

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

**NAELKA SARMENTO**

COMUNIDADES E FATORES DE VIRULÊNCIA  
BACTERIANOS NA CAVIDADE BUCAL DE  
PACIENTES INFANTIS COM INFECÇÕES  
ENDODÔNTICAS EM DENTES DECÍDUOS

Porto Alegre

2017

Naelka Sarmento

**COMUNIDADES E FATORES DE VIRULÊNCIA BACTERIANOS NA  
CAVIDADE BUCAL DE PACIENTES INFANTIS COM INFECÇÕES  
ENDODÔNTICAS EM DENTES DECÍDUOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para 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

2017

## CIP - Catalogação na Publicação

Sarmiento, Naelka

Comunidades e fatores de virulência bacterianos na cavidade bucal de pacientes infantis com infecções endodônticas em dentes decíduos / Naelka Sarmiento. -- 2017.

107 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, 2017.

1. Cavidade bucal. 2. Dentes decíduos. 3. Infecção endodôntica. 4. Revisão sistemática. 5. Métodos moleculares de diagnóstico. I. Montagner, Francisco, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Naelka Sarmento

**COMUNIDADES E FATORES DE VIRULÊNCIA BACTERIANOS NA  
CAVIDADE BUCAL DE PACIENTES INFANTIS COM INFECÇÕES  
ENDODÔNTICAS EM DENTES DECÍDUOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para 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.

Banca de avaliação:

Prof. Dr. Francisco Montagner – Orientador

Profa. Dra. Patrícia Maria Poli Kopper Móra (UFRGS)

Profa. Dra. Mariane Carvalho Araújo (UFSC)

Prof. Dr. André Luiz Tannus Dutra (UEA)

Profa. Dra. Márcia da Silva Schmitz (UFSM) (Suplente)

Dedico esta tese a minha mãe *Sizoleide*, à minha Vó *Conceição* (*in memoriam*) e ao meu Vô *Alberto* (*in memoriam*), grandes amores da minha vida, pelo amor e incentivo incondicional.

## AGRADECIMENTOS

A *Deus* e à *Nossa Senhora*, por sua infinita misericórdia que me sustenta todos os dias da minha vida.

À minha mãe *Sizoleide Ribeiro Sarmento*, obrigada por todo teu amor, apoio, doação e renúncias suas para que eu tivesse a oportunidade de chegar até aqui. Perdoe-me a ausência mesmo estando perto.

Ao amigo *Diego Cordeiro*, minha sincera gratidão a você que não mediu esforços em me ajudar a realizar as coletas deste estudo. Você foi a racionalidade, as mãos e a voz ativa que eu precisei.

À minha amiga-irmã *Ana Lúcia Diefenbach (Baby)*, obrigada por estar comigo em mais esta jornada e fazê-la mais engraçada, humana e suave.

Ao meu orientador *Prof. Dr. Francisco Montagner (Chico)*, obrigada pela oportunidade de aprender contigo, pelos ensinamentos científicos, por ser exemplo na docência e acima de tudo por sua amizade.

Aos amigos *Cintia Oda Carvalhal* e *Jonas Alves de Oliveira*, os primeiros a me incentivarem a enfrentar este doutorado. Obrigada pelo “empurrão”; vocês são grandes exemplos.

Aos amigos *Vanessa, Edson* e ao querido *Levi Braga*, obrigada pelo cuidado e acolhida afetuosa em Porto Alegre. O carinho de vocês foi peça fundamental para amenizar a distancia de casa.

À amiga *Tandra Peixoto*, obrigada por sua amizade, torcida pelas minhas conquistas e pelo ombro amigo quando necessário.

Às minhas tias *Vera Sarmento, Luiza Sarmento e Sizonete Sarmento*, obrigada pelo incentivo e orações.

À minha irmã **Josiane da Silva Gomes**, obrigada pelo sobrinho lindo **Luiz Miguel Hashimoto** que veio para alegrar nossas vidas.

Aos colegas da Disciplina de Odontopediatria do Curso de Odontologia da Universidade do Estado do Amazonas **André Luiz Tannus Dutra, Ana Patrícia Pereira, Cíntia Oda Carvalhal, Gimol Benchimol de Resende Prestes, Iria de Fátima Dutra, Maurício Bacarin**, obrigada pelo apoio e compreensão durante os períodos de ausência.

À **Coordenação do Curso de Odontologia da Universidade do Estado do Amazonas** obrigada pelo apoio ao meu crescimento científico e profissional.

Aos amigos **Celso Tinôco, José Onofre, Juliana Figueiredo, Luciana Alencar, Márcia Rachel e Sávio Albuquerque (Patológicos)** obrigados pelos anos de amizade e por serem alegria em minha vida.

À profa. Dra. **Maria Beatriz Cardoso Ferreira**, obrigada por estar sempre disponível em ajudar e a compartilhar seu conhecimento.

Ao prof. Dr. **Luciano Casagrande**, obrigada pela acolhida calorosa e a disponibilidade em colaborar com o desenvolvimento deste trabalho.

A colega **Pauline Mastella Lang**, minha gratidão a você que sempre esteve disposta em ajudar mesmo diante das atribuições do seu dia-a-dia.

Aos amigos **Márcio Basso** e **Rosana Bonamigo**, obrigada pela acolhida e carinho com que me receberam em Porto Alegre.

Às queridas **Letícia Marconatto** e **Adriana Giongo Borges**, pela estimável colaboração na elaboração deste trabalho e principalmente pela forma acolhedora com que me receberam. Meu muito obrigada.

À bibliotecária **Ida Rossi**, da Biblioteca Malvina Vianna Rosa da FO/UFRGS, pelo empenho e colaboração na busca de manuscritos utilizados na revisão sistemática.

Aos queridos *Paula Barcellos da Silva* e *Otávio Sposito*, Bah!!!, Como foi bom encontra-los durante este doutorado. Obrigada pelos bons momentos de descontração e pelo carinho com que me receberam.

Aos colegas de Laboratório de Endodontia da UFRGS (LabEndo), *Ludmila Coutinho Moraes, Júlia Iglesias, Karen Barea de Paula, Débora Delai, Ramiro, Quintana, Alexander P. Jardimne, Daiana Boijink Felipe Barroso Matoso, Luciana Luz e Camila Grock*, obrigada pelo convívio afetuosos.

Aos colegas do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia da UFRGS (LABIM), *Luisa Mercado* e *Ariel Rup*, obrigada pela disposição em ajudar e pelo convívio harmoniosos.

Ao programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), em especial ao Prof. Dr. *Cassiano Kuchenbecker Rösing* pela oportunidade de fazer parte deste Programa de Pós-Graduação.

Aos professores da disciplina de Endodontia da UFRGS, *Prof. Dr. Regis Burmeister dos Santos, Prof. Dr. João Ferlini, Profa. Dra. Patrícia Kopper, Profa. Dra. Fabiana Soares Grecca, Profa. Dra. Roberta Kochenborge Scarparo, Prof. Dr. Marcus Vínicus Reis Só, Profa. Dra. Renata Grazziotin, Prof. Dr. Tiago André Fontoura de Mello, Prof. Dr. Ricardo Abreu da Rosa, Profa. Dra. Simone Bonato Luisi*, obrigada pelo convívio e ensinamentos.



*“Não é o quanto fazemos, mas quanto **amor** colocamos naquilo que fazemos. Não é o quanto damos, mas quanto **amor** colocamos em dar”.*

**Madre Teresa de Calcutá**

**RESUMO**

A presente tese teve como objetivo realizar a descrição dos microrganismos que já foram isolados ou detectados em infecções endodônticas de dentes decíduos em pacientes infantis por meio de uma revisão sistemática, além de avaliar a composição bacteriana e a presença de genes de resistência a antibióticos em amostras de saliva (S), biofilme supragengival (SB), dentina (D) e câmara pulpar (RC) de dentes decíduos com infecções endodônticas. No Capítulo 1, realizou-se revisão sistemática em bancos de dados eletrônicos, tendo sido incluídos estudos clínicos que avaliaram presença de microrganismos em dentes decíduos com infecções endodônticas, por meio de análise microbiológica com cultivo ou de métodos moleculares. Foi realizada análise descritiva dos dados. A análise identificou 44 títulos, sendo revisados, na íntegra, 17 artigos. Foram selecionados 8 estudos clínicos, de acordo com os critérios de inclusão determinados. Por meio de busca manual, foram selecionados 2 artigos adicionais, totalizando 11 artigos excluídos desta revisão. Nos oito estudos clínicos incluídos na revisão sistemática, a identificação dos microrganismos envolvidos nas infecções endodônticas foi realizada por meio de várias técnicas como: cultura microbiológica, hibridização DNA-DNA, PCR e suas variações, clonagem, sequenciamento e pirosequenciamento, confirmando a diversidade de microrganismos envolvidos nas infecções endodônticas de dentes decíduos. A análise dos dados sugere que as infecções endodônticas em dentes decíduos são causadas por múltiplas combinações de espécies de micro-organismos, confirmando a sua natureza polibacteriana. No Capítulo 2, amostras de S, SB, D e RC foram coletadas de pacientes infantis com infecções endodônticas. O perfil das comunidades microbianas foram obtidos por meio da análise da região espaçadora intergênica relacionada aos genes 16S e 23S rRNA (PCR-RISA). Determinaram-se e índices de riqueza, dominância, índice de Shannon, índice de Chao-1 (alfa-diversidade) e análise multivariada de conglomerados (método UPGMA e índice de Similaridade de Bray-Curtis) e análise de coordenadas principais (PCoA) (beta-diversidade). Há um baixo grau de agrupamento entre as amostras de S, BS, D e RC, obtidas de um mesmo participante. Se presentes, os agrupamentos acontecem para sítios contíguos, mas com baixo percentual de similaridade. Amostras de um mesmo ecossistema obtidas de diferentes participantes abrigam comunidades bacterianas distintas, com baixa similaridade. Não parece haver uma relação entre a presença de um sinal/sintoma clínico e acréscimo no perfil de similaridade das comunidades bacterianas em RC. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os índices de alfa-diversidade (riqueza, dominância, Shannon e Chao-1) entre S, SB, D e RC. O uso prévio de antibióticos não modificou os resultados de alfa diversidade ou de beta diversidade obtidos. No Capítulo 3, verificou-se a distribuição dos genes de resistência bacteriana aos principais grupos de antibióticos em S, SB, D, e RC dentes decíduos em pacientes infantis com infecções endodônticas e também de amostras de saliva dos responsáveis (R) por meio de PCR para os genes *cfxA/cfxA2*, *blaTEM*, *blaZ*, *ampC*, *mecA*, *mefA*, *ermB*, *ermC*, *tetQ*, *tetM*, *tefW*, *linB*, *IsaB*. Realizou-se análise estatística descritiva e análise multivariada de conglomerados (método UPGMA e índice de Similaridade de Bray-Curtis). Dos pacientes selecionados, 3/8 utilizaram antibiótico previamente à coleta. Nenhum gene de resistência foi observado em todos os ecossistemas de um mesmo participante. Os genes mais frequentemente detectados foram os genes de resistência à tetraciclina *tetQ* e *tetW*.

Não foram detectados nas amostras os genes ampC, mecA, InuB e IsaB. A presença simultânea de um gene em dois nichos ocorre em ecossistemas contíguos. Não se observa um comportamento uniforme quanto ao perfil de agrupamento de diferentes amostras de um mesmo participante, e nem entre as amostras de saliva do participante infantil (S) e seu responsável (R). Há múltiplos perfis de distribuição de genes de resistência a agentes antimicrobianos em amostras de ecossistemas bucais contíguos em um mesmo paciente portador de infecção endodôntica. A análise conjunta dos dados permite concluir que cada um dos ecossistemas da cavidade bucal de crianças portadoras de infecções endodônticas avaliado apresenta espécies bacterianas e fatores de virulência distribuídos de forma única e distintas, a partir de uma perspectiva de análise de diversidade.

**Palavras-chave:** boca, saliva, dentes decíduos, cavidade pulpar, revisão sistemática, bactéria, reação em cadeia da polimerase, resistência a medicamentos, ecologia microbiana, diversidade, análise por conglomerados.

## ABSTRACT

This thesis aimed assessing information on the bacteria that were isolated/detected in teeth with endodontic infections from infant patients through a systematic review of the literature. Furthermore, the bacterial composition and the presence of resistance genes to antimicrobial agents was determined in saliva (S), in supragingival biofilm (SB), in dentine (D) and in pulp cavity (RC) samples. In the Chapter 1, a systematic review was conducted in electronic databasis. Clinical studies that evaluated the presence of microorganisms in primary teeth with endodontic infections through culture and molecular methods were included. Forty-four titles were selected and 17 articles were fully revised. Eight clinical studies were selected for data extraction. Two articles were included following the hand search. According to the data analysis, microbial identification was performed by culture, DNA-DNA hybridization, PCR, cloning and sequencing and next-generation sequencing methods. A high diversity in the microbial components identified/detected was reported. Endodontic infections in primary teeth are polymicrobial, with a multi-species consortia. In the Chapter 2, the S, SB, D and RC samples were collected from infant patients with endodontic infections. The ribosomal intergenic spacer analysis (PCR-RISA) for the 16S-23S rRNA genes interspacer region was employed to determine the bacterial fingerprint for each sample. Metrics for alpha and beta diversity were employed, such as richness, dominance, Shannon Index, Chao-1 Index, cluster analysis (UPGMA, Bray-Curtis Index) and principal coordinate analysis (PCoA). There was a low grouping profile for shared samples of S, SB, D and RC from the same participant. When detected, clustering behavior was observed for contiguous sites, with low percentage of similarity between them. Samples from the same site but from different subjects harboured distinct bacterial communities, with low similarity. No clinical sign/symptom was detected as a grouping factor for RC sample from different subjects. No statistical difference was detected for the alpha-diversity indexes among S, SB, D and RC. The previous exposition to antimicrobial agents has no effect over the alpha- and beta-diversity indexes. In the Chapter 3, the distribution of bacterial genes for antimicrobial resistance in S, SB, D and RC was determined in samples from children with endodontic infections and their relatives (R) by PCR. The presence of the genes *cfxA/cfxA2*, *blaTEM*, *blaZ*, *ampC*, *mecA*, *mefA*, *ermB*, *ermC*, *tetQ*, *tetM*, *tetW*, *linB*, and *lsaB* was detected in the samples. Descriptive statistical analysis and multivariate analysis (cluster analysis, UPGMA and Bray-Curtis similarity index) were carried out. Three out of 8 patients had antimicrobial agents previously to the appointment. No resistance gene was shared by all environments in the same participant. The most frequently detected genes were *tetQ* and *tetW*. The genes *ampC*, *mecA*, *linB*, and *lsaB* were not detected in any the samples. The same gene was detected only in two contiguous niches. Clustering analysis revealed no grouping pattern among the samples, despite they were or not from the same participant or his/her relative. Multiple profiles of resistance genes distribution were detected in the oral cavity samples from infant participants. The oral cavity in children with endodontic infection is a complex environment that harbours unique bacterial communities profiles and a distinct distribution of resistance genes to antimicrobial agents, considering an ecological perspective.

**Key-words:** mouth, saliva, primary teeth, pulp cavity, sistematic review, bacteria, polymerase chain reaction, drug resistance, microbial ecology, diversity, cluster analysis.

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

DNA	ácido desoxirribonucleico
dNTPs	desoxirribonucleico fosfatados
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
<i>et al.</i>	e colaboradores
g	gramas
h	horas
H <sub>2</sub> O	água
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	peróxido de hidrogênio
M	molar
mg	miligramas
MgCl <sub>2</sub>	cloreto de magnésio
min.	minutos
ml ou mL	mililitros
mmol	milimol
mmHg	milímetro de mercúrio
nm	nanômetro
pb ou bp	pares de base
pH	potencial hidrogeniônico
pmol	picomol
rpm	rotações por minuto
s	segundos
Ssp.	espécies
U	unidade
V/cm	volt/centímetro
A	alfa
B	beta
Y	gama
X	número de vezes
%	por cento
°C	Graus Celsius

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS (continuação)

$\mu\text{M}$	micromolar
$\mu\text{mol}$	micromole
$\mu\text{l}$ ou $\mu\text{L}$	microlitros
$\mu\text{g}$	microgramas
-	menos
+/-	mais ou menos
<	menor
>	maior
#	diâmetro

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>01</b>
<b>CAPÍTULO 1 – CARACTERIZAÇÃO DA COMUNIDADE MICROBIANA EM INFECÇÕES ENDODÔNTICAS EM DENTES DECÍDUOS: REVISÃO SISTEMÁTICA DA LITERATURA</b> .....	<b>03</b>
<b>CAPÍTULO 2 – COMUNIDADES BACTERIANAS DO ECOSSISTEMA BUCAL EM CRIANÇAS COM INFECÇÕES ENDODÔNTICAS APRESENTAM PERFIS COMPOSICIONAIS ÚNICOS</b> .....	<b>29</b>
<b>CAPÍTULO 3 – PRESENÇA DE GENES DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS EM ECOSSISTEMAS BUCAIS DE CRIANÇAS COM INFECÇÕES ENDODÔNTICAS</b> .....	<b>53</b>
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>80</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>82</b>
<b>ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS (UEA)</b> .....	<b>84</b>
<b>ANEXO B – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL (UFRGS)</b> .....	<b>87</b>



## 1 INTRODUÇÃO

2

3 Sabe-se que microbioma bucal é heterogêneo uma vez que abriga uma  
4 comunidade microbiana composta por múltiplas espécies de bactérias, fungos, vírus e  
5 archaea, que se organizam sobre a mucosa e a superfície dental na forma de um  
6 biofilme (ZAURA *et al.*, 2009). A colonização da cavidade bucal se dá precocemente,  
7 logo ao nascimento, especialmente por meio das interações materno-infantis (DRELL  
8 *et al.*, 2017). A cavidade bucal apresenta os maiores níveis e diversidade de  
9 microrganismos dentre todos os sítios do corpo humano, devido a suas características  
10 anátomo-fisiológicas (DEWHIRST *et al.*, 2010). Em indivíduos saudáveis, crianças e  
11 adultos, ela abriga um núcleo comum e estável de espécies dominantes e um núcleo  
12 único em cada paciente composto por membros pouco frequentes (HALL *et al.*, 2017;  
13 XU *et al.*, 2015; ZAURA *et al.*, 2009).

14 Os biofilmes se originam da adesão de colonizadores iniciais à uma película  
15 que se forma sobre o tecido duro do dente ou sobre a mucosa bucal, seguido da  
16 incorporação, multiplicação e integração de colonizadores secundários  
17 (KOLENBRANDER, 2011). Fatores ambientais como alterações na dieta podem  
18 promover flutuações na composição do microbioma bucal e em biofilmes associados  
19 (ADLER *et al.*, 2013). Assim, podem ocorrer frequentes alterações de pH que  
20 propiciam a desmineralização das superfícies dentárias, originando lesões de cárie  
21 tanto em dentes decíduos quanto em dentes permanentes (WU *et al.*, 2015). A  
22 interação de fatores microbianos, genéticos, imunológicos, comportamentais e  
23 ambientais, contribuem para o seu início e desenvolvimento (TAKAHASHI; NYVAD,  
24 2008). Quando a progressão da cárie não é controlada por métodos químicos e  
25 mecânicos associados à medidas de promoção de saúde, ocorrem alterações pulpare  
26 irreversíveis, que levam à necrose (BRAGA *et al.*, 2010; BRUSTOLIN *et al.*, 2017). Os  
27 microrganismos presentes na dentina infectada atingem a câmara pulpar e colonizam o  
28 sistema de canais radiculares, promovendo alterações na área de furca e do periápice  
29 dos dentes decíduos (GOMES *et al.*, 2013; PAZELLI *et al.*, 2003).

1 O microbioma bucal pode funcionar como um reservatório para vários genes  
2 de resistência a antibióticos, incluindo aqueles que codificam resistência a classes de  
3 antibióticos de uso comum, por exemplo, beta-lactâmicos, tetraciclina e macrolídeos  
4 (MORAES *et al.*, 2015). O paciente infantil parece experimentar vários ciclos de uso de  
5 antibióticos, pois estudos demonstram uma frequência elevada de prescrições para  
6 esta faixa etária (AABENHUS *et al.*, 2017), tanto para situações de profilaxia ou para  
7 tratamento de infecções, especialmente relacionadas ao trato respiratório inferior (DE  
8 LUCA *et al.*, 2016). De acordo com a Academia Americana de Odontopediatria (2006)  
9 antibióticos estão indicados especialmente para o tratamento de infecções dentais nas  
10 quais os pacientes apresentam aumento de volume, em conjunto com outras medidas  
11 para controle da infecção, tais como tratamento endodôntico ou extração dental  
12 (AMERICAN ACADEMY ON PEDIATRIC DENTISTRY COUNCIL ON CLINICAL  
13 AFFAIRS, 2008). Achados prévios da literatura sugerem que o efeito da utilização de  
14 agentes antimicrobianos sistêmicos no microbioma da cavidade bucal é transitório  
15 (ZAURA *et al.*, 2015), porém não há definição quanto ao efeito destas alterações na  
16 presença e expressão dos fatores de virulência bacterianos relacionados ao  
17 desenvolvimento de resistência.

18 Embora estudos prévios da literatura descrevam a composição microbiana  
19 na cavidade bucal de pacientes infantis e em sítios associados à patologias, é  
20 necessário compreender como se dá a distribuição dos microrganismos e a  
21 similaridade nos ecossistemas relacionados da saliva, biofilme supragengival, dentina  
22 e canal radicular de dentes decíduos portadores de infecções endodônticas. Da mesma  
23 forma, a análise de fatores de virulência relacionados à resistência a agentes  
24 antimicrobianos permite identificar e caracterizar o potencial de patogenicidade dos  
25 microrganismos presentes na cavidade bucal e nos canais radiculares.

26

1 **CAPÍTULO 1**

2

3 **Caracterização da comunidade microbiana em infecções endodônticas em dentes**  
4 **decíduos: revisão sistemática da literatura.**

5

6 Naelka Sarmiento <sup>1</sup>

7 Pauline Mastella Lang <sup>2</sup>

8 Luciano Casagrande <sup>3</sup>

9 Tatiane Silva Dal Pizzol <sup>4</sup>

10 Maria Beatriz Cardoso Ferreira <sup>5</sup>

11 Francisco Montagner <sup>6</sup>

12

13 <sup>1</sup> Aluna do Programa de Pós-graduação em Odontologia, Faculdade de Odontologia, Universidade  
14 Federal do Rio Grande do Sul (Porto Alegre, RS, Brasil)

15 <sup>2</sup> Professora do Curso de Odontologia, Universidade Regional Integrada, Campus Erechim (Erechim, RS,  
16 Brasil)

17 <sup>3</sup> Professor Adjunto, Departamento de Cirurgia e Ortopedia, Faculdade de Odontologia, Universidade  
18 Federal do Rio Grande do Sul (Porto Alegre, RS, Brasil).

19 <sup>4</sup> Professora Associada, Departamento de Produção e Controle de Medicamentos, Faculdade de  
20 Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Porto Alegre, RS, Brasil).

21 <sup>5</sup> Professora Titular, Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde,  
22 Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Porto Alegre, RS, Brasil)

23 <sup>6</sup> Professor Adjunto, Departamento de Odontologia Conservadora, Faculdade de Odontologia,  
24 Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Porto Alegre, RS, Brasil).

25 Autor Correspondente:

26 Prof Dr Francisco Montagner

27 Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Faculdade de Odontologia

28 Rua Ramiro Barcelos, 2492.

29 Bairro Santana – Porto Alegre, RS – Brasil. CEP 90035-003

30 E-mail: francisco.montagner@ufrgs.br

31 Telefone: +55 51 98137 2933

32

33 Artigo a ser submetido ao periódico *International Journal of Pediatric Dentistry*

34

## 1 **Resumo**

2

3 ANTECEDENTES – As lesões de cárie em dentes decíduos, quando não tratadas  
4 adequadamente, podem evoluir para a necrose pulpar, ocorrendo a proliferação de  
5 micro-organismos em todo o sistema de canais radiculares.

6 HIPÓTESE – A composição das comunidades microbianas em canais radiculares de  
7 dentes decíduos é polimicrobiana.

8 DELINEAMENTO – Realizou-se revisão sistemática em bancos de dados eletrônicos,  
9 tendo sido incluídos estudos clínicos que avaliaram presença de microrganismos em  
10 dentes decíduos com infecções endodônticas, por meio de análise microbiológica com  
11 cultivo ou de métodos moleculares. Dados relativos ao grupo de pesquisa, localização  
12 geográfica, fonte de amostra, número de participantes e métodos de identificação das  
13 amostras, foram coletados. Foi realizada análise descritiva dos dados.

14 RESULTADOS – A análise identificou 44 títulos, sendo revisados, na íntegra, 17  
15 artigos. Foram selecionados 8 estudos clínicos, de acordo com os critérios de inclusão  
16 determinados anteriormente para esta revisão sistemática. Por meio de busca manual,  
17 foram selecionados 2 artigos adicionais, totalizando 11 artigos excluídos desta revisão.  
18 Nos oito estudos clínicos incluídos na revisão sistemática, a identificação dos  
19 microrganismos envolvidos nas infecções endodônticas foi realizada por meio de várias  
20 técnicas como: cultura microbiológica, hibridização DNA-DNA, PCR e suas variações,  
21 clonagem, sequenciamento e pirosequenciamento, confirmando a diversidade de  
22 microrganismos envolvidos nas infecções endodônticas de dentes decíduos.

23 CONCLUSÕES – Esta revisão sistemática sugere que as infecções endodônticas em  
24 dentes decíduos são causadas por múltiplas combinações de espécies de micro-  
25 organismos, confirmando a sua natureza polibacteriana. Métodos que permitem a  
26 ampla caracterização microbiana devem ser empregados com o intuito de permitir a  
27 caracterização extensa desta microbiota, sem que as análises sejam voltadas para um  
28 grupo específico de microrganismos.

29

30 **Palavras-chave:** bactéria, dentes decíduos, cavidade pulpar, revisão-sistemática.

## 1 **Introdução**

2

3           As lesões cariosas profundas são o principal motivo de tratamento  
4 endodôntico em dentes decíduos posteriores, que apresentam necrose pulpar  
5 associada ou não ao envolvimento periapical/furca (1). Embora a promoção de saúde  
6 seja um enfoque da Odontologia Contemporânea, as alterações da polpa em dentes  
7 decíduos ainda são muito frequentes. (2). A necrose do tecido pulpar geralmente é  
8 iniciada por cárie e / ou trauma, é uma das causas mais comuns de dor e está  
9 associada à incapacidade funcional entre pacientes infantis. (3).

10           A colonização da cavidade oral começa ao nascimento, sendo que  
11 inicialmente a microbiota oral é relativamente simples na sua composição, podendo vir  
12 a receber, microrganismos exógenos de diferentes fontes. Logo, diversas comunidades  
13 microbianas são encontradas na superfície dentária, sulco gengival e mucosa (4). O  
14 biofilme dental cariogênico nas superfícies oclusais dos dentes decíduos está  
15 associado a lesões de cárie ativa que, por sua vez, se não forem adequadamente  
16 tratadas, irão evoluir e poderão levar ao comprometimento irreversível da polpa e à sua  
17 necrose, podendo causar sequelas no germe dos dentes permanentes. (5).

18           Diversas técnicas podem ser empregadas para a identificação dos  
19 microrganismos presentes em infecções orais, podendo envolver cultivo microbiano ou  
20 estudo de sequências de ácidos nucléicos. As técnicas de cultura microbiológica  
21 inicialmente foram empregadas para a identificação da microbiotas das infecções  
22 endodônticas. Entretanto, este reconhecimento parece ser restrito, pelo fato destas  
23 técnicas terem acurácia reduzida para microrganismos incultiváveis e exigentes. Isto  
24 justifica o emprego de técnicas de biologia molecular, pois são técnicas rápidas,  
25 específicas e sensíveis para a identificação desses microrganismos de cultivo mais  
26 complexo (6–8).

27           A obtenção e o processamento laboratorial de amostras clínicas de  
28 infecções endodônticas envolvem técnicas e procedimentos críticos, que fornecem  
29 dados importantes quanto à composição das infecções presentes no sistema de canais

1 radiculares. Tradicionalmente, os métodos de cultura microbiana foram empregados  
2 para o isolamento e caracterização dos microrganismos presentes em infecções  
3 endodônticas (9–11). Porém, a introdução de métodos moleculares de diagnóstico  
4 permitiu identificar bactérias de difícil cultivo e ainda não cultiváveis, além de uma  
5 ampla caracterização das comunidades microbianas (12,13).

6 O objetivo desta revisão sistemática foi caracterizar a composição  
7 microbiana de infecções endodônticas de dentes decíduos. A estratégia de busca foi  
8 formulada para responder à questão PICD (população, intervenção, comparação e  
9 desfecho) (1), a partir da definição de critérios de inclusão e exclusão. A questão foi  
10 estabelecida como: “Qual a população de microrganismos identificados ou detectados  
11 em infecções endodônticas presentes em crianças com até 10 anos de idade?”.

12

## 13 **Material e Métodos**

14

15 A revisão sistemática foi realizada obedecendo aos critérios do PRISMA  
16 (*Preferred Reported Items Systematic Review and Meta-Analysis*) (14); em que foram  
17 incluídos estudos clínicos que avaliaram a presença de microrganismos em dentes  
18 decíduos com infecções endodônticas. Assim, a questão PICO envolveu os seguintes  
19 aspectos:

- 20 ▪ População: Crianças até 10 anos de idade;
- 21 ▪ Intervenção: Presença de infecções endodônticas em um ou mais dentes;
- 22 ▪ Comparação: Ausente, por terem sido analisados estudos clínicos  
23 observacionais;
- 24 ▪ Desfecho: identificação ou detecção de microrganismos.

25

26 A **Figura 1** descreve a estratégia de busca adotada no estudo. A pesquisa  
27 incluiu artigos publicados de janeiro de 2006 até janeiro de 2017. Os termos foram  
28 pesquisados por dois pesquisadores de forma independente (NS e PML), em várias  
29 combinações, nas seguintes bases de dados eletrônicas: Medline (PubMed), Embase,

1 Web of Science, Scopus, Cochrane Library e Bireme. Nenhuma restrição quanto ao  
2 idioma foi aplicada.

3

4 (tw:(endodontic infection)) OR (tw:(root canal infection)) OR (tw:(endodontic infections)) OR (tw:(root  
5 canal infections)) AND (tw:(bacteria)) OR (tw:(microorganism)) OR (tw:(microorganisms)) OR  
6 (tw:(pathogen)) OR (tw:(pathogens)) AND (tw:(tooth, deciduous)) OR (tw:(primary teeth))

7 Figura 1: Estratégia de busca adotada para a revisão sistemática, apresentando as  
8 palavras-chave MeSH e os termos de busca para a investigação de microrganismos  
9 presentes em dentes decíduos com infecções endodônticas.

10

11 Após análise dos títulos e dos resumos os textos completos foram revisados,  
12 com base nos seguintes critérios de inclusão: estudos clínicos que avaliaram a  
13 presença de microrganismos em dentes decíduos com infecções endodônticas  
14 utilizando o método de cultivo ou métodos moleculares. Os critérios de exclusão foram:  
15 (1) ausência de especificação a respeito do quadro clínico – se a infecção era primária  
16 ou tratava-se de insucesso de tratamento endodôntico anterior; (2) ausência de  
17 informação sobre a idade do paciente ou (3) análise de dados de crianças com mais de  
18 10 anos de idade; (4) coleta de amostras de canal radicular expostos ao meio bucal; (5)  
19 ausência de classificação das bactérias em filo, gênero ou espécie ou (6) avaliação de  
20 somente uma espécie. Foi realizada uma busca “manual” das referências mencionadas  
21 nos artigos selecionados. A revisão dos artigos foi feita por dois revisores (NS e PML).  
22 Os dados foram tabulados em planilha de Microsoft Excel ®.

23 Registraram-se dados referentes a grupo de pesquisa, local onde a pesquisa  
24 foi realizada a coleta de material para análise, número da amostra, métodos usados  
25 para a identificação dos microrganismos e microrganismos identificados em cada  
26 estudo. Devido às diferenças metodológicas entre os trabalhos, não foi possível realizar  
27 uma meta-análise. Conduziu-se, então, uma análise descritiva de dados.

28

29

30

31

## 1 Resultados

2

3 Analisando todas as bases de dados e após exclusão das duplicatas, foram  
4 identificados 44 títulos: 13 na base *Pubmed*, 4 em *Web of Science*, 14 em *Scopus*, 10  
5 em *Embase*, 2 na *Bireme* e nenhum na base *Cochrane*. Após avaliação dos títulos,  
6 realizou-se a análise, na íntegra, de 17 estudos (**Fig. 2**). Foi realizada busca manual  
7 nas referências destes artigos, sendo encontradas 2 publicações adicionais. Das 19  
8 publicações analisadas, oito foram selecionadas, por atenderem aos critérios de  
9 inclusão determinados previamente.

10 Na **Tabela 1**, estão listados os 11 artigos não incluídos na revisão, assim como  
11 os motivos para a sua exclusão.

12 Na **Tabela 2**, aparecem os 8 artigos selecionados. Estes foram publicados em  
13 diferentes períodos de tempo (de 2006 a 2017), e as amostras foram coletadas em  
14 Brasil, Turquia, Coreia e México. Todos os trabalhos selecionados relataram prévia  
15 aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa, e, em nenhuma das pesquisas, foram  
16 descritos métodos de determinação de tamanho amostral. Em relação a este último  
17 aspecto, o número de participantes oscilou entre 10 e 35. Em relação ao número de  
18 dentes avaliados, o valor oscilou entre 10 a 110.

19 Seis artigos excluíram participantes que fizeram uso de antibióticos nos 3 meses  
20 anteriores à pesquisa, um excluiu participantes que fizeram aquele uso até 4 semanas  
21 antes (15) e um não relatou esta informação (16) (**Tabela 2**). Presença de cárie, fístula,  
22 radiolucidez periapical e diagnóstico do estado pulpar foi descrita nos artigos  
23 selecionados, conforme aparece na **Tabela 2B**.

24 O uso de cones de papel absorvente foi a forma de coleta da amostra do canal  
25 radicular relatada em todos os estudos selecionados, exceto no de Tavares e  
26 colaboradores (16), em que foi utilizada lima endodôntica como instrumento de coleta.

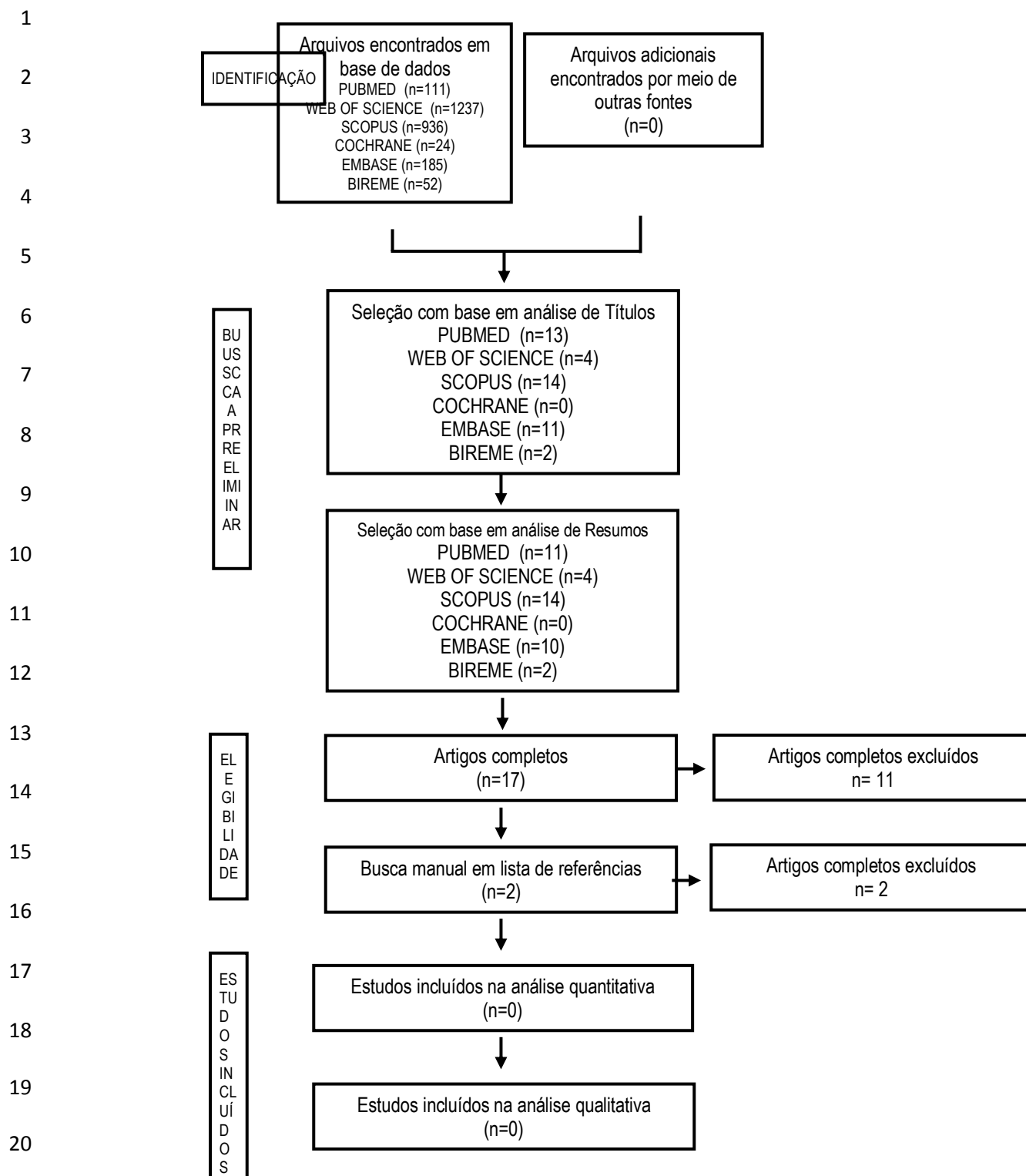
27 A identificação dos microrganismos envolvidos nas infecções endodônticas foi  
28 realizada por meio de diferentes técnicas: cultura microbiológica, hibridização DNA-



1 DNA, PCR e suas variações, clonagem, sequenciamento e pirosequenciamento  
2 (**Tabela 2B**).

3 A **Tabela 3** mostra a diversidade de microrganismos identificados nas infecções  
4 endodônticas de dentes decíduos, pelos diversos métodos utilizados.

5



**Figura 2.** Resultados após a estratégia de busca, desenvolvida para encontrar artigos que identificaram micro-organismos envolvidos em dentes decíduos com infecções endodônticas.-.

**Tabela 1** – Descrição dos estudos excluídos da revisão sistemática e seus respectivos critérios de exclusão.

<b>Autores/Ano</b>	<b>País de realização do estudo</b>	<b>Título da publicação</b>	<b>Sítio Bucal de coleta das amostras</b>	<b>Crítérios de exclusão</b>
<b>PAZELLI et al.. (2003) (2)</b>	Brasil	<i>Prevalence of microorganisms in root canal of human deciduous teeth with necrotic pulp and chronic periapical lesions.</i>	Canal radicular	(3); (5)
<b>FABRIS et al.. (2013) (17)</b>	Brasil	<i>Bacteriological analysis of necrotic pulp and fistulae in primary teeth.</i>	Canal radicular	(6)
<b>DE PAULA et al.. (2014) (18)</b>	Brasil	<i>Clinical signs and bacterial communities of deciduous necrotic root canal detects by PCR-DGGE analysis: Research association.</i>	Canal radicular	(5)
<b>COGULU et al.. (2008) (13)</b>	Turquia	<i>PCR-based identification of selected pathogens associated with endodontic infections in deciduous and permanent teeth.</i>	Canal radicular	(6)
<b>LOYOLA-RODRIGUEZ et al.. (2014) (19)</b>	México	<i>Molecular identification and antibiotic resistant bacteria isolated from primary dentition infections.</i>	Canal radicular	(2)
<b>TRICHES et al.. (2014) (20)</b>	Brasil	<i>Microbial profile of root canal of primary teeth with pulp necrosis and periradicular lesion.</i>	Canal radicular	(2)
<b>TOMIC-KAROVIC &amp; JELINEK (1971) (21)</b>	Iugoslávia	<i>Comparative study of the bacterial flora in surrounding, the root canals and sockets of deciduous molars.</i>	Canal radicular	(6)
<b>TOYOSHIMA et al.. (1988) (22)</b>	Japão	<i>A bacteriological study of periapical pathosis on deciduous teeth.</i>	Canal radicular	(2)
<b>SATO et al.. (1993) (23)</b>	Japão	<i>In vitro antimicrobial susceptibility to combinations of drugs on bacteria from carious and endodontic lesions of human deciduous teeth.</i>	Canal radicular	(2)
<b>SHANG et al.. (2013) (24)</b>	China	<i>Preliminary molecular analysis of bacterial composition in periapical lesions with primary endodontic infections of deciduous teeth..</i>	Tecido periapical	(3)
<b>YANG et al.. (2010) (25)</b>	China	<i>Polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis, cloning, and sequence analysis of bacteria associated with acute periapical abscesses in children.</i>	Pus de abscesso apical agudo	(3)

(1) Avaliação da presença de apenas uma espécie; (2) Ausência de informação sobre a idade dos participantes; (3) Coleta de amostras do sistema de canais radiculares com a câmara pulpar exposta ao ambiente bucal; (4) Ausência de especificação quanto ao fato da infecção ser primária ou secundária; (5) Ausência de classificação das bactérias em filo, gênero ou espécie; (6) Inclusão de participantes com mais de 10 anos de idade.

**Tabela 2A.** Características dos estudos incluídos na revisão sistemática.

<b>Autores/Ano/País de realização do estudo</b>	<b>Objetivos do estudo</b>	<b>Tamanhos amostrais</b>	<b>Exposição prévia a antibióticos</b>	<b>Presença de cárie</b>
<b>GOMES et al.. 2013 Brasil (9)</b>	<i>Evaluate the frequency of selected endodontic pathogens in the pulp chambers (PCs) and root canals (RCs) of infected primary teeth using PCR methods.</i>	15 participantes <sup>a</sup>	Não	Sim
<b>ITO et al.. 2011 Brasil (11)</b>	<i>Investigate the root canal microbiota of primary teeth with apical periodontitis and the in vivo antimicrobial effects of a calcium hydroxide/chlorhexidine paste used as root canal dressing</i>	19 participantes 30 canais radiculares	Não	Sim
<b>LEDEZMA-RASILO et al.. 2010 México (15)</b>	<i>Identify cultivable microorganisms from primary teeth with necrotic pulps.</i>	21 participantes 21 dentes	Não	Sim
<b>RUVIÈRE et al.. 2007 Brasil (7)</b>	<i>Asses in vivo, by checkerboard DNA-DNA hybridization, the prevalence and number of bacterial cells of 34 strains in root canals of human primary teeth under 2 clinical situations, teeth with irreversible pulpitis; and teeth with pulp necrosis and apical periodontitis.</i>	110 dentes <sup>b</sup>	Não	Sim
<b>SILVA et al.. 2006 Brasil (26)</b>	<i>Evaluate the bacterial profile in root canals of human primary teeth with necrotic pulp and periapical lesions using bacterial culture.</i>	20 participantes 20 dentes	Não	Sim
<b>TAVARES et al.. 2011 Brasil (16)</b>	<i>Evaluate the microbiota of endodontic infections in deciduous teeth by Checkerboard DNA–DNA hybridization after uniform amplification of DNA in samples by multiple displacement amplification (MDA).</i>	35 participantes 40 dentes	Não informado	Não informado
<b>TOPCUOGLU et al.. 2013 Turquia (8)</b>	<i>Evaluate the presence of the 10 oral bacterial species in samples from primary tooth root canals by using microarray technology and to determine the association of these organisms with clinical conditions.</i>	30 participantes 30 dentes	Não	Sim
<b>YUN et al.. 2017 Coréia (27)</b>	<i>Identify the endodontic microbiome in primary teeth with dental caries using high-throughput pyrosequencing and to establish data on the oral microbiome of primary teeth with endodontic infection.</i>	10 participantes 10 dentes	Não	Sim

\* <sup>a</sup>: número de dentes não especificados; <sup>b</sup>: número de pacientes não especificado.

**Tabela 2B.** Características dos estudos incluídos na revisão sistemática (*continuação*).

<b>Autores/Ano</b>	<b>Condição pulpar</b>	<b>Presença de radiolucidez apical</b>	<b>Presença de Fístula</b>
<b>GOMES <i>et al.</i> (2013) (9)</b>	Necrose	Sim	Sim
<b>ITO <i>et al.</i> (2011) (11)</b>	Necrose	Sim	Não informada
<b>LEDEZMA-RASILO <i>et al.</i> (2010) (15)</b>	Necrose	Sim	Sim
<b>RUVIÉRE <i>et al.</i> (2007) (7)</b>	Necrose e pulpíte irreversível	Não informada	Não informada
<b>SILVA <i>et al.</i> (2006) (26)</b>	Necrose	Sim	Não
<b>TAVARES <i>et al.</i> (2011) (16)</b>	Necrose	Sim	Não informada
<b>TOPCUOGLU <i>et al.</i> (2013) (8)</b>	Infecção endodôntica	Não informada	Não informada
<b>YUN <i>et al.</i> (2017) (27)</b>	Infecção endodôntica	Não informada	Sim

**Table 2C** Características dos estudos incluídos na revisão sistemática (*continuação*).

<b>Autores/Ano</b>	<b>Métodos de coleta da amostra</b>	<b>Métodos de análise da amostra</b>
<b>GOMES <i>et al.</i> (2013) (9)</b>	Mecha de algodão e cones de papel absorvente	PCR
<b>ITO <i>et al.</i> (2011) (11)</b>	Cones de papel absorvente	Cultura microbiana e hibridização DNA-DNA
<b>LEDEZMA-RASILO <i>et al.</i> (2010) (15)</b>	Cones de papel absorvente	Cultura microbiana
<b>RUVIÉRE <i>et al.</i> (2007) (7)</b>	Cones de papel absorvente	Hibridização DNA-DNA
<b>SILVA <i>et al.</i> (2006) (26)</b>	Cones de papel absorvente	Contagem de unidades formadoras de colônia
<b>TAVARES <i>et al.</i> (2011) (16)</b>	Lima manual tipo K #15	Hibridização DNA-DNA
<b>TOPCUOGLU <i>et al.</i> (2013) (8)</b>	Cones de papel absorvente	PCR <i>Microarray</i>
<b>YUN <i>et al.</i> (2017) (27)</b>	Cones de papel absorvente	PCR e sequenciamento de alto rendimento

**Tabela 3.** Gêneros e espécies bacterianas relatadas nos estudos incluídos na revisão sistemática.

Autores/Ano	Bactéria (Gêneros, espécies)
<b>GOMES et al.. (2013) (9)</b>	<p><b>Câmara pulpar:</b> <i>P. nigrescens</i>; <i>P. gingivalis</i>; <i>F. alocis</i>; <i>P. micra</i>; <i>T. denticola</i>; <i>T. forsythia</i>.</p> <p><b>Canal radicular:</b> <i>P. gingivalis</i>; <i>P. nigrescens</i>; <i>P. tanneriae</i>; <i>P. micra</i>; <i>T. denticola</i>; <i>T. forsythia</i>; <i>F. alocis</i>; <i>P. intermedia</i></p>
<b>ITO et al.. (2011) (11)</b>	<i>Neisseria mucosa</i> ; <i>F. nucleatum polymorphum</i> ; <i>P. melaninogenica</i> ; <i>S. gordonii</i>
<b>LEDEZMA-RASILO et al.. (2010) (15)</b>	<p><i>Bifidobacterium</i> spp 2; <i>Streptococcus intermedius</i>; <i>Actinomyces israelii</i>; <i>Bifidobacterium</i> spp 1; <i>Clostridium</i> spp; <i>Candida albicans</i>; <i>Clostridium beijerinckii</i>; <i>Actinomyces naeslundii</i>; <i>Lactobacillus acidophilus</i>; <i>Clostridium tertium</i>; <i>Clostridium ramosum</i>; <i>Prevotella melaninogenica</i>; <i>Propionibacterium acnes</i>; <i>Gemella morbilorum</i>; <i>Collinsella orofasciens</i>; <i>Propionibacterium propionicus</i>; <i>Bacteroides ovatus</i>; <i>Veillonella parvula</i>; <i>Veillonella atypica</i></p>
<b>RUVIÉRE et al.. (2007) (7)</b>	<p><i>Treponema denticola</i>; <i>Selenomonas</i>; <i>Streptococcus mitis</i>; <i>Streptococcus sanguinis</i>; <i>Streptococcus oralis</i>; <i>Streptococcus gordonii</i>; <i>Streptococcus intermedius</i>; <i>Prevotella nigrescens</i>; <i>Prevotella melaninogenica</i>; <i>Porphyromonas gingivalis</i>; <i>Peptostreptococcus micros</i>; <i>Prevotella intermedia</i>; <i>Leptotrichia buccalis</i>; <i>Gemella morbilorum</i>; <i>Fusobacterium nucleatum</i> spp; <i>polymorphum Fusobacterium nucleatum</i> spp <i>vincentii</i>; <i>Capnocytophaga sputigena</i>; <i>Capnocytophaga gingivalis</i>; <i>Capnocytophaga ochracea</i>; <i>Campylobacter rectus</i>; <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> sorotipo <i>b</i></p>
<b>SILVA et al.. (2006) (26)</b>	<p><i>Bacilos produtores de pigmento preto</i>; <i>Aeróbios</i>; <i>Streptococcus</i> spp.; <i>Streptococcus mutans</i>; <i>Streptococcus</i> e <i>S. sobrinus</i>; <i>Anaeróbios</i> Gram-negativos.</p>

**Tabela 3.** Gêneros e espécies bacterianas relatadas nos estudos incluídos na Revisão Sistemática (*continuação*).

Autor/Ano	Bactéria (Gênero, espécie)
<b>TAVARES et al.. (2011) (16)</b>	<i>Prevotella intermedia</i> ; <i>Neisseria mucosa</i> ; <i>Prevotella denticola</i> ; <i>Prevotella nigrescens</i> ; <i>Tannerella forsythia</i> ; <i>Fusobacterium nucleatum</i> sp. <i>vicentii</i> ; <i>Enterococcus faecalis</i> ; <i>Eikenella corrodens</i>
<b>TOPCUOGLU et al.. (2013) (8)</b>	<i>E. corrodens</i> ; <i>C. rectum</i> ; <i>P. gingivalis</i> ; <i>A. actinomycetemcomitans</i> ; <i>A. viscosus</i> ; <i>T. forsythia</i> ; <i>T. denticola</i> ; <i>P. micra</i> ; <i>P. intermedia</i> ; <i>F. nucleatum</i>
<b>YUN et al.. (2017) (27)</b>	<i>Neisseria</i> spp.; <i>Streptococcus</i> spp.; <i>Veillonella</i> spp., <i>Lactobacillus</i> spp.; <i>Acinetobacter</i> spp.; <i>Enterobacter</i> spp.; <i>Chryseobacterium</i> spp.; AF287795; <i>Lactobacillus</i> spp.; <i>Fusobacterium</i> spp.; <i>Prevotella</i> spp.; <i>Fusobacterium</i> spp.; <i>Dialister</i> spp.; <i>Atopobium</i> spp.



## 1 **Discussão**

2

3           As infecções endodônticas em dentes decíduos decorrem do  
4 ingresso de microrganismos na câmara pulpar e em todo o sistema de canais  
5 radiculares (22). As principais vias de acesso são a cárie dental e os  
6 traumatismos dentoalveolares (28). Diversos estudos clínicos, empregando  
7 métodos tradicionais, com cultivo de microrganismos, e métodos moleculares,  
8 por meio de análise de ácidos nucléicos têm sido realizados  
9 (7,9,11,15,16,26,27,29). Os resultados obtidos sugerem que a infecção  
10 endodôntica em dentes decíduos se assemelha àquela que ocorre em dentes  
11 permanentes (2,9,23,24). Deve-se considerar, entretanto, que os dentes  
12 decíduos apresentam particularidades anatômicas e padrão de doença  
13 diferenciado em relação aos dentes permanentes. Em molares decíduos, as  
14 alterações ósseas patológicas em decorrência da inflamação da polpa  
15 raramente são visualizadas na região periapical. Porém, são frequentemente  
16 detectadas na região interradicular, pois esta região é rica em foraminas e  
17 canais acessórios (30). Esses canais acessórios podem estar contaminados e  
18 preenchidos com tecido necrótico e biofilme, o que pode perpetuar lesões de  
19 furca, dificultando a obtenção de sucesso na terapia. Porém, não há na  
20 literatura estudo que compile os dados já publicados acerca da composição  
21 das comunidades microbianas presentes no sistema de canais radiculares e  
22 que permita traçar um panorama dos achados, direcionando futuras  
23 investigações neste campo.

24           Nos estudos incluídos nesta revisão sistemática, a caracterização  
25 das infecções endodônticas foi tradicionalmente realizada por meio da  
26 associação de técnicas tradicionais de cultivo, que recentemente tiveram seus  
27 dados confirmados e expandidos por meio das técnicas moleculares de  
28 diagnóstico (10). A caracterização da infecção endodôntica em dentes  
29 decíduos, por meio de cultura, demonstrou que há predomínio de  
30 microrganismos anaeróbios, existindo combinações de bactérias,  
31 especialmente combinações de bacilos pigmentados de preto e bactérias  
32 anaeróbias facultativas (2,15,23,26). As espécies bacterianas mais  
33 frequentemente isoladas nos três estudos foram: *Neisseria mucosa*,

1 *Fusobacterium nucleatum* spp *polymorphum*, *Prevotella. melaninogenica*,  
2 *Streptococcus gordonii*, *Bifidobacterium* spp, *Streptococcus intermedius*,  
3 *Streptococcus mutans*, e *Streptococcus sobrinus*. Porém, sabe-se que a  
4 diversidade bacteriana pode ser subestimada em um ecossistema, quando ela  
5 é avaliada por meio deste método, isoladamente (10). A identificação dos  
6 microrganismos por meio de cultura microbiológica se torna limitada tendo em  
7 vista que esta é uma técnica pouco sensível e alguns microrganismos são de  
8 difícil cultivo, justificando-se a importância de se investigar o microbioma das  
9 infecções endodônticas em dentes decíduos associando-se técnicas de  
10 biologia molecular (33).

11           Nos seis estudos da revisão sistemática em que foram empregadas  
12 técnicas de biologia molecular (7,9,11,16,27,29), os achados confirmaram e  
13 aprofundaram aqueles da cultura. As técnicas de biologia molecular mais  
14 frequentemente empregadas nos estudos selecionados foram a reação em  
15 cadeia da enzima polimerase (PCR) e a hibridização Checkerboard DNA-DNA.  
16 Estas são técnicas mais específicas, sensíveis e rápidas de serem realizadas  
17 do que cultura microbiana. Há possibilidade de detecção de microrganismos  
18 incultiváveis e fastidiosos, como destacaram Ruvierre *et al.*. (2007) (7) e  
19 Topcuoglu *et al.*. (2013) (29). A técnica de PCR espécie específico permite que  
20 se direcione a detecção de espécies alvo, por meio de amplificação de  
21 fragmentos de DNA pertencentes a espécies já conhecidas, sendo altamente  
22 sensível e específica (10). As espécies mais frequentemente detectadas nas  
23 amostras por meio desses métodos foram os anaeróbios estritos Gram-  
24 negativos *Prevotella nigrescens*, *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema*  
25 *denticola*, *Tanarella forsythia* e *Prevotella intermedia* (9,13). De acordo com  
26 Gomes *et al.*. (2013) (9), as amostras coletadas na câmara pulpar continham *P.*  
27 *micra*, *T. denticola* e *T. forsythia*.

28           A partir do início deste século, a análise do microbioma de infecções  
29 endodônticas em dentes permanentes direcionou-se para o estudo da  
30 composição das comunidades microbianas a elas associadas, privilegiando-se  
31 métodos de ampla caracterização e que não se restringissem a um número  
32 limitado de espécies ou espécies já conhecidas, por meio da utilização de  
33 diferentes técnicas e variações (6,34,35). O emprego da hibridização DNA-DNA  
34 nos estudos de Pazeli *et al.*. (2003) (2), Silva *et al.*. (2006) (26), Ruvierre *et al.*.

1 (2007) (7) e de Tavares *et al.* (2011) (16) segue este conceito. Esta técnica  
2 permite a análise simultânea de um número maior de amostras, frente a um  
3 número maior de microrganismos, sem realizar amplificação prévia do DNA.  
4 Assim, suas sensibilidade e especificidade são mais reduzidas do as dos  
5 métodos que empregam amplificação (10). Assim, naqueles três estudos  
6 (7,16,26), observou-se maior prevalência de bacilos pigmentados de preto,  
7 anaeróbios Gram-negativos e estreptococcus. E pela primeira vez, por meio do  
8 trabalho de Ruvierre *et al.* (2007) (7) foi relatada a presença de *Treponema*  
9 *denticola* em amostras de infecções endodônticas em dentes decíduos, sendo  
10 alta a sua frequência nas amostras estudadas. Na tentativa de superar as  
11 limitações do método, Tavares *et al.* (2011) (16) sugeriram a utilização de  
12 amplificação do DNA previamente à análise de hibridização. Porém a eficiência  
13 deste método não foi comparada à da não-amplificação.

14 Topcouglu *et al.* (2013) (29) utilizaram o método de *microarrays*  
15 para a detecção simultânea e quantificação da presença de múltiplos  
16 patógenos em infecções endodônticas de dentes decíduos, detectando os  
17 anaeróbios estritos *Fusobacterium nucleatum* (96,7% das amostras), *Prevotella*  
18 *intermedia* (86,7%), *Parvimonas micra* (83,3%) e *Treponema denticola* (76,7%).  
19 Este método permite a detecção simultânea de 10 espécies bacterianas em  
20 várias amostras, com limite mínimo de detecção de 100-500 células de uma  
21 determinada espécie bacteriana (36). Apenas um estudo empregou técnica de  
22 sequenciamento de alto rendimento (35), que permite a ampla caracterização  
23 do microbioma, pois não utiliza detecção direcionada para uma espécie ou  
24 determinado grupo de espécies bacterianas, além de ser uma técnica  
25 quantitativa. De acordo com Hong *et al.*, (2013) (35), por meio do  
26 sequenciamento de alto rendimento é possível que se detectem não só os  
27 membros da comunidade dominante, mas também os grupos pouco  
28 dominantes. Contudo esta é uma técnica de custo elevado, justificando assim o  
29 número reduzido de trabalhos que a empregam.

30 Idealmente, o método adotado para a coleta de amostras do sistema  
31 de canais radiculares deve recuperar o máximo de células microbianas, que  
32 estão dispostas tanto na forma planctônica ou em biofilmes. A coleta realizada  
33 por meio de cones de papel absorvente foi o método mais empregado nas  
34 pesquisas selecionadas, o que foi também observado por Yun e colaboradores

1 (20). Previamente à coleta com estes cones, é frequente o uso de limas  
2 endodônticas, visando a obtenção de uma amostra que abranja maior número  
3 de microrganismos, alcançando aqueles que estão nas paredes do canal  
4 radicular, constituindo o biofilme. Este método foi empregado em quatro  
5 estudos (2,7,13,21). No entanto, as limitações para a coleta e caracterização  
6 do microbioma total no sistema radicular estão associadas aos acidentes  
7 anatômicos, tais como canais acessórios e laterais, istmos, o que também é  
8 observado em dentes permanentes (20). Tavares *et al.* (2011) (16) ainda  
9 salientam que a utilização de limas K para coleta permite obter uma amostra da  
10 microbiota que inclui de forma mais efetiva micro-organismos presentes  
11 também do terço apical. Gomes *et al.* (2013) relataram a utilização de mechas  
12 de algodão para a coleta de amostras da região de soalho da câmara pulpar  
13 em dentes decíduos. Porém, é difícil determinar se realmente há possibilidade  
14 de coleta isolada de microrganismos desse local, ou se poderia haver  
15 contaminação com microrganismos do canal radicular. Recentemente, Van der  
16 Horst *et al.* (2013) sugeriram que os cones de papel empregados para coleta  
17 de amostras de sítios com peri-implantite poderiam ser fonte de DNA  
18 microbiano externo. Assim, propuseram o emprego de técnicas alternativas de  
19 coleta para estudos que avaliem a composição de comunidades microbianas, e  
20 de métodos que utilizem métodos de ampla detecção, tais como  
21 sequenciamento de alto rendimento. Portanto, observa-se que há limitação no  
22 método de coleta de amostras do sistema de canais radiculares de dentes  
23 decíduos com infecções endodônticas, estando associadas principalmente à  
24 anatomia e às características das etapas envolvidas na coleta.

25 No que se refere às técnicas para análise microbiológica, sabe-se  
26 que a diversidade bacteriana pode ser subestimada em um ecossistema,  
27 quando ela é avaliada por meio do método de cultura, isoladamente (10). Isto  
28 ocorreu em 37,5% dos estudos incluídos nesta revisão sistemática (11,15,26).  
29 A identificação dos microrganismos por meio de cultura microbiológica se torna  
30 limitada, tendo em vista que esta é uma técnica pouco sensível e alguns  
31 microrganismos são de difícil cultivo, justificando-se a importância de se  
32 investigar o microbioma das infecções endodônticas em dentes decíduos  
33 associando-se técnicas de biologia molecular (33). Estas foram empregadas

1 em 75% dos estudos analisados (7,9,11,16,27). Isto pode justificar a  
2 observação de resultados complementares quanto ao perfil microbiano nas  
3 amostras coletadas.

4           Nos artigos incluídos na presente revisão sistemática, pode-se  
5 observar uma grande variação quanto ao número de participantes incluídos.  
6 Deve-se considerar que o tratamento endodôntico nos dentes decíduos pode  
7 ser complexo, devido às características anatômicas e fisiológicas, tornando o  
8 acesso ao canal radicular difícil (31). Além disso, o reduzido número de  
9 participantes pode estar associado às dificuldades de obtenção da amostra  
10 pretendida, devido aos critérios de elegibilidade propostos, e também de  
11 manejo comportamental de pacientes odontopediátricos. Esta falta de  
12 homogeneidade quanto ao tamanho de amostra poderia justificar diferenças  
13 quantos aos resultados obtidos. Vale ressaltar que nenhum estudo selecionado  
14 mencionou ter conduzido um cálculo de tamanho amostral. O mesmo achado  
15 foi relatado por Moraes *et al.* (2015) (32) em uma revisão sistemática, que  
16 incluiu estudos de caracterização da presença de genes de resistência a  
17 agentes antimicrobianos, em amostras coletadas de canais radiculares de  
18 dentes permanentes, em pacientes adultos. Como limitações na análise dos  
19 resultados da presente revisão sistemática, podem-se citar as diferenças  
20 metodológicas observadas, como emprego de distintos materiais de coleta e  
21 técnicas para identificação dos microrganismos, além de tamanhos amostrais  
22 variados, sem cálculos prévios que o justifiquem.

23           Aspecto importante a ser também considerado é o uso de  
24 antimicrobianos previamente à coleta do material para análise microbiológica. A  
25 administração de antibióticos pode interferir na composição da microbiota da  
26 cavidade bucal (37). E, de um modo geral, as crianças estão expostas a uma  
27 maior frequência de uso de antimicrobianos, pois é comum receberem estes  
28 agentes para tratamento de infecções do trato respiratório superior (38). Além  
29 das prescrições realizadas por profissionais da área da saúde, destaca-se o  
30 uso inadequado de antibióticos em crianças ocasionado principalmente por  
31 automedicação e pelo conhecimento limitado dos pais sobre antimicrobianos  
32 (39). Em estudo conduzido na população chinesa (40), demonstraram a que  
33 62% dos pais haviam fornecido antibióticos para os filhos por meio de

1 automedicação. Sendo assim, a exposição prévia dos participantes a  
2 antibiótico foi um dos parâmetros escolhidos para análise na presente revisão  
3 sistemática. Na maioria dos artigos selecionados, os pacientes que haviam  
4 utilizado antimicrobianos nos 3 meses anteriores à realização da coleta de  
5 dados não foram incluídos na pesquisa (7,9,11,27,29).

6           Sendo assim, com base nos resultados aqui obtidos, sugere-se que  
7 as infecções endodônticas em dentes decíduos são causadas por combinações  
8 de diversas espécies, confirmando a sua natureza polibacteriana. Não se pode  
9 considerar que haja um padrão relacionado à composição bacteriana nos  
10 estudos, pois há uma tendência de os autores investigarem grupos bacterianos  
11 já conhecidos, especialmente as bactérias anaeróbias estritas. Futuros estudos  
12 devem empregar métodos que permitam a ampla caracterização do  
13 microbioma, sem que as análises sejam voltadas para um grupo específico de  
14 microrganismos. O estudo da riqueza e da abundância de espécies nas  
15 comunidades microbianas é de extrema importância, já que o comportamento  
16 da comunidade é obviamente dependente da sua diversidade (42). Portanto,  
17 estudos adicionais devem ser realizados com o intuito de compreender a  
18 composição das comunidades microbianas nas infecções endodônticas em  
19 dentes decíduos e também nos ecossistemas a elas relacionados.

20

21

22

23

## 1 **Bullet Points**

- 2       ▪ As infecções endodônticas em dentes decíduos são causadas por  
3       combinações de diversas espécies, confirmando a sua natureza  
4       polibacteriana.
- 5       ▪ Futuros estudos devem empregar métodos de ampla caracterização do  
6       microbioma dos canais radiculares infectados de dentes decíduos.
- 7       ▪ O conhecimento das infecções endodônticas em dentes decíduos  
8       permitirá abordagens mais seguras e efetivas para o seu controle.

9

## 10 **Referências**

11

- 12 1. Brustolin JP, Mariath AAS, Ardenghi TM, Casagrande L. Survival and  
13 Factors Associated with Failure of Pulpectomies Performed in Primary  
14 Teeth by Dental Students. *Braz Dent J.* 2017 Feb;28(1):121–8.
- 15 2. Pazelli LC, Freitas AC de, Ito IY, Souza-Gugelmin MCM de, Medeiros AS,  
16 Nelson-Filho P. Prevalence of microorganisms in root canals of human  
17 deciduous teeth with necrotic pulp and chronic periapical lesions. *Pesqui  
18 Odontol Bras Braz Oral Res.* 2003 Dec;17(4):367–71.
- 19 3. Krisdapong S, Prasertsom P, Rattananangsim K, Sheiham A. School  
20 absence due to toothache associated with sociodemographic factors, dental  
21 caries status, and oral health-related quality of life in 12- and 15-year-old  
22 Thai children. *J Public Health Dent.* 2013;73(4):321–8.
- 23 4. Albandar JM, Rams TE. Risk factors for periodontitis in children and young  
24 persons. *Periodontol 2000.* 2002;29:207–22.
- 25 5. Braga MM, Martignon S, Ekstrand KR, Ricketts DNJ, Imparato JCP,  
26 Mendes FM. Parameters associated with active caries lesions assessed by  
27 two different visual scoring systems on occlusal surfaces of primary molars  
28 - a multilevel approach. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2010  
29 Dec;38(6):549–58.

- 1 6. Siqueira JF, Rôças IN, Rosado AS. Investigation of bacterial communities  
2 associated with asymptomatic and symptomatic endodontic infections by  
3 denaturing gradient gel electrophoresis fingerprinting approach. *Oral*  
4 *Microbiol Immunol.* 2004 Dec;19(6):363–70.
- 5 7. Ruvierre DB, Leonardo MR, da Silva LAB, Ito IY, Nelson-Filho P.  
6 Assessment of the microbiota in root canals of human primary teeth by  
7 checkerboard DNA-DNA hybridization. *J Dent Child Chic Ill.* 2007  
8 Aug;74(2):118–23.
- 9 8. Topcuoglu N, Bozdoğan E, Kulekci G, Aktoren O. Presence of oral bacterial  
10 species in primary endodontic infections of primary teeth. *J Clin Pediatr*  
11 *Dent.* 2013;38(2):155–60.
- 12 9. Gomes GB, Sarkis-Onofre R, Bonow MLM, Etges A, Jacinto RC. An  
13 investigation of the presence of specific anaerobic species in necrotic  
14 primary teeth. *Braz Oral Res.* 2013 Apr;27(2):149–55.
- 15 10. Siqueira JF, Rôças IN. Uncultivated phylotypes and newly named species  
16 associated with primary and persistent endodontic infections. *J Clin*  
17 *Microbiol.* 2005 Jul;43(7):3314–9.
- 18 11. Ito IY, Junior FM, Paula-Silva FWG, Da Silva LAB, Leonardo MR, Nelson-  
19 Filho P. Microbial culture and checkerboard DNA-DNA hybridization  
20 assessment of bacteria in root canals of primary teeth pre- and post-  
21 endodontic therapy with a calcium hydroxide/chlorhexidine paste. *Int J*  
22 *Paediatr Dent.* 2011 Sep;21(5):353–60.
- 23 12. Sakamoto M, Rôças IN, Siqueira JF, Benno Y. Molecular analysis of  
24 bacteria in asymptomatic and symptomatic endodontic infections. *Oral*  
25 *Microbiol Immunol.* 2006 Apr;21(2):112–22.
- 26 13. Cogulu D, Uzel A, Oncag O, Eronat C. PCR-based identification of selected  
27 pathogens associated with endodontic infections in deciduous and  
28 permanent teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2008  
29 Sep;106(3):443–9.



- 1 14. Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG, PRISMA Group. Preferred  
2 reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA  
3 statement. *Int J Surg Lond Engl.* 2010;8(5):336–41.
- 4 15. Ledezma-Rasillo G, Flores-Reyes H, Gonzalez-Amaro AM, Garrocho-  
5 Rangel A, Ruiz-Rodriguez M del S, Pozos-Guillen AJ. Identification of  
6 cultivable microorganisms from primary teeth with necrotic pulps. *J Clin  
7 Pediatr Dent.* 2010;34(4):329–33.
- 8 16. Tavares WLF, Neves de Brito LC, Teles RP, Massara MLA, Ribeiro  
9 Sobrinho AP, Haffajee AD, *et al.* Microbiota of deciduous endodontic  
10 infections analysed by MDA and Checkerboard DNA-DNA hybridization. *Int  
11 Endod J.* 2011 Mar;44(3):225–35.
- 12 17. Fabris AS, Nakano V, Avila-Campos MJ. Bacteriological analysis of necrotic  
13 pulp and fistulae in primary teeth. *J Appl Oral Sci Rev FOB.* 2014  
14 Apr;22(2):118–24.
- 15 18. de Paula VAC, de Carvalho Ferreira D, Cavalcante FS, do Carmo FL,  
16 Rosado AS, Primo LG, *et al.* Clinical signs and bacterial communities of  
17 deciduous necrotic root canals detected by PCR-DGGE analysis: research  
18 association. *Arch Oral Biol.* 2014 Aug;59(8):848–54.
- 19 19. Loyola-Rodriguez JP, Garcia-Cortes JO, Martinez-Martinez RE, Patiño-  
20 Marin N, Martinez-Castañon GA, Zavala-Alonso NV, *et al.* Molecular  
21 identification and antibiotic resistant bacteria isolated from primary dentition  
22 infections. *Aust Dent J.* 2014 Dec;59(4):497–503.
- 23 20. Triches TC, de Figueiredo LC, Feres M, de Freitas SFT, Zimmermann GS,  
24 Cordeiro MMR. Microbial profile of root canals of primary teeth with pulp  
25 necrosis and periradicular lesion. *J Dent Child Chic Ill.* 2014 Apr;81(1):14–9.
- 26 21. Tomić-Karović K, Jelinek E. Comparative study of the bacterial flora in the  
27 surroundings, the root canals and sockets of deciduous molars. *Int Dent J.*  
28 1971 Sep;21(3):375–88.

- 1 22. Toyoshima Y, Fukushima H, Inoue JI, Sasaki Y, Yamamoto K, Katao H, *et*  
2 *al.*. [A bacteriological study of periapical pathosis on deciduous teeth].  
3 *Shoni Shikagaku Zasshi*. 1988;26(3):449–58.
- 4 23. Sato T, Hoshino E, Uematsu H, Noda T. Predominant Obligate Anaerobes  
5 in Necrotic Pulps of Human Deciduous Teeth. *Microbial Ecology in Health*  
6 *and Disease*. 6th ed. 1993;269–75.
- 7 24. Shang J, Yang Q, Zhao H, Cai S, Zhou Y, Sun Z. Preliminary molecular  
8 analysis of bacterial composition in periapical lesions with primary  
9 endodontic infections of deciduous teeth. *Chin Med J (Engl)*. 2013  
10 Aug;126(16):3112–7.
- 11 25. Yang Q-B, Fan L-N, Shi Q. Polymerase chain reaction-denaturing gradient  
12 gel electrophoresis, cloning, and sequence analysis of bacteria associated  
13 with acute periapical abscesses in children. *J Endod*. 2010 Feb;36(2):218–  
14 23.
- 15 26. da Silva LAB, Nelson-Filho P, Faria G, de Souza-Gugelmin MCM, Ito IY.  
16 Bacterial profile in primary teeth with necrotic pulp and periapical lesions.  
17 *Braz Dent J*. 2006;17(2):144–8.
- 18 27. Yun KH, Lee H-S, Nam OH, Moon CY, Lee J-H, Choi SC. Analysis of  
19 bacterial community profiles of endodontically infected primary teeth using  
20 pyrosequencing. *Int J Paediatr Dent*. 2017 Jan;27(1):56–65.
- 21 28. Raslan N, Wetzel W-E. Exposed human pulp caused by trauma and/or  
22 caries in primary dentition: a histological evaluation. *Dent Traumatol Off*  
23 *Publ Int Assoc Dent Traumatol*. 2006 Jun;22(3):145–53.
- 24 29. Topcuoglu N, Bozdoğan E, Kulekci G, Aktoren O. Presence of oral bacterial  
25 species in primary endodontic infections of primary teeth. *J Clin Pediatr*  
26 *Dent*. 2013;38(2):155–60.
- 27 30. Dammaschke T, Witt M, Ott K, Schäfer E. Scanning electron microscopic  
28 investigation of incidence, location, and size of accessory foramina in

- 1 primary and permanent molars. Quintessence Int Berl Ger 1985. 2004  
2 Oct;35(9):699–705.
- 3 31. Onçag O, Cogulu D, Gogulu D, Uzel A. Efficacy of various intracanal  
4 medicaments against *Enterococcus faecalis* in primary teeth: an in vivo  
5 study. J Clin Pediatr Dent. 2006;30(3):233–7.
- 6 32. Moraes LC, Só MVR, Dal Pizzol T da S, Ferreira MBC, Montagner F.  
7 Distribution of genes related to antimicrobial resistance in different oral  
8 environments: a systematic review. J Endod. 2015 Apr;41(4):434–41.
- 9 33. Siqueira JF, Rôças IN, Souto R, Uzeda M, Colombo AP. Microbiological  
10 evaluation of acute periradicular abscesses by DNA-DNA hybridization.  
11 Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2001 Oct;92(4):451–7.
- 12 34. Montagner F, Gomes BPFA, Kumar PS. Molecular fingerprinting reveals the  
13 presence of unique communities associated with paired samples of root  
14 canals and acute apical abscesses. J Endod. 2010 Sep;36(9):1475–9.
- 15 35. Hong B-Y, Lee T-K, Lim S-M, Chang SW, Park J, Han SH, *et al.*. Microbial  
16 analysis in primary and persistent endodontic infections by using  
17 pyrosequencing. J Endod. 2013 Sep;39(9):1136–40.
- 18 36. Vianna ME, Horz H-P, Gomes BPFA, Conrads G. Microarrays complement  
19 culture methods for identification of bacteria in endodontic infections. Oral  
20 Microbiol Immunol. 2005 Aug;20(4):253–8.
- 21 37. Zaura E, Brandt BW, Teixeira de Mattos MJ, Buijs MJ, Caspers MPM,  
22 Rashid M-U, *et al.*. Same Exposure but Two Radically Different Responses  
23 to Antibiotics: Resilience of the Salivary Microbiome versus Long-Term  
24 Microbial Shifts in Feces. mBio. 2015 Nov 10;6(6):e01693-01615.
- 25 38. Hui L, Li XS, Zeng XJ, Dai YH, Foy HM. Patterns and determinants of use of  
26 antibiotics for acute respiratory tract infection in children in China. Pediatr  
27 Infect Dis J. 1997 Jun;16(6):560–4.

- 1 39. Currie J, Lin W, Zhang W. Patient knowledge and antibiotic abuse:  
2 Evidence from an audit study in China. *J Health Econ.* 2011 Sep;30(5):933–  
3 49.
- 4 40. Yu M, Zhao G, Stålsby Lundborg C, Zhu Y, Zhao Q, Xu B. Knowledge,  
5 attitudes, and practices of parents in rural China on the use of antibiotics in  
6 children: a cross-sectional study. *BMC Infect Dis.* 2014 Feb 27;14:112.
- 7 41. da Silva RAB, Leonardo MR, da Silva LAB, de Castro LMS, Rosa AL, de  
8 Oliveira PT. Effects of the association between a calcium hydroxide paste  
9 and 0.4% chlorhexidine on the development of the osteogenic phenotype in  
10 vitro. *J Endod.* 2008 Dec;34(12):1485–9.
- 11 42. Siqueira JF, Rôças IN. The microbiota of acute apical abscesses. *J Dent*  
12 *Res.* 2009 Jan;88(1):61–5.
- 13

1 **CAPÍTULO 2**

2

3 **Comunidades bacterianas do ecossistema bucal em crianças com**  
4 **infecções endodônticas apresentam perfis composicionais únicos**

5

6 Naelka Sarmiento <sup>1</sup>

7 Letícia Marconatto <sup>2</sup>

8 Adriana Giongo Borges <sup>2</sup>

9 Maria Beatriz Cardoso Ferreira <sup>3</sup>

10 Luciano Casagrande <sup>1</sup>

11 Francisco Montagner <sup>1</sup>

12

13 1 Programa de Pós-graduação em Odontologia, Faculdade de Odontologia,  
14 Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Rua Ramiro Barcelos, 2492.  
15 Porto Alegre, RS, Brasil.

16 2 Laboratório de Geobiologia, Instituto do Petróleo e dos Recursos Naturais,  
17 Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Avenida Ipiranga,  
18 6681. Porto Alegre, RS, Brasil.

19 3 Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde,  
20 Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Rua Sarmiento Leite, 500. Porto  
21 Alegre, RS, Brazil.

22

23 Autor Correspondente:

24 Prof Dr Francisco Montagner

25 Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Faculdade de Odontologia

26 Rua Ramiro Barcelos, 2492.

27 Bairro Santana – Porto Alegre, RS – Brasil.

28 CEP 90035-003

29 E-mail: francisco.montagner@ufrgs.br

30 Telefone: +55 51 98137 2933

31

32 Artigo a ser submetido à revista *Clinical Oral Investigation* (Qualis A1 CAPES).

## 1 **Resumo**

2

3 *Objetivos* – Compreender a estrutura e a diversidade bacteriana em sítios da  
4 cavidade bucal de pacientes infantis, portadores de infecções endodônticas.

5 *Material e Métodos* – Amostras de saliva (S), biofilme supragengival (SB),  
6 dentina (D), cavidade pulpar (RC). O perfil das comunidades bacterianas foi  
7 determinado por meio da análise da região espaçadora intergênica relacionada  
8 aos genes 16S e 23S rRNA (PCR-RISA). Realizou-se análise estatística  
9 descritiva e análise de alfa e beta diversidade, onde foram determinadas a  
10 riqueza, dominância, índice de Shannon, índice de Chao-1, análise multivariada  
11 de conglomerados (método UPGMA e índice de Similaridade de Bray-Curtis) e  
12 análise de coordenadas principais (PCoA).

13 *Resultados* – Há um baixo grau de agrupamento entre as amostras de S, BS, D  
14 e RC, obtidas de um mesmo participante. Se presentes, os agrupamentos  
15 acontecem para sítios contíguos, mas com baixo percentual de similaridade.  
16 Amostras de um mesmo ecossistema obtidas de diferentes participantes  
17 abrigam comunidades bacterianas distintas, com baixa similaridade. Não  
18 parece haver uma relação entre a presença de um sinal/sintoma clínico e  
19 acréscimo no perfil de similaridade das comunidades bacterianas em RC. Não  
20 foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os índices de  
21 alfa-diversidade (riqueza, dominância, Shannon e Chao-1) entre S, SB, D e RC.  
22 O uso prévio de antibióticos não modificou os resultados de alfa diversidade ou  
23 de beta diversidade obtidos.

24 *Conclusões* – Cada ecossistema apresenta perfil composicional diferenciado,  
25 pois em um mesmo participante, amostras de S, SB, D e RC apresentam  
26 comunidades bacterianas únicas. Considerando-se amostras de RC, sugere-se  
27 que diferentes comunidades bacterianas são a base etiológica em infecções  
28 endodônticas primárias em dentes decíduos com necrose pulpar.

29 *Relevância clínica* – A cavidade bucal apresenta ecossistemas diferentes, com  
30 composições bacterianas únicas para cada paciente. Assim, deve-se abordar o  
31 tratamento das infecções associadas ao biofilme supragengival de forma a  
32 permitir a ruptura das estruturas da comunidade bacteriana que o constituem.

33

34 **Palavras-chave:** cavidade bucal, bactérias, RISA, ecologia microbiana,  
35 diversidade, análise por conglomerados.

36

## 1 **Introdução**

2

3           A cavidade bucal é um habitat em constante mutação no qual  
4 residem microrganismos comensais, dispersos em diferentes sítios (dentes,  
5 sulco gengival, língua, bochechas, palato duro e mole e amígdalas) [1, 2],  
6 permitindo o estabelecimento de comunidades microbianas distintas em cada  
7 um deles [3]. A aquisição do microbioma bucal inicia-se no processo de  
8 nascimento, e há grande similaridade entre as microbiotas bucal de crianças,  
9 da região da auréola mamária e do leite materno [4]. Nos primeiros seis meses  
10 de vida, a microbiota bucal da criança é formada a partir dos componentes da  
11 microbiota oral da mãe [4]. A erupção dos dentes decíduos e a sua substituição  
12 por dentes permanentes altera de forma drástica os habitats microbianos na  
13 cavidade bucal, o que pode promover alterações importantes no microbioma [5,  
14 6].

15           Em pacientes saudáveis, as comunidades microbianas na cavidade  
16 bucal apresentam componentes estáveis, representado pelas espécies  
17 abundantes, e outros que tem sua presença modificada ao longo do tempo, os  
18 menos abundantes [7, 8]. Fatores ambientais como alterações na dieta podem  
19 promover flutuações na composição microbiana [9]. Porém, quando há um  
20 decréscimo no número de espécies benéficas ou simbióticas e o aumento no  
21 número de patógenos, ocorre a disbiose [10]. Em condição de doença,  
22 bactérias comensais rompem a barreira da mucosa e geram estímulos  
23 inflamatórios crônicos em tecidos adjacentes [11].

24           Espécies bacterianas pioneiras são capazes de colonizar as  
25 superfícies da cavidade bucal, recobertas com uma película, sendo sucedidas  
26 por colonizadores secundários que originam uma estrutura complexa,  
27 denominada biofilme supragengival [12]. Os biofilmes formados nas mucosas e  
28 na superfície do dente são distintos, embora se forme a partir da saliva [7, 8]. A  
29 riqueza de espécies presentes no microbioma do biofilme supragengival é  
30 maior do que aquele do biofilme da saliva pois há elementos com potencial  
31 antimicrobiano que compõem a saliva [13]. Os biofilmes supra-gengivais de  
32 crianças que apresentam cárie diferenciam-se e sua composição daqueles que  
33 não apresentam. Há um predomínio de espécies dos gêneros *Actinobaculum*,

1 *Atopobium*, *Aggregatibacter*, e *Streptococcus* em pacientes infantis com cárie,  
2 enquanto que espécies pertencentes aos gêneros *Actinomyces*, *Bergeyella*,  
3 *Campylobacter*, *Granulicatella*, *Kingella*, *Leptotrichia* e *Streptococcus* foram  
4 detectados em biofilmes de crianças saudáveis [5]. Observa-se uma sucessão  
5 de espécies quando se avalia biofilmes supra-gengivais associados a  
6 diferentes estágios de progressão de cárie. Um predomínio de espécies como  
7 *Streptococcus mutans*, *Scardovia wiggisiae*, *Parascardovia denticolens* e  
8 *Lactobacillus salivarius* são encontrados em pacientes com cárie em dentina  
9 [14].

10 As lesões cariosas profundas são o principal motivo do tratamento  
11 endodôntico nos dentes decíduos posteriores, que apresentam necrose pulpar  
12 associada ou não ao envolvimento periapical/furca [15]. A necrose do tecido  
13 pulpar geralmente é iniciada por cáries, é uma das causas mais comuns de dor  
14 e está associada à incapacidade funcional entre pacientes infantis [16]. Para a  
15 caracterização da infecção endodôntica em dentes decíduos foram utilizadas  
16 técnicas clássicas de cultivo e técnicas de biologia molecular direcionadas à  
17 detecção de determinadas espécies [17–19]. Os resultados dos estudos  
18 sugerem que as infecções endodônticas em dentes decíduos são causadas por  
19 múltiplas combinações de espécies, confirmando a sua natureza  
20 polibacteriana, com predomínio de anaeróbios estritos, Gram-negativos, e  
21 alguns anaeróbios facultativos Gram-positivos. Yun *et al.* (2017) [20] utilizaram  
22 técnica de sequenciamento de alto rendimento para determinar a composição  
23 bacteriana de infecções endodônticas, e concluíram que há um grande número  
24 de espécies em canais radiculares de dentes decíduos infectados.

25 A compreensão atual das infecções humanas de origem endógena  
26 tem como base o conceito de que uma comunidade microbiana é a unidade de  
27 patogenicidade, opondo-se ao conceito reducionista associado a apenas uma  
28 espécie [21, 22]. Embora tenham sido analisadas as comunidades microbianas  
29 em diferentes ecossistemas bucais nos pacientes infantis, em condição de  
30 saúde e doença, é necessário compreender a sua estrutura e a sua diversidade  
31 em sítios da cavidade bucal de pacientes infantis, portadores de infecções  
32 endodônticas.



## 1 **Material e Métodos**

2

### 3 *Aspectos de ética em pesquisa e seleção dos participantes*

4

5 Este estudo foi aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa da  
6 Universidade do Estado do Amazonas (Manaus, AM, Brasil) e da Universidade  
7 Federal do Rio Grande do Sul (Porto Alegre, RS, Brasil) (CAAE  
8 47029015.6.0000.5016). Após a apresentação do estudo e tendo suas dúvidas  
9 esclarecidas, os responsáveis pelo paciente infantil assinaram um Termo de  
10 Consentimento Livre e Esclarecido relativo à participação do paciente infantil.  
11 Garantiu-se ao participante infantil que expressasse seu assentimento quanto a  
12 sua participação no estudo.

13 Foram convidados a participar do estudo oito pacientes infantis, de 3  
14 a 10 anos, de ambos os sexos, que procuraram atendimento odontológico na  
15 Policlínica de Odontologia da Universidade do Estado do Amazonas (UEA,  
16 Manaus, AM, Brasil). Os participantes não poderiam apresentar alteração  
17 sistêmica crônica, tais como diabetes ou alteração imunológica. Os critérios de  
18 inclusão foram: presença de alteração endodôntica em um dente decíduo;  
19 ausência de tratamento endodôntico anterior; presença de cárie, sem que  
20 houvesse exposição direta da câmara pulpar ao ecossistema bucal; raízes  
21 dentais intactas ou com menos de 2/3 de reabsorção; presença ou ausência de  
22 rarefação apical ou na região de furca. Amostra de apenas um dente por  
23 participante infantil foi coletada.

24

### 25 *Procedimentos clínicos*

26

27 Amostras de saliva não estimulada foram coletadas do paciente  
28 infantil (S). O participante foi instruído a cuspir dentro do frasco plástico (CRAL,  
29 Artigos para Laboratório Ltda, Cotia, SP, Brasil), por 1 minuto [23]. Amostras de  
30 biofilme supragengival (SB) foram coletadas do paciente infantil, utilizando-se  
31 micropincel esterilizado (Colténe Brasil, Vigodent Indústria e Comércio, Rio de

1 Janeiro, RJ, Brasil) [24]. A coleta das amostras de dentina (D) e do canal  
2 radicular (RC) foram realizadas sob isolamento absoluto, o qual foi desinfetado  
3 com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% por 30s, seguido por de solução de NaOCl 2,5% por mais 30s.  
4 Posteriormente, utilizou-se tiosulfato de sódio 5% para inativar os agentes  
5 desinfetantes. Coletou-se uma amostra do campo operatório com swab estéril  
6 para que se controlasse a efetividade do procedimento de desinfecção e  
7 remoção de DNA. Após a remoção de esmalte sem suporte, coletou-se tecido  
8 dentinário da parede circundante e pulpar da lesão de cárie com cureta de  
9 dentina esterilizada. A dentina coletada foi imediatamente acondicionada em  
10 tubos plásticos do tipo Eppendorf esterilizados. A cavidade de acesso foi  
11 preparada com brocas diamantadas de alta rotação esterilizadas sob irrigação  
12 com solução salina estéril. As amostras foram coletadas da cavidade pulpar,  
13 envolvendo a câmara pulpar e os canais radiculares. O canal mais amplo foi  
14 preenchido com solução salina estéril, seguido da fricção de uma lima tipo K  
15 #15 contra as paredes, respeitando-se o limite de 2 mm aquém do  
16 comprimento aparente do dente na radiografia. Em seguida o conteúdo foi  
17 aspirado com agulha e seringa estéreis e colocado em tubos plásticos  
18 esterilizados. Todas as amostras foram armazenadas em freezer, a -20°C até o  
19 seu processamento laboratorial.

20 Todos os dentes foram tratados endodonticamente. O diâmetro final  
21 da região apical determinado foi igual a uma lima tipo K 35. Utilizou-se solução  
22 de hipoclorito de sódio 1% como irrigante. A medicação intracanal empregada  
23 foi pasta de hidróxido de cálcio, por 14 dias. Na consulta seguinte, o sistema de  
24 canais radiculares foi obturado com pasta de hidróxido de cálcio espessada  
25 com óxido de zinco (proporção em peso 3:1). Os dentes foram restaurados  
26 com ionômero de vidro modificado com resina (Vitremer, 3M ESPE, St. Paul,  
27 MN, USA) ou resina composta (Adper Single Bond and Filtek Z-350, 3M ESPE,  
28 St. Paul, MN, USA).

29

30

## 1 *Procedimentos laboratoriais*

2

3 O DNA microbiano foi isolado por meio do conjunto PowerSoil® DNA  
4 Isolation Kit (QIAGEN, Valencia, Califórnia, USA), conforme recomendações do  
5 fabricante, exceto para a primeira etapa. Iniciou-se o procedimento de extração  
6 com aproximadamente 100 µL da amostra líquida. A concentração do DNA na  
7 amostra foi quantificada por meio de fluorescência, utilizando-se o Qubit  
8 (Thermo Fisher Scientific). As amostras foram armazenadas em freezer (-20°C)  
9 para posterior análise.

10 Realizou-se a Análise Região Espaçadora Intergênica Ribossomal  
11 (*Ribossomal Intergenic Spacer Analysis*, RISA) de acordo com o protocolo  
12 descrito previamente por Borneman and Triplett (1997) [25]. O perfil da  
13 comunidade bacteriana, considerando a técnica de RISA, foi obtido por meio da  
14 amplificação do DNA com os oligonucleotídeos 1406 F (5'-TGYACACAC  
15 CGCCCGT-3') e 23Sr (5'-GGGTTBCCCCATTCRG-3') [25]. Os parâmetros  
16 para o ciclo de amplificação foram: desnaturação inicial (94°C por 2 min); 35  
17 ciclos de amplificação (94°C for 30 s; 50°C for 30 s; 72°C por 1 min) e extensão  
18 final (72°C por 5 min). A mistura para a reação de PCR-RISA foi preparada  
19 considerando-se o volume total de 50 µL: 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 µM de cada primer,  
20 200 µM de cada dNTP, 1 U Platinum Taq DNA polimerase, 1 X PCR tampão de  
21 reação e aproximadamente 10 ng de DNA genômico. Os produtos da reação  
22 de PCR foram aplicados em gel de agarose 3% e as condições para  
23 eletroforese foram 75 V, 150 mA por 180 min (6.5 V cm<sup>-1</sup>), em tampão 0.5 X  
24 TBE. A presença de amplicons em cada amostra foi observada por meio de  
25 eletroforese em gel corado com o corante Gel Red (Uniscience). O tamanho  
26 dos fragmentos amplificados e corados foi estimado utilizando-se marcadores  
27 de peso molecular (Invitrogen, SP, Brasil).

28

29

## 1 *Análise de Dados*

2

3 O padrão de distribuição de bandas e a distância de similaridade  
4 entre as amostras foram analisadas utilizando-se o programa PAST v 3.10 [26].  
5 Em uma linha correspondente a amostra cada banda gerada em uma linha  
6 correspondente à amostra foi considerada uma unidade taxonômica  
7 operacional (OTU), representada pelo peso molecular demonstrado no gel de  
8 agarose. A intensidade das bandas não foi considerada para diferenciar o  
9 padrão de “*fingerprint*” entre as amostras. Os dados foram inseridos em uma  
10 planilha de cálculo. A presença ou ausência de bandas foi codificada para uma  
11 matriz binária, onde se comparou cada “*fingerprint*”.

12 Os índices de  $\alpha$ -diversidade empregados foram riqueza (S) e  
13 dominância (D). A riqueza (S) representa o número de espécies dentro de uma  
14 unidade de estudo. Os valores para dominância (D) representam quanto uma  
15 ou poucas espécies dominam a comunidade microbiana. A diversidade das  
16 comunidades microbianas foi determinada por meio do índice de Shannon (H).  
17 Esse índice considera o grau de uniformidade na abundância das espécies. A  
18 diversidade máxima para este índice seria quando todas as espécies tivessem  
19 igual abundância. O índice de Chao-1 foi empregado para descrever a riqueza  
20 das comunidades microbianas presentes na amostra. Empregou-se o pacote  
21 estatístico GraphPad Prism 3.0 para avaliar as diferenças estatísticas entre os  
22 índices de diversidade dos grupos.

23 A análise de  $\beta$ -diversidade incluiu o agrupamento das conforme o  
24 algoritmo de agrupamento em pares sem peso com média aritmética  
25 (Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Average, UPGMA), amostras  
26 e a métrica de similaridade adotada foi o índice de Bray-Curtis. A análise  
27 multivariada de coordenadas principais (Principal Coordinate Analysis, PCoA)  
28 foi empregada para complementar a descrição do agrupamento das amostras.

29

1 **Resultados**

2

3 A **Tabela 1** apresenta os dados demográficos, clínicos e  
 4 radiográficos coletados dos participantes, bem como a condição do canal  
 5 radicular no momento da coleta. Dos oito participantes, três utilizaram  
 6 antibiótico nos três meses prévios à coleta das amostras (P1, P3 e P8).

7

8 **Tabela 1.** Dados demográficos e condições clínicas correspondentes aos  
 9 participantes do estudo.

10

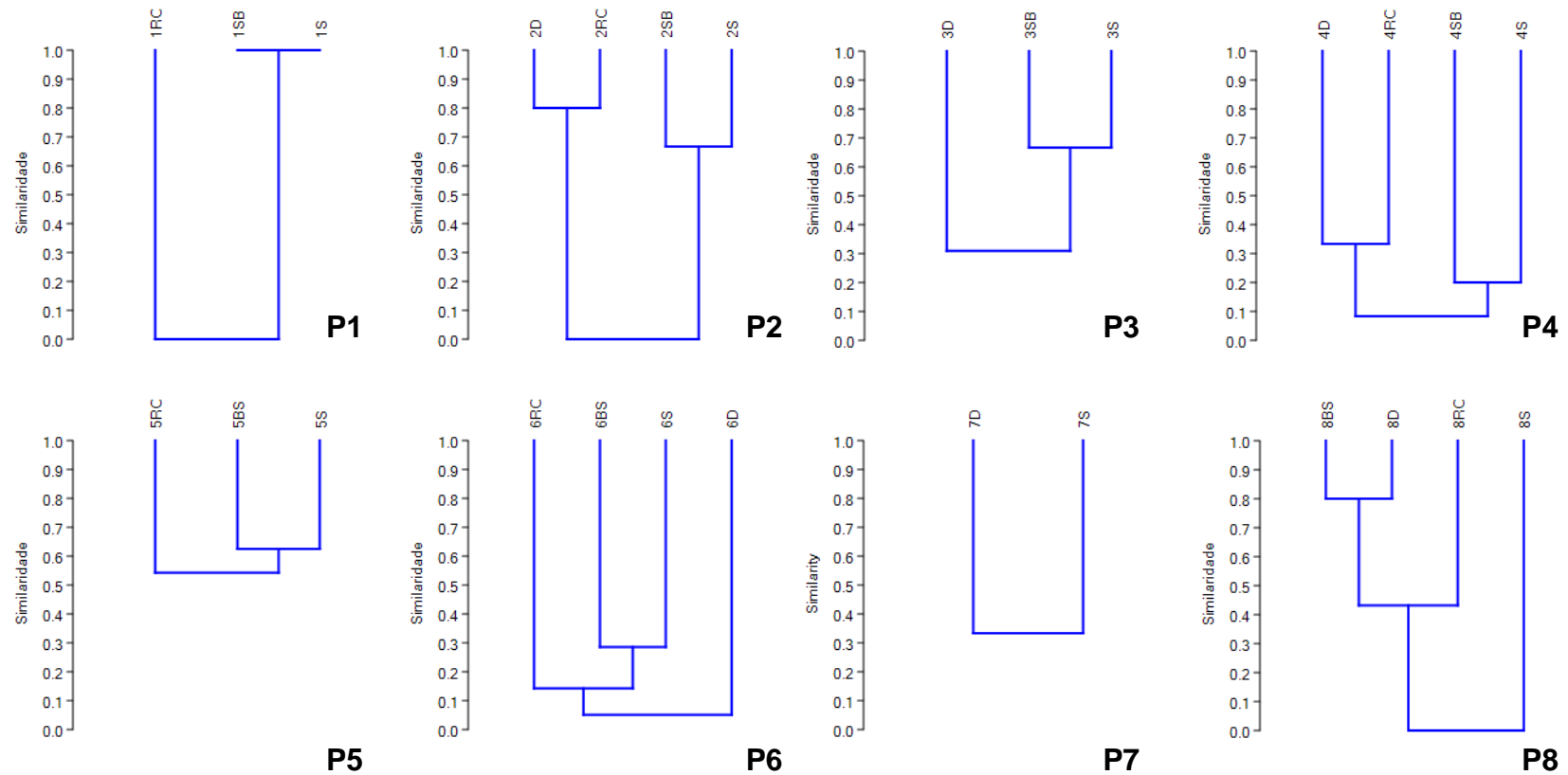
	Antibiótico há menos de 3 meses (G1)	Antibiótico há mais de 3 meses (G2)
<b>Número de participantes</b>	3	5
<b>Sexo</b>		
Feminino	1	2
Masculino	2	3
<b>Idade média (em anos)</b>	5,3	6,4
<b>Dor espontânea</b>	2	0
<b>Edema</b>	1	0
<b>Mobilidade</b>	1	0
<b>Condição da coroa</b>		
Cárie	3	5
<b>Necrose pulpar</b>	3	5
<b>Achados radiográficos</b>		
Radiolucidez na furca	1	1
Reabsorção radicular		
Ausente	1	3
< 1/3	2	2
> 1/3	0	0
Integridade da cripta	2	4
<b>Condição do canal</b>		
Seco	1	1
Úmido	2	4
Exsudato sanguinolento	2	4
Pus	0	0
Exsudato claro	0	0

11

12 As amostras 1D, 3RC, 5D, 7SB, 7RC demonstraram bandas  
 13 relativas à presença de bactéria (gene 16S rRNA), porém não geraram  
 14 múltiplas bandas após amplificação com o conjunto de oligonucleotídeos

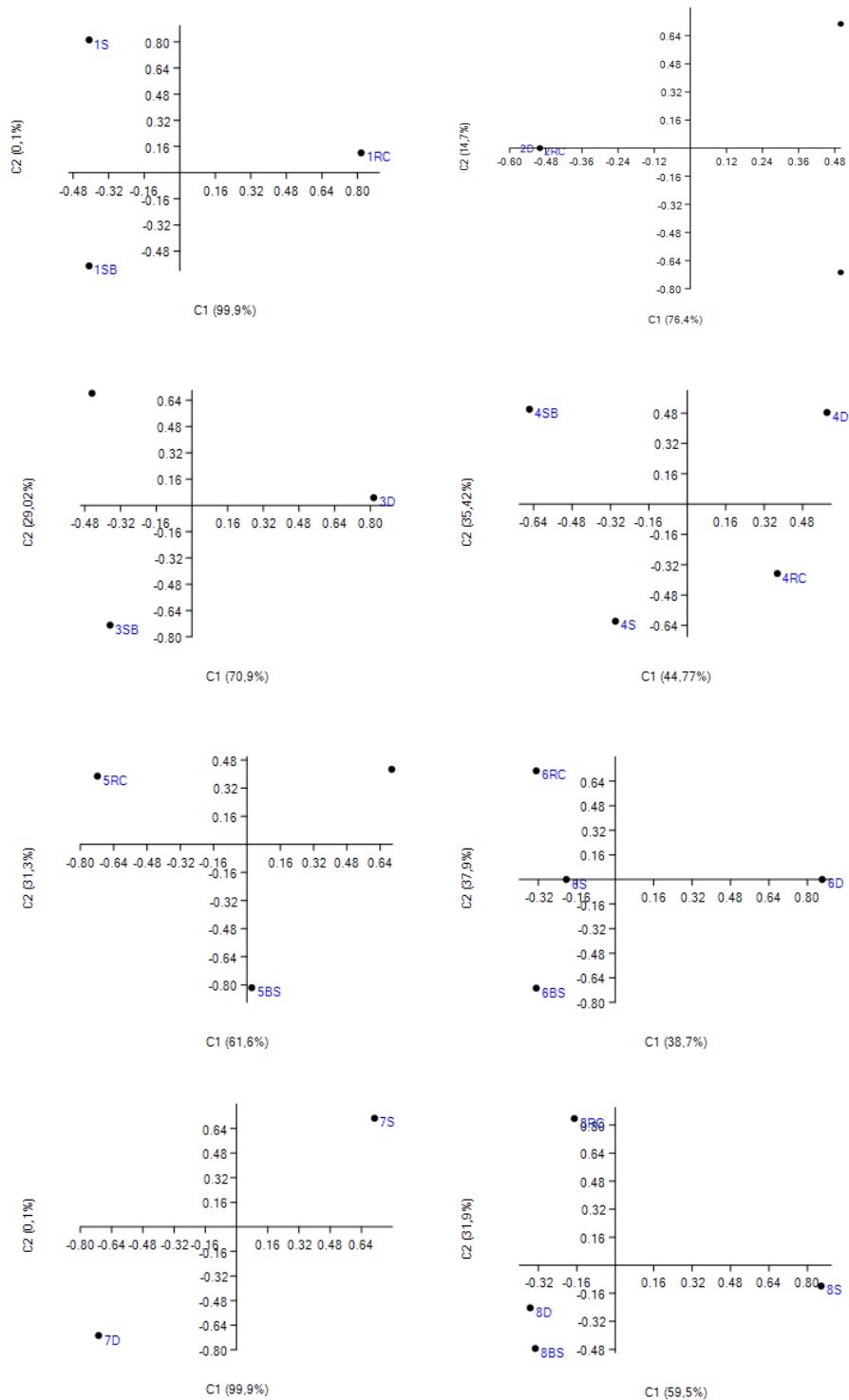
1 empregados na técnica de RISA. Não se observou amplificação de DNA  
2 bacteriano nas amostras coletadas do campo operatório após a desinfecção.

3           As **Figuras 1 e 2** demonstram a similaridade das amostras quanto à  
4 presença de espécies bacterianas, representadas pela construção de  
5 dendogramas e pela análise de coordenadas principais, respectivamente.  
6 Constata-se um baixo grau de agrupamento entre as amostras de diferentes  
7 ecossistemas, em um mesmo participante. Quando presentes, os  
8 agrupamentos acontecem para sítios contíguos, mas com pequena  
9 semelhança para o percentual de similaridade. Assim, cada sítio, em um  
10 mesmo paciente, parece ter uma composição microbiana única.



**Figura 1.** Análise de dendogramas para similaridade das amostras quanto à presença de espécies bacterianas (método RISA), considerando-se os sítios bucais de um mesmo participante. Análise de conglomerados, com agrupamento clássico, com método UPMGA e índice de similaridade de Bray-Curtis; Coeficientes cofenéticos: P1 = 1; P2 = 1; P3= 0,867; P4 = 0,8825; P5 = 0,8423; P6 = 0,8635; P7 = 0,9912; P8 = 0,9945. Análises feitas no software PAST 3.0.

1

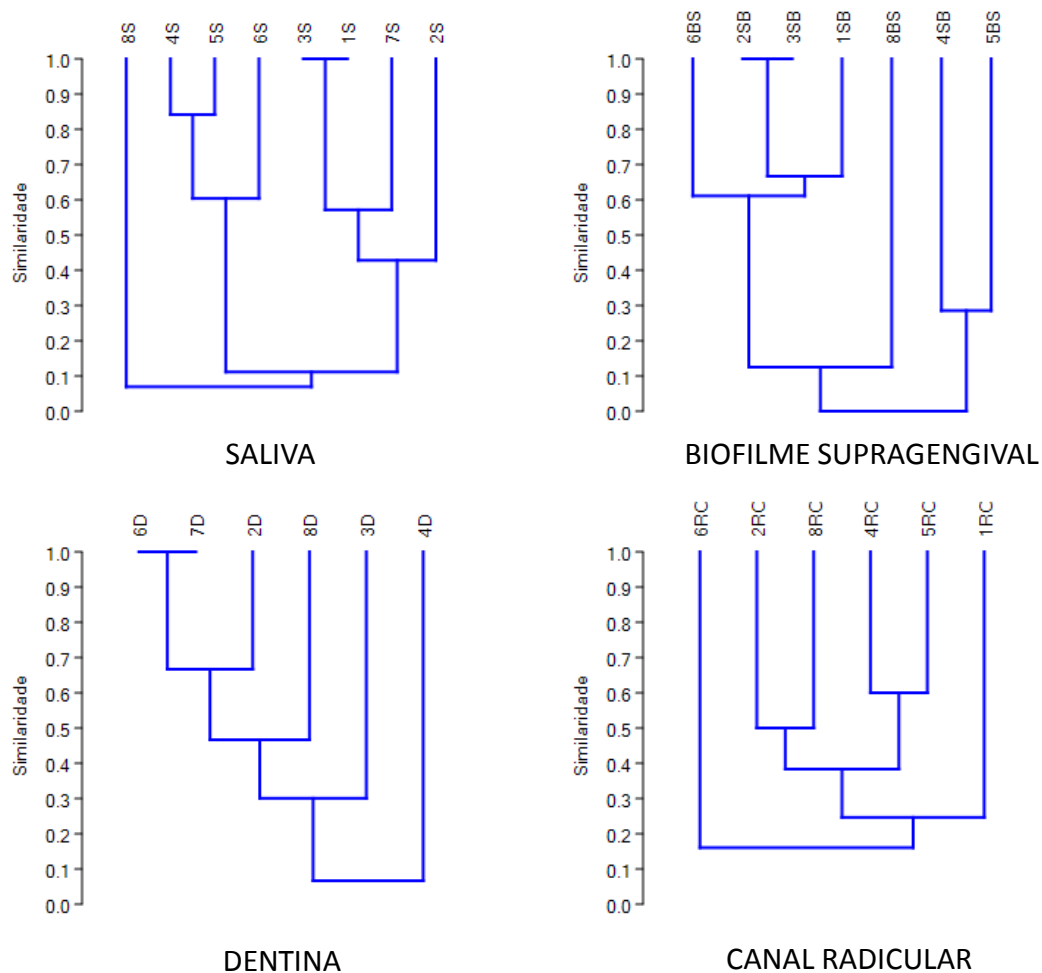


2

3 **Figura 2.** Análise multivariada ordenativa de coordenadas principais para similaridade das  
 4 amostras de um mesmo paciente quanto à presença de espécies bacterianas (método RISA).  
 5 (Índice de similaridade de Bray-Curtis). Análises feitas no software PAST 3.0.



1 A **Figura 3** ilustra por meio de dendogramas o grau de similaridade das  
 2 amostras de um mesmo ecossistema, mas que pertencem a participantes diferentes.  
 3 Identificou-se que amostras de um mesmo ecossistema mas obtidas de diferentes  
 4 pacientes abrigam comunidades bacterianas diferentes, com baixa similaridade.



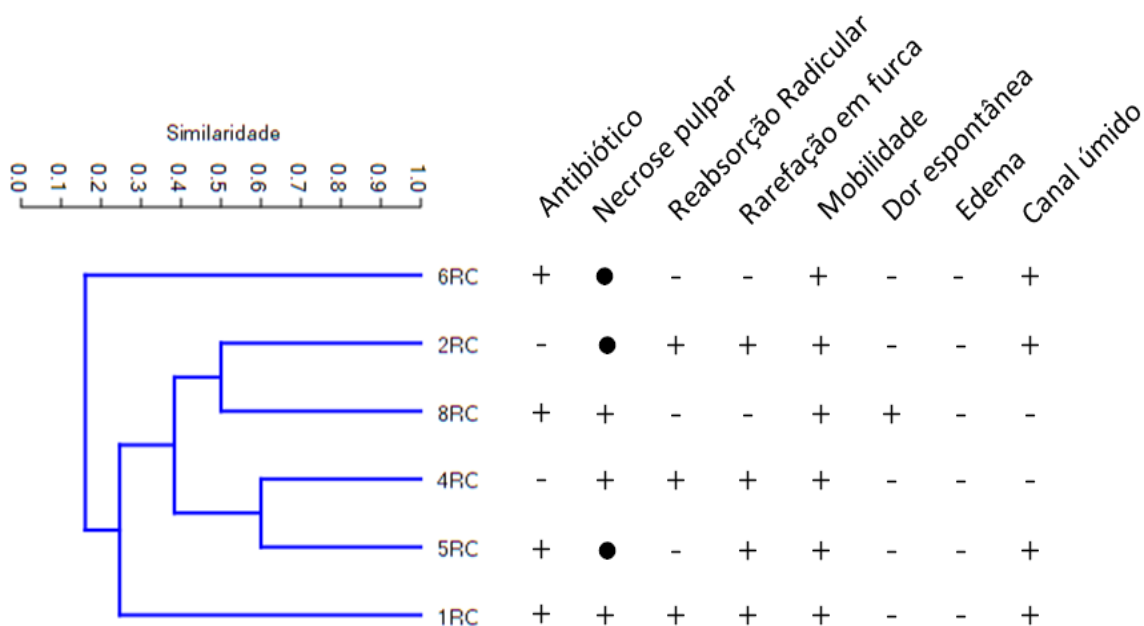
5  
 6 **Figura 3.** Análise de dendogramas para similaridade das amostras de um mesmo sítio bucal,  
 7 quanto à presença de espécies bacterianas (método RISA), considerando-se os diferentes  
 8 participantes. Análise de conglomerados, com agrupamento clássico, com método UPMGA e  
 9 índice de similaridade de Bray-Curtis; Coeficientes cofenéticos: Saliva = 0,933; Biofilme  
 10 supragengival = 0,9518; Dentina = 0,9447; Canal radicular: 0,6471. Análises feitas no software  
 11 PAST 3.0.

12

13

14

1  
2 Na **Figura 4** está representado o dendograma gerado a partir do  
3 agrupamento, conforme a similaridade observada nas amostras coletadas de canais  
4 radiculares dos participantes, e também os sinais e sintomas clínicos associados aos  
5 dentes avaliados. Observa-se que cada canal radicular infectado abriga uma  
6 comunidade bacteriana única, com percentuais de similaridade que variam de 15% a  
7 60%. Não parece haver uma relação entre a presença de um sinal/sintoma clínico e  
8 acréscimo no perfil de similaridade das comunidades bacterianas no interior do canal  
9 radicular.



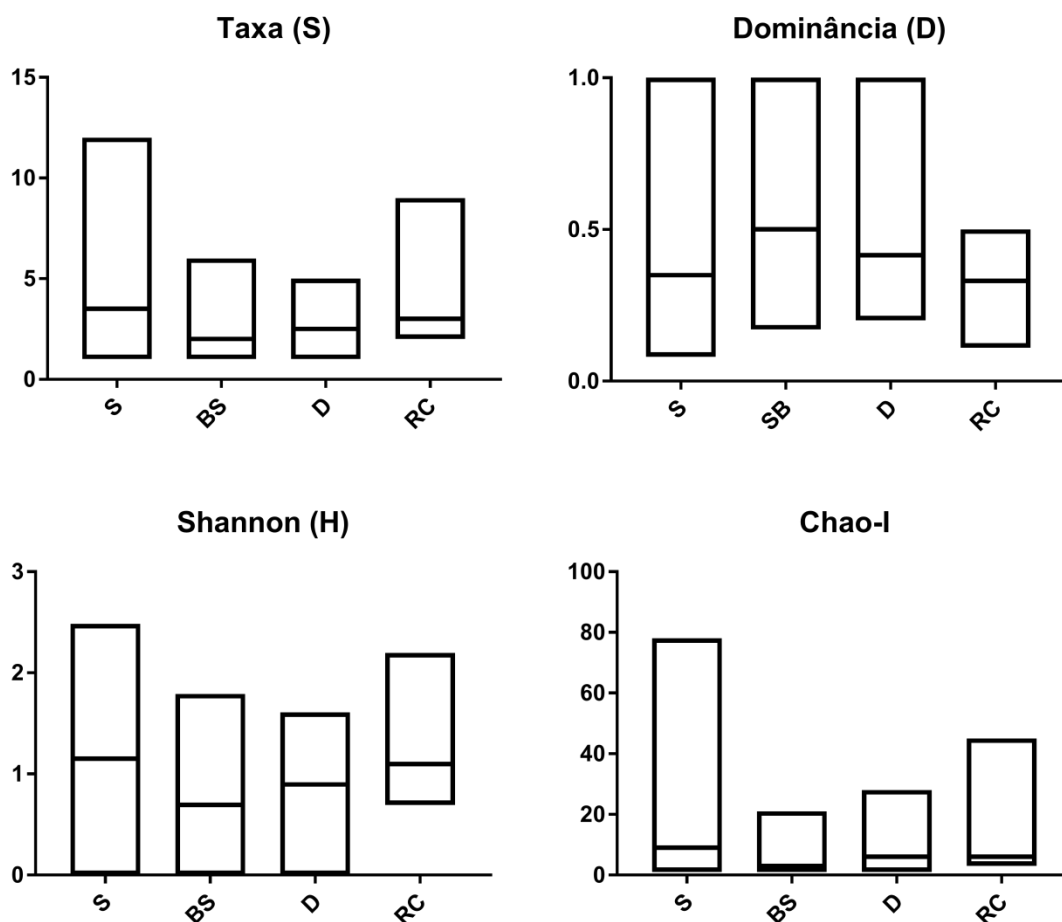
10  
11 **Figura 4.** Análise de dendogramas para similaridade das amostras de canal radicular (CR) de  
12 diferentes participantes e sinais/sintomas/achados clínicos quanto à presença de espécies  
13 bacterianas (método RISA). Análise de conglomerados, com agrupamento clássico, com  
14 método UPMGA e índice de similaridade de Bray-Curtis; Coeficiente cofenético = 0,6471.  
15 Análises feitas no software PAST 3.0.

16

17

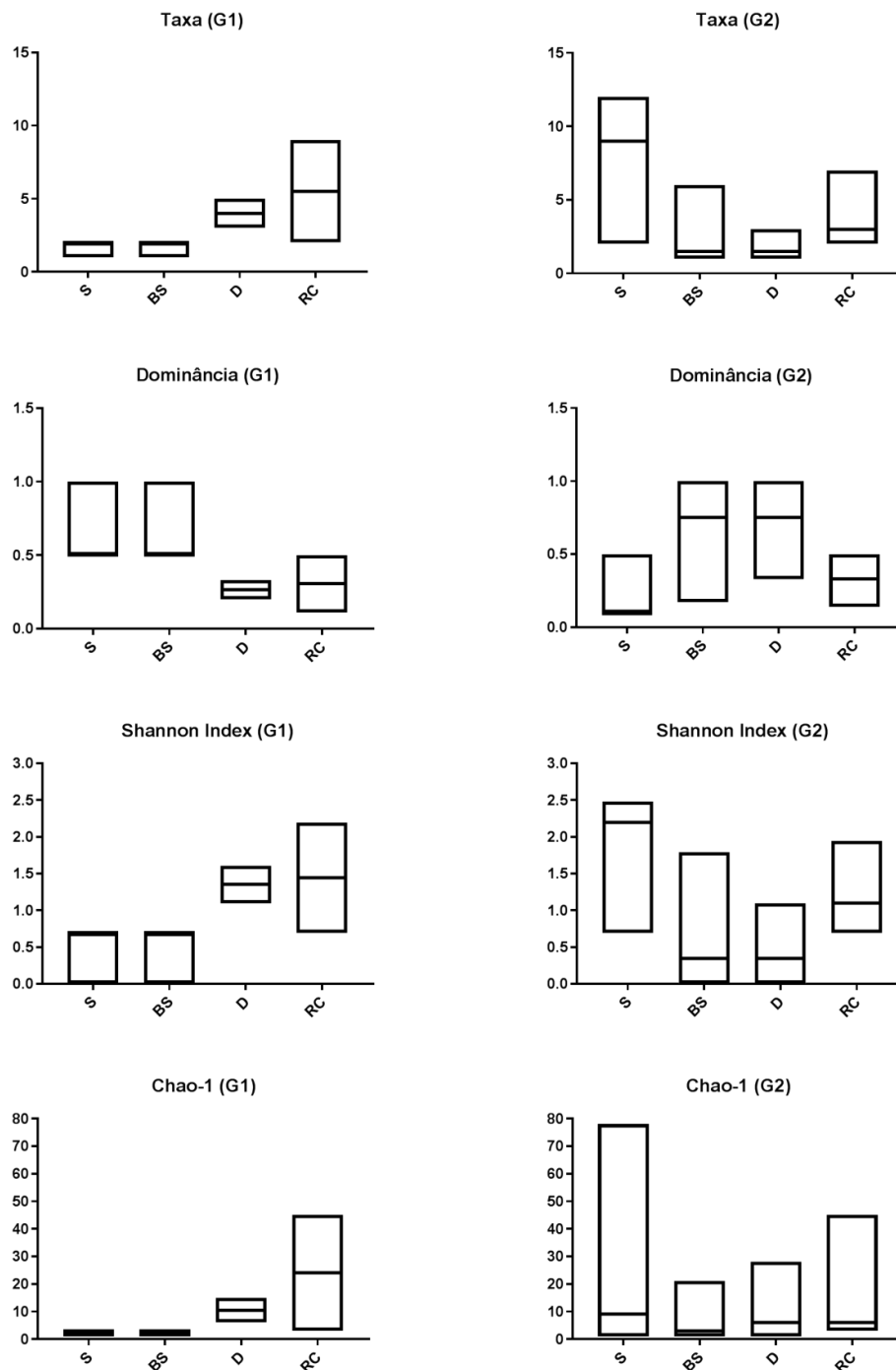
1 Os valores de riqueza (S) Dominância (D), Índice de Shannon (H) e  
 2 estimativa de riqueza de Chao-1 (Chao-1) para as amostras de S, BS, D e RC estão  
 3 representados nas **Figuras 5** e **6**. Não foram observadas diferenças estatisticamente  
 4 significativas entre os índices de alfa diversidade entre ecossistemas, mesmo quando a  
 5 análise foi realizada considerando-se o uso prévio ou não de antibiótico (**Figura 6**).

6



7  
 8 **Figura 5.** Índices de alfa-diversidade em amostras de saliva (S), biofilme supragengival (BS),  
 9 dentina (D) e canal radicular (CR) de pacientes com infecções endodônticas em dentes  
 10 decíduos. A barra presente no interior de cada caixa indica o valor da mediana de cada índice,  
 11 obtida a partir do conjunto das amostras. Não houve diferença estatisticamente significativa  
 12 entre os ecossistemas, para um mesmo índice (Teste de Kruskal Wallis, com pós-teste de  
 13 Dunn,  $P > 0,05$ ).

14



1  
 2 **Figura 6.** Índices de alfa-diversidade em amostras de saliva (S), biofilme supragengival (BS),  
 3 dentina (D) e canal radicular (CR) de pacientes com infecções endodônticas em dentes  
 4 decíduos, considerando-se o uso ou não de antibióticos (G1 e G2, respectivamente). A barra  
 5 presente no interior de cada caixa indica o valor da mediana de cada índice, obtida a partir do  
 6 conjunto das amostras. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os

1 ecossistemas, para um mesmo índice (Teste de Kruskal Wallis, com pós-teste de Dunn,  
2  $P > 0,05$ ).

### 3 **Discussão**

4  
5 A cavidade bucal é um ecossistema complexo com diferentes nichos [1–3],  
6 onde microrganismos comensais formam comunidades ora dinâmicas ora estáveis [7,  
7 8] e que, mediante mudanças ambientais, geram alterações patológicas nos tecidos  
8 moles e tecidos dentais [10]. Os biofilmes na superfície do dente, que se formam a  
9 partir de uma película adquirida colonizada por uma sucessão de microrganismos  
10 rompem a estrutura do esmalte e da dentina, originando lesões de cárie [3]. Nos dentes  
11 decíduos, a continuidade desse processo gera alterações pulpares inflamatórias  
12 reversíveis ou irreversíveis que pode culminar com a necrose pulpar. Considerando-se  
13 as peculiaridades da anatomia interna do dente decíduo, a presença da infecção na  
14 cavidade pulpar atinge não apenas a região periapical, mas principalmente a área de  
15 furca [19]. Estudos demonstram que, embora originadas da saliva, as comunidades  
16 microbianas em biofilmes supragengivais, cárie e canal radicular de dentes decíduos  
17 são distintas. Porém, não há relato na literatura que descreva a relação de similaridade  
18 entre as comunidades bacterianas em sítios contíguos, tais como saliva, biofilme  
19 supragengival, dentina cariada e canal radicular, em pacientes infantis portadores de  
20 infecções endodônticas. Considerando os achados, avaliou-se como o uso de  
21 antibiótico ou como sinais/sintomas clínicos da patologia endodôntica poderiam  
22 influenciar a composição bacteriana em ecossistemas específicos.

23 O estudo de comunidades microbianas complexas exige a utilização de  
24 métodos de diagnóstico microbiológico que permitam a ampla detecção de  
25 microrganismos, de forma não seletiva. Tradicionalmente, o cultivo de microrganismos  
26 em meios de cultura não-seletivos foram empregados [27]. Porém, sabe-se que na  
27 cavidade oral existem mais de 1000 espécies bacterianas, algumas arqueias e fungos  
28 [28], aproximadamente 60% dos microrganismos não foram cultivados ainda, ou são de  
29 difícil cultivo [29]. Assim, para a análise de amostras do ecossistema bucal, torna-se  
30 necessária a utilização de métodos moleculares de ampla detecção tais como o  
31 eletroforese em gel com gradiente de desnaturação (DGGE), análise de fragmentos

1 terminais de restrição (tRFLP), clonagem e sequenciamento de Sanger e recentemente  
2 o sequenciamento de alto rendimento. A utilização dessas técnicas pressupõe que a  
3 detecção de determinada espécie não é dependente de sua viabilidade no ecossistema  
4 ou de sua recuperação no laboratório [27].

5 No presente estudo, empregou-se a análise da região espaçadora  
6 intergênica ribossomal (*Ribossomal Intergenic Spacer Analysis*, RISA) para a  
7 caracterização do perfil bacteriano das amostras. Este método envolve a amplificação  
8 da região entre os genes que codificam as subunidades 16S e 23S do RNA ribossomal,  
9 por meio do emprego de oligonucleotídeos direcionados a regiões conservadas dos  
10 genes 16S e 23S rRNA, presentes no DNA bacteriano [30]. A região intergênica 16S-  
11 23S apresenta diferença em seu comprimento e sequência de nucleotídeos, o que pode  
12 ser empregado para distinguir as diferentes espécies [30, 31]. Obtém-se um padrão de  
13 migração de bandas em gel de agarose ou poliacrilamida (*fingerprint*), convertido para  
14 um perfil que considera a ausência ou presença de determinado comprimento de  
15 banda, representando assim a ausência ou presença de uma determinada espécie  
16 bacteriana [30]. As limitações deste método estão associadas às falhas no processo de  
17 extração de DNA, na reação de amplificação do DNA ou em uma seletividade dos  
18 oligonucleotídeos para a amplificação de fragmentos de regiões intergênicas menores  
19 [30]. Há uma tendência ao uso de técnicas de sequenciamento de alto rendimento as  
20 quais empregam plataformas que permitem a análise de milhares a milhões de  
21 moléculas de DNA simultaneamente [32]. Porém, apresentam ainda alto custo,  
22 especialmente para análise de um número extenso de amostras obtidas em estudos  
23 clínicos.

24 Os dados gerados a partir da análise laboratorial das amostras são  
25 complexos, e há necessidade do emprego de métodos matemáticos e de métricas que  
26 permitam compreender e comparar a sua diversidade [33]. No presente estudo, foram  
27 avaliadas as diversidades alfa e beta, que correspondem à diversidade bacteriana em  
28 um único sítio e às diferenças nas diversidades bacterianas entre os sítios,  
29 respectivamente [34]. Estudos que coletaram amostras da cavidade bucal de crianças  
30 também utilizaram esses métodos matemáticos e de métricas para a comparação na

1 estrutura do microbioma de saliva, biofilme supragengival e canal radicular de dentes  
2 decíduos [4, 5, 14, 20].

3           As comunidades bacterianas de S, SB, D e RC de um mesmo paciente não  
4 apresentam diferença entre si quanto à alfa diversidade. Assim, o número de diferentes  
5 espécies que as compõem, a dominância das espécies na amostra e os índices de  
6 diversidade são similares. Porém, quando são comparadas entre si, considerando sua  
7 estrutura composicional ou beta-diversidade, parecem ser distintas. Os resultados do  
8 presente estudo são consoantes com os previamente relatados na literatura.  
9 Receptores diferenciados que estão presentes em superfícies duras do dente ou em  
10 mucosas, interferências externas, fatos associados à idade e comportamentos dos  
11 pacientes contribuem para esta diferenciação [3, 7, 35]. Estudos indicam que o  
12 microbioma do biofilme supragengival em crianças parece ser mais rico que o  
13 microbioma salivar [13].

14           A utilização de agentes antimicrobianos previamente à coleta não modificou  
15 os índices de alfa e beta-diversidade, mesmo em ecossistemas mais expostos à ação  
16 dos antimicrobianos, tais como a saliva e o biofilme supragengival. O mesmo  
17 comportamento foi observado por Zaura *et al.* (2015) [36], pois 7 dias após o uso de  
18 agentes antimicrobianos sistêmicos, o microbioma salivar era similar ao observado no  
19 momento inicial do estudo. Espera-se que o efeito do agente antimicrobiano no interior  
20 da cavidade pulpar seja restrito, uma vez que foram selecionados dentes em que esta  
21 não apresentava contato direto com a cavidade bucal e não havia circulação pulpar  
22 direta no tecido necrosado.

23           Os resultados sugerem ainda que amostras de um mesmo ecossistema  
24 obtidas de diferentes participantes abrigam comunidades bacterianas diferentes, com  
25 baixa similaridade. Embora estudos indiquem que há um grupo comum de espécies na  
26 cavidade bucal de diferentes pacientes, é esperado que distintos perfis microbianos  
27 sejam identificados em cada um deles [6, 8, 37]. Estes achados podem ser estendidos  
28 para amostras de SB, D e CR. Entretanto, estudos adicionais com amostras de um  
29 mesmo paciente devem ser realizados para que sejam determinados os grupos  
30 bacterianos que constituem o núcleo comum de espécies nesses ecossistemas.

1 Um número expressivo de espécies anaeróbias estritas, anaeróbias  
2 facultativas, Gram-positivas e Gram-negativas participam da composição das  
3 comunidades bacterianas em infecções endodônticas em dentes decíduos [17, 18, 20].  
4 As análises de amostras de canais radiculares de dentes permanentes com infecções  
5 endodônticas agudas demonstraram diversidade interindividual marcante, onde cada  
6 paciente abrigava uma comunidade microbiana única [38–40]. Questiona-se a  
7 capacidade dos métodos convencionais de coleta em obter amostras individualizadas  
8 do ecossistema do canal radicular, uma vez que há contato das soluções e dos  
9 instrumentos de coleta com a câmara pulpar [41]. No presente estudo, todas as  
10 amostras foram coletadas da cavidade pulpar de dentes decíduos com necrose pulpar e  
11 não apenas do canal radicular. O objetivo foi incluir na amostra os microrganismos que  
12 estavam presentes não apenas no canal radicular mais também no soalho e região de  
13 furca. Assim, a amostra torna-se mais representativa do sistema de canais radiculares  
14 em dentes decíduos e considera as peculiaridades que o diferenciam dos dentes  
15 permanentes.

16 Observa-se que cada canal radicular infectado abriga uma comunidade  
17 bacteriana única, com percentuais de similaridade que variam de 15% a 60%. Este  
18 comportamento também foi observado por De Paula *et al.* (2014) [42]. Entretanto, não  
19 houve uma relação entre a presença de um determinado sinal/sintoma clínico e  
20 aumento no perfil de agrupamento ou similaridade das comunidades bacterianas no  
21 interior do canal radicular. Assim, sugere-se que diferentes comunidades bacterianas  
22 são a base etiológica em infecções endodônticas primárias em dentes decíduos com  
23 necrose pulpar. Sob o ponto de vista clínico, entende-se o tratamento endodôntico em  
24 dentes decíduos portadores de necrose pulpar como a utilização de protocolos que  
25 buscam a desestruturação das comunidades microbianas que, mesmo com  
26 características distintas, são passíveis de controle por meio dos protocolos de  
27 desinfecção do sistema de canais radiculares.

28 Após a análise microbiológica das comunidades bacterianas em amostras de  
29 saliva, biofilme supragengival, dentina e câmara pulpar de dentes decíduos de  
30 pacientes portadores de infecções endodônticas, sugere-se que cada ecossistema



1 apresenta perfil composicional diferenciado, mesmo pertencendo a um mesmo  
2 participante. Análises adicionais devem ser conduzidas com o intuito de caracterizar os  
3 microrganismos compartilhados por esses ecossistemas e as integrações de suas vias  
4 metabólicas e de patogenicidade.

5

## 6 **Referências**

7

- 8 1. Tlaskalová-Hogenová H, Stepánková R, Hudcovic T, *et al.* (2004) Commensal  
9 bacteria (normal microflora), mucosal immunity and chronic inflammatory and  
10 autoimmune diseases. *Immunol Lett* 93:97–108 . doi: 10.1016/j.imlet.2004.02.005
- 11 2. Dewhirst FE, Chen T, Izard J, *et al.* (2010) The human oral microbiome. *J Bacteriol*  
12 192:5002–5017 . doi: 10.1128/JB.00542-10
- 13 3. Marsh PD, Percival RS (2006) The oral microflora--friend or foe? Can we decide? *Int*  
14 *Dent J* 56:233–239
- 15 4. Drell T, Štšepetova J, Simm J, *et al.* (2017) The Influence of Different Maternal  
16 Microbial Communities on the Development of Infant Gut and Oral Microbiota. *Sci*  
17 *Rep* 7:9940 . doi: 10.1038/s41598-017-09278-y
- 18 5. Lif Holgerson P, Öhman C, Rönnlund A, Johansson I (2015) Maturation of Oral  
19 Microbiota in Children with or without Dental Caries. *PloS One* 10:e0128534 . doi:  
20 10.1371/journal.pone.0128534
- 21 6. Costello EK, Stagaman K, Dethlefsen L, *et al.* (2012) The application of ecological  
22 theory toward an understanding of the human microbiome. *Science* 336:1255–1262  
23 . doi: 10.1126/science.1224203
- 24 7. Xu X, He J, Xue J, *et al.* (2015) Oral cavity contains distinct niches with dynamic  
25 microbial communities. *Environ Microbiol* 17:699–710 . doi: 10.1111/1462-  
26 2920.12502
- 27 8. Hall MW, Singh N, Ng KF, *et al.* (2017) Inter-personal diversity and temporal  
28 dynamics of dental, tongue, and salivary microbiota in the healthy oral cavity. *NPJ*  
29 *Biofilms Microbiomes* 3:2 . doi: 10.1038/s41522-016-0011-0
- 30 9. Adler CJ, Dobney K, Weyrich LS, *et al.* (2013) Sequencing ancient calcified dental  
31 plaque shows changes in oral microbiota with dietary shifts of the Neolithic and  
32 Industrial revolutions. *Nat Genet* 45:450–455, 455e1 . doi: 10.1038/ng.2536

- 1 10. Roberts FA, Darveau RP (2015) Microbial Protection and Virulence in Periodontal  
2 Tissue as a Function of Polymicrobial Communities: Symbiosis and Dysbiosis.  
3 *Periodontol* 2000 69:18–27 . doi: 10.1111/prd.12087
- 4 11. Kumar PS, Leys EJ, Bryk JM, *et al.* (2006) Changes in periodontal health status are  
5 associated with bacterial community shifts as assessed by quantitative 16S cloning  
6 and sequencing. *J Clin Microbiol* 44:3665–3673 . doi: 10.1128/JCM.00317-06
- 7 12. Kolenbrander PE (2011) Multispecies communities: interspecies interactions  
8 influence growth on saliva as sole nutritional source. *Int J Oral Sci* 3:49–54 . doi:  
9 10.4248/IJOS11025
- 10 13. Ren W, Zhang Q, Liu X, *et al.* (2017) Exploring the oral microflora of preschool  
11 children. *J Microbiol Seoul Korea* 55:531–537 . doi: 10.1007/s12275-017-6474-8
- 12 14. Richards VP, Alvarez AJ, Luce AR, *et al.* (2017) Microbiomes of Site-Specific Dental  
13 Plaques from Children with Different Caries Status. *Infect Immun* 85: . doi:  
14 10.1128/IAI.00106-17
- 15 15. Brustolin JP, Mariath AAS, Ardenghi TM, Casagrande L (2017) Survival and Factors  
16 Associated with Failure of Pulpectomies Performed in Primary Teeth by Dental  
17 Students. *Braz Dent J* 28:121–128 . doi: 10.1590/0103-6440201601009
- 18 16. Krisdapong S, Prasertsom P, Rattananangsim K, Sheiham A (2013) School  
19 absence due to toothache associated with sociodemographic factors, dental caries  
20 status, and oral health-related quality of life in 12- and 15-year-old Thai children. *J*  
21 *Public Health Dent* 73:321–328 . doi: 10.1111/jphd.12030
- 22 17. Ito IY, Junior FM, Paula-Silva FWG, *et al.* (2011) Microbial culture and checkerboard  
23 DNA-DNA hybridization assessment of bacteria in root canals of primary teeth pre-  
24 and post-endodontic therapy with a calcium hydroxide/chlorhexidine paste. *Int J*  
25 *Paediatr Dent* 21:353–360 . doi: 10.1111/j.1365-263X.2011.01131.x
- 26 18. Ruvierre DB, Leonardo MR, da Silva LAB, *et al.* (2007) Assessment of the microbiota  
27 in root canals of human primary teeth by checkerboard DNA-DNA hybridization. *J*  
28 *Dent Child Chic Ill* 74:118–123
- 29 19. Gomes GB, Sarkis-Onofre R, Bonow MLM, *et al.* (2013) An investigation of the  
30 presence of specific anaerobic species in necrotic primary teeth. *Braz Oral Res*  
31 27:149–155
- 32 20. Yun KH, Lee H-S, Nam OH, *et al.* (2017) Analysis of bacterial community profiles of  
33 endodontically infected primary teeth using pyrosequencing. *Int J Paediatr Dent*  
34 27:56–65 . doi: 10.1111/ipd.12226

- 1 21. Siqueira JF, Rôças IN (2009) Community as the unit of pathogenicity: an emerging  
2 concept as to the microbial pathogenesis of apical periodontitis. *Oral Surg Oral Med*  
3 *Oral Pathol Oral Radiol Endod* 107:870–878 . doi: 10.1016/j.tripleo.2009.01.044
- 4 22. Jenkinson HF, Lamont RJ (2005) Oral microbial communities in sickness and in  
5 health. *Trends Microbiol* 13:589–595 . doi: 10.1016/j.tim.2005.09.006
- 6 23. Sreenivasan PK, Haraszthy VI, Zambon JJ (2011) The effect of a microbead  
7 dentifrice on microbial load in oral microenvironments. *Int J Dent Hyg* 9:136–142 .  
8 doi: 10.1111/j.1601-5037.2010.00465.x
- 9 24. Papapostolou A, Kroffke B, Tatakis DN, *et al.* (2011) Contribution of host genotype  
10 to the composition of health-associated supragingival and subgingival microbiomes.  
11 *J Clin Periodontol* 38:517–524 . doi: 10.1111/j.1600-051X.2011.01718.x
- 12 25. Borneman J, Triplett EW (1997) Molecular microbial diversity in soils from eastern  
13 Amazonia: evidence for unusual microorganisms and microbial population shifts  
14 associated with deforestation. *Appl Environ Microbiol* 63:2647–2653
- 15 26. Hammer O, Harper DAT, Ryan PD (2001) PAST: Paleontological statistics software  
16 package for education and data analysis. *Paleontol Electron* 4:9
- 17 27. Siqueira JF, Rôças IN (2005) Exploiting molecular methods to explore endodontic  
18 infections: Part 1--current molecular technologies for microbiological diagnosis. *J*  
19 *Endod* 31:411–423
- 20 28. Wade WG (2013) The oral microbiome in health and disease. *Pharmacol Res*  
21 69:137–143 . doi: 10.1016/j.phrs.2012.11.006
- 22 29. Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, *et al.* (2005) Defining the normal bacterial flora of the  
23 oral cavity. *J Clin Microbiol* 43:5721–5732 . doi: 10.1128/JCM.43.11.5721-  
24 5732.2005
- 25 30. Fisher MM, Triplett EW (1999) Automated approach for ribosomal intergenic spacer  
26 analysis of microbial diversity and its application to freshwater bacterial  
27 communities. *Appl Environ Microbiol* 65:4630–4636
- 28 31. Jensen MA, Webster JA, Straus N (1993) Rapid identification of bacteria on the  
29 basis of polymerase chain reaction-amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms.  
30 *Appl Environ Microbiol* 59:945–952
- 31 32. Siqueira JF, Fouad AF, Rôças IN (2012) Pyrosequencing as a tool for better  
32 understanding of human microbiomes. *J Oral Microbiol* 4: . doi:  
33 10.3402/jom.v4i0.10743

- 1 33. Purvis A, Hector A (2000) Getting the measure of biodiversity. *Nature* 405:212–219 .  
2 doi: 10.1038/35012221
- 3 34. Whittaker R (1972) Evolution and measurement of species diversity. *Taxon* 21:213–  
4 251
- 5 35. Zhou Y, Mihindukulasuriya KA, Gao H, *et al.* (2014) Exploration of bacterial  
6 community classes in major human habitats. *Genome Biol* 15:R66 . doi: 10.1186/gb-  
7 2014-15-5-r66
- 8 36. Zaura E, Brandt BW, Teixeira de Mattos MJ, *et al.* (2015) Same Exposure but Two  
9 Radically Different Responses to Antibiotics: Resilience of the Salivary Microbiome  
10 versus Long-Term Microbial Shifts in Feces. *mBio* 6:e01693-01615 . doi:  
11 10.1128/mBio.01693-15
- 12 37. Zaura E, Keijser BJJ, Huse SM, Crielaard W (2009) Defining the healthy “core  
13 microbiome” of oral microbial communities. *BMC Microbiol* 9:259 . doi:  
14 10.1186/1471-2180-9-259
- 15 38. Montagner F, Gomes BPFA, Kumar PS (2010) Molecular fingerprinting reveals the  
16 presence of unique communities associated with paired samples of root canals and  
17 acute apical abscesses. *J Endod* 36:1475–1479 . doi: 10.1016/j.joen.2010.06.004
- 18 39. Montagner F, Jacinto RC, Signoretti FGC, *et al.* (2012) Clustering behavior in  
19 microbial communities from acute endodontic infections. *J Endod* 38:158–162 . doi:  
20 10.1016/j.joen.2011.09.029
- 21 40. Hsiao WW, Li KL, Liu Z, *et al.* (2012) Microbial transformation from normal oral  
22 microbiota to acute endodontic infections. *BMC Genomics* 13:345 . doi:  
23 10.1186/1471-2164-13-345
- 24 41. Figdor D, Brundin M (2016) Contamination Controls for Analysis of Root Canal  
25 Samples by Molecular Methods: An Overlooked and Unsolved Problem. *J Endod*  
26 42:1003–1008 . doi: 10.1016/j.joen.2016.04.015
- 27 42. de Paula VAC, de Carvalho Ferreira D, Cavalcante FS, *et al.* (2014) Clinical signs  
28 and bacterial communities of deciduous necrotic root canals detected by PCR-  
29 DGGE analysis: research association. *Arch Oral Biol* 59:848–854 . doi:  
30 10.1016/j.archoralbio.2014.05.012

31

32

1 **CAPÍTULO 3**

2

3

4 **Presença de genes de resistência a antimicrobianos em ecossistemas bucais de**  
5 **crianças com infecções endodônticas**

6

7 Naelka Sarmiento <sup>1</sup>

8 Luciano Casagrande <sup>2</sup>

9 Maria Beatriz Cardoso Ferreira <sup>3</sup>

10 Francisco Montagner <sup>4</sup>

11

12 <sup>1</sup> Aluna do Programa de Pós-graduação em Odontologia, Faculdade de Odontologia,  
13 Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Porto Alegre, RS, Brasil)

14 <sup>2</sup> Professor Adjunto, Departamento de Cirurgia e Ortopedia, Faculdade de Odontologia,  
15 Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Porto Alegre, RS, Brasil).

16 <sup>3</sup> Professora Titular, Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Básicas da  
17 Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Porto Alegre, RS, Brasil)

18 <sup>4</sup> Professor Adjunto, Departamento de Odontologia Conservadora, Faculdade de  
19 Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Porto Alegre, RS, Brasil).

20

21 Autor Correspondente

22 Prof Dr Francisco Montagner  
23 Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
24 Faculdade de Odontologia  
25 Rua Ramiro Barcelos, 2492.  
26 Bairro Santana – Porto Alegre, RS – Brasil.  
27 CEP 90035-003  
28 E-mail: [francisco.montagner@ufrgs.br](mailto:francisco.montagner@ufrgs.br)  
29 Telefone: +55 51 98137 2933

30

31 Artigo a ser submetido à revista *Clinical Oral Investigation* (Qualis A1 CAPES).

32

## 1 RESUMO

2

3 *Objetivos* – verificar a distribuição dos genes de resistência bacteriana aos principais  
4 grupos de antibióticos em saliva, biofilme supragengival, dentina e canal radicular de  
5 dentes decíduos em pacientes infantis com infecções endodônticas e também de  
6 amostras de saliva dos responsáveis.

7 *Material e Métodos* – amostras de saliva (S), biofilme supragengival (SB), dentina (D),  
8 canal radicular (RC) de pacientes infantis e saliva do responsável (R) foram coletadas.  
9 A presença dos genes de resistência *cfxA/cfxA2*, *bla*TEM, *bla*Z, *ampC*, *mecA*, *mefA*,  
10 *ermB*, *ermC*, *tetQ*, *tetM*, *tetW*, *linB*, *IsaB* foi determinada por meio de PCR gene  
11 específico. Realizou-se análise estatística descritiva e análise multivariada de  
12 conglomerados (método UPGMA e índice de Similaridade de Bray-Curtis).

13 *Resultados* – Foram selecionados oito pacientes, com idade entre 3 e 6 anos, sendo  
14 que 3 utilizaram antibiótico previamente à coleta. Nenhum gene de resistência foi  
15 observado em todos os ecossistemas de um mesmo participante. Os genes mais  
16 frequentemente detectados foram os genes de resistência à tetraciclina *tetQ* e *tetW*.  
17 Não foram detectados nas amostras os genes *ampC*, *mecA*, *InuB* e *IsaB*. A presença  
18 simultânea de um gene em dois nichos ocorre em ecossistemas contíguos. Não se  
19 observa um comportamento uniforme quanto ao perfil de agrupamento de diferentes  
20 amostras de um mesmo participante, e nem entre as amostras de saliva do participante  
21 infantil (S) e seu responsável (R).

22 *Conclusões* – Há múltiplos perfis de distribuição de genes de resistência a agentes  
23 antimicrobianos em amostras de ecossistemas bucais contíguos em um mesmo  
24 paciente portador de infecção endodôntica.

25 *Relevância clínica* – Considerando-se as altas taxas de resistência bacteriana aos  
26 antibióticos frequentemente prescritos, é importante conhecer a distribuição de genes  
27 associados à resistência em amostras da cavidade bucal de pacientes com infecções  
28 endodônticas, pois podem interferir no tratamento e prognóstico desses dentes.

29

30 **Palavras-chaves:** boca, cavidade pulpar, infecção, antibacterianos, resistência a  
31 medicamentos, reação em cadeia da polimerase.

32

## 1 **Introdução**

2

3 A utilização excessiva de agentes antimicrobianos favorece o surgimento e a  
4 dispersão da resistência bacteriana. Há um esforço liderado pela Organização Mundial  
5 da Saúde para implementar um plano de ação global com o objetivo de reduzir as taxas  
6 de resistência aos agentes antimicrobianos, especialmente antibacterianos [1]. O uso  
7 racional de antibióticos deve abranger abordagens que atinjam não apenas os  
8 prescritores, mas também os dispensadores de medicamentos e a população [2–5].  
9 Após análise de banco de dados do sistema público de saúde da Holanda, observou-se  
10 que 1/5 da população do país recebeu antibióticos no período de 2010-2013,  
11 especialmente os idosos, as mulheres e as crianças menores de 5 anos [6]. Em 2013,  
12 66,8 milhões de prescrições de antimicrobianos foram dispensadas por pediatras ou  
13 médicos da família para crianças com menos de 19 anos nos Estados Unidos [7]. Em  
14 um estudo na Itália, 47% das crianças avaliadas receberam prescrições de agentes  
15 antimicrobianos, tanto para situações de profilaxia ou para tratamento de infecções,  
16 especialmente relacionadas ao trato respiratório inferior [8].

17 Há poucas informações na literatura relacionada aos padrões de prescrição  
18 de agentes antimicrobianos por cirurgiões-dentistas, especialmente aquelas  
19 direcionadas ao paciente infantil. Embora o percentual de prescrições de antibióticos  
20 realizadas por médicos tenha reduzido 18% ao longo de 17 anos, Marra *et al.* (2016)  
21 [9] observaram que a contribuição dos cirurgiões-dentistas no número de prescrições  
22 de antibióticos aumentou de 6,7% para 11,3% na Colúmbia Britânica, Canadá. Roberts  
23 *et al.* (2017) [10] indicaram que a taxa de prescrição de antibióticos por cirurgiões-  
24 dentistas foi de 77,5 para cada 1000 habitantes no ano de 2013, sendo composta  
25 principalmente por penicilinas. Observa-se na literatura dados que sugerem que os  
26 pacientes utilizam antibióticos antes de procurarem atendimento odontológico de  
27 urgência [11], e também recebem prescrições após tratamento local para o controle da  
28 infecção [11, 12]. De acordo com a Academia Americana de Odontopediatria (2006)  
29 [13], antibióticos estão indicados especialmente para o tratamento de infecções dentais  
30 nas quais os pacientes apresentam aumento de volume, em conjunto com outras

1 medidas para controle da infecção, tais como tratamento endodôntico ou extração  
2 dental.

3 Estudos recentes indicam que a administração de antibióticos sistêmicos  
4 pode alterar a composição e comportamento das comunidades microbianas em  
5 diferentes ecossistemas do organismo em humanos, especialmente no intestino e na  
6 saliva [14–17]. Zaura *et al.* (2015) [17] demonstraram que o microbioma salivar parece  
7 sofrer alterações composicionais mais breves que o microbioma intestinal,  
8 demonstrando capacidade de resiliência. Porém, após o uso, uma tendência à proteção  
9 contra antibióticos foi observada, evidenciada pela presença mais intensa de fatores de  
10 virulência bacterianos associados ao desenvolvimento de resistência [17]. Sabe-se que  
11 os microrganismos presentes na cavidade bucal são usualmente comensais, porém  
12 tornam-se patogênicos quando há alteração no ecossistema, apresentando potencial  
13 para causar doenças associadas ao biofilme dental, tais como doença periodontal, cárie  
14 e infecções no sistema de canais radiculares [18]. Quando presentes em um  
15 determinado ecossistema, os microrganismos carregam consigo seus fatores de  
16 virulência e podem expressá-los, contribuindo para que sua patogenicidade seja  
17 potencializada. Em uma revisão sistemática da literatura, Moraes *et al.* (2015) [19]  
18 indicaram que genes de resistência a antibióticos, principalmente relacionados aos  
19 grupos dos lactâmicos e das tetraciclinas, têm sido detectados em amostras de  
20 diferentes ecossistemas da cavidade bucal.

21 Considerando-se o reduzido número de estudos que avaliam a composição  
22 microbiana em ecossistemas da cavidade bucal de crianças e a presença de fatores de  
23 virulência associados, há necessidade de se conhecer a distribuição dos genes de  
24 resistência bacteriana aos principais grupos de antibióticos em saliva, biofilme  
25 supragengival, dentina e canal radicular de pacientes infantis com infecções  
26 endodônticas e também de amostras de saliva dos responsáveis.

27

## 28 **Material e Métodos**

29



1 Este estudo foi aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa da  
2 Universidade do Estado do Amazonas (Manaus, AM, Brasil) e da Universidade Federal  
3 do Rio Grande do Sul (Porto Alegre, RS, Brasil) (CAAE 47029015.6.0000.5016). Após a  
4 apresentação do estudo e tendo suas dúvidas esclarecidas, os responsáveis pelo  
5 paciente infantil assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido relativo à  
6 sua participação e um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido relativo à  
7 participação do paciente infantil. Garantiu-se ao participante infantil que expressasse  
8 seu assentimento quanto a sua participação no estudo.

9 Foram convidados a participar do estudo oito pacientes infantis, de 3 a 10  
10 anos, de ambos os sexos, e seus responsáveis maiores de 18 anos, que procuraram  
11 atendimento odontológico na Policlínica de Odontologia da Universidade do Estado do  
12 Amazonas (UEA, Manaus, AM, Brasil). Os participantes não poderiam apresentar  
13 alteração sistêmica crônica, tais como diabetes ou alteração imunológica. Os critérios  
14 de inclusão foram: presença de alteração endodôntica em um dente decíduo; ausência  
15 de tratamento endodôntico anterior; presença de cárie, sem que houvesse exposição  
16 direta da câmara pulpar ao ecossistema bucal; raízes dentais intactas ou com menos  
17 de 2/3 de reabsorção; presença ou ausência de rarefação apical ou na região de furca.  
18 Amostra de apenas um dente por participante infantil foi coletada. Os participantes  
19 responsáveis pelo paciente não poderiam ter utilizado agente antimicrobiano nos três  
20 meses anteriores à realização do estudo.

21 Amostras de saliva não estimulada foram coletadas do paciente infantil (S) e  
22 do responsável (R). O participante foi instruído a cuspir dentro do frasco plástico  
23 (CRAL, Artigos para Laboratório Ltda, Cotia, SP, Brasil), por 1 minuto [20]. Amostras de  
24 biofilme supragengival (SB) foram coletadas do paciente infantil, utilizando-se  
25 micropincel esterilizado (Colténe Brasil, Vigodent Indústria e Comércio, Rio de Janeiro,  
26 RJ, Brasil) [21]. A coleta das amostras de dentina (D) e do canal radicular (RC) foram  
27 realizadas sob isolamento absoluto, o qual foi desinfetado com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% por 30s,  
28 seguido por de solução de NaOCl 2,5% por mais 30s. Posteriormente, utilizou-se  
29 tiosulfato de sódio 5% para inativar os agentes desinfetantes. Coletou-se uma amostra  
30 do campo operatório com swab estéril para que se controlasse a efetividade do

1 procedimento de desinfecção e remoção de DNA. Após a remoção de esmalte sem  
2 suporte, coletou-se tecido dentinário da parede circundante e pulpar da lesão de cárie  
3 com cureta de dentina esterilizada. A dentina coletada foi imediatamente acondicionada  
4 em tubos plásticos esterilizados, tipo Eppendorf. A cavidade de acesso foi preparada  
5 com brocas diamantadas de alta rotação esterilizadas sob irrigação com solução salina  
6 estéril. As amostras foram coletadas da cavidade pulpar, envolvendo a câmara pulpar e  
7 os canais radiculares. O canal mais amplo foi preenchido com solução salina estéril,  
8 seguido da fricção de uma lima tipo K #15 contra as paredes, respeitando-se o limite de  
9 2 mm aquém do comprimento aparente do dente na radiografia. Em seguida o conteúdo  
10 foi aspirado com agulha e seringa estéreis e colocado em tubos de plásticos  
11 esterilizados. Todas as amostras foram armazenadas em *freezer*, a -20°C até o seu  
12 processamento laboratorial.

13 Todos os dentes foram tratados endodonticamente. O diâmetro final da  
14 região apical determinado foi igual a uma lima tipo K 35. Utilizou-se solução de  
15 hipoclorito de sódio 1% como irrigante. A medicação intracanal empregada foi pasta de  
16 hidróxido de cálcio, por 14 dias. Na consulta seguinte, o sistema de canais radiculares  
17 foi obturado com pasta de hidróxido de cálcio espessada com óxido de zinco  
18 (proporção em peso 3:1). Os dentes foram restaurados com ionômero de vidro  
19 modificado com resina (Vitremer, 3M ESPE, St. Paul, MN, USA) ou resina composta  
20 (Adper Single Bond and Filtek Z-350, 3M ESPE, St. Paul, MN, USA).

21 Realizou-se técnica de reação em cadeia da enzima polimerase sequência  
22 específica (PCR primer específico) para determinar a presença dos genes de  
23 resistência aos agentes antimicrobianos nas amostras coletadas. Inicialmente,  
24 empregaram-se os oligonucleotídeos direcionados para o gene 16S rRNA, que indicam  
25 a presença de DNA bacteriano nas amostras. Então, procedeu-se a detecção dos  
26 genes *cfxA/cfxA2*, *blaTEM*, *blaZ*, *ampC*, *mecA* (associados ao desenvolvimento de  
27 resistência aos agentes lactâmicos), *ermB*, *ermC*, *mecA* e *mefA* (associados ao  
28 desenvolvimento de resistência aos macrolídeos), *tetM*, *tetQ* e *tetW* (associados ao  
29 desenvolvimento de resistência microbiana às tetraciclinas), *InuB* e *IsaB* (associados ao  
30 desenvolvimento de resistência a lincosamidas).

1 O DNA bacteriano das amostras foi extraído utilizando-se o conjunto de  
2 reagentes disponíveis no kit QIAamp DNA Micro Kit (QIAGEN, Valencia, Califórnia,  
3 EUA), conforme instruções do fabricante. Para cada amostra de S, BS, D, RC e R,  
4 realizou-se amplificação, conforme as seguintes condições de reação. As reações de  
5 PCR foram processadas em alíquotas de 12 µl por reação, sendo 8,6 µl de Taq PCR  
6 Mastermix Kit (QIAGEN, Valencia, Califórnia, EUA); 0,2 µl de solução do  
7 oligonucleotídeo Forward (10Mm) (Invitrogen, SP, Brasil); 0,2 µl de solução do  
8 oligonucleotídeo Reverse (10Mm) (Invitrogen, SP, Brasil); 2 µl de Coral Load Dye  
9 (QIAGEN, Valencia, Califórnia, EUA); 1 µl da suspensão contendo DNA bacteriano  
10 isolado da amostra clínica. As etapas do ciclo de PCR incluíram uma desnaturação  
11 inicial, seguida de ciclos de desnaturação, anelamento e extensão, tendo por fim um  
12 período de extensão final. As reações de PCR foram realizadas em um termociclador  
13 (Mastercycler Family, Brazil Eppendorf, São Paulo, Brasil). As sequências dos  
14 nucleotídeos, as temperaturas específicas das etapas da reação de PCR, o  
15 comprimento do fragmento amplificado e a citação bibliográfica referente a cada *primer*  
16 estão listados na Tabela 1.

17 Os produtos de PCR foram analisados por meio de eletroforese em gel de  
18 agarose 1%, corado com GelRed (Biotium, Hayward, EUA) e visualizados sob  
19 transiluminação de luz ultravioleta (Major Science, Saratoga, EUA). A detecção foi  
20 baseada na presença de bandas claras do tamanho molecular esperado usando um  
21 marcador de DNA de 100 pb (DNA Ladder, Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil). Os  
22 controles positivos consistiram em amostras onde os fragmentos alvo foram  
23 previamente amplificados, e levados para sequenciamento. Os controles negativos  
24 foram formados por alíquotas de água, utilizada como complemento na reação de  
25 amplificação.

26 Para a análise dos dados, considerou-se o uso prévio ou não de antibiótico  
27 pelo paciente infantil, gerando-se dois grupos de amostras. No Grupo 1 (G1), os  
28 participantes utilizaram antibiótico há menos de 3 meses antes da coleta das amostras.  
29 No Grupo 2 (G2), os participantes não utilizaram antibiótico.

1            Registrou-se a presença ou ausência da detecção de cada gene de  
2 resistência nas amostras individuais de cada participante em seu respectivo  
3 ecossistema. Os dados foram dispostos em uma planilha de cálculo Microsoft Excel<sup>®</sup>.  
4 Realizou-se análise multivariada de conglomerados, utilizando-se o programa Past 3  
5 versão 3.14 (Øyvind Hammer, Natural History Museum, University of Oslo) [22]. O grau  
6 de similaridade entre as amostras de S, BS, D, RC e R foi determinada por meio de  
7 coeficiente de agrupamento, utilizando-se o método UPGMA e o cálculo da distância  
8 entre as amostras foi determinado por meio do índice de Similaridade de Bray-Curtis.  
9 Amostras com valores de distâncias 1 ou próximo a 1 formaram um grupo com alta  
10 similaridade e são conectadas apenas através de uma barra vertical, próximo ao 1, na  
11 escala do eixo das coordenadas. Amostras com distâncias menores que 1 demonstram  
12 menores níveis de similaridade, aproximando-se do ponto zero. Considerou-se o  
13 método de agrupamento adequado quando o coeficiente cofenético foi maior ou igual a  
14 0,70. O coeficiente de correlação cofenético demonstra o grau de deformação  
15 provocado pela construção do dendograma, o que poderia gerar um diagrama que  
16 representaria uma imagem distorcida da realidade dos dados [23].

**Tabela 1.** Sequências de nucleotídeos, temperaturas específicas e referências para a realização das etapas da reação de PCR.

Categoria de Antimicrobiano	Gene	Sequência de nucleotídeos	Condições de Reação			Fragmento	Referência
			Des. Inicial <sup>a</sup>	Ciclos <sup>b</sup>	Elong. Final <sup>c</sup>		
	Gene 16SrRNA	5'TCCTACGGGAGGCAGCAGT3' 5'GGACTACCAGGTATCTAATCCTGTT3'	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	[24]
Lactâmicos	cfxA/A2	5'GCGCAA ATCCTCCTT TAACAA 3' 5'ACC GCC ACA CCA ATT TCG3'	94°C – 5 min.	25 ciclos D: 94°C – 1 min. A: 60°C – 1 min. E: 72°C – 30 min.	72°C-10 min.	802 pB	[25]
	blaTEM	5'CCAATGCTTAATCAGTGAGG3' 5'ATGAGTATTCAACATTTCCG3'	95°C – 15 min.	30 ciclos D:94°C/96°C – 15-60 seg. A:55°C E:72°C-30/90 seg.	72°C-5/10 min.	858 pB	[26]
	blaZ	5'CAGTTCACATGCCAAAGAG3' 5'TACACTCTTGGCGGTTTC3'	95°C – 15 min.	30 ciclos D:94°C/96°C 1min. A: 54°C 1 min E:72°C 1m/30 seg.	72°C-5/10 min.	846 pB	[27]
	ampC	5'-TAAACACCACATATGTTCCG-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	[28]
	mecA	5'-AAA ATC GAT GGT AAA GGT TGG C-3' 5'-AGT TCT GCA GTA CCG GAT TTG C-3'	94°C – 2 min.	30:ciclos D:94°C – 1 min. A:55°C – 30s. E:72°C – 1mi,30 min.	72°C – 5 min.	533 pB	[29]
Macrolídeos	ermB	5'GAA AAG GTA CTC AAC CAA ATA 3' 5'AGT AAC GGT ACT TAA ATT GTTT AC 3'	94°C –25 min.	30 ciclos D: 94° C – 30 s A: 52°C – 30seg E: 72°C –1min.	72°C – min.	639 pB	[30]
	ermC	5'-AAT CGG CTC AGG AAA AGG-3' 5'-ATC GTC AAT TCC TGC ATG-3'	94°C -5 mim	30 ciclos D:94°C – 1min. A:54°C – 1min. E:72°C – 2m30s	72°C – 75 min.	562 pB	[27]
	mefA	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	[31]

<sup>a</sup> Des. Inicial: Desnaturação inicial. <sup>b</sup> Ciclos – D: desnaturação; A: anelamento; E: extensão. <sup>c</sup> Elong. Final: alongamento final. Min.: minutos; Seg.: segundos

**Tabela 1 - continuação.** Sequências de nucleotídeos, temperaturas específicas e referências para a realização das etapas da reação de PCR.

Categoria de Antimicrobiano	Gene	Sequência de nucleotídeos	Condições de Reação			Comprimento fragmento	Referência
			Des. Inicial <sup>a</sup>	Ciclos <sup>b</sup>	Elong. Final <sup>c</sup>		
Tetraciclinas	tetM	5'GTGGACAAAGGTACAACGAG3' 5'CGGTAAAGTTCGTACACAC3'	95°C – 15 min.	30 ciclos D: 94°C/96°C – 15-60 seg. A: 55°C E: 72°C-30/90 seg.	72°C-5/10 min.	406 pB	[32]
	tetQ	5'TTATACTTCCTCCGGCATCG3' 5'ATCGGTTTCGAGAATGTCCAC3'	95°C – 15 min.	30 ciclos D: 94°C/96°C – 15-60 seg. A: 55°C E: 72°C-30/90 seg.	72°C-5/10 min.	904 pB	[32]
	tetW	5'GAGAGCCTGCTATATGCCAGC3' 5'GGCGTATCCACAATGTTAAC3'	95°C – 15 min.	30 ciclos D: 94°C/96°C – 15-60 seg. A: 64°C E: 72°C-30/90"	72°C-5/10 min.	168 pB	[33]
Lincosamidas	linB	5'-CCTACCTATTGTTTGTGGAA-3' 5'-ATAACGTTACTCTCCTATTTC-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	[34]
	lsaB	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	[35]

<sup>a</sup> Des. Inicial: Desnaturação inicial. <sup>b</sup> Ciclos – D: desnaturação; A: anelamento; E: extensão. <sup>c</sup> Elong. Final: alongamento final. Min.: minutos; Seg.: segundos

## 1 **Resultados**

2

3 Participaram desta pesquisa 8 participantes infantis com idade média 5,3  
4 anos para os participantes que fizeram uso de antibióticos e 6,3 anos para os que não  
5 usaram antibióticos. A maioria dos participantes foi do sexo masculino. Todos os dentes  
6 incluídos foram molares decíduos, que portavam necrose pulpar. Porém apenas 2  
7 participantes apresentavam sintomatologia dolorosa espontânea, sendo que destes, 1  
8 demonstrava aumento de volume local associado.

9 A **Tabela 2** demonstra as frequências absoluta e relativa de detecção dos  
10 genes de resistência a agentes antimicrobianos nos ecossistemas S, BS, D e RC, e  
11 também a sua ocorrência simultânea em mais de um ambiente.

12 Não foram detectados nas amostras os genes *ampC*, *mecA*, *InuB* e *IsaB*. Em  
13 todos os ecossistemas, de ambos os grupos, foi detectada ao menos uma amostra  
14 contendo gene de resistência às tetraciclinas, especialmente o gene *tetQ*.  
15 Considerando-se um mesmo ecossistema, amostras de S, BS e D do G2 apresentaram  
16 um número mais expressivo de genes de resistência do que as amostras do G1, exceto  
17 para RC.

18 Nenhum dos genes estudados foi detectado em todas as amostras de um  
19 mesmo paciente. Observou-se detecção simultânea de um mesmo gene de resistência  
20 aos pares, especialmente em ecossistemas contíguos. No Grupo 1, o gene *tetQ* foi  
21 detectado em amostras pareadas de SB+D e D+RC. Já o gene *cfxA/cfxA2* foi  
22 observado simultaneamente em D+RC. No Grupo 2, os genes *tetM* e *tetQ* foram  
23 detectados simultaneamente em S+SB e SB+D.

**Tabela 2.** Frequências absoluta e relativa de detecção de genes de resistência a agentes antimicrobianos em pacientes com necrose pulpar e infecção endodôntica, considerando-se os ecossistemas da cavidade bucal.

	Grupo 1 - Antimicrobiano < 3 meses antes da coleta (n=3)							Grupo 2 - Antimicrobiano >3 meses antes da coleta (n=5)						
	S	SB	D	RC	S + SB	SB + D	D + RC	S	SB	D	RC	S + BS	BS + D	D + RC
<i>cfxA</i>	0	0	3	1 (33,3%)	0	0	1 (33,3%)	0	0	1 (20%)	0	0	0	0
<i>blaTEM</i>	0	1 (33,3%)	0	1 (33,3%)	0	0	0	0	1 (20%)	1 (20%)	0	0	1 (20%)	0
<i>blaZ</i>	1 (33,3%)	0	1	0	0	0	0	0	0	2 (40%)	0	0	0	0
<i>ampC</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>mefA</i>	2 (66,7%)	0	0	1 (33,3%)	0	0	0	3 (60%)	0	2	0	0	0	0
<i>ermB</i>	0	0	0	1 (33,3%)	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0
<i>ermC</i>	0	0	1 (33,3%)	1 (33,3%)	0	0	0	0	0	2	1 (20%)	0	0	1 (20%)
<i>tetQ</i>	0	1 (33,3%)	2 (66,7%)	2 (66,7%)	0	1 (33,3%)	2 (66,7%)	3 (60%)	2 (40%)	4 (80%)	1 (20%)	2 (40%)	1 (20%)	1 (20%)
<i>tetM</i>	0	1 (33,3%)	0	2	0	0	0	1 (20%)	1 (20%)	3 (60%)	0	1 (20%)	1 (20%)	0
<i>tetN</i>	1 (33,3%)	0	0	0	0	0	0	3 (60%)	0	1 (20%)	0	0	0	0
<i>linB</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>lsaB</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

\* S = saliva; SB = biofilme supragengival; D = dentina; RC = canal radicular.

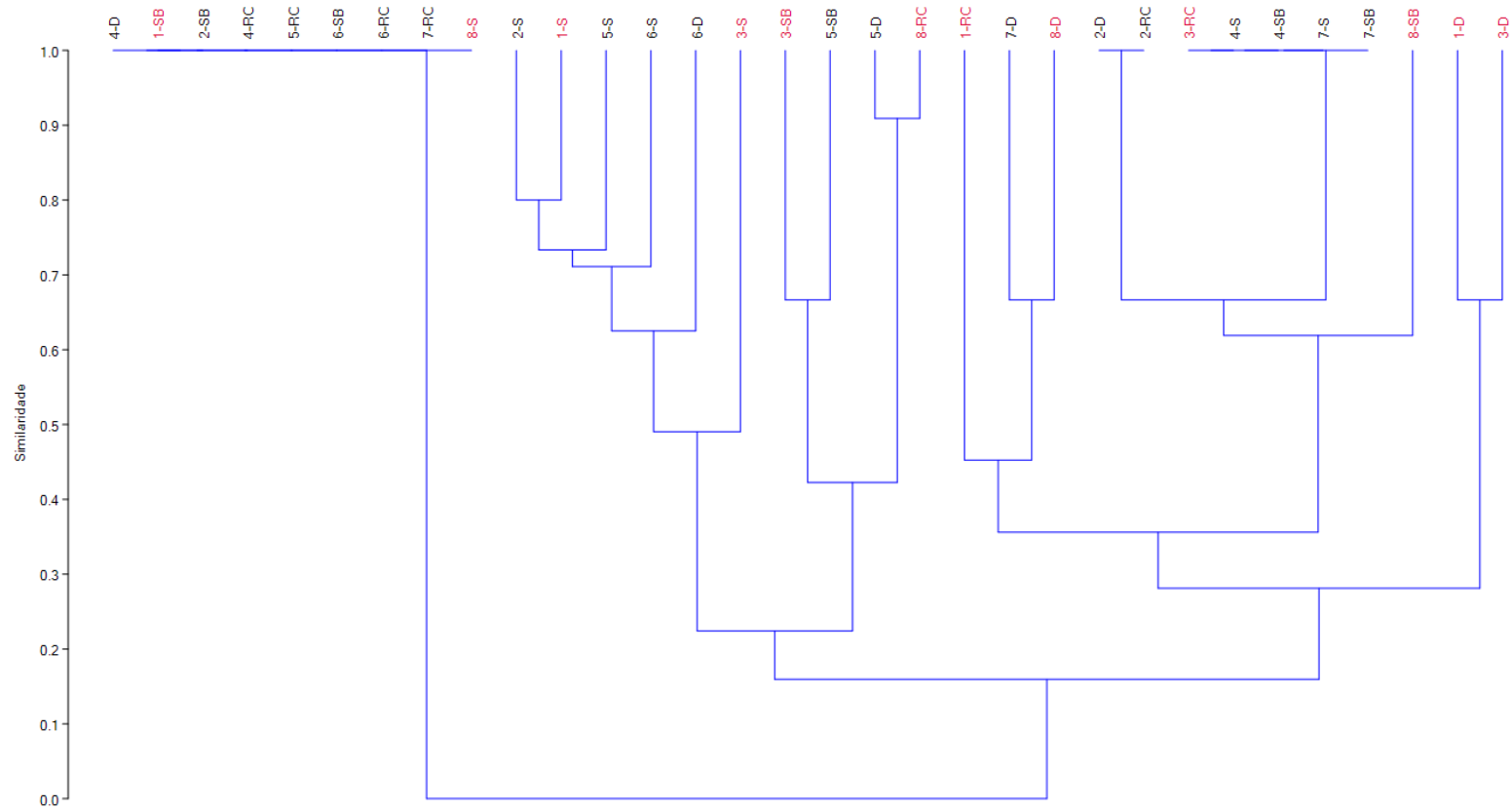


1           A **Figura 1** apresenta os agrupamentos para amostras de saliva, biofilme  
2 supragengival, dentina e canal radicular dos Grupos 1 e 2, considerando-se a presença  
3 dos genes de resistência aos agentes antimicrobianos, detectados por meio de PCR  
4 gene-específico.

5           Não se observa um comportamento uniforme quanto ao perfil de  
6 agrupamento de diferentes amostras de um mesmo participante. Cabe salientar que:

- 7           a) Em **P1**, **P3**, **P5**, e **P8**, os valores de similaridade entre os ecossistemas  
8 são baixos, assim:  $S \neq SB \neq D \neq RC$ ;
- 9           b) Em **P2** e **P6**, há menores valores de similaridade entre as amostras de  
10 saliva e biofilme supragengival, sendo que as amostras da dentina e do  
11 canal radicular são parecidas, assim:  $S \neq SB \neq (D = RC)$ ;
- 12           c) Em **P4**, há igualdade entre amostras de saliva e biofilme supragengival, e  
13 também entre dentina e canal radicular, assim:  $(S = SB) \neq (D = RC)$ ;
- 14           d) Em **P7**, há igualdade entre amostras de saliva e biofilme supragengival,  
15 sendo estas diferentes das de dentina e do canal radicular, assim:  
16  $(S = SB) \neq D \neq RC$ .

17           As amostras de canal radicular (RC) dos participantes **P4**, **P5**, **P6** e **P7**  
18 demonstraram ser idênticas quanto ao agrupamento, considerando-se a presença dos  
19 genes de resistência estudados.



**Figura 1.** Dendrograma correspondente ao agrupamento das amostras coletadas dos participantes, considerando-se a similaridade quanto à presença de genes de resistência em saliva (S), biofilme supragengival (SB), dentina (D) e canal radicular (CR). Método de agrupamento UPGMA, Índice de Similaridade de Bray-Curtis, Coeficiente cofenético = 0,9137. Siglas em vermelho indicam as amostras dos participantes do Grupo 1. Cada símbolo é composto pelo número do participante (de 1 a 8), seguido do ecossistema ao qual a amostra pertence (S, SB, D, ou RC).

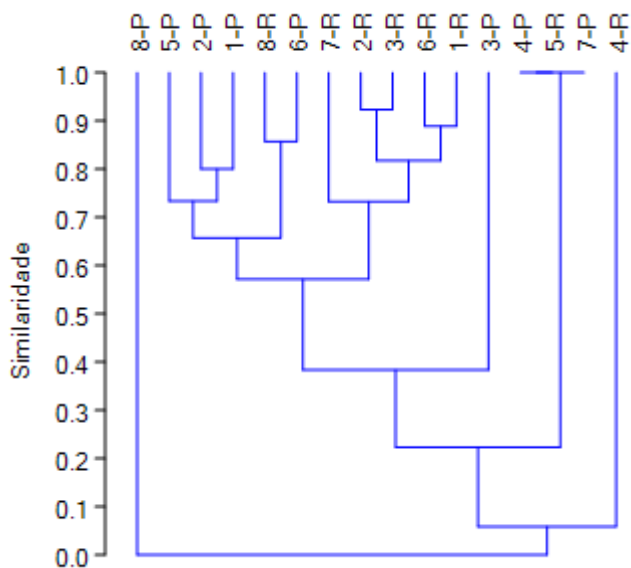
1 A presença simultânea de genes de resistência a agentes antimicrobianos  
 2 na saliva dos participantes infantis (S) e de seus responsáveis (R) está apresentada na  
 3 **Tabela 3**. No G1, os genes *mefA* e *tetW* foram detectados simultaneamente em  
 4 amostras de saliva dos participantes infantis e dos responsáveis. No G2, os genes  
 5 *mefA*, *tetQ* e *tetW* foram detectados simultaneamente em amostras de saliva dos  
 6 participantes infantis e dos responsáveis. O número de amostras positivas para a  
 7 presença de genes de resistência parece ser maior para os responsáveis (R) do que  
 8 para os participantes infantis (S).

9  
 10 **Tabela 3.** Presença de genes de resistência em amostras de saliva em crianças e em  
 11 seus parentes próximos.

	Grupo 1 - Antimicrobiano <3 meses antes da coleta (n=3)			Grupo 2 - Antimicrobiano >3 meses antes da coleta (n=5)		
	S	R	Simultâneo	S	R	Simultâneo
<i>cfxA</i>	0	2 (66,7%)	0	0	0	0
<i>blaTEM</i>	0	0	0	0	0	0
<i>blaZ</i>	1 (33,3%)	0	0	0	1 (20%)	0
<i>ampC</i>	0	0	0	0	0	0
<i>mecA</i>	0	0	0	0	0	0
<i>mefA</i>	2 (66,7%)	3 (100%)	2 (66,7%)	3 (60%)	2 (40%)	2 (40%)
<i>ermB</i>	0	2	0	0	3 (60%)	0
<i>ermC</i>	0	1 (33,3%)	0	0	3 (60%)	0
<i>tetQ</i>	0	3 (100%)	0	3 (60%)	4 (80%)	2 (40%)
<i>tetM</i>	0	2 (66,7%)	0	1 (20%)	2 (40%)	0
<i>tetW</i>	1 (33,3%)	3 (100%)	1 (33,3%)	3 (60%)	3 (60%)	2 (40%)
<i>linB</i>	0	0	0	0	0	0
<i>lsaB</i>	0	0	0	0	0	0

13  
 14  
 15 A **Figura 2** demonstra a similaridade entre as amostras de saliva coletadas  
 16 do participante infantil (P) e de seu responsável (R), considerando-se a presença dos  
 17 genes de resistência estudados. O máximo valor de similaridade observado entre  
 18 amostras pareadas de P e R foi de 0,55 (1P x 1R; 2P x 2R; 6P x 6R). As amostras

- 1 pertencentes a 8P e 8M não demonstraram nenhuma similaridade. O valor para  
 2 mediana de similaridade observada foi de 0,275.



- 3  
 4 **Figura 2.** Dendrograma correspondente ao agrupamento das amostras de saliva  
 5 coletadas dos participantes infantis (P) e dos seus responsáveis (R), considerando-se a  
 6 similaridade quanto à presença de genes de resistência. Método de agrupamento  
 7 UPGMA, Índice de Similaridade de Bray-Curtis, Coeficiente cofenético = 0,9028.

- 8  
 9

## 1 **Discussão**

2

3           Embora a quase totalidade da microbiota que se implanta na cavidade bucal  
4 seja constituída de microrganismos de baixa virulência e de comportamento  
5 anfibiótico [36], a cavidade bucal da criança pode vir a receber, de diferentes fontes,  
6 microrganismos exógenos, que podem se instalar de forma transitória ou definitiva. A  
7 composição das comunidades bacterianas na saliva de crianças com e sem lesões de  
8 cárie se modifica com a idade e parece ser similar entre os membros de uma mesma  
9 família [37]. Demonstrou-se grande similaridade na presença de grupos de compostos  
10 resultantes do metabolismo bacteriano na saliva pacientes infantis gêmeos,  
11 especialmente quando apresentavam o mesmo tipo de dentição [38]. A presença de  
12 patologias associadas ao biofilme dental parece modificar o ecossistema bucal.  
13 Amostras de saliva, canal radicular infectado e abscesso apical agudo de um mesmo  
14 paciente adulto demonstram composição microbiana com diferentes graus de  
15 similaridade [39, 40].

16           Ainda não há consenso na literatura de como a utilização de agentes  
17 antimicrobianos modula a estrutura do microbioma oral e a seleção de microrganismos  
18 e, conseqüentemente, a expressão de seus fatores de virulência [15–17]. O  
19 microbioma salivar parece demonstrar maior resiliência e capacidade de recuperação  
20 do que o microbioma intestinal após a exposição a agentes antimicrobianos, por curto  
21 período de tempo [17]. Não há estudos na literatura que identifiquem a presença de  
22 genes de resistência a agentes antimicrobianos em S, SB, D e RC de pacientes com  
23 infecções endodônticas agudas. Moraes *et al.* (2015) [36] realizaram estudo  
24 semelhante, porém avaliaram amostras de saliva, biofilme supragengival e canal  
25 radicular de pacientes adultos portadores de dentes com infecções endodônticas aguda  
26 ou crônica. Portanto, há necessidade de se conhecer a distribuição dos genes de  
27 resistência bacteriana aos principais grupos de antibióticos em saliva, biofilme  
28 supragengival, dentina e canal radicular de pacientes infantis portadores de dentes  
29 decíduos com infecções endodônticas e também de amostras de saliva dos  
30 responsáveis.

1 Em estudo de revisão sistemática da literatura, Moraes *et al.* (2015) [19]  
2 relataram a presença de 33 genes de resistência a antibióticos em amostras da  
3 cavidade bucal em adultos e crianças: *blaTEM*; *blaZ*; *cfxA*; *cfxA2*; *blaCMY2*; *ampC*;  
4 *mecA*; *pbp1A*; *pbp2X*; *pbp2B*; *ermA*; *ermB*; *ermC*; *ermE*; *ermV*; *tetM*; *tetO*; *tetQ*; *tetS*;  
5 *tetW*; *tet32*; *tetA*; *tetB*; *tetC*; *tetD*; *tetK*; *tetL*; *vanA*; *vanB*; *vanC1*; *vanC2/3*; *vanD*; *vanE*.  
6 No presente estudo, foram selecionados 13 dos mais frequentes genes de resistência  
7 aos agentes beta-lactâmicos, lincosamidas, macrolídeos e tetraciclina. Os beta-  
8 lactâmicos são os agentes de primeira escolha para tratamento das infecções  
9 endodônticas devido à sua eficácia, segurança, acesso e conveniência para  
10 administração [10, 41]. A clindamicina e a eritromicina pertencem ao grupo das  
11 lincosamidas e macrolídeos, respectivamente, e são considerados antibióticos de  
12 segunda escolha, indicados para pacientes com alergia aos lactâmicos [42]. As  
13 tetraciclina foram empregadas como complemento em tratamentos periodontais [43],  
14 porém, recentemente, muitas bactérias de relevância em infecções humanas  
15 demonstram-se resistentes a elas [44]. Embora se tenha uma tendência a não  
16 prescrição de tetraciclina para crianças, estudo de Pöyhönen *et al.* (2017) [45]  
17 indicaram que o uso de doxiciclina em pacientes menores de 8 anos não induziu  
18 manchamento em dentes permanentes.

19 Para a detecção da presença dos genes, utilizou-se a técnica de PCR  
20 direcionado a sequência específica, em amostras representativa de ecossistemas orais  
21 de pacientes infantis com infecções endodônticas e de seus responsáveis. Esta técnica  
22 permite a amplificação de sequência alvo de nucleotídeos, a partir de ácidos nucleicos  
23 isolados de amostras clínicas, seguida da sua visualização em géis que contêm  
24 corante fluorescente [46]. De acordo com a literatura, estudos realizaram a detecção de  
25 genes de resistência a antibióticos tanto em amostras totais de um ecossistema [47,  
26 48] ou em isolados clínicos de espécies bacterianas que podem carregá-los [49–53].  
27 Porém, esta não é uma técnica quantitativa, e não permite que seja determinado se o  
28 gene alvo está ativo ou não [46]. A presença ou ausência do gene na amostra é  
29 tradicionalmente apresentada nas formas de frequência absoluta e relativa, com testes  
30 estatísticos de comparação das frequências entre os grupos [47–51]. Optou-se por  
31 utilizar uma análise multivariada para determinação da similaridade dos perfis da

1 presença de genes de resistência nas amostras estudadas, de um mesmo participante  
2 (S x SB x D x RC); de um mesmo ecossistema para diferentes participantes; e entre a  
3 saliva do participante (S) e do responsável (R). Como resultado, os dados foram  
4 apresentados em um dendograma, que ilustra esta proximidade, pois amostras mais  
5 similares são combinadas para formar grupos. Esta análise foi utilizada anteriormente  
6 por Montagner *et al.* (2012) [54] para comparar a similaridade da distribuição de  
7 espécies associadas às infecções endodônticas agudas, e também por Foxman *et al.*  
8 (2014) [38] para comparar a similaridade entre amostras do metaboloma oral de  
9 crianças.

10 As amostras coletadas de S, BS e D de pacientes que não fizeram uso de  
11 antibiótico previamente à consulta (G2) apresentaram uma maior diversidade de genes  
12 de resistência detectáveis por meio de PCR. A utilização de um agente antimicrobiano  
13 parece ter modulado a presença de espécies bacterianas, reduzindo também espécies  
14 que abrigavam genes de resistência. Cabe salientar que a presença de genes de  
15 resistência aos antibióticos em uma cepa bacteriana não significa necessariamente que  
16 a cepa será resistente, mas que abriga o potencial para a sua expressão. Podem ser  
17 citados os achados de Montagner *et al.* (2014) [55], quando gene de resistência a beta-  
18 lactâmicos *cfxA/cfxA2* foi detectado em 2 isolados de infecções endodônticas agudas,  
19 mas apenas uma cepa expressava o gene. Entretanto, esses resultados devem ser  
20 avaliados com cautela, pois Zaura *et al.* (2015) [17] indicam que a resiliência do  
21 microbioma salivar é mais expressiva, demonstrando potencial de recuperação em  
22 período de 7 dias.

23 No presente estudo, detectou-se ao menos uma amostra contendo gene de  
24 resistência às tetraciclinas em todos os ecossistemas, sendo os mais frequentes os  
25 genes *tetQ* e *tetM*. Lancaster *et al.* (2005) [51] isolaram bactérias de saliva e biofilme  
26 supragengival em crianças e observaram que 15/18 participantes abrigavam genes de  
27 resistência às tetraciclinas, especialmente *tetM*. Sanai *et al.* (2002) [50] isolou cepas de  
28 *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia/nigrescens* do biofilme supragengival  
29 de crianças e observaram em diferentes etapas do tratamento clínico, sendo que 55%  
30 delas abrigavam *tetQ*. Em revisão sistemática da literatura, Lang *et al.* (2016) [56]

1 indicaram que 40% dos anaeróbios estritos isolados de infecções endodônticas agudas  
2 em pacientes adultos apresentavam-se resistentes às tetraciclina. Assim, a análise  
3 conjunta dos dados sugere que as cepas não apenas carreguem os genes de  
4 resistência, mas também os expressem.

5 Embora vários genes de resistência aos betalactâmicos tenham sido  
6 detectados em amostras orais [19], as bactérias isoladas de infecções orais agudas de  
7 pacientes adultos demonstram baixas taxas de resistência laboratorial a esses agentes  
8 [56]. No presente estudo, um número reduzido de amostras abrigou os genes de  
9 resistência *cfxA*, *bla*TEM, *bla*Z, *ampC*, e *mecA*. Esses resultados parecem concordar  
10 com relatos prévios na literatura. Ao estudarem amostras pareadas obtidas de  
11 pacientes adultos com infecções endodônticas, Moraes *et al.* (2015) [48] relataram que  
12 o gene *cfxA/cfxA2* foi detectado mais frequentemente em saliva e biofilme  
13 supragengival do que em canais radiculares. Montagner *et al.* (2014) [55] detectaram o  
14 gene *cfxA/cfxA2* em 2/26 amostras de canais radiculares de pacientes adultos,  
15 portadores de infecções endodônticas agudas. Os resultados laboratoriais das análises  
16 das amostras parecem fornecer dados que suportem o uso de agentes beta-lactâmicos  
17 como agentes de primeira escolha como adjuvantes ao tratamento de infecções  
18 endodônticas agudas. Salienta-se que, também é importante avaliar a resposta clínica  
19 de pacientes que por ventura apresentam genes de resistência a antibióticos desse  
20 grupo.

21 Os genes de resistência aos macrolídeos e às lincosamidas não foram  
22 frequentemente detectados em S, SB, D e RC das amostras de pacientes infantis  
23 estudadas. Ojo *et al.* (2004) [31] observaram que isolados da cavidade bucal e urina de  
24 crianças saudáveis com baixa exposição a antibióticos no Japão carregavam o gene  
25 *mefA* e *ermB*, em diferentes proporções. Não há estudo na literatura que indique a  
26 frequência de detecção de genes de resistência às lincosamidas em ecossistemas  
27 bucais de pacientes infantis.

28 Os genes estudados não foram detectados simultaneamente em todas as  
29 amostras de S, SB, D e RC de um mesmo participante. Quando ocorre, a detecção  
30 simultânea de um mesmo gene de resistência se dá aos pares, especialmente em



1 ecossistemas contíguos. Esse resultado é evidenciado pela ausência de uniformidade  
2 no perfil de agrupamento de diferentes amostras de um mesmo participante. As  
3 amostras de um mesmo participante não formam um agrupamento único, distinto dos  
4 demais. Estudos prévios que avaliaram amostras coletadas da boca e dentes em  
5 adultos com infecções endodônticas indicam que cada ecossistema abriga  
6 comunidades microbianas distintas [39, 40]. Montagner et al. (2010) [40] coletaram  
7 amostras de canal radicular e abscesso apical agudo de um mesmo paciente,  
8 indicando que há comunidades com composição e riquezas diferenciadas nesses  
9 ecossistemas. Hsiao *et al.* (2012) [39] sugerem que amostras de abscesso apical  
10 agudo e de canais radiculares infectados são distintas de amostras de saliva de um  
11 mesmo paciente, porém mais similares entre si. Os genes de resistência à tetraciclina  
12 (*tetW* e *tetQ*) e *mefA* foram compartilhados por alguns participantes infantis e  
13 responsáveis. Não se observam agrupamentos com grau de similaridade próximos para  
14 os perfis da presença de genes de resistência a agentes antimicrobianos na saliva do  
15 paciente infantil e na saliva do responsável. Ling *et al.* (2013) [57] avaliaram o  
16 microbioma salivar de crianças e adultos saudáveis por meio de sequenciamento de  
17 alto rendimento e sugeriram que há diferenças composicionais evidentes. Portanto,  
18 sugere-se que as prováveis diferenças na composição microbiana de S, SB, D, RC e R  
19 influenciam o perfil distinto e único de distribuição dos genes de resistência nesses  
20 ecossistemas.

21 A análise dos resultados do presente estudo sugerem que há múltiplos perfis  
22 de distribuição de genes de resistência a agentes antimicrobianos em amostras de  
23 ecossistemas bucais contíguos em um mesmo paciente portador de infecção  
24 endodôntica. O mesmo comportamento foi observado para amostras de um mesmo  
25 ecossistema bucal, obtidos de diferentes pacientes.

26

## 27 **Agradecimentos**

28 Agradecemos à Profa. Dra. Mariza Maltz e à Profa. Dra. Clarissa Cavalcanti Fatturi-  
29 Parolo, responsáveis pelo Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Oral (LABIM-  
30 UFRGS) por disponibilizar o parque de equipamentos empregado no presente estudo.

1 Agradecemos ao Cirurgião-dentista Diego Cordeiro pelo auxílio durante as coletas  
2 clínicas.

3

4

## 1 Referências

- 2  
3  
4 1. WHO | Global action plan on AMR. In: WHO. <http://www.who.int/antimicrobial-resistance/global-action-plan/en/>. Accessed 11 Nov 2017
- 5  
6 2. Grigoryan L, Burgerhof JGM, Haaiker-Ruskamp FM, *et al.* (2007) Is self-medication  
7 with antibiotics in Europe driven by prescribed use? *J Antimicrob Chemother*  
8 59:152–156 . doi: 10.1093/jac/dkl457
- 9 3. Chaudhari VL, Mali SN, Dawari AV, Nishandar TB (2017) Awareness about rational  
10 use of medicines among fresh Bachelor of Medicine and Bachelor of Surgery  
11 graduates. *J Educ Health Promot* 6:94. doi: 10.4103/jehp.jehp\_59\_17
- 12 4. World Health Organization (2002) Promoting rational use of medicines: core  
13 components. 1–6
- 14 5. Yu M, Zhao G, Stålsby Lundborg C, *et al.* (2014) Knowledge, attitudes, and  
15 practices of parents in rural China on the use of antibiotics in children: a cross-  
16 sectional study. *BMC Infect Dis* 14:112 . doi: 10.1186/1471-2334-14-112
- 17 6. Aabenhus R, Hansen MP, Siersma V, Bjerrum L (2017) Clinical indications for  
18 antibiotic use in Danish general practice: results from a nationwide electronic  
19 prescription database. *Scand J Prim Health Care* 35:162–169. doi:  
20 10.1080/02813432.2017.1333321
- 21 7. Fleming-Dutra KE, Demirjian A, Bartoces M, *et al.* (2017) Variations in Antibiotic and  
22 Azithromycin Prescribing for Children by Geography and Specialty - United States,  
23 2013. *Pediatr Infect Dis J*. doi: 10.1097/INF.0000000000001708
- 24 8. De Luca M, Donà D, Montagnani C, *et al.* (2016) Antibiotic Prescriptions and  
25 Prophylaxis in Italian Children. Is It Time to Change? Data from the ARPEC Project.  
26 *PLoS ONE* 11: . doi: 10.1371/journal.pone.0154662
- 27 9. Marra F, George D, Chong M, *et al.* (2016) Antibiotic prescribing by dentists has  
28 increased: Why? *J Am Dent Assoc* 147:320–327. doi:  
29 10.1016/j.adaj.2015.12.014
- 30 10. Roberts RM, Bartoces M, Thompson SE, Hicks LA (2017) Antibiotic prescribing by  
31 general dentists in the United States, 2013. *J Am Dent Assoc* 148:172–178.e1  
32 . doi: 10.1016/j.adaj.2016.11.020
- 33 11. De-Paula KB, Silveira LS da, Fagundes GX, *et al.* (2014) Patient automedication  
34 and professional prescription pattern in an urgency service in Brazil. *Braz Oral Res*  
35 28:

- 1 12. Tanwir F, Marrone G, Tariq A, Lundborg CS (2015) Diagnosis and prescribing  
2 pattern of antibiotics and painkillers among dentists. *Oral Health Prev Dent* 13:75–  
3 83 . doi: 10.3290/j.ohpd.a32341
- 4 13. American Academy on Pediatric Dentistry Council on Clinical Affairs (2008)  
5 Guideline on appropriate use of antibiotic therapy for pediatric dental patients.  
6 *Pediatr Dent* 30:212–214
- 7 14. Stewardson AJ, Gaïa N, François P, *et al.* (2015) Collateral damage from oral  
8 ciprofloxacin versus nitrofurantoin in outpatients with urinary tract infections: a  
9 culture-free analysis of gut microbiota. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin*  
10 *Microbiol Infect Dis* 21:344.e1-11. doi: 10.1016/j.cmi.2014.11.016
- 11 15. Rashid M-U, Zaura E, Buijs MJ, *et al.* (2015) Determining the Long-term Effect of  
12 Antibiotic Administration on the Human Normal Intestinal Microbiota Using Culture  
13 and Pyrosequencing Methods. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 60 Suppl  
14 2:S77-84. doi: 10.1093/cid/civ137
- 15 16. Abeles SR, Jones MB, Santiago-Rodriguez TM, *et al.* (2016) Microbial diversity in  
16 individuals and their household contacts following typical antibiotic courses.  
17 *Microbiome* 4:39. doi: 10.1186/s40168-016-0187-9
- 18 17. Zaura E, Brandt BW, Teixeira de Mattos MJ, *et al.* (2015) Same Exposure but Two  
19 Radically Different Responses to Antibiotics: Resilience of the Salivary Microbiome  
20 versus Long-Term Microbial Shifts in Feces. *mBio* 6:e01693-01615. doi:  
21 10.1128/mBio.01693-15
- 22 18. Avila M, Ojcius DM, Yilmaz O (2009) The oral microbiota: living with a permanent  
23 guest. *DNA Cell Biol* 28:405–411. doi: 10.1089/dna.2009.0874
- 24 19. Moraes LC, Só MVR, Dal Pizzol T da S, *et al.* (2015) Distribution of genes related to  
25 antimicrobial resistance in different oral environments: a systematic review. *J Endod*  
26 41:434–441 . doi: 10.1016/j.joen.2014.12.018
- 27 20. Sreenivasan PK, Haraszthy VI, Zambon JJ (2011) The effect of a microbead  
28 dentifrice on microbial load in oral microenvironments. *Int J Dent Hyg* 9:136–142.  
29 doi: 10.1111/j.1601-5037.2010.00465.x
- 30 21. Papapostolou A, Kroffke B, Tatakis DN, *et al.* (2011) Contribution of host genotype  
31 to the composition of health-associated supragingival and subgingival microbiomes.  
32 *J Clin Periodontol* 38:517–524 . doi: 10.1111/j.1600-051X.2011.01718.x
- 33 22. Hammer O, Harper DAT, Ryan PD (2001) PAST: Paleontological statistics software  
34 package for education and data analysis. *Paleontol Electron* 4:9
- 35 23. Vicini L (2005) Análise multivariada da teoria à prática [monografia de  
36 especialização]

- 1 24. Nadkarni MA, Martin FE, Jacques NA, Hunter N (2002) Determination of bacterial  
2 load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set.  
3 *Microbiol Read Engl* 148:257–266 . doi: 10.1099/00221287-148-1-257
- 4 25. Iwahara K, Kuriyama T, Shimura S, *et al.* (2006) Detection of *cfxA* and *cfxA2*, the  
5 beta-lactamase genes of *Prevotella* spp., in clinical samples from dentoalveolar  
6 infection by real-time PCR. *J Clin Microbiol* 44:172–176 . doi:  
7 10.1128/JCM.44.1.172-176.2006
- 8 26. Call DR, Bakko MK, Krug MJ, Roberts MC (2003) Identifying antimicrobial  
9 resistance genes with DNA microarrays. *Antimicrob Agents Chemother* 47:3290–  
10 3295
- 11 27. Perreten V, Vorlet-Fawer L, Slickers P, *et al.* (2005) Microarray-based detection of  
12 90 antibiotic resistance genes of gram-positive bacteria. *J Clin Microbiol* 43:2291–  
13 2302 . doi: 10.1128/JCM.43.5.2291-2302.2005
- 14 28. Bou G, Martínez-Beltrán J (2000) Cloning, nucleotide sequencing, and analysis of  
15 the gene encoding an AmpC beta-lactamase in *Acinetobacter baumannii*.  
16 *Antimicrob Agents Chemother* 44:428–432
- 17 29. Louie L, Goodfellow J, Mathieu P, *et al.* (2002) Rapid detection of methicillin-  
18 resistant staphylococci from blood culture bottles by using a multiplex PCR assay. *J*  
19 *Clin Microbiol* 40:2786–2790
- 20 30. Bley C, van der Linden M, Reinert RR (2011) *mef(A)* is the predominant macrolide  
21 resistance determinant in *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes*  
22 in Germany. *Int J Antimicrob Agents* 37:425–431. doi:  
23 10.1016/j.ijantimicag.2011.01.019
- 24 31. Ojo KK, Ulep C, Van Kirk N, *et al.* (2004) The *mef(A)* gene predominates among  
25 seven macrolide resistance genes identified in gram-negative strains representing  
26 13 genera, isolated from healthy Portuguese children. *Antimicrob Agents Chemother*  
27 48:3451–3456 . doi: 10.1128/AAC.48.9.3451-3456.2004
- 28 32. Ng LK, Martin I, Alfa M, Mulvey M (2001) Multiplex PCR for the detection of  
29 tetracycline resistant genes. *Mol Cell Probes* 15:209–215. doi:  
30 10.1006/mcpr.2001.0363
- 31 33. Aminov RI, Garrigues-Jeanjean N, Mackie RI (2001) Molecular ecology of  
32 tetracycline resistance: development and validation of primers for detection of  
33 tetracycline resistance genes encoding ribosomal protection proteins. *Appl Environ*  
34 *Microbiol* 67:22–32. doi: 10.1128/AEM.67.1.22-32.2001
- 35 34. Bozdogan B, Berrezouga L, Kuo MS, *et al.* (1999) A new resistance gene, *linB*,  
36 conferring resistance to lincosamides by nucleotidylation in *Enterococcus faecium*  
37 HM1025. *Antimicrob Agents Chemother* 43:925–929

- 1 35. Gómez-Sanz E, Torres C, Lozano C, *et al.* (2010) Detection, molecular  
2 characterization, and clonal diversity of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*  
3 CC398 and CC97 in Spanish slaughter pigs of different age groups. *Foodborne*  
4 *Pathog Dis* 7:1269–1277 . doi: 10.1089/fpd.2010.0610
- 5 36. Albandar JM, Rams TE (2002) Risk factors for periodontitis in children and young  
6 persons. *Periodontol* 2000 29:207–222
- 7 37. Foxman B, Luo T, Srinivasan U, *et al.* (2016) The effects of family, dentition, and  
8 dental caries on the salivary microbiome. *Ann Epidemiol* 26:348–354 . doi:  
9 10.1016/j.annepidem.2016.03.006
- 10 38. Foxman B, Srinivasan U, Wen A, *et al.* (2014) Exploring the effect of dentition,  
11 dental decay and familiarity on oral health using metabolomics. *Infect Genet Evol J*  
12 *Mol Epidemiol Evol Genet Infect Dis* 22:201–207. doi:  
13 10.1016/j.meegid.2013.09.020
- 14 39. Hsiao WW, Li KL, Liu Z, *et al.* (2012) Microbial transformation from normal oral  
15 microbiota to acute endodontic infections. *BMC Genomics* 13:345. doi:  
16 10.1186/1471-2164-13-345
- 17 40. Montagner F, Gomes BPF, Kumar PS (2010) Molecular fingerprinting reveals the  
18 presence of unique communities associated with paired samples of root canals and  
19 acute apical abscesses. *J Endod* 36:1475–1479. doi: 10.1016/j.joen.2010.06.004
- 20 41. Ellison SJ (2009) The role of phenoxymethylpenicillin, amoxicillin, metronidazole  
21 and clindamycin in the management of acute dentoalveolar abscesses--a review. *Br*  
22 *Dent J* 206:357–362 . doi: 10.1038/sj.bdj.2009.257
- 23 42. European Society of Endodontology position statement: the use of antibiotics in  
24 endodontics. - PubMed - NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28436043>.  
25 Accessed 15 Nov 2017
- 26 43. Walker C, Karpinia K (2002) Rationale for use of antibiotics in periodontics. *J*  
27 *Periodontol* 73:1188–1196. doi: 10.1902/jop.2002.73.10.1188
- 28 44. Roberts MC (2003) Tetracycline therapy: update. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis*  
29 *Soc Am* 36:462–467 . doi: 10.1086/367622
- 30 45. Pöyhönen H, Nurmi M, Peltola V, *et al.* (2017) Dental staining after doxycycline use  
31 in children. *J Antimicrob Chemother* 72:2887–2890. doi: 10.1093/jac/dkx245
- 32 46. Siqueira JF, Rôças IN (2005) Exploiting molecular methods to explore endodontic  
33 infections: Part 1--current molecular technologies for microbiological diagnosis. *J*  
34 *Endod* 31:411–423

- 1 47. Rôças IN, Siqueira JF (2013) Detection of antibiotic resistance genes in samples  
2 from acute and chronic endodontic infections and after treatment. Arch Oral Biol  
3 58:1123–1128 . doi: 10.1016/j.archoralbio.2013.03.010
- 4 48. Moraes LC, Fatturi-Parolo CC, Ferreira MBC, *et al.* (2015) Saliva, supragingival  
5 biofilm and root canals can harbor gene associated with resistance to lactamic  
6 agents. Braz Oral Res 29:52 . doi: 10.1590/1807-3107BOR-2015.vol29.0052
- 7 49. Kouidhi B, Zmantar T, Hentati H, *et al.* (2011) Molecular investigation of macrolide  
8 and Tetracycline resistances in oral bacteria isolated from Tunisian children. Arch  
9 Oral Biol 56:127–135 . doi: 10.1016/j.archoralbio.2010.09.010
- 10 50. Sanai Y, Persson GR, Starr JR, *et al.* (2002) Presence and antibiotic resistance of  
11 *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, and *Prevotella nigrescens* in  
12 children. J Clin Periodontol 29:929–934
- 13 51. Lancaster H, Bedi R, Wilson M, Mullany P (2005) The maintenance in the oral cavity  
14 of children of tetracycline-resistant bacteria and the genes encoding such  
15 resistance. J Antimicrob Chemother 56:524–531 . doi: 10.1093/jac/dki259
- 16 52. Nemoto H, Nomura R, Ooshima T, Nakano K (2013) Distribution of amoxicillin-  
17 resistant oral streptococci in dental plaque specimens obtained from Japanese  
18 children and adolescents at risk for infective endocarditis. J Cardiol 62:296–300 .  
19 doi: 10.1016/j.jjcc.2013.05.008
- 20 53. Nemoto H, Nakano K, Masuda K, *et al.* (2011) Distribution of oral streptococci highly  
21 resistant to amoxicillin in dental plaque specimens from Japanese children and  
22 adolescents. J Med Microbiol 60:1853–1859 . doi: 10.1099/jmm.0.027615-0
- 23 54. Montagner F, Jacinto RC, Signoretti FGC, *et al.* (2012) Clustering behavior in  
24 microbial communities from acute endodontic infections. J Endod 38:158–162 . doi:  
25 10.1016/j.joen.2011.09.029
- 26 55. Montagner F, Jacinto RC, Correa Signoretti FG, *et al.* (2014) Beta-lactamic  
27 resistance profiles in *Porphyromonas*, *Prevotella*, and *Parvimonas* species isolated  
28 from acute endodontic infections. J Endod 40:339–344 . doi:  
29 10.1016/j.joen.2013.10.037
- 30 56. Lang PM, Jacinto RC, Dal Pizzol TS, *et al.* (2016) Resistance profiles to  
31 antimicrobial agents in bacteria isolated from acute endodontic infections:  
32 systematic review and meta-analysis. Int J Antimicrob Agents 48:467–474 . doi:  
33 10.1016/j.ijantimicag.2016.08.018
- 34 57. Ling Z, Liu X, Wang Y, *et al.* (2013) Pyrosequencing analysis of the salivary  
35 microbiota of healthy Chinese children and adults. Microb Ecol 65:487–495 . doi:  
36 10.1007/s00248-012-0123-x

## 1 **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

2

3 A presente tese teve como objetivo realizar a descrição dos microrganismos  
4 que já foram isolados ou detectados em infecções endodônticas de dentes decíduos  
5 em pacientes infantis por meio de uma revisão sistemática, além de avaliar a  
6 composição bacteriana e a presença de genes de resistência a antibióticos em  
7 amostras de saliva, biofilme supragengival, dentina e câmara pulpar de dentes  
8 decíduos com infecções endodônticas.

9 No **Capítulo 1**, apresentou-se uma revisão sistemática da literatura, que foi  
10 conduzida com o objetivo obter informações detalhadas quanto aos grupos de  
11 microrganismos identificados ou detectados em infecções endodônticas presentes em  
12 crianças com até 10 anos de idade. Dentre as limitações observadas na análise dos  
13 resultados, podem-se citar as diferenças metodológicas observadas entre os estudos,  
14 como emprego de distintos materiais de coleta e técnicas para identificação dos  
15 microrganismos, além de tamanhos amostrais variados, sem cálculos prévios que o  
16 justifiquem. Considerando os resultados, sugere-se que as infecções endodônticas em  
17 dentes decíduos são causadas por combinações de diversas espécies, confirmando a  
18 sua natureza polibacteriana. Não se pode considerar que haja um padrão relacionado à  
19 composição bacteriana nos estudos, pois há uma tendência de os autores investigarem  
20 grupos bacterianos já conhecidos, especialmente as bactérias anaeróbias estritas.  
21 Observou-se então a necessidade da realização de estudo que empregasse métodos  
22 que permitissem a ampla caracterização do microbioma, sem que as análises sejam  
23 voltadas para um grupo específico de microrganismos.

24 No **Capítulo 2**, apresentou-se a descrição da diversidade bacteriana em  
25 amostras de saliva, biofilme supragengival, dentina e canal radicular de dentes  
26 decíduos com infecções endodônticas. O estudo da riqueza e da abundância de  
27 espécies nas comunidades microbianas é de extrema importância, já que o  
28 comportamento e a patogenicidade da comunidade é obviamente dependente da sua  
29 diversidade. Foi possível determinar as relação estruturais das comunidades  
30 microbianas contíguas em ecossistemas relacionados ao sistema de canais radiculares



1 de dentes decíduos. Empregou-se o método de PCR-RISA, garantindo uma análise  
2 mais completa e não direcionada a um grupo de espécies bacterianas. Observou-se  
3 que cada ecossistema apresenta perfil composicional diferenciado, mesmo  
4 pertencendo a um mesmo participante. Análises adicionais devem ser conduzidas com  
5 métodos de sequenciamento de alto rendimento, com o intuito de caracterizar os  
6 microrganismos compartilhados por esses ecossistemas e as integrações de suas vias  
7 metabólicas e de patogenicidade.

8           No **Capítulo 3**, foram explorados um dos fatores de virulência que fornece  
9 às bactérias a possibilidade de sobreviver à exposição de agentes letais às células.  
10 Estudaram-se genes associados à resistência bacteriana aos antimicrobianos  
11 pertencentes ao grupo dos beta-lactâmicos, macrolídeos, tetraciclinas e lincosamidas,  
12 pois estes são frequentemente prescritos em Odontologia. Os genes de resistência à  
13 tetraciclina e à eritromicina foram frequentemente detectados em amostras de  
14 diferentes ecossistemas. Cabe salientar que a detecção de genes de resistência aos  
15 antibióticos não significa necessariamente resistência a eles, mas sim o potencial para  
16 a expressão da proteína codificada. Não há uma distribuição homogênea destes genes  
17 em S, SB, D e RC. Cada paciente parece apresentar um perfil único de distribuição de  
18 genes de resistência, e que não é similar ao do responsável que a conduziu até a  
19 consulta.

20           Considerando-se os métodos empregados nos estudos, a análise conjunta  
21 dos dados permite concluir que cada um dos ecossistemas da cavidade bucal de  
22 crianças portadoras de infecções endodônticas avaliado apresenta espécies  
23 bacterianas e fatores de virulência distribuídos de forma única e distintas, a partir de  
24 uma perspectiva de análise de diversidade.

25

## 1 REFERÊNCIAS

2

3 AABENHUS, Rune *et al.*. Clinical indications for antibiotic use in Danish general  
4 practice: results from a nationwide electronic prescription database. **Scandinavian**  
5 **Journal of Primary Health Care**, [s. l.], v. 35, n. 2, p. 162–169, 2017.

6 ADLER, Christina J. *et al.*. Sequencing ancient calcified dental plaque shows changes  
7 in oral microbiota with dietary shifts of the Neolithic and Industrial revolutions. **Nature**  
8 **Genetics**, [s. l.], v. 45, n. 4, p. 450–455, 455e1, 2013.

9 AMERICAN ACADEMY ON PEDIATRIC DENTISTRY COUNCIL ON CLINICAL  
10 AFFAIRS. Guideline on appropriate use of antibiotic therapy for pediatric dental  
11 patients. **Pediatric Dentistry**, [s. l.], v. 30, n. 7 Suppl, p. 212–214, 2008.

12 BRAGA, Mariana M. *et al.*. Parameters associated with active caries lesions assessed  
13 by two different visual scoring systems on occlusal surfaces of primary molars - a  
14 multilevel approach. **Community Dentistry and Oral Epidemiology**, [s. l.], v. 38, n. 6,  
15 p. 549–558, 2010.

16 BRUSTOLIN, Juliane Priscila *et al.*. Survival and Factors Associated with Failure of  
17 Pulpectomies Performed in Primary Teeth by Dental Students. **Brazilian Dental**  
18 **Journal**, [s. l.], v. 28, n. 1, p. 121–128, 2017.

19 DE LUCA, Maia *et al.*. Antibiotic Prescriptions and Prophylaxis in Italian Children. Is It  
20 Time to Change? Data from the ARPEC Project. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 11, n. 5, 2016.  
21 Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4868290/>>. Acesso em:  
22 11 nov. 2017.

23 DEWHIRST, Floyd E. *et al.*. The human oral microbiome. **Journal of Bacteriology**, [s.  
24 l.], v. 192, n. 19, p. 5002–5017, 2010.

25 DRELL, Tiina *et al.*. The Influence of Different Maternal Microbial Communities on the  
26 Development of Infant Gut and Oral Microbiota. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 7, n. 1, p.  
27 9940, 2017.

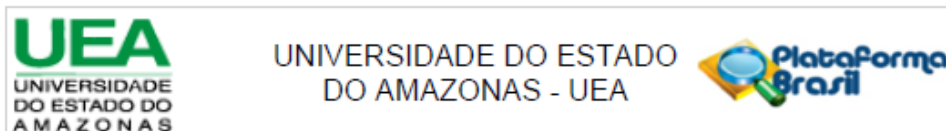
28 GOMES, Genara Brum *et al.*. An investigation of the presence of specific anaerobic  
29 species in necrotic primary teeth. **Brazilian Oral Research**, [s. l.], v. 27, n. 2, p. 149–  
30 155, 2013.

31 HALL, Michael W. *et al.*. Inter-personal diversity and temporal dynamics of dental,  
32 tongue, and salivary microbiota in the healthy oral cavity. **NPJ biofilms and**  
33 **microbiomes**, [s. l.], v. 3, p. 2, 2017.

34 KOLENBRANDER, Paul E. Multispecies communities: interspecies interactions  
35 influence growth on saliva as sole nutritional source. **International Journal of Oral**  
36 **Science**, [s. l.], v. 3, n. 2, p. 49–54, 2011.

- 1 MORAES, Ludmila Coutinho *et al.*. Distribution of genes related to antimicrobial  
2 resistance in different oral environments: a systematic review. **Journal of**  
3 **Endodontics**, [s. l.], v. 41, n. 4, p. 434–441, 2015.
- 4 PAZELLI, Luciana Cunha *et al.*. Prevalence of microorganisms in root canals of human  
5 deciduous teeth with necrotic pulp and chronic periapical lesions. **Pesquisa**  
6 **Odontologica Brasileira = Brazilian Oral Research**, [s. l.], v. 17, n. 4, p. 367–371,  
7 2003.
- 8 TAKAHASHI, N.; NYVAD, B. Caries ecology revisited: microbial dynamics and the  
9 caries process. **Caries Research**, [s. l.], v. 42, n. 6, p. 409–418, 2008.
- 10 WU, C. C. *et al.*. Inhibitory effect of *Lactobacillus salivarius* on *Streptococcus mutans*  
11 biofilm formation. **Molecular Oral Microbiology**, [s. l.], v. 30, n. 1, p. 16–26, 2015.
- 12 XU, Xin *et al.*. Oral cavity contains distinct niches with dynamic microbial communities.  
13 **Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 17, n. 3, p. 699–710, 2015.
- 14 ZAURA, Egija *et al.*. Defining the healthy “core microbiome” of oral microbial  
15 communities. **BMC microbiology**, [s. l.], v. 9, p. 259, 2009.
- 16 ZAURA, Egija *et al.*. Same Exposure but Two Radically Different Responses to  
17 Antibiotics: Resilience of the Salivary Microbiome versus Long-Term Microbial Shifts in  
18 Feces. **mBio**, [s. l.], v. 6, n. 6, p. e01693-01615, 2015.
- 19
- 20

## ANEXO A - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS (UEA)



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DA EMENDA

**Título da Pesquisa:** Caracterização de comunidades microbianas e avaliação da distribuição dos genes de resistência a agentes antimicrobianos em ecossistemas orais de pacientes infantis e seu núcleo familiar

**Pesquisador:** NAELKA SARMENTO

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 47029015.6.0000.5016

**Instituição Proponente:** Escola Superior de Ciências da Saúde da Universidade do Estado do

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 1.907.490

#### Apresentação do Projeto:

O protocolo foi avaliado e aprovado pelo CEP UEA em 17 de Agosto de 2015, conforme parecer número 1.188.788. A pesquisadora reapresenta como emenda.

**Justificativa da emenda:** Esta emenda tem como objetivo solicitar a inclusão da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como coparticipante ao projeto de pesquisa. O projeto já foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade do Estado do Amazonas (Manaus, AM). Os procedimentos que envolvem o recrutamento de participantes ocorrem apenas no Centro onde o projeto já foi aprovado. Serão realizadas na UFRGS a análise laboratorial das amostras coletadas. Atenciosamente, Francisco Montagner

**Pesquisador Responsável:** NAELKA SARMENTO

**Submetido em:** 23/01/2017

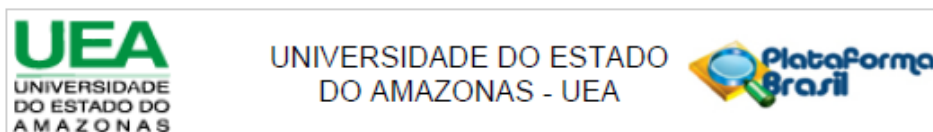
**Instituição Proponente:** Escola Superior de Ciências da Saúde da Universidade do Estado do Amazonas/UEA

#### Objetivo da Pesquisa:

Objetivos apresentados na primeira versão, conforme parecer número 1.188.788, emitido pelo CEP

**Endereço:** Av. Carvalho Leal, 1777  
**Bairro:** chapada **CEP:** 69.050-030  
**UF:** AM **Município:** MANAUS  
**Telefone:** (92)3878-4368 **Fax:** (92)3878-4368 **E-mail:** cep.uea@gmail.com

## ANEXO A - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS (UEA) (Continuação)



Continuação do Parecer: 1.907.490

UEA em 17 de Agosto de 2015.

### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos e benefícios - apresentados na primeira versão, conforme parecer número 1.188.788, emitido pelo CEP UEA em 17 de Agosto de 2015.

### Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Metodologia - apresentados na primeira versão, conforme parecer número 1.188.788, emitido pelo CEP UEA em 17 de Agosto de 2015.

### Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Termos de apresentação obrigatórios - apresentados na primeira versão, conforme parecer número 1.188.788, emitido pelo CEP UEA em 17 de Agosto de 2015.

### Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Trata-se de protocolo de pesquisa envolvendo seres humanos, pertencente ao grupo III, fora das áreas temáticas especiais. Trata-se de emenda que tem o objetivo de inclusão da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como coparticipante ao projeto de pesquisa. O protocolo está completo e atende a Resolução 466/12 do CNS. Diante do exposto somos pela aprovação.

### Considerações Finais a critério do CEP:

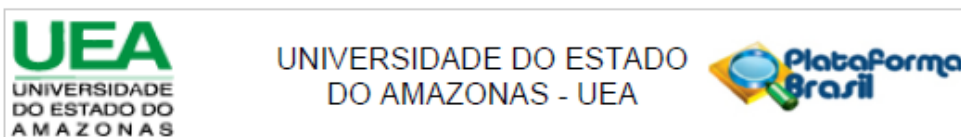
Tendo em vista a legislação vigente, o CEP recomenda ao pesquisador: comunicar toda e qualquer alteração do projeto e no termo de consentimento livre e esclarecido, para análise das mudanças; informar imediatamente qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento da pesquisa. O comitê de ética solicita a V. Sa., que encaminhe relatórios parciais de andamento a cada 06 (seis) meses da pesquisa e ao término. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_841213 E1.pdf	23/01/2017 09:37:51		Aceito
Outros	SARMENTO_Adendo.pdf	23/01/2017 09:30:57	FRANCISCO MONTAGNER	Aceito
Folha de Rosto	FOLHA DE ROSTO DOUTORADO.pdf	24/06/2015 23:51:13		Aceito

Endereço: Av. Carvalho Leal, 1777  
 Bairro: chapada CEP: 69.050-030  
 UF: AM Município: MANAUS  
 Telefone: (92)3878-4368 Fax: (92)3878-4368 E-mail: oep.uea@gmail.com

## ANEXO A - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS (UEA) (Continuação)



Continuação do Parecer: 1.907.490

Outros	ANEXO 2.pdf	19/06/2015 16:27:25		Aceito
Outros	CURRICULO - LUCIANO CASAGRANDE.pdf	19/06/2015 00:16:03		Aceito
Outros	CURRICULO - MARIA BEATRIZ.pdf	19/06/2015 00:14:54		Aceito
Outros	CURRICULO-FRANCISCO MONTAGNER.pdf	19/06/2015 00:14:09		Aceito
Outros	CURRICULO - NAELKA SARMENTO.pdf	19/06/2015 00:10:59		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	SARMENTO-TCLEs.docx	18/06/2015 23:41:27		Aceito
Outros	SARMENTO-ANEXO 1.docx	18/06/2015 23:41:11		Aceito
Outros	SARMENTO-APENDICE 3.docx	18/06/2015 23:40:50		Aceito
Outros	SARMENTO-APÊNDICE 1.docx	18/06/2015 23:38:28		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	SARMENTO-PROJETO-CEP.doc	18/06/2015 23:37:46		Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

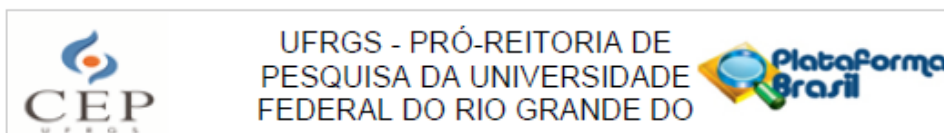
Não

MANAUS, 05 de Fevereiro de 2017

Assinado por:  
DOMINGOS SÁVIO NUNES DE LIMA  
(Coordenador)

Endereço: Av. Carvalho Leal, 1777  
Bairro: chapada CEP: 69.050-030  
UF: AM Município: MANAUS  
Telefone: (92)3878-4368 Fax: (92)3878-4368 E-mail: cep.uea@gmail.com

## ANEXO B - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL (UFRGS)



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Caracterização de comunidades microbianas e avaliação da distribuição dos genes de resistência a agentes antimicrobianos em ecossistemas orais de pacientes infantis e seu núcleo familiar

**Pesquisador:** NAELKA SARMENTO

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 47029015.6.3001.5347

**Instituição Proponente:** Escola Superior de Ciências da Saúde da Universidade do Estado do

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 1.956.508

#### Apresentação do Projeto:

**Instituição proponente:** Universidade do Estado do Amazonas

**Instituição co-partícipe:** UFRGS

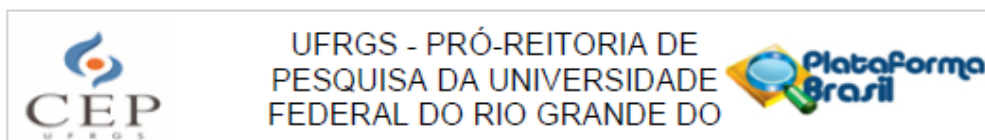
A colonização da cavidade oral começa tão cedo quanto o nascimento, sendo que neste momento a microbiota oral é relativamente simples na sua composição. Entretanto, com a erupção dos dentes ocorre importante diferenciação ecológica da microbiota as quais podem ser influenciadas pela transmissão de microrganismos entre pais e crianças.

O objetivo do projeto é caracterizar as comunidades microbianas e verificar a presença de fatores de resistência a agentes antimicrobianos em amostras da cavidade oral de crianças e adultos, pertencentes a um mesmo núcleo familiar, na cidade de Manaus

Os procedimentos clínicos serão realizados na Policlínica de Odontologia da Universidade do Estado do Amazonas, em Manaus, Amazonas (Apêndice 1). Os procedimentos laboratoriais serão

**Endereço:** Av. Paulo Gama, 110 - Sala 317 do Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro  
**Bairro:** Farroupilha **CEP:** 90.040-080  
**UF:** RS **Município:** PORTO ALEGRE  
**Telefone:** (51)3308-3738 **Fax:** (51)3308-4085 **E-mail:** etica@propeq.ufrgs.br

## ANEXO B - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL (UFRGS) (Continuação)



Continuação do Parecer: 1.956.508

realizados no Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Bucal da FO/UFRGS

O tamanho amostral calculado foi de 12 indivíduos e, para compensar eventuais perdas, 3 indivíduos (correspondendo a 25% do tamanho calculado) foram acrescentados à amostra, obtendo-se um número final de 15 indivíduos para realização deste estudo. Crianças com idade entre 3 a 10 anos, que comparecerem à Policlínica de Odontologia da Universidade do Estado do Amazonas, em Manaus, AM, apresentando incisivos, caninos e molares decíduos com necrose pulpar.

Serão realizadas: 1- Coleta de Saliva; 2- Coleta do Biofilme Supragengival; 3-Coleta do Canal Radicular; 4- Coleta da saliva de membros do núcleo familiar. As amostras microbiológicas serão introduzidas em tubos plásticos, submetidas para isolamento do DNA microbiano seguida da técnica de PCR Simples para a detecção da presença dos genes associados ao desenvolvimento de resistência a agentes antimicrobianos.

### Objetivo da Pesquisa:

Caracterizar as comunidades microbianas e verificar a presença de fatores de resistência a agentes antimicrobianos em amostras da cavidade oral de crianças e adultos, pertencentes a um mesmo núcleo familiar, na cidade de Manaus

### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os principais riscos são os inerentes ao procedimento reabilitador que deve ser realizado nos participantes do estudo e um potencial desconforto dos demais membros familiares durante a coleta de material. Entretanto, os participantes podem desistir de participar sem prejudicar o tratamento do paciente. Os benefícios são indiretos e envolvem potenciais alternativas terapêuticas.

### Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Projeto bem elaborado e relevante para o campo de atuação dos profissionais. Projeto previamente aprovado por CEP da Universidade do Estado do Amazonas.

### Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os pesquisadores apresentaram TCLE adequado e demais autorizações das Instituições envolvidas.

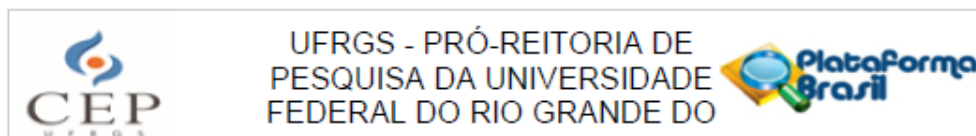
### Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Os participantes vinculados à Instituição co-participe realizarão os testes laboratoriais e o projeto encontra-se adequado. Recomenda-se que, em adição ao TCLE, seja incluso um Termo de Assentimento, para os eventuais participantes que sejam menores de idade.

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



## ANEXO B - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL (UFRGS) (Continuação)



Continuação do Parecer: 1.956.508

### Considerações Finais a critério do CEP:

Aprovado.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_841213 E1.pdf	23/01/2017 09:37:51		Aceito
Outros	SARMENTO_Adendo.pdf	23/01/2017 09:30:57	FRANCISCO MONTAGNER	Aceito
Folha de Rosto	FOLHA DE ROSTO DOUTORADO.pdf	24/06/2015 23:51:13		Aceito
Outros	ANEXO 2.pdf	19/06/2015 16:27:25		Aceito
Outros	CURRICULO - LUCIANO CASAGRANDE.pdf	19/06/2015 00:16:03		Aceito
Outros	CURRICULO - MARIA BEATRIZ.pdf	19/06/2015 00:14:54		Aceito
Outros	CURRICULO-FRANCISCO MONTAGNER.pdf	19/06/2015 00:14:09		Aceito
Outros	CURRICULO - NAELKA SARMENTO.pdf	19/06/2015 00:10:59		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	SARMENTO-TCLÉs.docx	18/06/2015 23:41:27		Aceito
Outros	SARMENTO-ANEXO 1.docx	18/06/2015 23:41:11		Aceito
Outros	SARMENTO-APENDICE 3.docx	18/06/2015 23:40:50		Aceito
Outros	SARMENTO-APÊNDICE 1.docx	18/06/2015 23:38:28		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	SARMENTO-PROJETO-CEP.doc	18/06/2015 23:37:46		Aceito

### Situação do Parecer:

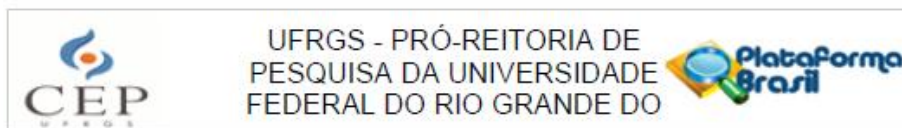
Aprovado

### Necessita Apreciação da CONEP:

Não

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

**ANEXO B - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL (UFRGS) (Continuação)**



Continuação do Parecer: 1.956.508

PORTO ALEGRE, 09 de Março de 2017

---

Assinado por:  
José Artur Bogo Chies  
(Coordenador)

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