrobianos gerou maiores valores de uniformidade da quantidade de indivíduos de uma mesma espécie nas amostras de saliva. Os valores de diversidade de Shannon em BS e CR foram maiores quando não se utilizou agente antimicrobiano.

Em relação à índice de riqueza de Simpson, observa-se que:

- Em G1, há uma maior riqueza de OTUs em BS e CR, quando comparados com S (Teste de Friedmann, $P < 0.05$);
- Em G2, há uma maior riqueza de OTUs em BS e S, quando comparados com CR (Teste de Friedmann, $P < 0.05$);
- A riqueza em G2-S é maior que em G1-S (Teste U de Mann-Whitney, $P < 0.05$).
- Não há diferença entre a riqueza em G1-BS e G2-BS (Teste U de Mann-Whitney, $P > 0.05$);
- A riqueza é maior em G1-CR do que em G2-CR (Teste U de Mann-Whitney, $P < 0.05$).

Portanto, quando não há o uso de agentes antimicrobianos antes do tratamento, o número de OTUs é maior em BS e em CR que em S. Quando o participante fez uso de agente antimicrobiano, não há diferença entre o número de OTUs em S e em BS, havendo uma redução da riqueza em amostras de CR.

Ao se comparar o mesmo sítio dos dois grupos, há uma maior riqueza de espécies nas amostras de saliva quando o paciente fez uso de antimicrobiano. Comportamento inverso é observado para a amostra de canal radicular, onde um número menor de OTUs foi encontrado. Não houve diferença entre as amostras de BS para G1 e G2.

Para o Índice de Chao-I, observa-se que:

- Em G1, há maiores valores de riqueza de espécie em BS do que em CR e S (Teste de Friedmann, $P < 0.05$);
- Em G2, não há diferença nos valores de riqueza de espécies entre os ecossistemas S, BS e CR (Teste de Friedmann, $P > 0.05$);
- A riqueza de espécies em G2-S é maior que em G1-S (Teste U de Mann-Whitney, $P < 0.05$).

O valor de riqueza de Chao-1, que representa o número de OTUs raras em uma amostra, foi maior em S de pacientes que utilizaram agentes antimicrobianos. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os valores de Chao-1 para amostras de G1-BS e G2-BS ou de G1-CR ou de G2-CR.

5.2.4 Avaliação da beta diversidade das comunidades procarióticas

Para a análise de beta-diversidade, observa-se clara proximidade entre amostras de G1-BS e G2-BS, considerando-se PC1, PC2 e PC3. Há um distanciamento entre as amostras de saliva entre o G1 e o G2, indicando que o uso de agentes antimicrobianos prévio à coleta pode ter alterado a comunidade de procariotos nas amostras. As amostras G1-CR e G2-CR estão mais distantes das demais amostras. Este dado indica que há, possivelmente, uma maior seleção dos constituintes procarióticos das comunidades microbianas encontradas em canais radiculares, o que as distancia das comunidades procarióticas de saliva e de biofilme supragengival. Quando observadas pela perspectiva de PC2 e PC3, há distanciamento entre G1-CR e G2-CR. Entretanto, salienta-se que a contribuição destes componentes para a construção gráfica é de 14,18% e 11,46%, respectivamente, menor que aquele associado à PC1 (66,66%).

Quando comparadas todos os dados de beta-diversidade de amostras de S, BS e CR, independente do grupo a que pertencem, não se observou diferença estatisticamente significativa entre eles (Teste ANOSIM; $P=0,19$; $R=66\%$). Assim, não há diferença dos valores de beta-diversidade entre os nichos S, BS e CR, considerando-se os componentes procarióticos.

Quando comparadas todos os dados de beta-diversidade do Grupo 1 a todos os dados do Grupo 2, não se observou diferença estatisticamente significativa entre eles (Teste ANOSIM; $P=0,66$; $R=-18\%$). Assim, em uma comparação conjunta de todos os ecossistemas de um mesmo grupo, não há influência da utilização de agentes antimicrobianos sobre a comunidade de procariotos presentes.

A **Figura 4** representa a análise de coordenadas principais, considerando-se as amostras.

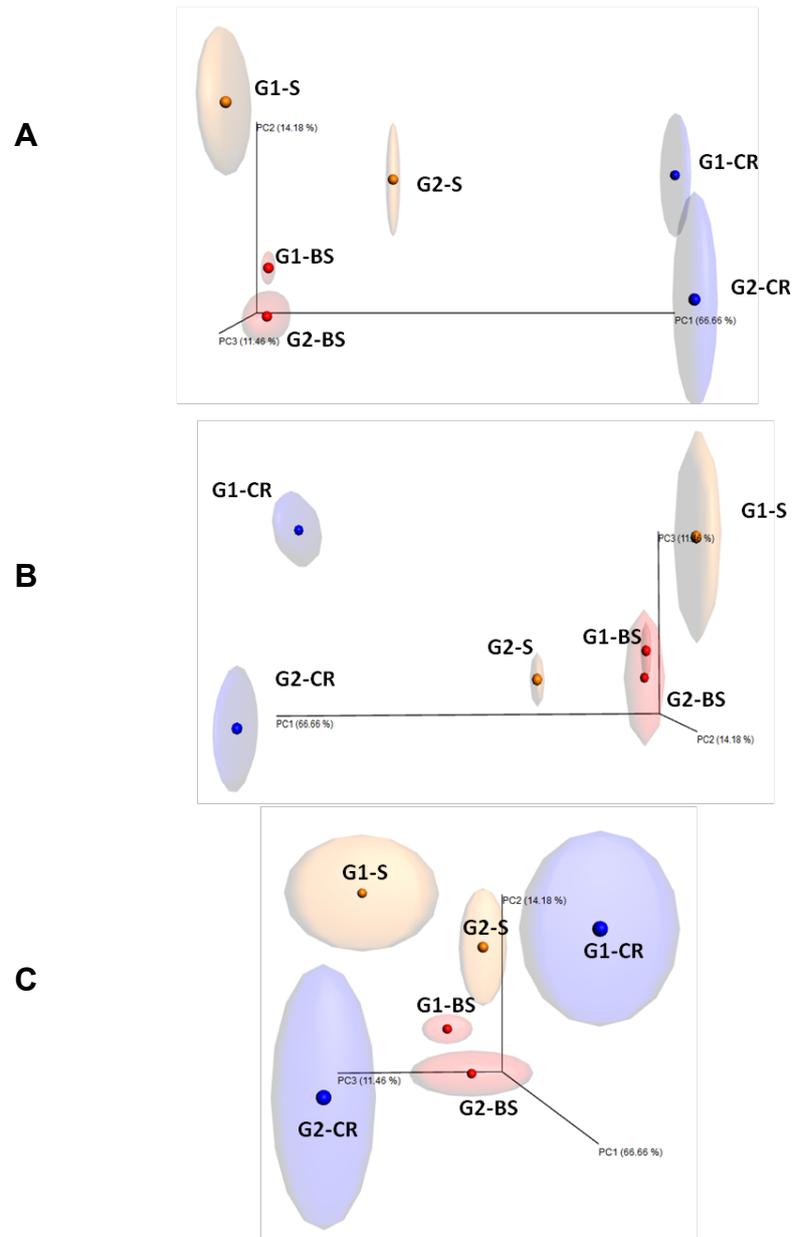


Figura 4. Medidas de beta-diversidade: análise de coordenadas principais para as amostras, com método de agrupamento UPGMA, com *jackknifing*, e método de comparação UniFrac com peso. Representação dos três eixos principais: A (PC1), B (PC2) e C (PC3). G1 = sem antibiótico; G2 = com antibiótico; S = saliva; BS = biofilme supragengival; CR = canal radicular.

5.3 Detecção de genes de resistência a agentes antimicrobianos

A **Tabela 8** mostra a frequência de detecção dos genes de resistência a agentes antimicrobianos nos ecossistemas saliva, biofilme supragengival e canal radicular, e também a sua ocorrência simultânea em mais de um ambiente.

Não foram detectados genes de resistência à vancomicina e genes *blaZ*, *mecA*, *InuB* e *ermC*. Ao menos um gene de resistência às tetraciclina estava presente em pelo menos uma amostra. O gene *ermB* foi frequentemente detectado em amostras de S, BS e CR em ambos os grupos. O gene *tetM* foi detectado simultaneamente em todos os ecossistemas em 4/6 pacientes do G1. O mesmo comportamento foi observado para o gene *tetQ* (3/6) neste grupo.

Tabela 8. Frequência de detecção dos genes de resistência a agentes antimicrobianos em amostras dependendo do uso prévio ou não de agentes antimicrobianos.

Antibiótico	Gene	S		BS		CR		S + BS		S + CR		BS + CR		S + BS + CR	
		G1	G2	G1	G2	G1	G2	G1	G2	G1	G2	G1	G2	G1	G2
Lactâmicos	<i>blaZ</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>mecA</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>blaTEM</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>ampC</i>	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0
Tetraciclina	<i>tetM</i>	6	5	6	5	4	3	6	4	4	2	4	2	4	1
	<i>tetQ</i>	6	3	3	1	5	2	3	0	5	2	3	0	3	0
	<i>tetW</i>	3	5	5	5	1	3	3	4	1	2	1	2	1	1
	<i>ermB</i>	4	5	3	4	4	1	2	3	4	0	2	1	2	0
Macrolídeos	<i>ermC</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>mefA</i>	1	4	1	5	0	1	1	4	0	1	0	1	0	1
	<i>vanA</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Vancomicina	<i>vanD</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>vanE</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>InuB</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Lincosamida	<i>IsaB</i>	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0

* S = saliva; BS = biofilme supragengival; CR = canal radicular; G1 = Grupo 1; G2 = grupo 2.

A **Figura 5** apresenta os agrupamentos para amostras de S, BS e CR dos Grupos 1 e 2, considerando-se a presença dos genes de resistência aos agentes antimicrobianos, detectados por meio de PCR gene-específico. Não se observa um

nível de agrupamento alto entre amostras de um mesmo paciente, de um mesmo ecossistema, ou de um mesmo grupo, devido à nítida distinção entre os grupos formados. O coeficiente cofenético com valor superior a 0,7 demonstra adequação no método de agrupamento, para resumir a informação do conjunto de dados.

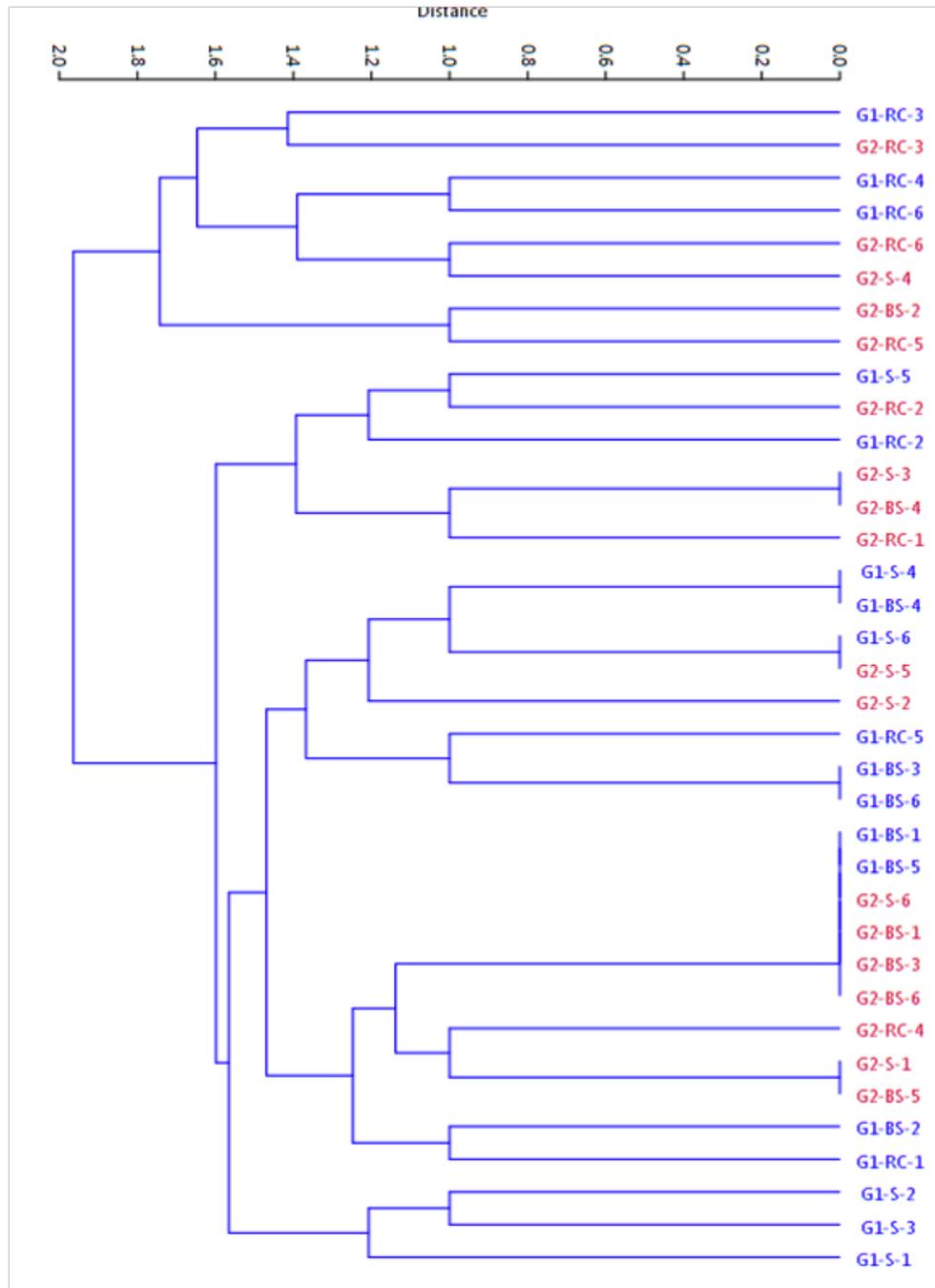


Figura 5. Dendrograma representativo do perfil da presença de genes de resistência a agentes antimicrobianos em amostras dos grupos G1 e G2. Método de agrupamento UPMGA, com distância Euclidiana. Coeficiente de correlação cofenético = 0,8171.

6 DISCUSSÃO

6.1 Aspectos Metodológicos e Análise de Dados

A população que compôs este estudo foi formada por doze pacientes que buscaram atendimento de urgência na Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, apresentando sinais e sintomas associados a infecções endodônticas agudas. A presença de dor espontânea, necrose pulpar, dor à percussão vertical e eventual aumento de volume associado a edema caracterizaram a presença de abscesso apical agudo (Gutmann et al., 2009). Neste estudo, foram incluídos intencionalmente pacientes que fizeram uso de agentes antimicrobianos previamente à consulta. Em estudo retrospectivo, De Paula et al. (2014) avaliaram prontuários de 223 pacientes que procuraram tratamento no Serviço desta Faculdade de março de 2009 a março de 2011 com objetivo de avaliar a frequência de uso de antimicrobianos pelos pacientes previamente ao atendimento. A dor de origem endodôntica foi a queixa mais frequente do paciente (72,6%). Trinta e dois pacientes (14,3%) relataram ter utilizado agentes antimicrobianos antes da consulta, sendo que a maioria destes empregaram beta-lactâmicos. Torna-se importante compreender discutir os aspectos metodológicos para a análise das amostras, a fim de se estabelecer o impacto do uso prévio de antibióticos nas comunidades microbianas que integram a cavidade bucal.

A diversidade microbiana em canais radiculares infectados tem sido amplamente explorada por meio de cultura e de métodos moleculares. Estes têm revelado uma maior complexidade da microbiota endodôntica do que o anteriormente relatado. Além de detectar algumas espécies cultiváveis em maior prevalência, esses métodos também expandiram a lista de supostos patógenos endodônticos pela inclusão de algumas espécies microbianas de difícil cultivo ou até mesmo aquelas que nunca foram encontradas anteriormente em infecções endodônticas (Siqueira & Rôças, 2005). Tendo em vista o conceito de que infecções endodônticas são polimicrobianas, estas novas tecnologias vão ao encontro do conceito holístico de que a comunidade é realmente a unidade de patogenicidade (Kuramitsu et al., 2007). No ano de 2010 foram publicados os primeiros estudos que

buscam descrever a microbiota endodôntica por meio do sequenciamento de alto rendimento. Salienta-se que o reconhecimento de perfis comunitários envolvidos com diferentes situações clínicas pode representar um passo importante para uma melhor compreensão da patogênese das infecções endodônticas. Além disso, é possível estabelecer as bases para o estabelecimento de protocolos terapêuticos mais eficazes. Assim, não se pode desconsiderar a abordagem ampla para a avaliação das comunidades microbianas quando do uso prévio de antibióticos no microbioma de saliva, biofilme supragengival e canais radiculares de pacientes com infecção endodôntica aguda.

Para a caracterização das comunidades microbianas, utilizou-se sequenciamento de alto rendimento – MiSeq Illumina (San Diego, CA, USA). Uma etapa importante para alta qualidade dos resultados gerados por SAR consiste na escolha de *primers* para amplificação de regiões do gene procariótico 16S rRNA. Este gene possui nove regiões hipervariáveis ladeadas por regiões de sequências mais conservadas. Kumar et al (2011) salientaram que a região hipervariável escolhida para o sequenciamento pode influenciar o perfil das comunidades microbianas detectado. No presente estudo, com o objetivo de tornar efetiva a leitura das sequências, uma região de aproximadamente 469 pb das regiões hipervariáveis V3 e V4 do gene 16S rRNA foi selecionada para sequenciamento. Esta região fornece ampla informação para a classificação taxonômica de comunidades microbianas a partir de espécimes do microbioma humano tendo sido inclusive utilizada pelo *Human Microbiome Project* (Turnbaugh et al., 2007; Fadrosh et al., 2014). Yu et al (2008) avaliaram diferentes genes para regiões variáveis do gene 16S rRNA quanto à possibilidade de fornecer maior discriminação das comunidades de Archaea em amostras de rumem de ovelhas, por meio de PCR-DGGE. De acordo com os autores, os produtos de PCR da região V3 forneceram os perfis de DGGE com mais informações, permitindo a identificação de metanogênicos frequentes em amostras de rumem de ovelhas. Portanto, a escolha da região V3-V4 parece ser adequada para a análise de comunidades de procariotos. Sugere-se que outras regiões hipervariáveis devam ser avaliadas com este mesmo fim e comparações entre os resultados devam ser realizadas.

O sequenciamento de um grande número de amostras, que é muitas vezes necessário para estudos de genética de populações, ainda é economicamente

desafiador, apesar da redução dos custos dos SAR. O uso de agrupamento de amostras ou *pools* (*Pool-seq*) é uma alternativa pois reduz custo e tempo de processamento. Ela consiste na união de amostras de vários indivíduos antes do sequenciamento. O agrupamento de amostras pode interferir principalmente na detecção de alelos raros. Entretanto, estudos comparando os resultados de SAR em amostras individuais ou geradas a partir de *pools* demonstram resultados robustos e confiáveis para ambos. Incoerências em leituras podem ser corrigidas por filtros de qualidade (Anand et al., 2016; Gautier et al., 2013). No presente estudo, observou-se que 100% das sequências geradas por meio da Plataforma MiSeq Illumina passaram por filtro de qualidade, com média de comprimento de 409,95 pb. Cada amostra individual contribuiu com a mesma concentração de DNA para análise, evitando distorções na composição do microbioma do *pool*. A apresentação qualitativa e quantitativa dos dados relativos às OTUs, em seus mais variados níveis, permitiu ainda a análise das comunidades microbianas por meio de métricas de ecologia.

Como as comunidades microbianas analisadas no presente estudo são complexas, há a necessidade de compreender a sua diversidade, por meio de uma análise integrada de sua composição. O termo "biodiversidade" é uma simples contração da "diversidade biológica" e, em uma análise preliminar, o conceito parece simples. A biodiversidade é a soma de toda a variação biótica, desde os genes até os ecossistemas. Entretanto, o desafio surge quando se quer inserir métricas a um conceito tão amplo, de maneira a fornecer informações úteis (Purvis & Hector, 2000). Em 1972, Whittaker sugeriu três níveis para a medição da diversidade, considerando o componente espacial de sua distribuição: alfa, beta e gama. No presente estudo, foram avaliadas as diversidades alfa e beta. A diversidade "alfa" corresponde à diversidade em um único sítio. Já a "beta" diversidade representa as diferenças nas diversidades entre os sítios. A "gama" diversidade abrange parâmetros amplos, que envolveria todos os ecossistemas possíveis.

As medidas de alfa diversidade consideram a riqueza de espécies e também a uniformidade (equitabilidade) com que elas se distribuem na amostra. As medidas de alfa diversidade são também chamadas de índices de heterogeneidade (Magurran, 2013). Diversidade biológica pode ser dividida em dois componentes: riqueza de espécies e uniformidade. O termo "riqueza de espécies" é simplesmente

o número de espécies dentro de uma unidade de estudo. “Uniformidade” descreve a variabilidade das abundâncias das espécies (Marrugan, 2013). Para que sejam analisadas de forma conjunta, criaram-se métodos de estatística que incorporam informações de riqueza e de uniformidade, que são conhecidos como “índices de diversidade”. No presente estudo, foram escolhidos para análise: dominância, índice Shannon, índice de Simpson e o índice de riqueza de Chao (Chao-1).

Enquanto que a uniformidade representa o quão similares são as espécies em suas abundâncias, os valores para dominância representam quanto uma ou poucas espécies dominam a comunidade microbiana. Os valores de dominância variam de 0 a 1. O índice de Shannon é uma medida de heterogeneidade que leva em consideração o grau de uniformidade na abundância das espécies (Magurran, 2013). A diversidade máxima para este índice seria quando todas as espécies tivessem igual abundância.

Estudos empregando SAR demonstraram que há um núcleo de espécies comuns em amostras da cavidade bucal de indivíduos saudáveis (Zaura et al., 2009) e que há um predomínio de espécies microbianas pertencentes aos filos Bacteroidetes, Firmicutes e Fusobacterium (Li et al., 2010; Santos et al., 2011; Hsiao et al., 2012; Tzanetakis et al., 2015) em infecções endodônticas agudas. Assim, empregou-se o índice de Simpson que confere mais peso à presença das espécies comuns em sua análise de diversidade. Entretanto, Jacinto et al. (2005) e Montagner et al. (2010) indicaram que nenhuma espécie microbiana parece ser detectada em todas as amostras, e a grande maioria das espécies é detectada em apenas uma amostra. O método de Chao-1 estima a riqueza total utilizando o número de espécies representadas por apenas um indivíduo nas amostras e o número de espécies representadas com apenas dois indivíduos nas amostras (Magurran, 2013). A análise de riqueza considerando as espécies pouco abundantes parece ser válida para estudo de comunidades microbianas em infecções endodônticas. Considerando-se os conceitos anteriores, parece lícito indicar a associação de índices que contemplem membros abundantes e pouco abundantes nas comunidades microbianas para que uma análise abrangente seja determinada.

Embora as medidas de alfa diversidade permitam comparar as comunidades de saliva, biofilme supragengival e canal radicular considerando-se a riqueza e a uniformidade da distribuição dos seus integrantes, não permitem dizer o

quanto elas são distintas entre si (Magurran, 2003). Para avaliar como o sítio de coleta da amostra e o efeito da utilização de agentes antimicrobianos influenciam na composição das comunidades microbianas, optou-se por realizar análise de beta diversidade. Assim, quanto menos espécies as amostras de saliva, biofilme supragengival e canal radicular compartilharem, mais alta é a diversidade beta. Mesmo que estas análises tenham sido utilizadas para estudo de comunidades microbianas em biofilme supragengival associado ou não às lesões de cárie (Chen et al., 2015; Xiao et al., 2016), não há estudos que a empreguem para comparar comunidades microbianas em canais radiculares infectados. O método empregado para análise foi o de UPGMA com *jackknifing*, conforme descrito por Lozupone & Knight (2005). O método UniFrac permite determinar as diferenças entre as comunidades microbianas, considerando as informações filogenéticas, considerando as linhagens presentes nas amostras. De acordo com os autores, os métodos anteriores ao UniFrac não consideravam a importância dos diferentes graus de similaridade entre as sequências na construção da beta-diversidade, gerando perda de informações passíveis de fornecer discriminação entre elas.

Considerando-se que a utilização de agentes antimicrobianos alteraria o microbioma bucal e como a resistência a antibióticos em diferentes espécies bacterianas pode ser mediada pela expressão de genes, torna-se necessária a detecção destes em amostras de saliva, biofilme supragengival e canal radicular. O método de PCR gene específico permite amplificação de uma sequência de ácidos nucleicos com alta especificidade (Siqueira & Rôças, 2005), justificando-se a sua escolha para o presente estudo. Moraes et al (2015b) identificaram a presença de 33 genes de resistência a antibióticos em amostras da cavidade bucal em adultos e crianças. Dentre eles destacam-se: *blaTEM*; *blaZ*; *cfxA*; *cfxA2*; *blaCMY2*; *ampC*; *mecA*; *pbp1A*; *pbp2X*; *pbp2B*; *ermA*; *ermB*; *ermC*; *ermE*; *ermV*; *tetM*; *tetO*; *tetQ*; *tetS*; *tetW*; *tet32*; *tetA*; *tetB*; *tetC*; *tetD*; *tetK*; *tetL*; *vanA*; *vanB*; *vanC1*; *vanC2/3*; *vanD*; *vanE*. Para o presente estudo, foram selecionados 15 genes relacionados à resistência aos agentes beta-lactâmicos, tetraciclinas, macrolídeos, vancomicina e lincosamidas. Além da descrição da frequência da detecção de cada gene, os dados foram apresentados na forma de dendograma, como resultado de análise multivariada. Este método foi previamente empregado por Montagner et al. (2012) para comparar a similaridade da distribuição de espécies associadas às infecções

endodônticas agudas, em amostras de canal radicular e abscesso apical agudo coletados de um mesmo paciente. Para Magurran (2013), a análise de agrupamento é um método intuitivo de representar diferenças entre amostras, onde as mais similares são combinadas para formar grupos. A técnica de agrupamento empregada no estudo foi UPGMA e o cálculo da distância entre as amostras foi determinado por meio do método Euclidiano. De acordo com Vicini (2005), há muitos algoritmos para se formar agrupamentos e, devido à existência de vários critérios, o pesquisador deve optar por aquele que for mais adequado à análise em estudo.

6.2 Composição e diversidade procariótica em amostras de S, BS e CR

Não há evidências sólidas na literatura de como o uso de antimicrobianos possa alterar o microbioma oral e quais suas repercussões clínicas. Os participantes do grupo 2 utilizaram amoxicilina ou cefalexina previamente à consulta. A amoxicilina demonstra amplo espectro de ação, atuando principalmente sobre cocos Gram-positivos e Gram-negativos e bacilos Gram-negativos. As cefalosporinas apresentam ação frente a aeróbios Gram-positivos, não tendo atividade anerobicida significativa (Wannmacher & Ferreira, 1999). Considerando-se parâmetros de distribuição, estes medicamentos parecem estar presentes na saliva após curtos períodos da sua ingestão. De acordo com Smyth et al (1981), após a administração oral de 500mg de amoxicilina, a concentração atinge 0,3µg/mL em 30 minutos.

Alguns estudos clínicos e revisões de literatura analisaram uso de antimicrobianos e seus efeitos no microbioma da cavidade bucal. Stark et al. (1996) relataram que uma ingestão anterior de amoxicilina pode alterar a composição microbiana dentro da cavidade oral, com um ligeiro aumento no número de cepas resistentes. Ready et al (2004) avaliaram amostras de biofilme supragengival de crianças que receberam agentes antimicrobianos 3 meses antes da coleta microbiológica quanto à presença de bactérias resistentes à amoxicilina. Observaram um acréscimo no número, proporção e na concentração inibitória mínima de cepas resistentes à eritromicina quando do uso prévio de amoxicilina. Baglie et al. (2007) encontraram uma diminuição nas unidades formadoras de colônias, contando 60 minutos após a ingestão oral de amoxicilina. Em recente

revisão sistemática, Lang et al (2016) observaram também uma alteração nos padrões de resistência de cepas isoladas em amostras de pacientes que haviam recebido agentes antimicrobianos previamente à coleta. Entretanto, Zaura et al (2015) avaliaram o efeito do uso de agente antimicrobiano por 7 dias no microbioma da saliva, comparando amostras antes e após o uso. Os autores indicaram que o microbioma salivar demonstrou relativa estabilidade aos 7 dias, demonstrando uma capacidade de reorganização, sugerindo assim maior resiliência frente a um agente externo.

No presente estudo, em amostras de saliva e biofilme supragengival houve um predomínio de espécies pertencentes ao domínio Bacteria, e aos filos Firmicutes seguido por Bacteroidetes, quando do uso ou não de agentes antimicrobianos. Entretanto, nas amostras de canal radicular, houve um predomínio de Bacteroidetes, seguido de Firmicutes. Considerando-se os componentes do domínio Archaea, sua presença foi observada apenas nas amostras do canal radicular, sendo pertencentes ao filo Euryarchaeota e gênero *Methanobrevibacter*. Estes achados ilustram que o ecossistema do canal radicular infectado é único e distinto da saliva e do biofilme supragengival, considerando-se aspectos de tensão de oxigênio e de fonte nutricional. Gomes et al (1994) indicaram que interações positivas e negativas entre espécies bacterianas são o elemento chave da sobrevivência no interior deste ecossistema. Entretanto, estudos adicionais devem ser conduzidos para que as interações entre componentes do Domínio Bacteria e Archaea sejam estabelecidas.

Quando não se utilizou antimicrobianos (Grupo 1), observou-se em amostras de saliva a presença de 55 gêneros diferentes, sendo *Streptococcus* o mais abundante, compondo 46,8% das OTUs detectadas. Entretanto, um percentual menor de OTUs pertencentes ao gênero *Streptococcus* foi observado no biofilme supragengival (21%), e componentes do gênero *Fusobacterium* contribuíram com 9,4% dos reads. Observou-se no pool de amostras de saliva dos pacientes que utilizaram agentes antimicrobianos (Grupo 2) 65 gêneros, não havendo predomínio de um único. Foram observadas OTUs pertencentes a *Streptococcus* (18,0%), *Prevotella* (14,4%), *Veillonella* (10,7%), *Porphyromonas* (10,0%). Já no biofilme supragengival, observa-se *Streptococcus* (22,3%), *Fusobacterium* (8,9%), *Prevotella* (6,8%), *Capnocytophaga* (7,9%), *Porphyromonas* (4,2%). A presença maciça de

integrantes do filo Firmicutes e do gênero *Streptococcus* em amostras de saliva (Zaura et al., 2009; Simón-Soro et al., 2013) e da superfície dental já haviam sido reportadas (Simón-Soro et al., 2013), concordando com os resultados deste estudo.

Em ambos os grupos, nas amostras de canal radicular, os filos mais abundantes foram Bacteroidetes seguido por Firmicutes; e os gêneros mais detectados foram *Porphyromonas*, *Prevotella* e *Parvimonas*. Os resultados do presente estudo confirmam o perfil polimicrobiano das infecções endodônticas agudas, com predomínio de bactérias anaeróbias estritas e Gram-negativas descritos por meio de cultura microbiana e métodos moleculares (Gomes et al., 2004; Siqueira & Rôças, 2013). Li et al. (2010), Hsiao et al. (2012) e Tzanetakis et al. (2015) também descreveram Bacteroidetes e Firmicutes como filos mais abundantes em amostras de canal radicular com infecção primária. Os gêneros mais abundantes foram *Prevotella*, *Tannerella* e *Parvimonas*; *Prevotella* e *Fusobacterium*; e *Bacteroidaceae_unclassified*, *Prevotella*, *Parvimonas*, respectivamente. Resultados um pouco diferentes foram obtidos por Santos et al. (2011) onde os filos mais abundantes foram Firmicutes e Fusobacteria e os gêneros mais prevalentes foram *Fusobacterium* e *Parvimonas*. Como estes estudos foram realizados em diferentes países, fatores associados à localização geográfica podem explicar estas divergências (Roças et al., 2011; Machado de Oliveira et al., 2007).

Apenas amostras de CR continham integrantes do Domínio Archaea, filo Euryarcheota e gênero *Methanobrevibacter*. Estudos anteriores que buscavam avaliar a presença de representantes do domínio Archaea em canal radicular com infecção endodôntica obtiveram resultados. Em 2005, Siqueira et al. não encontraram DNA de Archaea em amostras em infecções crônicas e abscessos agudos por meio de RT-PCR. No mesmo ano, Vianna et al. (2005) foram o primeiro grupo a relatar Archaea em infecções primárias usando RT-PCR. Archaea constituiu até 2,5% da comunidade de procaríotos. Utilizando PCR gene específico, Vickerman et al. (2007) confirmaram a presença de Archaea em 2/34 amostras de pacientes com infecções endodônticas. Jiang et al. (2009) detectaram Archaea em amostras de canal radicular com infecções primárias e secundárias por meio de RT-PCR. O presente estudo parece ser até então o primeiro a utilizar sequenciamento de alto rendimento na avaliação da presença de Archaea nestas infecções. Observou-se que pacientes que não fizeram uso de agentes antimicrobianos antes da consulta

apresentaram maior número de OTUs do Domínio Archaea quando comparado ao grupo que usou antibiótico (0,31% *versus* 0,01%, respectivamente). Dridi et al (2011) testou a suscetibilidade de cepas de *Methanobrevibacter smithii* e observou que elas eram resistentes à ampicilina, estreptomicina, gentamicina, rifampicina, ofloxacina, tetraciclina, anfotericina B e vancomicina. As cepas foram suscetíveis a bacitracina, metronidazol, ornidazol e esqualamina. Os autores sugeriram que Archaea metanogênicas são altamente resistentes aos antibióticos, sendo suscetíveis somente aos medicamentos capazes de atuar em Bacteria e Eukarya. Portanto, a diferença na concentração de OTUs de Archaea nas amostras analisadas não parece estar associada ao uso prévio do agente antimicrobiano.

Considerando-se que a dominância reflete quanto uma ou poucas espécies dominam a comunidade microbiana, e que seus valores variam de forma crescente de 0 a 1, todas as amostras apresentaram valores baixos. Entretanto, no Grupo 1 há uma menor riqueza de OTUs em S do que em BS e CR. Sugere-se assim um domínio maior de determinado grupo de espécies em amostras de saliva do que em BS e CR. Em G2, comportamento inverso é observado, pois há riqueza maior em S e BS do que em CR.

O índice de Shannon leva em consideração o grau de uniformidade na abundância das espécies (Magurran, 2013), sendo que valores maiores indicam maior diversidade. O uso de agentes antimicrobianos gerou maiores valores de uniformidade da quantidade de indivíduos de uma mesma espécie nas amostras de saliva. Os valores de diversidade de Shannon em BS e CR foram maiores quando não se utilizou agente antimicrobiano.

Ao considerar o índice de Simpson, que considera a presença das espécies mais comuns em sua análise de diversidade, observam-se maiores valores para G2S do que para G1S, e não há diferença entre G1BS e G2BS. Em G1, se observam maiores valores para G1BS e G1CR do que em G1S. Em G2, valores maiores são observados em G2BS e G2S do que em G2CR.

Considerando-se a diversidade para espécies pouco abundantes pela métrica de Chao-1, os valores para G2S são maiores que para G1S. Em pacientes que não utilizaram antibiótico, maiores valores são observados em G1BS do que em G1S e G1CR. Não há diferença estatisticamente significativa para G2S, G2SB e G2CR.

A análise conjunta dos resultados de alfa diversidade permite estabelecer que o uso prévio de antimicrobiano parece oportunizar que outras espécies, antes menos abundantes, se estabeleçam em maior número na cavidade oral, especialmente em saliva. O microbioma do biofilme supragengival parece não ser modificado, uma vez que os valores dos índices que avaliam as espécies mais abundantes e menos abundantes não são diferentes. Zaura et al (2015) sugerem que a resiliência do microbioma da cavidade oral pode ser capaz de restabelecer as comunidades microbianas após período de 7 dias de uso de antibiótico. Assim, as alterações observadas no presente estudo podem estar associadas a períodos inferiores de uso de antibiótico, demonstrando que ainda não foi possível restabelecer a configuração basal da comunidade microbiana.

Para amostras de canal radicular, observa-se maior valor de dominância e para o índice de Shannon em G2, sugerindo que um número menor de espécies apresenta um número maior de componentes e que há uma menor uniformidade na abundância das espécies que em G1. Cabe discutir qual o possível efeito do antibiótico no interior do sistema de canais radiculares. Durante a coleta das amostras, foram selecionados apenas dentes que não apresentavam contato direto com a cavidade bucal. Da mesma forma, como há necrose pulpar não há corrente sanguínea capaz de introduzir o fármaco neste sítio. Assim, salienta-se que diferenças composicionais para comunidades de procaríotos (bactérias e Archaea) em amostras de canais radiculares de G1 e G2 possam ser relacionadas à grande heterogeneidade das comunidades presentes no interior de sistema de canais radiculares de pacientes com infecções intrarradiculares sintomáticas, como indicado previamente por Montagner et al (2010).

A análise de beta diversidade permite a representação gráfica e uma ilustração mais precisa da comparação entre os diferentes ecossistemas. Por meio da análise das coordenadas principais as esferas representativas das amostras de saliva estão distantes entre si e também daquelas do biofilme supragengival. Os estudos Zaura et al. (2009) e Simón-Soro et al. (2013) sugerem que a saliva apresenta uma composição microbiana distinta das superfícies duras, considerando-se a análise dos componentes principais (PCA) e análise de coordenadas principais (PCoA), respectivamente. As amostras de canal radicular estão ainda mais afastadas das amostras de saliva e biofilme supragengival, e também entre si. Não há relato prévio na literatura de comparação de beta diversidade entre amostras de

canal radicular, biofilme supragengival e saliva, restringindo possíveis comparações. Ao se comparar valores agrupados de beta diversidade entre G1 e G2 ou entre S, BS e CR não foi observado diferença estatisticamente significativa. Este fato se deve às compensações que possam ter existido durante o agrupamento dos dados de condições ou ecossistemas distintos.

Todavia, é notável a aproximação das amostras de BS dos dois grupos, em qualquer posição do **Gráfico 4**, demonstrando que este nicho foi o menos afetado pelo uso de antibiotico prévio à consulta. Um biofilme é um agrupamento estruturado de bactérias incorporado em uma matriz polimérica auto-produzida constituída por polissacarídeo, proteína e DNA. Os biofilmes bacterianos causam infecções crônicas porque mostram tolerância aumentada aos antibióticos e aos produtos químicos desinfetantes assim como resistindo a fagocitose e outros componentes do sistema de defesa do corpo (Høiby et al., 2010)

Bactérias que se ligam a uma superfície e crescem como um biofilme estão mais protegidas da ação de antibióticos. Os mecanismos de proteção nos biofilmes parecem ser distintos daqueles que são responsáveis pela resistência microbiana convencional aos antibióticos. Nos biofilmes, a menor penetração de antibióticos, limitação de nutrientes e crescimento lento, respostas de estresse adaptativo e formação de células de resistentes são hipóteses de constituir uma defesa em várias camadas (Stewart, 2002).

6.3 Detecção de genes de resistência a agentes antimicrobianos em Saliva, Biofilme supragengival e Canal Radicular

Considerando-se que não devem ser avaliadas apenas alterações nas espécies e na carga microbiana, mas também nos fatores de virulência associada a eles, é importante que a presença de genes de resistência seja avaliada quando se faz o uso prévio ou não de agentes antimicrobianos. Embora não observando diferença na composição microbiana, Zaura et al (2015) relataram que a presença de componentes associados ao desenvolvimento de resistência aumentou na saliva após a exposição aos agentes antibióticos. Em revisão sistemática, Moraes et al (2015) observaram que os genes mais frequentemente detectados em amostras de saliva, biofilme supragengival e canal radicular portadores de infecções

endodônticas foram *tetM*, *tetQ*, *tetW*. Os agentes beta-lactâmicos são os antibióticos de primeira escolha como adjuvantes no tratamento de infecção endodônticas agudas (Ellison, 2009; Lang et al., 2016).

Os três possíveis mecanismos que explicam a resistência de microrganismos aos antibióticos beta-lactâmicos são: produção de enzimas (beta-lactamases) capazes de inativar o antibiótico; alteração das proteínas de ligação à penicilina presente na parede celular bacteriana; e da falta ou redução na expressão de proteínas da membrana externa de bactérias gram-negativas que restringe a entrada do agente antimicrobiano no interior celular (Babic et al., 2006). De acordo com o presente estudo, os genes de resistência a agentes beta-lactâmicos não foram frequentemente detectados em amostras de saliva, biofilme supragengival e canal radicular com infecção endodôntica aguda. Em estudo prévio, Moraes et al (2015a) também observaram baixa taxa de detecção para o gene *cfxA/cfxA2* em amostras de canal radicular. A análise das amostras não permitiu a detecção dos genes *mecA* e *blaZ*. Estes genes também não foram detectados em amostras de canais radiculares por Jungermann et al (2011) e Rôças & Siqueira (2012). O gene *blaTEM* foi detectado em apenas uma amostra de saliva e não foi encontrado em amostras de canais radiculares. Entretanto estudos na literatura indicam que suas taxas de detecção em canais radiculares variam de 17 a 43% (Jungermann et al., 2011; Rôças & Siqueira et al., 2012; Rôças & Siqueira et al., 2013). Estes resultados do presente estudo são plausíveis, uma vez que há predomínio de bactérias do gênero *Streptococcus* nas amostras. Em bactérias Gram-positivas, a resistência a beta-lactâmicos resulta da expressão de proteínas intrínsecas de ligação de penicilina (*penicillin-binding proteins*), que reduz a afinidade dessas por esses agentes (Smith et al., 2004). Embora ocorram com frequência nestas infecções, porém com menor carga microbiana, as bactérias Gram-negativas demonstram resistência por meio da expressão de betalactamases.

Tradicionalmente, a eritromicina foi a primeira alternativa às penicilinas para o tratamento das infecções odontogênicas em pacientes alérgicos (Montgomery, 2000). Apresentam-se como antibióticos de amplo espectro, com atividade frente a bactérias Gram-positivas aeróbias e alguns anaeróbios (Dietrich, 1999). Entretanto, tem-se observado altas taxas de resistência dos isolados a este antibiótico (Lang et al., 2016). Os mecanismos de resistência a macrolídeos mais frequentemente

observados são mediados pelos genes *mefA* e *ermB/ermC*. O gene *ermB* é responsável por dimetilação na posição A2058 do gene 23S rRNA, resultando em resistência a macrolídeo-lincosamida-estreptogramina B (MLSB) (Sutcliffe 1999). O *ermB* ou outra metilase homóloga é encontrada em quase todas as espécies bacterianas, (Roberts et al., 1999; Tait-Kamradt et al., 2000). O gene de resistência a macrolídeos *ermB* foi frequentemente detectado em amostras de saliva, biofilme supragengival e canal radicular em ambos os grupos. Seville et al. (2009) encontraram a presença deste gene em alta frequência na saliva. Entretanto, estudos que o avaliaram em amostras de canal radicular não o detectaram (Rôças & Siqueira, 2012; Lins et al, 2013). O gene *ermC* não foi detectado em nenhuma amostra no presente estudo. Entretanto, Rôças & Siqueira (2012) e Rôças & Siqueira (2013) detectaram o gene em 10-24% de amostras de canal radicular com infecção sintomática. O gene *mefA* codifica uma bomba de efluxo específica, sendo encontrada em espécies de *Streptococcus* (Sutcliffe et al., 1996). O gene *mefA* foi frequentemente detectado, principalmente em amostras de saliva e biofilme supragengival no Grupo 2.

A clindamicina é uma alternativa a ser prescrita caso o paciente apresente alergia aos antibióticos beta-lactâmicos (Holmes & Pellecchia, 2016). De acordo com Leclercq (2002) as bactérias desenvolvem resistência às lincosamidas de três formas: através da modificação do alvo (metilação ou mutação que impede a ligação do antibiótico ao seu alvo ribossomal); através do efluxo do antibiótico; e, pela inativação do fármaco. Os genes de resistência a lincosamidas não tinham sido testados diretamente de amostras bucais até o momento. Dos dois genes avaliados, o gene *InuB* não foi encontrado, enquanto o gene *IsaB* apresentou-se em duas amostras (saliva e biofilme supragengival) e não em canais radiculares.

Os genes de resistência às tetraciclinas foram frequentemente detectados nas amostras avaliadas, independentemente do grupo. Achados similares foram reportados anteriormente na literatura (Lancaster et al, 2005; Seville et al, 2009; Jungermann et al, 2011; Rôças & Siqueira, 2012; Lins et al, 2013; Rôças & Siqueira, 2013). Observou-se um predomínio em amostras de saliva e biofilme supragengival, especialmente para os genes *tetM* e *tetQ*. Para Roberts (2003) as altas taxas de resistência à tetraciclina se deve à resistência intrínseca entre anaeróbios estritos e resistência secundária, adquirida por meio de sua ampla utilização e uso incorreto.

No presente estudo, não foram detectados os três genes de resistência à vancomicina investigados. Estes resultados estão de acordo com os outros trabalhos prévios que também não encontraram amostras positivas para genes de resistência à vancomicina (Jungermann et al., 2011; Lins et al., 2013).

Através do método de análise de conglomerados com métrica UPMGA e distância Euclidiana, não foi observado um nível de agrupamento claro entre amostras, nem quanto ao grupo ou mesmo quanto a um ecossistema específico. Este resultado heterogêneo pode ser devido à pequena amostragem e/ou o número de genes testados muito diverso.

Cabe salientar que a detecção de genes de resistência aos antibióticos não significa necessariamente resistência a eles, mas sim o potencial para a expressão da proteína codificada. Um exemplo são os achados de Montagner et al (2012). Os autores detectaram gene de resistência a beta-lactâmicos em 2 de 26 isolados de infecções endodônticas agudas, mas apenas uma linhagem havia expressado esse gene como determinado por métodos fenotípicos. Além disso, também é importante avaliar a resposta clínica de pacientes que apresentam genes de resistência a antibióticos.

7 CONCLUSÃO

Baseado nos resultados obtidos e nas limitações experimentais do presente estudo, pode-se concluir que:

- a) Há predomínio de integrantes do domínio Bactéria em todas as amostras de saliva, biofilme supragengival e canal radicular. Dentre esses ecossistemas, apenas o canal radicular parece apresentar condições favoráveis para a colonização por integrantes do domínio Archaea, uma vez que foram capazes de abrigar espécies pertencentes ao gênero *Methanobrevibacter*.
- b) Os filos Firmicutes e Bacteroidetes predominam em amostras de saliva, biofilme supragengival e canais radiculares, demonstrando alteração na proporção dos seus componentes dependendo do ecossistema ou do uso de agente antimicrobiano.
- c) Em amostras de saliva, o uso prévio de agentes antimicrobianos foi capaz de exercer efeito sobre o microbioma, gerando um equilíbrio no percentual de componentes dos filos Firmicutes e Bacteroidetes, o que se refletiu na emergência de espécies pouco abundantes.
- d) O microbioma do biofilme supragengival parece não ser significativamente modificado pelo uso de agentes antimicrobianos, demonstrando maior estabilidade quanto à riqueza de espécies e à dominância.
- e) Considerando os aspectos de beta-diversidade, não se pode afirmar que há uniformidade na composição do microbioma de saliva, biofilme supragengival e canal radicular portador de infecção endodôntica aguda de pools de mesmos indivíduos. Amostras de cada um dos ecossistemas distribuem-se espacialmente de forma peculiar, não indicando perfil de agrupamento entre elas. As comunidades microbianas de biofilmes supragengivais parecem ser mais similares, independentemente do uso ou não de agentes antimicrobianos.
- f) Genes de resistência a tetraciclinas e macrolídeos foram encontrados com frequência em amostras de saliva, biofilme supragengival e canal

radicular, independentemente do uso ou não de antibióticos beta-lactâmicos.

- g) Os genes de resistência tetM, tetQ e tetW são frequentemente compartilhados em ecossistemas orais de um mesmo grupo, podendo estar presentes simultaneamente em amostras de saliva, biofilme supragengival e canal radicular de um mesmo paciente.
- h) Bactérias carreadoras de genes de resistência a lactâmicos e clindamicina não foram detectadas frequentemente nos microbiomas estudados.
- i) Os perfis de presença de genes de resistência em ecossistemas relacionados parecem diferir, não apresentando similaridade que permita alto grau de agrupamento de amostras de um mesmo paciente ou pertencente a um mesmo ecossistema.

REFERÊNCIAS

1. Adessi C, Matton G, Ayala G, Turcatti G, Mermod JJ, Mayer P, Kawashima E. Solid phase DNA amplification: characterisation of primer attachment and amplification mechanisms. *Nucleic Acids Res.* 2000;28(20):E87.
2. Albers SV, Meyer BH. The archaeal cell envelope. *Nat Rev Microbiol.* 2011;9(6):414-26.
3. Aminov RI, Garrigues-Jeanjean N, Mackie RI. Molecular ecology of tetracycline resistance: development and validation of primers for detection of tetracycline resistance genes encoding ribosomal protection proteins. *Appl Environ Microbiol.* 2001;67(1):22-32.
4. Anand S, Mangano E, Barizzone N, Bordoni R, Sorosina M, Clarelli F, Corrado L, Martinelli Boneschi F, D'Alfonso S, De Bellis G. Next Generation Sequencing of Pooled Samples: Guideline for Variants' Filtering. *Sci Rep.* 2016;6:33735.
5. 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.
6. Avila M, Ojcius DM, Yilmaz O. The oral microbiota: living with a permanent guest. *DNA Cell Biol.* 2009;28(8):405-11.
7. Babic M, Hujer AM, Bonomo RA. What's new in antibiotic resistance? Focus on beta-lactamases. *Drug Resist Updat.* 2006;9(3):142-56.
8. Baglie S, Del Ruenis AP, Motta RH, et al. Plasma and salivary amoxicillin concentrations and effect against oral microorganisms. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2007;45: 556–62.
9. Bou G, Martínez-Beltrán J. Cloning, nucleotide sequencing, and analysis of the gene encoding an AmpC beta-lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000;44(2):428-32.
10. Bozdogan B, Berrezouga L, Kuo MS, Yurek DA, Farley KA, Stockman BJ, Leclercq R. A new resistance gene, *linB*, conferring resistance to lincosamides by nucleotidylation in *Enterococcus faecium* HM1025. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999;43(4):925-9.

11. Call DR, Bakko MK, Krug MJ, Roberts MC. Identifying antimicrobial resistance genes with DNA microarrays. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47(10):3290-5.
12. Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, Fierer N, Peña AG, Goodrich JK, Gordon JI, Huttley GA, Kelley ST, Knights D, Koenig JE, Ley RE, Lozupone CA, McDonald D, Muegge BD, Pirrung M, Reeder J, Sevinsky JR, Turnbaugh PJ, Walters WA, Widmann J, Yatsunencko T, Zaneveld J, Knight R. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods.* 2010;7(5):335-6.
13. Chen L, Qin B, Du M, Zhong H, Xu Q, Li Y, Zhang P, Fan M. Extensive description and comparison of human supra-gingival microbiome in root caries and health. *PLoS One.* 2015;10(2):e0117064.
14. Davies J, Davies D. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2010;74(3):417-33.
15. De-Paula KB, Silveira LS, Fagundes GX, Ferreira MB, Montagner F. Patient automedication and professional prescription pattern in an urgency service in Brazil. *Braz Oral Res.* 2014;28. pii: S1806-83242014000100250.
16. DeLong EF. Microbial population genomics and ecology. *Curr Opin Microbiol.* 2002;5(5):520-4.
17. Depardieu F, Perichon B, Courvalin P. Detection of the van alphabet and identification of enterococci and staphylococci at the species level by multiplex PCR. *J Clin Microbiol.* 2004;42(12):5857-60.
18. DeSantis TZ, Hugenholtz P, Larsen N, Rojas M, Brodie EL, Keller K, Huber T, Dalevi D, Hu P, Andersen GL. Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Appl Environ Microbiol.* 2006;72(7):5069-72.
19. Dewhirst FE, Chen T, Izard J, Paster BJ, Tanner AC, Yu WH, Lakshmanan A, Wade WG. The human oral microbiome. *J Bacteriol.* 2010;192(19):5002-17.
20. Dietrich SM. Macrolídeos. In: Wannmacher L, Ferreira MBC. *Farmacologia clínica para Dentistas.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p.191-6.
21. Dridi B, Fardeau ML, Ollivier B, Raoult D, Drancourt M. The antimicrobial resistance pattern of cultured human methanogens reflects the unique phylogenetic position of archaea. *J Antimicrob Chemother.* 2011;66(9):2038-44

22. Ellison SJ. The role of phenoxymethylpenicillin, amoxicillin, metronidazole and clindamycin in the management of acute dentoalveolar abscesses--a review. *Br Dent J.* 2009;206(7):357-62.
23. Estrela C, Guedes OA, Silva JA, Leles CR, Estrela CR, Pécora JD. Diagnostic and clinical factors associated with pulpal and periapical pain. *Braz Dent J.* 2011;22(4):306-11.
24. Fadrosch DW, Ma B, Gajer P, Sengamalay N, Ott S, Brotman RM, Ravel J. An improved dual-indexing approach for multiplexed 16S rRNA gene sequencing on the Illumina MiSeq platform. *Microbiome.* 2014;2(1):6.
25. Fedurco M, Romieu A, Williams S, Lawrence I, Turcatti G. BTA, a novel reagent for DNA attachment on glass and efficient generation of solid-phase amplified DNA colonies. *Nucleic Acids Res.* 2006;34(3):e22.
26. Fines M, Perichon B, Reynolds P, Sahm DF, Courvalin P. VanE, a new type of acquired glycopeptide resistance in *Enterococcus faecalis* BM4405. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999;43(9):2161-4.
27. Flynn TR. What are the Antibiotics of Choice for Odontogenic Infections, and How Long Should the Treatment Course Last? *Oral Maxillofacial Surg Clin N Am;* 2011; 23: 519–536.
28. Gautier M, Foucaud J, Gharbi K, Cézard T, Galan M, Loiseau A, Thomson M, Pudlo P, Kerdelhué C, Estoup A. Estimation of population allele frequencies from next-generation sequencing data: pool-versus individual-based genotyping. *Mol Ecol.* 2013;22(14):3766-79.
29. Gomes BP, Drucker DB, Lilley JD. Association of specific bacteria with some endodontic signs and symptoms. *Int Endod J.* 1994; 27(6): 291-298.
30. Gomes BP, Pinheiro ET, Gadê-Neto CR, Sousa EL, Ferraz CC, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Microbiological examination of infected dental root canals. *Oral Microbiol Immunol.* 2004;19(2):71-6
31. Gómez-Sanz E, Torres C, Lozano C, Fernández-Pérez R, Aspiroz C, Ruiz-Larrea F, Zarazaga M. Detection, molecular characterization, and clonal diversity of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* CC398 and CC97 in Spanish slaughter pigs of different age groups. *Foodborne Pathog Dis.* 2010;7(10):1269-77.

32. Gutmann JL, Baumgartner JC, Gluskin AH, Hartwell GR, Walton RE. Identify and define all diagnostic terms for periapical/periradicular health and disease states. *J Endod*. 2009;35(12):1658-74.
33. Haapasalo M. Black-pigmented gram-negative anaerobes in endodontic infections. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 1993;6(2-3):213-7.
34. Hammer, Øyvind; Harper, David A.T.; Ryan, Paul D. Past: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica* 4(1): 9 p, 2001. Available at: http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/past.pdf > Acesso em 10/09/2015.
35. Heller D, Helmerhorst EJ, Gower AC, Siqueira WL, Paster BJ, Oppenheim FG. Microbial Diversity in the Early In Vivo-Formed Dental Biofilm. *Appl Environ Microbiol*. 2016;82(6):1881-8.
36. Holmes CJ, Pellicchia R. Antimicrobial Therapy in Management of Odontogenic Infections in General Dentistry. *Dent Clin North Am*. 2016;60(2):497-507.
37. Horz HP. Archaeal Lineages within the Human Microbiome: Absent, Rare or Elusive? *Life (Basel)*. 2015;5(2):1333-45.
38. Hsiao WW, Li KL, Liu Z, Jones C, Fraser-Liggett CM, Fouad AF. Microbial transformation from normal oral microbiota to acute endodontic infections. *BMC Genomics*. 2012;13:345.
39. Hugon P, Dufour JC, Colson P, Fournier PE, Sallah K, Raoult D. A comprehensive repertoire of prokaryotic species identified in human beings. *Lancet Infect Dis*. 2015;15(10):1211-9.
40. Isenberg HD. Pathogenicity and virulence: another view. *Clin Microbiol Rev* 1988; 1: 40–53.
41. Jacinto RC, Gomes BP, Shah HN, Ferraz CC, Zaia AA, Souza Filho FJ. Quantification of endotoxins in necrotic root canals from symptomatic and asymptomatic teeth. *J Med Microbiol*. 2005; 54(Pt8): 777-83.
42. Jiang WX, Hu YJ, Gao L, He ZY, Zhu CL, Ma R, Huang ZW. The impact of various time intervals on the supragingival plaque dynamic core microbiome. *PLoS One*. 2015;10(5):e0124631.
43. Jiang YT, Xia WW, Li CL, Jiang W, Liang JP. Preliminary study of the presence and association of bacteria and archaea in teeth with apical periodontitis. *Int Endod J*. 2009;42(12):1096-103.

44. Jungermann GB, Burns K, Nandakumar R, Tolba M, Venezia RA, Fouad AF. Antibiotic resistance in primary and persistent endodontic infections. *J Endod* 2011;37(10):1337–44.
45. 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.
46. Khelaifia S, Drancourt M. Susceptibility of archaea to antimicrobial agents: applications to clinical microbiology. *Clin Microbiol Infect*. 2012;18(9):841-8.
47. Kuczynski J, Stombaugh J, Walters WA, González A, Caporaso JG, Knight R. Using QIIME to analyze 16S rRNA gene sequences from microbial communities. *Curr Protoc Bioinformatics*. 2011 Dec;Chapter 10:Unit 10.7.
48. Kumar PS, Brooker MR, Dowd SE, Camerlengo T. Target region selection is a critical determinant of community fingerprints generated by 16S pyrosequencing. *PLoS One*. 2011;6(6):e20956.
49. Kuramitsu HK, He X, Lux R, Anderson MH, Shi W. Interspecies interactions within oral microbial communities. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2007;71(4):653-70.
50. Lancaster H, Bedi R, Wilson M, Mullany P. The maintenance in the oral cavity of children of tetracycline-resistant bacteria and the genes encoding such resistance. *J Antimicrob Chemother*. 2005;56(3):524-31.
51. Lang PM, Jacinto RC, Dal Pizzol TS, Ferreira MB, Montagner F. Resistance profiles to antimicrobial agents in bacteria isolated from acute endodontic infections: systematic review and meta-analysis. *Int J Antimicrob Agents*. 2016;48(5):467-474.
52. Leclercq R. Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications. *Clin Infect Dis*. 2002;34(4):482-92.
53. Lepp PW, Brinig MM, Ouverney CC, Palm K, Armitage GC, Relman DA. Methanogenic Archaea and human periodontal disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(16):6176-81.
54. Li L, Hsiao WWL, Nandakumar R, Barbuto SM, Mongodin EF, Paster BJ, Fraser-Liggett CM, Fouad AF: Analyzing endodontic infections by deep coverage pyrosequencing. *J Dent Res* 2010, 89:980–984.
55. Lins RX, de Oliveira Andrade A, Hirata Junior R, Wilson MJ, Lewis MA, Williams DW, Fidel RA. Antimicrobial resistance and virulence traits of

- Enterococcus faecalis* from primary endodontic infections. *J Dent.* 2013;41(9):779-86.
56. Lopes HP; Siqueira JF. *Endodontia: Biologia e Técnica*. 2^a. ed. Rio de Janeiro. Ed. Medsi-Guanabara Koogan S. A. 2004. 964p.
 57. Lozupone C, Knight R. UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol.* 2005;71(12):8228-35.
 58. Machado de Oliveira JC, Siqueira JF Jr, Rôças IN, Baumgartner JC, Xia T, Peixoto RS, Rosado AS. Bacterial community profiles of endodontic abscesses from Brazilian and USA subjects as compared by denaturing gradient gel electrophoresis analysis. *Oral Microbiol Immunol.* 2007;22(1):14-8.
 59. Madigan MT, Clark DP, Stahl D, Martinko JM. *Brock Biology of Microorganisms*. 13th ed. San Francisco: Benjamin Cummings, 2010: 1155 pp.
 60. Magurran AE. *Medindo a diversidade biológica*. Curitiba-PR: Editora da UFPR, 2013. 261p.
 61. Mardis ER. Next-Generation Sequencing Platforms. *Annu. Rev. Anal. Chem.* 2013;6:287–303.
 62. Margulies M, Egholm M, Altman WE, Attiya S, Bader JS, Bemben LA, Berka J, Braverman MS, Chen YJ, Chen Z, Dewell SB, Du L, Fierro JM, Gomes XV, Godwin BC, He W, Helgesen S, Ho CH, Irzyk GP, Jando SC, Alenquer ML, Jarvie TP, Jirage KB, Kim JB, Knight JR, Lanza JR, Leamon JH, Lefkowitz SM, Lei M, Li J, Lohman KL, Lu H, Makhijani VB, McDade KE, McKenna MP, Myers EW, Nickerson E, Nobile JR, Plant R, Puc BP, Ronan MT, Roth GT, Sarkis GJ, Simons JF, Simpson JW, Srinivasan M, Tartaro KR, Tomasz A, Vogt KA, Volkmer GA, Wang SH, Wang Y, Weiner MP, Yu P, Begley RF, Rothberg JM. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature.* 2005 15;437(7057):376-80.
 63. Marsh PD. Microbiology of dental plaque biofilms and their role in oral health and caries. *Dent Clin North Am.* 2010;54(3):441-54.
 64. Matarazzo F, Ribeiro AC, Faveri M, Taddei C, Martinez MB, Mayer MP. The domain Archaea in human mucosal surfaces. *Clin Microbiol Infect.* 2012;18(9):834-40.
 65. Meyer E, Gastmeier P, Deja M, Schwab F. Antibiotic consumption and resistance: data from Europe and Germany. *Int J Med Microbiol.* 2013;303(6-7):388-95.

66. Miele A, Bandera M, Goldstein BP. Use of primers selective for vancomycin resistance genes to determine van genotype in enterococci and to study gene organization in VanA isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995;39(8):1772-8.
67. Miller WD. An introduction to the study of the bacterio-pathology of the dental pulp. *The Dental cosmos.* 1894;36:505-528.
68. Möller ÅJR. Microbiological examination of root canals and periapical tissues of human teeth. *Odontologisk Tidskrift.* 1966; 74, (Suppl.),1–380.
69. 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.
70. Montagner F, Jacinto RC, Correa Signoretti FG, Scheffer de Mattos V, Grecca FS, Gomes BP. Beta-lactamic resistance profiles in *Porphyromonas*, *Prevotella*, and *Parvimonas* species isolated from acute endodontic infections. *J Endod.* 2014;40(3):339-44.
71. Montagner F, Jacinto RC, Signoretti FG, Sanches PF, Gomes BP. Clustering behavior in microbial communities from acute endodontic infections. *J Endod.* 2012;38(2):158-62.
72. Montgomery EH. Antibióticos antibacterianos. In: Yagiela JA, Neidle EA, Dowd FJ. *Farmacologia e Terapêutica para Dentistas*; 2000. Pg.468-502.
73. Moraes LC, Fatturi-Parolo CC, Ferreira MB, Só MV, Montagner F. Saliva, supragingival biofilm and root canals can harbor gene associated with resistance to lactamic agents. *Braz Oral Res.* 2015a;29:52.
74. Moraes LC, Só MV, Dal Pizzol T da S, Ferreira MB, Montagner F. Distribution of genes related to antimicrobial resistance in different oral environments: a systematic review. *J Endod.* 2015b;41(4):434-41.
75. Nadkarni et al. Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set. *Microbiol* 2002;148:257–266.
76. Nair PR. Light and electron microscopic studies of root canal flora and periapical lesions. *J Endod.* 1987; 13(1): 29-40.
77. Newman P, MacFadyen EE, Gillespie FC, Stephen KW. An in-dwelling electrode for in-vivo measurement of the pH of dental plaque in man. *Arch Oral Biol.* 1979;24(7):501-7.

78. Ng LK, Martin I, Alfa M, Mulvey M. Multiplex PCR for the detection of tetracycline resistant genes. *Mol Cell Probes*. 2001;15(4):209-15.
79. Nóbrega LM, Montagner F, Ribeiro AC, Mayer MA, Gomes BP. Molecular Identification of Cultivable Bacteria From Infected Root Canals Associated With Acute Apical Abscess. *Braz Dent J*. 2016;27(3):318-24.
80. Ojo KK, Ulep C, Van Kirk N, Luis H, Bernardo M, Leitao J, Roberts MC. The *mef(A)* gene predominates among seven macrolide resistance genes identified in gram-negative strains representing 13 genera, isolated from healthy Portuguese children. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48(9):3451-6.
81. Ozok AR, Persoon IF, Huse SM, Keijser BJ, Wesselink PR, Crielaard W, Zaura E. Ecology of the microbiome of the infected root canal system: a comparison between apical and coronal root segments. *Int Endod J*. 2012;45(6):530-41.
82. Papapostolou A, Kroffke B, Tatakis DN, Nagaraja HN, Kumar PS. Contribution of host genotype to the composition of health-associated supragingival and subgingival microbiomes. *J Clin Periodontol* 2011; 38: 517–524.
83. Perreten V, Vorlet-Fawer L, Slickers P, Ehricht R, Kuhnert P, Frey J. Microarray-based detection of 90 antibiotic resistance genes of gram-positive bacteria. *J Clin Microbiol*. 2005;43(5):2291-302..
84. Prestinaci F, Pezzotti P, Pantosti A. Antimicrobial resistance: a global multifaceted phenomenon. *Pathog Glob Health*. 2015;109(7):309-18.
85. Purvis A, Hector A. Getting the measure of biodiversity. *Nature*. 2000 11;405(6783):212-9.
86. Rasiah IA, Wong L, Anderson SA, Sissons CH. Variation in bacterial DGGE patterns from human saliva: over time, between individuals and in corresponding dental plaque microcosms. *Arch Oral Biol*. 2005;50(9):779-87.
87. Ready D, Lancaster H, Qureshi F, Bedi R, Mullany P, Wilson M. Effect of amoxicillin use on oral microbiota in young children. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48(8):2883-7.
88. Ricucci D, Loghin S, Siqueira JF Jr. Correlation between clinical and histologic pulp diagnoses. *J Endod*. 2014;40(12):1932-9.
89. Riesenfeld CS, Schloss PD, Handelsman J. Metagenomics: genomic analysis of microbial communities. *Annu Rev Genet*. 2004;38:525-52.
90. Riggio MP, Aga H, Murray CA, Jackson MS, Lennon A, Hammersley N, Bagg J. Identification of bacteria associated with spreading odontogenic infections by

- 16S rRNA gene sequencing. *Oral Sur Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2007; 103(5): 610-7.
91. Roberts M C, Sutcliffe J, Courvalin P, Jensen L B, Rood J, Seppala H. Nomenclature for macrolide and macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance determinants. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999;43:2823–2830.
 92. Roberts MC. Antibiotic toxicity, interactions and resistance development. *Periodontol 2000.* 2002, Vol. 28, 2002, 280–297.
 93. Roberts MC. Tetracycline therapy: update. *Clin Infect Dis.* 2003;36(4):462-7.
 94. Rôças IN, Alves FR, Rachid CT, Lima KC, Assunção IV, Gomes PN, Siqueira JF Jr. Microbiome of Deep Dentinal Caries Lesions in Teeth with Symptomatic Irreversible Pulpitis. *PLoS One.* 2016;11(5):e0154653.
 95. Rôças IN, Siqueira JF Jr, Debelian GJ. Analysis of symptomatic and asymptomatic primary root canal infections in adult Norwegian patients. *J Endod.* 2011;37(9):1206-12.
 96. Rôças IN, Siqueira Jr JF. Antibiotic resistance genes in anaerobic bacteria isolated from primary dental root canal infections. *Anaerobe* 2012;18(6):576–80.
 97. Rôças IN, Siqueira Jr JF. Detection of antibiotic resistance genes in samples from acute and chronic endodontic infections and after treatment. *Arch Oral Biol.* 2013;58(9):1123-8.
 98. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977;74(12):5463-7.
 99. Santos AL, Siqueira JF Jr, Rôças IN, Jesus EC, Rosado AS, Tiedje JM. Comparing the bacterial diversity of acute and chronic dental root canal infections. *PLoS.* 2011;6(11):e28088.
 100. Schmieder R, Edwards R. Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. *Bioinformatics.* 2011;27(6):863-4.
 101. Seville LA, Patterson AJ, Scott KP, Mullany P, Quail MA, Parkhill J, Ready D, Wilson M, Spratt D, Roberts AP. Distribution of tetracycline and erythromycin resistance genes among human oral and fecal metagenomic DNA. *Microbial Drug Resistance* 2009;15(3): 159–66.
 102. Shin J, Ming GL, Song H. Decoding neural transcriptomes and epigenomes via high-throughput sequencing. *Nat Neurosci.* 2014;17(11):1463-75.
 103. Silhavy TJ, Kahne D, Walker S. The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010;2(5):a000414.

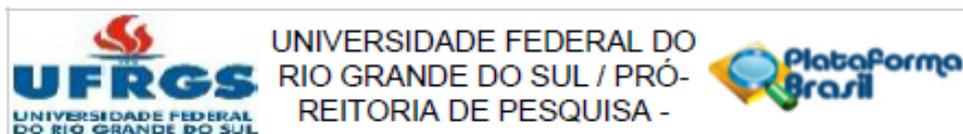
104. Silva P. *Farmacologia*. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002.
105. Simón-Soro A, Tomás I, Cabrera-Rubio R, Catalan MD, Nyvad B, Mira A. Microbial geography of the oral cavity. *J Dent Res*. 2013;92(7):616-21.
106. Siqueira JF Jr, Rôças IN, Baumgartner JC, Xia T. Searching for Archaea in infections of endodontic origin. *J Endod*. 2005;31(10):719-22.
107. Siqueira JF Jr, Rôças IN. Community as the unit of pathogenicity: an emerging concept as to the microbial pathogenesis of apical periodontitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2009;107(6):870-8.
108. Siqueira JF Jr, Rôças IN. Exploiting molecular methods to explore endodontic infections: Part 1--current molecular technologies for microbiological diagnosis. *J Endod*. 2005;31(6):411-23.
109. Siqueira JF Jr, Rôças IN. Microbiology and treatment of acute apical abscesses. *Clin Microbiol Rev*. 2013;26(2):255-73.
110. Siqueira Junior JF, Rôças IN. Community as the unit of pathogenicity: an emerging concept as to the microbial pathogenesis of apical periodontitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2009;107(6):870-8.
111. Smith A, Jackson MS, Kennedy H. Antimicrobial susceptibility of viridans group streptococcal blood isolates to eight antimicrobial agents. *Scand J Infect Dis*. 2004;36(4):259-63.
112. Smyth RD, Pfeffer M, Van Harken DR, Cohen A, Hottendorf GH. Human pharmacokinetics and disposition of sarmoxicillin, a lipophilic amoxicillin prodrug. *Antimicrob Agents Chemother*. 1981;19(6):1004-12.
113. Socransky SS, Haffajee AD. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontol 2000*. 2002;(28):12-55.
114. Sreenivasan PK, Haraszthy VI, Zambon JJ. The effect of a microbead dentifrice on microbial load in oral microenvironments. *Int J Dent Hyg*. 2011;9(2):136-42.
115. Stark CA, Adamsson I, Edlund C, et al. Effects of omeprazole and amoxicillin on the human oral and gastrointestinal microflora in patients with *Helicobacter pylori* infection. *J Antimicrob Chemother* 1996(38):927–39.
116. Sutcliffe J, Tait-Kamradt A, Wondrack L. *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes* resistant to macrolides but sensitive to clindamycin: a common resistance pattern mediated by an efflux system. *Antimicrob Agents Chemother*. 1996(40):1817–1824.

117. Sutcliffe J. Resistance to macrolides mediated by efflux mechanisms. *Curr Opin Investig Drugs*. 1999;1:403–412.
118. Tait-Kamradt A, Davies T, Appelbaum PC, Depardieu F, Courvalin P, Petitpas J, Wondrack L, Walker A, Jacobs MR, Sutcliffe J. Two new mechanisms of macrolide resistance in clinical strains of *Streptococcus pneumoniae* from Eastern Europe and North America. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000;44(12):3395-401.
119. Takahashi N., Nyvad B. Caries Ecology Revisited: Microbial Dynamics and the Caries Process. *Caries Res* 2008;42:409–418.
120. Tlaskalová-Hogenová H, Stepánková R, Hudcovic T, Tucková L, Cukrowska B, Lodinová-Zádníková R, Kozáková H, Rossmann P, Bártová J, Sokol D, Funda DP, Borovská D, Reháková Z, Sinkora J, Hofman J, Drastich P, Kokesová A. Commensal bacteria (normal microflora), mucosal immunity and chronic inflammatory and autoimmune diseases. *Immunol Lett*. 2004;15;93(2-3):97-108.
121. Trieu-Cuot, P., C. Poyart-Salmeron, C. Carlier, and P. Courvalin. 1990. Nucleotide sequence of the erythromycin resistance gene of the conjugative transposon Tn1545. *Nucleic Acids Research* 18:3660.
122. Turcatti G, Romieu A, Fedurco M, Tairi AP. A new class of cleavable fluorescent nucleotides: synthesis and optimization as reversible terminators for DNA sequencing by synthesis. *Nucleic Acids Res*. 2008;36(4):e25.
123. Turnbaugh PJ, Ley RE, Hamady M, Fraser-Liggett CM, Knight R, Gordon JI. The human microbiome project. *Nature*. 2007;18;449(7164):804-10.
124. Tzanetakis GN, Azcarate-Peril MA, Zachaki S, Panopoulos P, Kontakiotis EG, Madianos PN, Divaris K. Comparison of Bacterial Community Composition of Primary and Persistent Endodontic Infections Using Pyrosequencing. *J Endod*. 2015;41(8):1226-33.
125. Utter DR, Mark Welch JL, Borisy GG. Individuality, Stability, and Variability of the Plaque Microbiome. *Front Microbiol*. 2016;22;7:564.
126. Vázquez-Baeza Y, Pirrung M, Gonzalez A, Knight R. EMPeror: a tool for visualizing high-throughput microbial community data. *Gigascience*. 2013 26;2(1):16.
127. Vianna ME, Conrads G, Gomes BP, Horz HP. Identification and quantification of archaea involved in primary endodontic infections. *J Clin Microbiol*. 2006;44(4):1274-82.

128. Vicini L. Análise multivariada da teoria à prática [monografia de especialização]. Santa Maria: UFSM, CCNE, 2005.
129. Vickerman MM, Brossard KA, Funk DB, Jesionowski AM, Gill SR. Phylogenetic analysis of bacterial and archaeal species in symptomatic and asymptomatic endodontic infections. *J Med Microbiol.* 2007;56(Pt 1):110-8.
130. Wade WG. The oral microbiome in health and disease. *Pharmacol Res.* 2013;69(1):137-43.
131. Wannmacher LE; Ferreira MBC. *Farmacologia Clínica para Dentistas.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.
132. Whitman WB, Coleman DC, Wiebe WJ. Prokaryotes: the unseen majority. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 6578–83.
133. Whittaker RH. Evolution and measurement of species diversity. *Taxon.* 1972;21(2/3),.213-251.
134. Woese CR, Kandler O, Wheelis ML. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1990;87(12):4576-9.
135. Wood SR, Kirkham J, Marsh PD, Shore RC, Nattress B, Robinson C. Architecture of intact natural human plaque biofilms studied by confocal laser scanning microscopy. *J Dent Res.* 2000;79(1):21-7.
136. World Health Organization Antimicrobial resistance: global report on surveillance 2014. Geneva, Switzerland: WHO; 2014. <http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en/>. Acesso em: 17/11/2016.
137. Xiao C, Ran S, Huang Z, Liang J. Bacterial Diversity and Community Structure of Supragingival Plaques in Adults with Dental Health or Caries Revealed by 16S Pyrosequencing. *Front Microbiol.* 2016;22(7):1145.
138. Xu X1, He J, Xue J, Wang Y, Li K, Zhang K, Guo Q, Liu X, Zhou Y, Cheng L, Li M, Li Y, Li Y, Shi W, Zhou X. Oral cavity contains distinct niches with dynamic microbial communities. *Environ Microbiol.* 2015;17(3):699-710.
139. Yu Z, García-González R, Schanbacher FL, Morrison M. Evaluations of different hypervariable regions of archaeal 16S rRNA genes in profiling of methanogens by Archaea-specific PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol.* 2008;74(3):889-93.

140. Zaura E, Brandt BW, Teixeira de Mattos MJ, Buijs MJ, Caspers MP, Rashid MU, Weintraub A, Nord CE, Savell A, Hu Y, Coates AR, Hubank M, Spratt DA, Wilson M, Keijser BJ, Crielaard W. Same Exposure but Two Radically Different Responses to Antibiotics: Resilience of the Salivary Microbiome versus Long-Term Microbial Shifts in Feces. *MBio*. 2015;10;6(6):e01693-15.
141. Zaura E, Keijser BJ, Huse SM, Crielaard W. Defining the healthy "core microbiome" of oral microbial communities. *BMC Microbiol*. 2009 15;9:259.
142. Zaura E, Mira A. Editorial: the oral microbiome in an ecological perspective. *Front Cell Infect Microbiol*. 2015;29(5):39.
143. Zaura E. Next-generation Sequencing Approaches to understanding the oral microbiome. *Adv Dent Res*. 2012;22(4):81-85.
144. Zhang J, Chiodini R, Badr A, Zhang G. The impact of next-generation sequencing on genomics. *J Genet Genomics*. 2011;20;38(3):95-109.
145. Zijngel V, van Leeuwen MB, Degener JE, Abbas F, Thurnheer T, Gmür R, Harmsen HJ. Oral biofilm architecture on natural teeth. *PLoS One*. 2010 24;5(2):e9321.

APÊNDICE 1 – Termo de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da UFRGS:



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Alteração no Projeto "DETECÇÃO DE *Prevotella* spp., *Porphyromonas* spp. E DO GENE ASSOCIADO À PRODUÇÃO DE LACTAMASES EM INFECÇÕES ENDODÔNTICAS AGUDAS" - Autorização para execução de análise complementar

Pesquisador: FRANCISCO MONTAGNER

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 08375712.1.0000.5347

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.183.741

Data da Relatoria: 13/08/2015

Apresentação do Projeto:

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo CEP UFRGS em 11/10/2012 (No. parecer: 137.263).

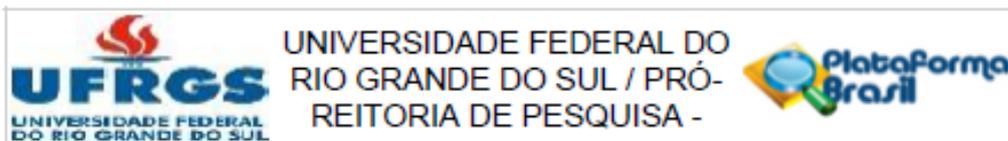
Segundo os pesquisadores, o adendo se justifica pela necessidade de análise adicional das amostras coletadas, a fim de conhecer a comunidade microbiana presente nas amostras em um sentido mais amplo. Com o acréscimo das análises adicionais, os pesquisadores esperam traçar o perfil microbiano (bacteriano e fúngico) de amostras de saliva, biofilme supragengival e canal radicular em diferentes situações clínicas, uma vez que este dado ainda não está descrito na literatura.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo geral da pesquisa foi alterado para incluir as análises adicionais. O novo texto é mostrado a seguir: "Esse projeto de pesquisa tem como objetivo compreender a estrutura das comunidades microbianas e verificar a presença de genes relacionados à resistência bacteriana aos agentes antimicrobianos em amostras de saliva, biofilme microbiano supragengival e canal radicular em diferentes situações.

Os objetivos específicos adicionados ao projeto são:

Endereço: Av. Paulo Gama, 110 - Sala 317 do Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro
Bairro: Farroupilha **CEP:** 91.040-060
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3308-3738 **Fax:** (51)3308-4085 **E-mail:** etica@propesq.ufrgs.br



Continuação do Parecer: 1.183.741

- Detectar a presença de genes relacionados a resistência bacteriana (blaTEM, blaZ, ampC, mecA - resistência aos agentes betalactâmicos; ermB, ermC, mecA e mefA - resistência aos macrolídeos; tetM, tetQ e tetW – resistência a tetraciclina; lnuB e lsaB - resistência a lincosamidas e genes vanA, vanD e vanE - resistência à vancomicina) em amostras de saliva, biofilme supragengival e canal radicular em pacientes com patologia periapical aguda e crônica.
- Determinar a influência da utilização ou não de agente antimicrobiano prévio sobre a frequência dos genes de resistência.
- Conhecer e comparar a comunidade microbiana do pool de amostras de saliva, biofilme supragengival e canal radicular nas diferentes condições clínicas através de técnicas de sequenciamento (Next Generation Sequencing – Illumina).

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não houve mudanças no texto dos riscos e benefícios da pesquisa.

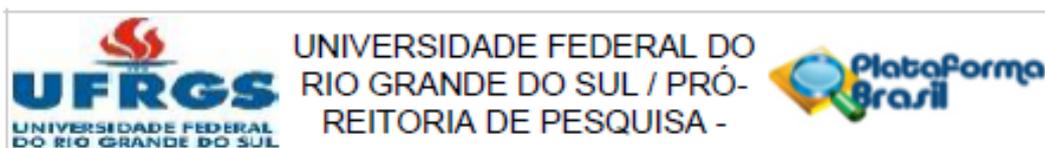
Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

As mudanças apresentadas na nova versão do projeto de pesquisa visam explorar as características das comunidades microbianas presentes nas amostras, por meio de sequenciamento e de detecção de outros genes de resistência antimicrobiana, associados a outras classes de antimicrobianos, tais como macrolídeos, tetraciclina, lincosamidas e glicopeptídeos. Não haverá inclusão de novos voluntários na pesquisa.

A detecção da presença de genes relacionados à resistência bacteriana (agentes betalactâmicos; macrolídeos; tetraciclina; lincosamidas e vancomicina) em amostras de saliva, placa microbiana supragengival e canal radicular em pacientes com patologia periapical aguda ou crônica será realizada por PCR. A análise da diversidade microbiana será por meio da nova técnica de sequenciamento (NGS - next generation sequencing) ILLUMINA. Esse processo será realizado por meio de serviço terceirizado (Laboratório Helixxa, Paulínia, São Paulo). O transporte das amostras entre as instituições será realizado em conformidade com a RDC 20/2014, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, do Ministério da Saúde. Segundo os pesquisadores, "as etapas adicionais serão realizadas após a aprovação do adendo. Será necessária a prorrogação do projeto por 1 ano. Assim o projeto será finalizado em 04 de agosto de 2016". O novo cronograma foi apresentado no formulário da plataforma Brasil.

Foi informado ainda que "O projeto será submetido a agências de fomento, e em caso negativo, os custos serão arcados pelos pesquisadores docentes".

Endereço: Av. Paulo Gama, 110 - Sala 317 do Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro
 Bairro: Farróupilha CEP: 90.040-060
 UF: RS Município: PORTO ALEGRE
 Telefone: (51)3308-3738 Fax: (51)3308-4085 E-mail: etica@propesq.ufrgs.br



Continuação do Parecer: 1.183.741

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os pesquisadores anexaram carta solicitando a aprovação do adendo e destacando as alterações feitas no projeto de pesquisa.

Recomendações:

Recomenda-se a aprovação da nova versão do projeto de pesquisa.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há sugestão de mudanças na nova versão do projeto de pesquisa. Assim, recomenda-se aprovação.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Aprovado.

PORTO ALEGRE, 13 de Agosto de 2015

Assinado por:
MARIA DA GRAÇA CORSO DA MOTTA
 (Coordenador)

Endereço: Av. Paulo Gama, 110 - Sala 317 do Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro
Bairro: Farroupilha **CEP:** 90.040-050
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3308-3738 **Fax:** (51)3308-4085 **E-mail:** etica@propeq.ufrgs.br