

Augusto César Sette Dias

INFECÇÕES ODONTOGÊNICAS GRAVES:  
ETIOLOGIA MICROBIANA, PERFIL DE CITOCINAS E DE  
SUSCETIBILIDADE A DROGAS ANTIMICROBIANAS

Departamento de Microbiologia  
Instituto de Ciências Biológicas  
Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte

2016

Augusto César Sette Dias

INFECÇÕES ODONTOGÊNICAS GRAVES:  
ETIOLOGIA MICROBIANA, PERFIL DE CITOCINAS E DE  
SUSCETIBILIDADE A DROGAS ANTIMICROBIANAS

Tese apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Doutor.

Orientadora: Paula Prazeres Magalhães

Coorientador: Luiz de Macêdo Farias

Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios

Departamento de Microbiologia

Instituto de Ciências Biológicas

Universidade Federal de Minas Gerais

2016

## COLABORAÇÃO

Maria Auxiliadora Roque de Carvalho  
Departamento de Microbiologia  
Instituto de Ciências Biológicas

Antônio Paulino Ribeiro Sobrinho  
Departamento Odontologia Restauradora

Evandro Neves Abdo  
Departamento de Clínica, Patologia e Cirurgia Odontológicas  
Faculdade de Odontologia  
UFMG  
Belo Horizonte, MG

Flávia Teles  
The Forsyth Institute  
Cambridge, MA

Luciana Carla Neves de Brito  
Faculdade de Odontologia  
Universidade de Itaúna  
Itaúna, MG

Aos meus pais Élio e Canuta,  
minha esposa Neuma e ao nosso filho  
Gustavo pelo incentivo, paciência, carinho  
e compreensão.

## **AGRADECIMENTOS**

À Profa Paula Prazeres, minha querida e coerente orientadora, obrigado pela orientação clara e direta. Agradeço pela amizade, conselhos, confiança, e compreensão em todos os momentos deste trabalho. Em momentos conturbados eu sabia que havia alguém ao meu lado. Agradeço também por ter permitido a experiência docente, o que me fez muito bem. Absorvi seus conselhos, suas posições e cresci com isso. Espero não ter dado muito trabalho. Obrigado pela oportunidade de aprender com você.

Ao Prof. Luiz de Macedo, co-orientador, querido mestre e amigo, sincero, direto e claro. Você me permitiu em muitas vezes a crítica construtiva, e sem a qual seria impossível a realização desta etapa. Agradeço pela sua postura de professor, de orientador e de pessoa. Levarei isso para toda a minha vida. Obrigado pela minha formação Mestre!!!!!!

Ao Prof. Antonio Paulino, sereno, que apesar do pouco contato, foi uma figura essencial na realização desta pesquisa. Agradeço pelas amplas conversas que tivemos. Obrigado pelos conselhos e convívio e por proporcionar a realização deste trabalho. Aprendi muito com você e levo este aprendizado para toda a minha vida.

À Profa. Maria Auxiliadora Roque de Carvalho, pelos ensinamentos da vida. Sou grato ter me introduzido no mundo da Microbiologia Oral, juntamente com o Prof Luiz de Macedo. Tenho orgulho de ter vocês como parte da minha formação. Te respeito e considero, obrigado!!!!

Ao Prof. Evandro Abdo, por me iniciar à carreira acadêmica pela amizade, ensinamentos da vida, conselhos e por ter me incentivado tantas vezes. Sem dúvida a sua postura de professor, de orientador e de pessoa teve impacto direto na minha formação. Em momentos difíceis me balizei na sua postura e integridade e as utilizei como exemplo. Eu serei eternamente grato!!!

À Profa. Simone pelo convívio e amizade, eu agradeço. Antes de tudo te considero como uma amiga.

Aos pós-doutorandos do laboratório Cristina Dutra e Kelly Grillo, pela presteza, companheirismo e amizade.

À Kamilla Maciel pela amizade e auxílio providencial ao trabalho relativo à resposta imune. Obrigado, você é demais!!!

Aos meus colegas de laboratório de mestrado e doutorado que estavam presentes na alegria e na tristeza, o meu muito obrigado. Vocês contribuíram , ajudaram , fizeram acontecer. Não esquecerei jamais!!!

Agradeço a Patrícia Oliveira, João Fernando, Samir Elian, Mirna, Silvia Pietra, Jaqueline Moreira, Ana Gabriela e Marcela Braga, por terem congregado comigo esta etapa maravilhosa da vida.

Obrigado Natália, Taysa Andre e Jéssica, conviver com vocês foi muito bom. O apoio foi fundamental para os mais diferentes momentos da minha estadia aqui.

Obrigado Mariana Vaz e Diego Marquioli, o retorno de vocês ao laboratório foi algo que me trouxe muita felicidade. Convivermos novamente, foi tudo de bom.

Aos estudantes de Iniciação Científica (ICs), que além do auxílio sério e responsável foram fonte de alegria. Aproveitei cada minuto ao lado de cada um. Vocês moram no meu coração!!!!

Obrigado Amanda, Cássia, Carol Peconick e Yanmeric, o que tenho em mãos foi fruto do auxílio de vocês. Agradeço por se empenharem em um trabalho árduo que executaram com eficiência.

Agradeço também ao Matheus, Deborah, Jade e Deyse, apesar de não trabalharmos diretamente juntos a nossa convivência foi fantástica.

Aos meus ex-colegas de laboratório Renata Gomes, João Paulo, Simone Cristina, Carolina Vallef, Rafael Mangerotti e José Sergio, obrigado pelos ensinamentos e pela amizade. Este trabalho não seria possível sem vocês.

Aos pacientes dos quais foram obtidos os espécimes clínicos, que mesmo em um momento de sofrimento não se negaram à cooperação deste trabalho.

Á todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho e participaram comigo desta jornada, expresso minha gratidão.

Enfim, agradeço a Deus por ter me permitido a conclusão desta pesquisa e por ter tido o privilégio de trabalhar com pessoas tão maravilhosas quanto vocês.



*“É mais fácil obter o  
que se deseja com um  
sorriso do que à ponta  
da espada.”*

*William Shakespeare*

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	19
1.1 <b><i>Infecções Odontogênicas Graves: Aspectos Gerais</i></b>	19
1.1.1 <i>ASPECTOS GERAIS</i>	19
1.1.2 <i>ETIOLOGIA</i>	21
1.2 <b><i>Organismos Fastidiosos e não Cultiváveis Associados A Outras Infecções Odontogênicas</i></b>	24
1.3 <b><i>MICROBIOMA</i></b>	27
1.4 <b><i>HOMINGS - HUMAN ORAL MICROBE IDENTIFICATION USING NEXT GENERATION SEQUENCING</i></b>	30
1.5 <b><i>RESISTÊNCIA A DROGAS ANTIMICROBIANAS NA ODONTOLOGIA</i></b>	32
1.6 <b><i>RESPOSTA IMUNO-INFLAMATÓRIA NAS INFECÇÕES ORAIS</i></b>	40
1.6.1 <i>ASPECTOS GERAIS</i>	40
1.6.2 <i>CÉLULAS T HELPER</i>	42
1.6.3 <i>CITOCINAS</i>	44
1.6.4 <i>QUIMIOCINAS</i>	48
1.6.5 <i>RESPOSTA IMUNO-INFLAMATÓRIA ASSOCIADA AOS PROCESSOS INFECCIOSOS ODONTOGÊNICOS</i>	50
<b>2 JUSTIFICATIVA</b>	55
<b>3 OBJETIVOS</b>	57
3.1 <b><i>OBJETIVO GERAL</i></b>	57
3.2 <b><i>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</i></b>	57
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b>	58
4.1 <b><i>AVALIAÇÃO DA MICROBIOTA ASSOCIADA A INFECÇÕES ODONTOGÊNICAS GRAVES POR ABORDAGEM METAGENÔMICA</i></b>	58
4.1.1 <i>GRUPO DE ESTUDO E OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS</i>	58
4.1.2 <i>EXTRAÇÃO DE DNA</i>	59

4.1.3	<i>PROTOCOLO HOMINGS</i>	59
4.1.4	<i>SEQUENCIAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS</i>	60
<b>4.2</b>	<b><i>PARTE II - AVALIAÇÃO DO PERFIL DE SUSCETIBILIDADE A DROGAS ANTIMICROBIANAS DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE PACIENTES COM INFECÇÕES ODONTOGÊNICAS GRAVES</i></b>	60
4.2.1	<i>AMOSTRAS BACTERIANAS</i>	60
4.2.2	<i>ANTIBIOGRAMA</i>	61
4.2.2.1	<i>DISCO-DIFUSÃO</i>	63
4.2.2.2	<i>CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA</i>	65
<b>4.3</b>	<b><i>PARTE III - AVALIAÇÃO DO PERFIL IMUNO-INFLAMATÓRIO: NÍVEL DE TRANSCRIÇÃO DE CITOCINAS E QUIMIOCIAS</i></b>	66
4.3.1	<i>GRUPO DE ESTUDO E OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS</i>	66
4.3.2	<i>EXTRAÇÃO DE RNA</i>	67
4.3.3	<i>QUANTIFICAÇÃO DO RNA</i>	67
4.3.4	<i>SÍNTESE DE cDNA</i>	68
4.3.5	<i>QUANTIFICAÇÃO DE mRNA DE CITOCINAS E QUIMIOCIAS</i>	68
4.3.6	<i>ANÁLISE ESTATÍSTICA</i>	69
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	71
<b>5.1</b>	<b><i>PARTE I: AVALIAÇÃO DA MICROBIOTA ASSOCIADA A INFECÇÕES ODONTOGÊNICAS GRAVES POR ABORDAGEM METAGENÔMICA</i></b>	71
<b>5.2</b>	<b><i>PARTE II - AVALIAÇÃO DO PERFIL DE SUSCETIBILIDADE A DROGAS ANTIMICROBIANAS DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE PACIENTES COM INFECÇÕES ODONTOGÊNICAS GRAVES</i></b>	78
<b>5.3</b>	<b><i>PARTE III - AVALIAÇÃO DO PERFIL IMUNO-INFLAMATÓRIO: NÍVEL DE TRANSCRIÇÃO DE CITOCINAS E QUIMIOCIAS</i></b>	88
<b>6</b>	<b>SÍNTESE DE RESULTADOS E CONCLUSÕES</b>	94

<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	96
<b>ANEXOS</b>	128
<b>Anexo A. Aprovação pelos comitês de ética em pesquisa da UFMG e do Hospital Odilon Behrens</b>	128
<b>Anexo B. Termo de consentimento livre e esclarecido</b>	132
<b>Anexo C. Artigos</b>	133
<i>Carta de aceite do artigo: Cytokine expression in patients hospitalized for severe odontogenic infection in Brazil</i>	133
<i>Artigo I. Cytokine expression in patients hospitalized for severe odontogenic infection in Brazil</i>	134
<i>Artigo II. Susceptibility profiling of isolates from severe odontogenic infections</i>	148

## LISTA DE FIGURAS

	p
FIGURA 1- Princípio da abordagem empregada pela plataforma <i>Illumina</i> . Agrupamentos de sequências são formados por meio da amplificação por ponte, requerendo sequências adaptadoras e iniciadoras em uma base sólida	31
FIGURA 2- Subtipos de linfócitos T CD4+: citocinas e tipo de resposta relacionada	43
FIGURA 3- Estrutura das quimiocinas. Diagrama esquemático indicando as relações dos resíduos conservados de cisteína (C) e pontes dissulfeto. As subfamílias C, CC, CXC e CX3C de quimiocinas estão representadas	48
FIGURA 4- Relação entre riqueza de microrganismos e freqüência nos 37 pacientes avaliados (%).	74
FIGURA 5- Prevalência de microrganismos nos 37 pacientes avaliados (%).	75
FIGURA 6- Relação entre o total de reads encontrados nos pacientes e os reads de uma única espécie.	76
FIGURA 7- Abundância relativa dos microrganismos nos 37 pacientes avaliados.	77
FIGURA 8- Perfil de suscetibilidade a antimicrobianos de 10 amostras de <i>Staphylococcus</i> isoladas de pacientes com infecções odontogênicas graves	83
FIGURA 9- Perfil de suscetibilidade a antimicrobianos de 36 amostras de cocos Gram positivos catalase negativos isoladas de pacientes com infecções odontogênicas graves	84
FIGURA 10- Perfil de suscetibilidade a antimicrobianos de 28 amostras de bactérias anaeróbias obrigatórias isoladas de pacientes com infecções odontogênicas graves	86

FIGURA 11- Expressão de mRNA das citocinas IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-10, IL-17A, TGF- $\beta$  e TNF- $\alpha$  e das quimiocinas CCL2/MCP-1, CCL5 e IL-8 em amostras recuperadas de abscessos periapicais agudos de pacientes com infecções odontogênicas graves (grupo caso, n = 12) e fluido intersticial de dentes com polpa vital de pacientes saudáveis (grupo controle, n = 12).

## LISTA DE QUADROS

	P
QUADRO 1- Amostras bacterianas isoladas de abscessos de pacientes hospitalizados com infecção odontogênica grave submetidas a antibiograma.	62
QUADRO 2- Drogas antimicrobianas utilizadas para os antibiogramas	64
QUADRO 3- Sequência dos <i>primers</i> , temperatura de desnaturação e tamanho do amplicon das reações de amplificação empregadas no estudo.	70

## LISTA DE ABREVIATURAS

APC: Célula apresentadora de antígeno

ATCC: *American type culture collection*

CETEA: Comissão de Ética em Experimentação Animal

CCL: *chemokine (C-C motif) ligand*

CD-: *Cluster of differentiation*

cDNA: DNA complementar

°C: grau *Celsius*

CIM: concentração inibitória mínima

CLSI: *Clinical and Laboratory Standards Institute*

Ct: *threshold cycle*

DNA: Ácido desoxirribonucleico

EDTA: Ácido etilenodiaminotetracético

Foxp3: *forkhead box P3*

GAPDH: *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*

HOMINGS: *Human Oral Microbe Identification Using Next Generation Sequencing*

IFN: Interferon

Ig: Imunoglobulina

kDa: Kilodaltons

ng: nanograma

NK: *Natural Killer*

IL-: Interleucina

LPS: *Lipopolysaccharides*

MCP1: *monocyte chemotactic protein 1*

MHC: *Major histocompatibility complex*

mm: milímetro

min: minuto

mRNA: RNA mensageiro

pb: Pares de base

PCR: *Polymerase chain reaction*

PMN: Leucócitos polimorfonucleares

pH: Potencial hidrogeniônico

RANK: Receptor ativador do fator nuclear kappa B

RANKL: Ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B

*rDNA*: DNA ribossomal

RNA: Ácido ribonucleico

TGF: *Transforming growth factor*

Th: Célula T *helper*

TNF-: Fator de necrose tumoral

Treg: Célula T regulatória

UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais

µg: microgramas

µL: microlitros

## RESUMO

As infecções odontogênicas, processos infecciosos originados nos tecidos dentais ou de suporte, apresentam natureza polimicrobiana e estão associadas ao desequilíbrio da microbiota indígena e de sua interação com o hospedeiro. A doença pode evoluir de forma grave, levando à hospitalização do paciente. Considerando a escassez de dados referentes ao tema, desenvolvemos este estudo, que visa avaliar a composição da microbiota associada ao quadro, o perfil de suscetibilidade a drogas antimicrobianas da mesma e a expressão de citocinas pró-inflamatórias e regulatórias associadas à doença. Para a avaliação do perfil de suscetibilidade a antimicrobianos, foram incluídas 74 amostras de bactérias anaeróbias facultativas e obrigatórias isoladas de 30 pacientes internados em decorrência de infecções odontogênicas graves. O antibiograma foi realizado de acordo com metodologia preconizada pelo CLSI. Para avaliação da expressão de citocinas pró-inflamatórias, foram estudadas amostras de secreção purulenta obtidas de 12 pacientes caso e 12 indivíduos controle. PCR em tempo real precedido de transcrição reversa foi empregado para quantificação da expressão de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-17A, IFN- $\gamma$ , IL-10, TGF- $\beta$ , IL-8, CCL2 e CCL5. No que se refere ao estudo do microbioma associado a infecções odontogênicas graves, foram avaliados espécimes clínicos oriundos de 38 pacientes, foi utilizada a abordagem HOMINGS – (*Human Oral Microbe Identification Using Next Generation Sequencing*). Relativo aos resultados do antibiograma, quando todo o grupo é considerado, os maiores índices de resistência foram observados para eritromicina e clindamicina (45 % e 30 %, respectivamente). Entre os anaeróbios obrigatórios, taxas elevadas de suscetibilidade foram detectadas. Destacaram-se os índices de resistência ao metronidazol e à clindamicina, de, aproximadamente, 45 % e 25 %, respectivamente. Com relação ao perfil de citocinas, foi observada alta expressão das citocinas pró-inflamatórias IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-17-A e IL-1 $\beta$  e das quimiocinas IL-8 e CCL2/MCP-1, foi observado também baixa expressão da quimiocina CCL5 e citocinas anti-inflamatórias IL-10 e TGF- $\beta$ . Com relação ao microbioma, foi observado um perfil polimicrobiano com uma média de 88 espécies por paciente, com a prevalência de *Rothia Dentocariosa*, *Parvimonas micra* entre outros. Os dados aqui gerados contribuem para a compreensão da

interrelação entre uma microbiota patogênica e a resposta orquestrada pelo hospedeiro em um quadro de infecção oral grave.

**Palavras-chave:** infecções odontogênicas, suscetibilidade, microbiota oral, perfil de citocinas.

## **ABSTRACT**

*Odontogenic infections are defined as polymicrobial processes that affect the teeth or their supporting structures, being associated with the interaction between indigenous microbiota and host. Due to possible complications in the course of the disease, emergent hospitalization might be necessary. Considering the paucity of data on the topic, the aim of this study was to evaluate the susceptibility profile of isolated bacteria, the expression of cytokines/chemokines and the microbiota associated with severe odontogenic infection. In order to evaluate antimicrobial susceptibility profile, we followed CLSI guidelines. To determine the profile of cytokine expression, samples of pus obtained from 12 patients and 12 control individuals were included in the investigation. Real time PCR was employed to quantify the expression of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-17A, IFN- $\gamma$ , IL-10, TGF- $\beta$ , IL-8, CCL2 and CCL5. Regarding to microbial profile, the microbiota of 38 patients with the disease was evaluated by metagenomics HOMINGS – (Human Oral Microbe Identification Using Next Generation Sequencing). A total of 74 isolates were obtained from 30 hospitalized patients presenting odontogenic infections. When the whole study group was evaluated, higher resistance rates were observed for erythromycin and clindamycin (about 45% and 30%, respectively). Among anaerobes, the highest resistance rates were about 45% for metronidazol and 25% for clindamycin. Regarding to cytokines expression, high amounts of the proinflammatory cytokines: IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-17A, IL-1 $\beta$  and the chemokines: IL-8, CCL2/MCP-1, were observed. While, low expression of the chemokine CCL5 and anti-inflammatory cytokines: IL-10 and TGF- $\beta$  was observed. Regarding to microbial profile, it was observed an average of 88 species per patient, with the prevalence of *Rothia dentocariosa* and *Parvimonas micra*. These results contribute to our knowledge about the interrelationship between pathogenic microorganisms and the response orchestrated by the host in a condition of severe oral infection.*

**Keywords:** *odontogenic infection, microbiome, oral microbiota, cytokines expression.*

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 **INFECÇÕES ODONTOGÊNICAS GRAVES**

5

### 1.1.1 *ASPECTOS GERAIS*

10 Infecções odontogênicas são processos infecciosos originados nos tecidos dentais ou de suporte. A maioria das infecções que se apresentam na cavidade oral pode ser considerada odontogênica e primária, sendo as mais frequentes, relacionadas a cárie dental, gengivites, periodontites e pericoronarites (VICENTE-RODRIGUEZ, 2004). De acordo com Seppänen *et al.* (2010), a  
15 incidência é de cerca de 7,2 a cada 100.000 habitantes.

A propagação de infecções odontogênicas, geralmente, é contida por barreiras anatômicas ou pelos planos do tecido, como músculos e ossos. Entretanto, em determinadas situações, pode ocorrer a propagação da infecção, por exemplo, em direção à laringe, ao mediastino e aos espaços cervicais  
20 profundos, originando as infecções odontogênicas graves. Estas foram, muitas vezes, observadas como processos profundos da cabeça e pescoço. Em muitos estudos, infecções dentárias são apontadas como origem prevalente de infecções cervico-faciais (SUGATA *et al.*, 1997; SENNES *et al.*, 2002; LARAWIN *et al.*, 2006; BOYANOVA *et al.*, 2006).

25 As infecções odontogênicas podem se espalhar muito rapidamente, obstruindo, inclusive, as vias aéreas. É possível, ainda, a propagação em tecidos alvos mais distantes, causando, mais frequentemente, trombose do seio cavernoso, abscesso cerebral e meningite (SUGATA *et al.*, 1997; GREEN *et al.*, 2001; JIMÉNEZ *et al.*, 2004).

30 Fatores predisponentes para as infecções odontogênicas incluem senilidade, diabetes não compensada (especialmente tipo 1), alteração de neutrófilos, mudanças hormonais (puberdade, gravidez), radioterapia, quimioterapia, trauma, doenças psiquiátricas, hipertensão, neoplasias malignas

da cabeça e pescoço e abuso de entorpecentes (NATARAJAN, 2005; DARAMOLA *et al.*, 2009).

Pacientes com infecções odontogênicas podem requerer cuidados hospitalares. Entre os fatores de risco potenciais associados ao aumento do período de internação ou risco de óbito dos pacientes com infecções odontogênicas graves, citam-se problemas médicos preexistentes, idade avançada, febre presente na admissão do paciente, doenças respiratórias, localização da infecção, complicações, como falha da terapêutica de primeira escolha, e necessidade de reintervenção (FLYNN *et al.*, 2006; PETERS *et al.*, 1996; ZHANG *et al.*, 2010). Entretanto, de acordo com Garcia-Roco *et al.* (2003) e Kunkel *et al.* (2006), nenhuma variável social ou clínica pode predizer curso grave de infecções odontogênicas. De acordo com Seppänen *et al.* (2010), que avaliaram a relação entre doenças de base e idade de indivíduos acometidos por infecções odontogênicas graves, há aumento da prevalência destas comorbidades na população acometida com o aumento da idade média.

Nas infecções odontogênicas graves, os dentes responsáveis pela infecção focal, em ordem decrescente de prevalência, são o primeiro molar inferior permanente, o terceiro molar inferior, o segundo molar permanente inferior, o segundo molar inferior decíduo, o primeiro molar superior permanente, o primeiro molar inferior decíduo e o primeiro e segundo molares decíduos superiores (PARKER & KHATEERY, 2001).

As infecções odontogênicas graves apresentam como sinais e sintomas mais comuns, edema, dor no assoalho da boca, febre, disfagia, odinofagia, sialose, trismo, odontalgia e respiração fétida. Mudanças na fonação, aflição respiratória e cianose são sinais de comprometimento das vias aéreas. Os pacientes podem apresentar disfonia, caracterizada por “uma voz de batata quente”, causada pelo edema. Estes achados devem servir como aviso para os clínicos da obstrução grave das vias aéreas superiores. Taquicardia e taquipneia não são incomuns (PETERSON, 1993; DAVID & LEMONICK, 2002; ULUIBAU *et al.*, 2005, SETTE-DIAS *et al.*, 2012).

Zaleckas *et al.* (2010) estudaram o perfil demográfico dos pacientes com celulites no assoalho bucal sendo que, em quase sua totalidade, os processos tinham origem em infecções dentárias. Destes, 65% residiam em região urbana,

47% tinham emprego, 15% eram aposentados, 22% estavam desempregados, 10% eram crianças, 2% eram estudantes e 4% eram deficientes.

Wong (1999) relatou taxa de mortalidade de, aproximadamente, um em cada 150 pacientes e Sette-Dias *et al.*, (2012) observaram uma taxa de mortalidade de 1,7% nos pacientes hospitalizados por infecções odontogênicas. O autor destacou que os pacientes que foram a óbito eram, na sua maioria, diabéticos, com infecções profundas ou necrosantes.

### 10 1.1.2 ETIOLOGIA

O surgimento da doença oral parece estar associado ao desequilíbrio da microbiota indígena, levando ao aumento percentual da população de bactérias envolvidas no processo. Para melhor entendimento do quadro, é necessário conhecer a ecologia da cavidade oral e identificar fatores responsáveis pela transição da natureza das relações entre as bactérias orais e o hospedeiro, de benéficas para patogênicas. Fatores relacionados ao hospedeiro, ao microrganismo e externos podem influenciar o ecossistema oral (MARSH; MARTIN, 2005).

Vários critérios têm sido desenvolvidos para se relacionar microrganismos específicos à etiologia de doenças odontogênicas. Para se reconhecer uma bactéria como patógeno importante, ela deve apresentar as seguintes características: ser prevalente na lesão, sua eliminação deve estar associada à melhora clínica, deve ser detectada resposta imune específica do hospedeiro contra ela, os microrganismos suspeitos devem apresentar fatores de virulência que possam se relacionar à doença e a destruição do tecido deve ser reproduzida na presença do patógeno putativo em modelos experimentais (SOCRANSKY, 2009, KURAMITSU *et al.*, 2007).

Diferenças sutis são relatadas entre a microbiota associada ao abscesso dentário localizado e àquela observada na disseminação da infecção odontogênica, incluindo, neste processo, a presença de *Streptococcus* do grupo *anginosus* e *Fusobacterium* spp. como parte da microbiota predominante (HAN &

KERSCHNER, 2001; SCHUMAN & TURNER, 1999). A *Prevotella* parece desempenhar papel significativo na disseminação da infecção odontogênica. Segundo Riggio *et al.* (2007), o gênero representa 50% das amostras isoladas de de pus aspirado de pacientes acometidos pela doença.

5 Segundo Warnke *et al.* (2008), a natureza polimicrobiana de abscessos odontogênicos foi confirmada em 98% dos espécimes clínicos. Observa-se um consórcio de bactérias, cuja composição é regulada pelas relações positivas e negativas entre seus membros. Na dependência das interações entre os microrganismos, pode ocorrer a potencialização da patogenicidade dos mesmos  
10 (BROOK, 1986).

Stefanopoulos & Kolokotronis (2004) e Warnke *et al.* (2008) relatam, como organismos predominantemente observados em abscessos odontogênicos, cocos Gram positivos microaerófilos e anaeróbios facultativos, e bastonetes Gram negativos e cocos gram positivos anaeróbios obrigatórios. De acordo com os  
15 autores, nenhuma espécie pode ser implicada consistentemente em todos os casos avaliados.

As interações nutricionais são importantes determinantes ecológicos, que resultam em maior eficiência metabólica de toda a comunidade e aumentam a probabilidade de certas espécies serem encontradas, concomitantemente, em um  
20 mesmo *habitat*. Estas interações nutricionais são representadas, principalmente, por cadeias alimentares e cooperações bacterianas para a utilização de substratos derivados do hospedeiro (SIQUEIRA & RÔÇAS 2009).

Entre os microrganismos anaeróbios facultativos, destacam-se os cocos Gram positivos, em especial *Streptococcus* do grupo viridans. *Streptococcus milleri* é relatada como a espécie mais prevalente (SENNES *et al.*, 2002; SOBOTTKA *et al.*, 2002; CHAN & CHAN, 2003; AL-QAMACHI *et al.*, 2010). Merecem, ainda, ser mencionados *Staphylococcus* coagulase negativo, *Enterococcus*, *Neisseria*, *Corynebacterium*, *Haemophilus*, *Actinomyces*, *Lactobacillus*, *Moraxella*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*,  
25 *Enterobacteriaceae*, *Eikenella corrodens*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Capnocytophaga* (SUNDQVIST *et al.*, 1989; SENNES *et al.*, 2002; SOBOTTKA *et al.*, 2002; CHAN & CHAN, 2003; MAESTRE VERA, 2004; VICENTE-RODRÍGUEZ, 2004; WARNKE *et al.*, 2008).

Dentre os anaeróbios obrigatórios, os gêneros *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Fusobacterium*, *Bacteroides* e *Peptostreptococcus* são os mais frequentes. Citam-se, também, *Propionibacterium*, *Clostridium* e *Veillonella* (SENNES *et al.*, 2002; SOBOTTKA *et al.*, 2002; CHAN & CHAN, 2003; SOUSA *et al.*, 2003; MAESTRE VERA, 2004, VICENTE-RODRÍGUEZ, 2004; JACINTO *et al.*, 2008).

Heimdahl *et al.* (1985) relataram perfis microbianos diferentes quando compararam infecções odontogênicas moderadas e graves. Os autores concluíram que os espécimes clínicos oriundos de quadros graves continham maior proporção de microrganismos Gram negativos, sendo *Fusobacterium nucleatum* frequentemente detectado.

Segundo Boyanova *et al.* (2006), há uma pequena diferença na recuperação de microrganismos depois de instituído o tratamento empírico com antimicrobianos. Os microrganismos predominantemente encontrados foram *Prevotella*, seguido por *Fusobacterium*, *Actinomyces*, cocos anaeróbios, *Eubacterium* e *Bacteroides fragilis*. A taxa de detecção de *Fusobacterium* em pacientes não tratados foi maior que em pacientes tratados.

Riggio *et al.* (2007) realizaram um estudo para determinar a prevalência de microrganismos associados com a propagação de infecções odontogênicas. Amostras de secreção purulenta obtidas de quatro pacientes foram analisadas por métodos de cultura microbiológica e PCR, clonagem e sequenciamento de rDNA 16S. Pelo método de cultura foram identificadas espécies dos gêneros *Prevotella*, *Streptococcus* e *Fusobacterium*. O método genético permitiu a detecção de uma microbiota mais diversa. O gênero predominante foi *Prevotella*, em especial a espécie *Prevotella oris*, amostras não cultiváveis de *Peptostreptococcus*, *Prevotella* PUS9.180 e um microrganismo pertencente ao filo Bacteroidetes.

## 1.2 ORGANISMOS FASTIDOSOS E NÃO CULTIVÁVEIS ASSOCIADOS A OUTRAS INFECÇÕES ORAIS

5 Segundo Chen *et al.* (2010), embora o biofilme oral de seres humanos venha sendo extensivamente estudado, mais da metade dos organismos ainda não foram validamente nomeados e mais de um terço são incultiváveis. Para Robertson & Smith (2009), melhorias nas técnicas de cultura e identificação microbiana assim como a utilização de abordagens mais modernas, inclusive independentes de cultivo, como técnicas de genética molecular, têm possibilitado o melhor conhecimento desta microbiota. Segundo os autores, a detecção de espécies *novas*, até então desconhecidas, abre uma nova área de estudo, que inclui a pesquisa dos fatores de virulência presentes nestas bactérias e a relevância dos mesmos, bem como das interações com outros microrganismos já conhecidos e mais bem estudados.

O gênero *Atopobium* foi criado por Collins e Wallbanks (1992), para incluir os microrganismos anteriormente classificados como *Lactobacillus minutum*, *Lactobacillus rimae* e *Streptococcus parvulus*. Análise da sequência do rDNA 16S demonstrou que as referidas espécies estavam relacionados com uma linha distinta de actinobactérias (STACKEBRANDT *et al.*, 1997). Representantes do gênero *Atopobium* são relatados como parte da microbiota gengival de seres humanos. São bastonetes Gram positivos, anaeróbios obrigatórios, observados em gengiva humana saudável e associados à periodontite crônica (OLSEN *et al.*, 1991; KUMAR *et al.*, 2003). O grupo também já foi implicado na ocorrência de sepse (CHUNG *et al.*, 2007; ANGELAKIS *et al.*, 2009).

A espécie *Dialister invisus* é constituída por pequenos cocos Gram negativos isolados, em pares, cadeias curtas ou grupos pequenos, anaeróbios obrigatórios e móveis. O cultivo é difícil, as colônias são circulares e transparentes e o cultivo em meio líquido produz apenas uma ligeira turvação, visível somente com a adição de 1% de carboidrato (DOWNES *et al.*, 2003). Assim, é provável que a presença do microrganismo em bolsas periodontais e canais radiculares venha sendo subestimada (DJAIS *et al.*, 2006). Para Kumar *et al.* (2005), *Dialister* é comumente encontrado na cavidade oral, inclusive associado a doenças como

periodontite marginal, cárie (CHHOUR *et al.*, 2005 ), halitose (KAZOR *et al.*, 2003) e periodontite apical (MUNSON *et al.*, 2002; SIQUEIRA & ROÇAS 2002). Espécies de *Dialister* também foram detectadas em espécimes clínicos obtidos de pacientes com vaginose bacteriana (FREDRICKS *et al.*, 2005), infecções do trato urinário (DOMANN *et al.*, 2003), do trato intestinal (WANG *et al.*, 2005) e abscesso cerebral (ROUSEE *et al.*, 2002). O isolamento da bactéria de indivíduos com infecções endodônticas tem sido ocasionalmente relatado, mas, a dificuldade de distinção entre amostras de *Dialister* e de outras bactérias isoladas da cavidade oral pode dificultar sua detecção (SUMMANEN *et al.*, 1993; WEIGER *et al.*, 1995; DOAN *et al.*, 2000).

O *Filifactor alocis* foi isolado pela primeira vez em 1985, do sulco gengival, sendo denominado, a princípio, de *Fusobacterium alocis* (JALAVA & EEROLA, 1999). É um bastonete Gram negativo anaeróbio obrigatório (observado, inicialmente, em pacientes com periodontite crônica (KUMAR *et al.*, 2003; KUMAR *et al.*, 2005; DAHLEN *et al.*, 2006), periodontite agressiva generalizada (HUTTER *et al.*, 2003) e infecções endodônticas (SIQUEIRA & RÔÇAS, 2003). Posteriormente, *F. alocis* foi detectado em pacientes com paralisia cerebral com doença periodontal, sendo proposto como um potencial marcador para a doença ativa (KUMAR *et al.*, 2006). Para Schlafer *et al.* (2010), *F. alocis* parece ser um importante marcador de doença periodontal. Acredita-se que a bactéria desempenhe papel importante como um dos arquitetos da organização estrutural de biofilmes periodontais.

Siqueira e Rôças (2005) encontraram clones relacionados ao gênero *Synergistes* na microbiota endodôntica de dentes não tratados. Este filotipo também foi detectado por Munson *et al.* (2002) tanto em dentes não submetidos a tratamento endodôntico como pós falha do tratamento. Diferentes clones de *Synergistes*, como W090 e BA121, foram observados em canais radiculares infectados e em indivíduos com periodontite, inclusive periodontite refratária (KUMAR *et al.*, 2003). A prevalência elevada de *Synergistes* em canais radiculares sugere que estes microrganismos desempenham papel na patogênese das lesões perirradiculares (SIQUEIRA & ROÇAS, 2005).

De acordo com Olsen *et al.* (1991), os membros do gênero *Olsenella* são bastonetes Gram positivos pequenos, elípticos, imóveis, que ocorrem

individualmente, em pares e em cadeias curtas, não formadores de esporos e anaeróbios obrigatórios. De acordo com o estudo realizado por Chavez de Paz *et al.*(2004), a espécie *Olsenella uli* predomina sobre outros bastonetes Gram positivos em amostras do canal radicular obtidas após preparo e instrumentação, sugerindo que esta espécie pode resistir às medidas de antissepsia intracanal e assim, pode estar envolvida em infecções persistentes. Segundo Siqueira e Roças (2005), espécies de *Olsenella*, particularmente *O. uli*, são membros comuns da microbiota endodôntica primária associada a infecções.

Segundo Paster *et al.*(2002), o clone X083 é um filotipo ainda não cultivado do filo Bacteroidetes, inicialmente detectado em amostras obtidas de pacientes com periodontite necrosante superficial e gengivite ulcerativa. De acordo com sequenciamento do rDNA 16S, apresenta mais de 99% de semelhança com o clone Bacteroidetes MCE7\_20, que foi identificado, pela primeira vez, em infecções endodônticas crônicas (MUNSON *et al.*, 2002). O clone X083 vem sendo associado a periodontite apical crônica (SAITO *et al.*, 2006; SAKAMOTO *et al.*, 2006; MACHADO DE OLIVEIRA *et al.*,2007, RÔÇAS; SIQUEIRA, 2008), abscesso apical agudo (JACINTO *et al.*,2007) e ao insucesso do tratamento endodôntico (SAKAMOTO *et al.*, 2008).

Siqueira e Rôças (2009) avaliaram a microbiota de abscessos apicais agudos, encontrando maior prevalência de *F. nucleatum*, *Parvimonas micra* e *Porphyromonas endodontalis*. Relataram, ainda, *O. uli*, *Streptococcus*, *E. corrodens* e alguns filotipos ainda não cultivados (Bacteroidetes clone X083 e *Synergistes* BA121), além de espécies recém nomeadas (*Prevotella baroniae* e *Dialister invisus*).

Para Cogulu *et al.* (2008), a espécie *Treponema denticola* está fortemente associada com radioluscência periapical e dor, enquanto *P. gingivalis* está relacionada com sensibilidade à percussão nos dentes decíduos e permanentes. Segundo Siqueira e Roças (2006), tanto *T. denticola* como *Tanerella forsythia* foram frequentemente detectadas em abscessos endodônticos. Sassone *et al.* (2008) realizaram um estudo com o objetivo de avaliar a composição da microbiota das infecções endodônticas primárias, utilizando o método *checkerboard* de hibridização DNA-DNA. Os autores concluíram que existe

associação entre a contagem bacteriana total, a quantidade de *T. forsythia* e a presença de sintomatologia dolorosa.

Nonnenmacher *et al.* (2004) relataram que *Desulfobulbus*, um microrganismo Gram negativo, anaeróbio obrigatório, está significativamente associado com sítios periodontais profundos. O clone *Desulfobulbus* OT 041 foi detectado exclusivamente em amostras obtidas de pacientes com periodontite (TELES *et al.*, 2011).

Já as espécies do gênero *Selenomonas* são microrganismos frequentemente detectados no ambiente oral. Estes são anaeróbios obrigatórios móveis, Gram negativos e apresentam morfologia bacilar. A bactéria pode ser isolada da microbiota subgengival e também tem sido implicada como agente etiológico da doença periodontal. Proporções mais elevadas deste microrganismo são observadas em pacientes com periodontite crônica generalizada. Devido às dificuldades de cultivo e isolamento da bactéria, são requeridas técnicas de genética molecular para estudos de prevalência do organismo (FAVERI *et al.*, 2008; DRESCHER *et al.*, 2010).

O gênero *Rothia* inclui seis espécies, das quais apenas três são comumente encontradas na cavidade oral (*Rothia dentocariosa*, *Rothia mucilaginosa* e *Rothia aeria*) e são, na maioria das vezes, simbióticas. O microrganismo é Gram positivo, anaeróbio facultativo, pleomórfico, catalase positivo e imóvel. Atua como patógeno oportunista, causando algumas doenças além de cárie dental e doença periodontal, sendo a endocardite bacteriana frequentemente associada a *Rothia* (RUOFF, 2002 VON-GRAEVENITZ, 2004; SHAKOOR *et al.*, 2011).

25

### 1.3 **MICROBIOMA**

30 Microbioma humano é conceituado como a comunidade ecológica comensal, simbiótica e de microrganismos patogênicos que compartilha os espaços corporais. O conhecimento do microbioma pode auxiliar na melhor compreensão das doenças infecciosas, contribuindo, inclusive, para o

delineamento de estratégias mais eficazes de prevenção e controle das mesmas. (LEDERBERG *et al.*, 2001)

5 Aproximadamente 700 espécies de organismos procariotos estão presentes na cavidade oral humana. Destas cerca de 49% são conhecidas e nomeadas, 17% são cultivadas mas ainda não nomeadas e 34% são conhecidas apenas como filotipos incultiváveis (<http://www.homd.org>).

10 Não diferente de outros sítios do corpo humano, os microrganismos que colonizam a cavidade oral têm potencial significativo de se disseminar para tecidos adjacentes, causando doenças, ou seja, habilidade anfibiótica. Estes microrganismos são implicados como a causa de doenças orais, tais como, cárie dentária, periodontite e infecções endodônticas, e também têm ligação com a etiopatogenia de doenças sistêmicas, incluindo doenças cardiovasculares, acidente vascular cerebral e pneumonia (DEWHIRST *et al.*, 2010, BELSTRØM *et al.*, 2016a).

15 Em geral, existem três principais categorias de análise molecular microbiana que são: 1) métodos baseados em PCR, incluindo PCR com alvo único, PCR *multiplex* e PCR quantitativo; 2) métodos de hibridização de DNA-DNA, tais como hibridação *in situ*, *checkerboard* e *microarrays* de rDNA 16S; e 3) sequenciamento, incluindo o mais recentemente, denominado sequenciamento de nova geração (PASTER; DEWHIRST, 2009; MARDIS, 2013).

20 Para Linnarsson *et al.* (2010) e Mardis *et al.* (2013), desde os avanços introduzidos por Sanger, o método de sequenciamento tem sido uma base sólida para a investigação em todos os ramos das ciências biológicas e da saúde. O emprego do sequenciamento do rDNA 16S para a identificação bacteriana foi proposto por Carl Woese, na década de 80, quando foi mostrado que relações filogenéticas de bactérias poderiam ser determinadas comparando esta porção do genoma. Com a utilização de *primers* universais complementares a regiões conservadas do rDNA 16S por Weisburg e colaboradores, no início da década de 90, foi possível sequenciar várias regiões hipervariáveis do gene. Estas regiões apresentam uma relação com a filogenia das espécies, o que permitiu, desde 25 30 então, a criação de bancos de dados e, conseqüentemente, a identificação taxonômica. Assim, a técnica de identificação por meio do sequenciamento do

rDNA 16S tornou o "padrão ouro" para criação de perfis microbianos e identificação destes microrganismos.

5 Desta forma, a ecologia microbiana passou por profunda mudança de foco das análises filogenéticas observacionais de caracterização experimental (HUGENHOLTZ *et al.*, 1998; THE HUMAN MICROBIOME CONSORTIUM, 2012).

10 Inicialmente, a metagenômica era baseada na associação de clonagem clássica com o sequenciamento de Sanger, o que, geralmente, permitia a obtenção de alguns alvos previamente selecionados, sendo o sequenciamento um fator limitante. Novas abordagens dispensam a etapa de clonagem e, conseqüentemente, os problemas inerentes à mesma. Atualmente, é possível o sequenciamento direto de amostras coletadas das mais diversas fontes, empregando-se diversas técnicas comercialmente disponíveis (TEELING *et al.*, 2012; BELSTRØM *et al.*, 2016b).

15 Diversas abordagens, convencionais ou de genética molecular, podem ser empregadas para determinação do microbioma. A metagenômica refere-se ao estudo, por metodologia independente de cultivo, que permite avaliar os genomas presentes na microbiota de determinado *habitat* (PETROSINO *et al.*, 2009).

20 Para Kozich *et al.* (2013), os rápidos avanços da tecnologia de sequenciamento mudaram o panorama experimental da ecologia microbiana. As abordagens que geravam centenas de fragmentos de rDNA 16S foram substituídas por métodos que permitem a obtenção de bibliotecas de clones para o sequenciamento de milhões de fragmentos. Diante da ampla gama de produtos disponíveis, é fundamental avaliar os pontos fortes, pontos fracos e a adequação geral dessas plataformas para a investigação de comunidades microbianas, de  
25 forma a obter dados mais informativos e acurados.

Segundo Schloss *et al.* (2011), essa mudança decorreu da redução dos custos das técnicas de sequenciamento, além do desenvolvimento de ferramentas robustas de bioinformática. Os autores concordam na necessidade de avaliação cuidadosa da plataforma a ser empregada, visando à obtenção de  
30 seqüências de qualidade, levando em consideração o custo gerado por amostra processada. Para Wang *et al.* (2005) também é importante observar o comprimento das seqüências geradas, visto que seqüências mais longas são

mais facilmente relacionadas a um grupo taxonômico, utilizando-se um classificador.

5 Para o preparo das amostras, de forma geral, como se parte de uma amostra de DNA de fita dupla, os passos são conceitualmente comuns, independente da plataforma a ser utilizada. Para a conversão de uma amostra em uma biblioteca sequenciável, o DNA deve ser extraído, fragmentado, amplificado, purificado e quantificado. Outro ponto a ser considerado é que para cada uma das plataformas existentes, a biblioteca de DNA deve ser fragmentada com adaptadores flanqueados à sequência conhecida (PASTER *et al.*, 2009).

10 As três principais tecnologias de sequenciamento de nova geração são: 1) pirosequenciamento com a plataforma 454 *Sequencing*, da Roche®, que envolve a fragmentação do DNA e a amplificação com adaptadores especiais, que produz até um milhão de cópias (400.000 sequências de DNA com cerca de 2500 bases de comprimento); 2) a plataforma SOLiD®, semelhante àquela da Roche, que  
15 utiliza a incorporação de uma ligase e oligonucleotídios universais; e 3) a plataforma *Illumina*®, que também utiliza DNA fragmentado e adaptadores especializados, mas utiliza a uma superfície de fase sólida (FIG 1) (MARDIS *et al.*, 2008). Para Bentley *et al.* (2008) e Caporaso *et al.*, (2012) , esta última plataforma oferece uma ampla cobertura e custo mais reduzido.

20

#### 1.4 **HOMINGS - HUMAN ORAL MICROBE IDENTIFICATION USING NEXT GENERATION SEQUENCING**

25

O HOMINGS foi desenvolvido pelos pesquisadores Bruce Paster e Floyd Dewhirst, a partir do HOMIM (*Human Oral Microbe Identification Microarray*), associando esta técnica ao sequenciamento de nova geração, com análise *in silico*. Os fragmentos, de cerca de 440 pb, que normalmente são obtidos pela

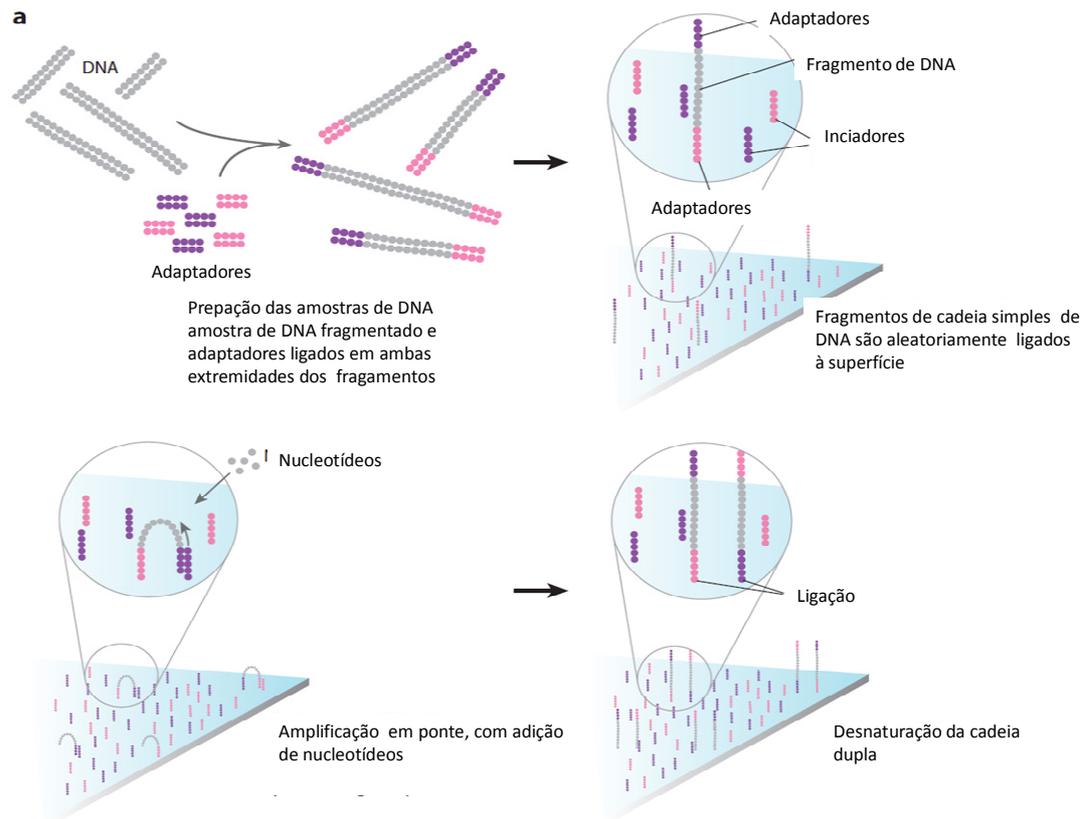


FIGURA 1

5 Princípio da abordagem empregada pela plataforma *Illumina*. Agrupamentos de sequências são formados por meio da amplificação por ponte, requerendo sequências adaptadoras e iniciadoras em uma base sólida (Adaptado de MARDIS *et al.*, 2008, p. 400.).

10

plataforma MiSeq (*Illumina*) são comparados com sondas espécie-específicas, após removidas sequências não utilizáveis e sequências quiméricas. Muitas das sondas foram originalmente concebidas para HOMIM. Os dados são analisados no programa *Probe Seq* para HOMINGS e, então, a frequência de bactérias é

15 determinada. A técnica emprega mais de 600 sondas oligonucleotídicas, de 17 a 40 bases, e permite a identificação de microrganismos orais e algumas espécies estreitamente relacionadas. Os resultados são expressos como frequência do microrganismo identificado. O método pode ser aplicado para avaliar associações entre bactérias orais, em condições de saúde e doenças, como os diversos tipos

20 de periodontite, cárie, gengivite, pneumonia associada à ventilação mecânica, lesões endodônticas, abscessos e halitose. Também pode ser utilizado para

determinar a eficácia de terapias e a progressão das doenças orais. (homings.forsyth.org, GOMES *et al.*, 2015, BELSTRØM *et al.*, 2016a).

Esta abordagem, quando comparada às demais plataformas discutidas, permite uma identificação mais precisa. Entretanto, está limitada a um painel de  
5 microrganismos para os quais as sondas foram sintetizadas (WANG *et al.*, 2014).

### 1.5 **RESISTÊNCIA A DROGAS ANTIMICROBIANAS NA ODONTOLOGIA**

10

Infecções odontogênicas da região maxilofacial são consideradas doenças graves, mesmo considerando-se os grandes avanços da quimioterapia antimicrobiana, em decorrência de possíveis complicações, principalmente, disseminação aos espaços anatômicos profundos. Para a abordagem terapêutica  
15 adequada dos pacientes acometidos pelo quadro, é necessário, entre outros, o conhecimento dos agentes etiológicos da doença e do seu perfil de suscetibilidade a drogas antimicrobianas (CHUNDURI *et al.*, 2012).

20

Embora estas informações sejam fundamentais, devido a características intrínsecas das infecções odontogênicas e dos agentes do processo, a investigação laboratorial não é realizada na rotina clínica. Assim, uma abordagem pragmática e racional para a seleção empírica do antimicrobiano é aceitável, desde que a escolha seja baseada em dados científicos e na experiência consolidada (KURIYAMA *et al.*, 2000). Atualmente, o tratamento baseia-se,  
25 e administração de altas doses de antimicrobianos, definidos de forma empírica, direcionados aos microrganismos possivelmente envolvidos (PETERSON, 1993).

30

A resistência bacteriana, a drogas antimicrobianas, tem sido considerada um problema relevante para a área de saúde, inclusive, para a Odontologia. Segundo Aracil *et al.*(2001), Groppo *et al.*(2005) e Bresco-Salinas *et al.* (2006), no  
que se refere a bactérias orais, taxas crescentes de resistência a drogas antimicrobianas, como macrolídeos, penicilinas e clindamicina, vêm sendo detectadas entre diversos grupos de microrganismos. Destacam-se, entre eles, os gêneros *Porphyromonas* e *Prevotella*.

35

A avaliação da resistência bacteriana a antimicrobianos deve considerar a importância do grupo microbiano estudado, a doença em questão e o papel

representado pela droga testada no tratamento, justificando-se o monitoramento dos níveis de resistência a antimicrobianos apresentado pelos principais patógenos (VAN-WINKELHOFF *et al.*, 2005). A utilização inadequada de antimicrobianos favorece a seleção de bactérias resistentes, além de ter  
5 repercussões importantes na ecologia do hospedeiro. Para minimizar este risco e obter máximo efeito antimicrobiano, é necessário saber em quais situações clínicas seu uso é indicado e a relação de eficácia entre as diferentes drogas antimicrobianas e os microrganismos associados à etiopatogenia de infecções odontogênicas (LÓPEZ-PÍRIZ *et al.*, 2007).

10 Entre os anaeróbios obrigatórios, diversos estudos sugerem que *Prevotella*, *Porphyromonas* e *Fusobacterium* são os microrganismos predominantes entre bastonetes Gram negativos isolados a partir de infecções odontogênicas orofaciais (HEIMDAHL, 1985; BROOK, 1991; CHUNDURI *et al.*, 2012).

15 Para Goldstein *et al.* (1995), enquanto bactérias anaeróbias são patógenos clínicos importantes, laboratórios de análises clínicas variam em suas capacidades e interesse no isolamento e identificação de anaeróbios e no seu desempenho para realização de testes de suscetibilidade a antimicrobianos de bactérias anaeróbias. Com o aumento da resistência a uma variedade de agentes  
20 clássicos “anti-anaeróbios”, incluindo vários relatos de casos de resistência clínica ao metronidazol, é clara a necessidade do emprego de antibiograma com o objetivo de monitoramento da evolução da resistência antimicrobiana.

Considerando que o uso, ainda que correto, de drogas antimicrobianas exerce pressão seletiva, favorecendo a elevação das taxas de resistência  
25 bacteriana, o uso de terapias de curta duração tem sido recomendado, embora nem sempre embasado por dados científicos. Chardin *et al.* (2009) realizaram um estudo que teve como objetivo avaliar o impacto da terapia antimicrobiana contra *Streptococcus*, comparando terapias de amoxicilina de três e sete dias. Os resultados mostraram que ambos os esquemas terapêuticos tiveram eficácia  
30 clínica semelhante. Em relação ao impacto destas terapias sobre as bactérias, os autores encontraram semelhança na seleção de amostras resistentes. Eles concluíram que a sensibilidade reduzida à amoxicilina é um fenômeno que se desenvolve rapidamente, sendo observado mesmo após terapia de curta duração.

Para Veloo *et al.* (2012), o monitoramento do perfil de suscetibilidade de microrganismos patogênicos aos antimicrobianos é fundamental para o tratamento de pacientes com doenças infecciosas. Estabelecer concentrações inibitórias mínimas de modo sistemático revela mudanças nos padrões de sensibilidade e permite detectar o surgimento de resistência aos antimicrobianos. Esta é uma informação essencial para o uso racional destes compostos na prática clínica. Os autores consideram que as diferenças geográficas no perfil de resistência antimicrobiana entre patógenos periodontais devem-se, provavelmente, ao uso diferenciado de antimicrobianos. Estas diferenças reforçam a necessidade de monitoramento local.

Eick *et al.* (1999) avaliaram os níveis de resistência a antimicrobianos de microrganismos obtidos de placa bacteriana subgingival e abscessos odontogênicos. Os autores mostraram que as amostras recuperadas de placa subgingival apresentavam-se mais resistentes a antimicrobianos do que aquelas isoladas de abscessos odontogênicos. A explicação dada pelos pesquisadores para o achado foi a presença de biofilme, que dificulta a penetração das drogas antimicrobianas. Contudo, os autores alertam para a necessidade de cuidado na interpretação dos resultados obtidos *in vitro*, que não devem ser extrapolados indiscriminadamente para a situação *in vivo*.

Gaetti-Jardim *et al.* (2010) realizaram um estudo com o objetivo de avaliar a suscetibilidade a drogas antimicrobianas de microrganismos isolados de infecções periodontais e peri-implantares. Foram testadas azitromicina, claritromicina, clindamicina, eritromicina, lincomicina, metronidazol e tetraciclina. Um total de 187 amostras de bactérias anaeróbias obrigatórias e facultativas foi estudado. Os resultados mostraram que a resistência a eritromicina, lincomicina e tetraciclina era mais disseminada entre os microrganismos isolados. Os autores concluíram que a utilização de macrolídeos mais tradicionais para o tratamento destas infecções merece ser mais bem avaliada, devendo, os mesmos, serem substituídos por “novos” fármacos do grupo.

Warnke *et al.* (2008) examinaram o espectro de patógenos potenciais encontrados em abscessos odontogênicos e seu perfil de suscetibilidade a penicilina, amoxicilina + ácido clavulânico, doxiciclina, clindamicina e moxifloxacino. Segundo os autores, embora a maioria das amostras isoladas

destes abscessos seja suscetível à penicilina, o antimicrobiano é menos eficaz que os demais fármacos testados. Moxifloxacino mostrou a maior eficácia contra anaeróbios facultativos e bons resultados contra anaeróbios obrigatórios. Os autores relataram ainda que, além de drenagem do abscesso cirúrgico, penicilina intravenosa adicional é suficiente para a rápida resolução das manifestações clínicas na maioria dos pacientes com abscesso odontogênico.

Kuriyama *et al.* (2007) consideraram a amoxicilina como um antimicrobiano apropriado como de primeira escolha. A amoxicilina tem espectro de atividade semelhante ao da penicilina V, mas a sua maior dose/intervalo a torna uma alternativa atraente. A combinação de amoxicilina e ácido clavulânico é útil para pacientes que tenham sido previamente tratados apenas com a droga  $\beta$ -lactâmica, sem sucesso.

A eritromicina é um macrolídio com espectro de ação comparável ao da penicilina, para tratamento de infecções odontogênicas. É mais ativo contra bactérias Gram positivas e cocos anaeróbios orais. Há indícios de aumento das taxas de resistência à eritromicina (SANDS, 1995). A azitromicina, outro antimicrobiano da classe dos macrolídios, tem grau mais elevado de absorção oral e é mais ativo contra amostras Gram negativas. Apresenta espectro de ação e taxas de resistência similares aos observados para a eritromicina, não sendo considerada uma droga de primeira escolha para infecções odontogênicas (MAESTRE JR., 2002).

Pinto *et al.* (2015) realizaram um estudo com o objetivo de avaliar o perfil de suscetibilidade a macrolídios de microrganismos isolados de infecções odontogênicas graves no Hospital Municipal Odilon Behrens, Minas Gerais, Brasil. As amostras de *Streptococcus* do grupo viridans apresentaram resistência similar aos diferentes macrolídios, azitromicina, eritromicina e claritromicina. Desta maneira, pode-se optar pelo emprego do antimicrobiano com menos efeitos colaterais e posologia facilitada.

Segundo Brook *et al.* (2005), a clindamicina tem sido utilizada clinicamente há mais de 30 anos e tem demonstrado um bom registro de eficácia e segurança em uma variedade de infecções, incluindo infecções odontogênicas. No entanto, a utilização deste agente tem sido limitada, em geral, pela possibilidade de desenvolvimento de colite pseudomembranosa, embora a taxa

de ocorrência desta complicação colite pseudomembranosa associada ao uso de clindamicina não é mais frequente que aquela relacionada a muitos outros antimicrobianos comumente empregados. A clindamicina é considerada uma droga altamente eficaz no campo da Odontologia, devendo ser considerada como um antimicrobiano de primeira linha para tratamento de pacientes alérgicos à penicilina, com as mais diversas infecções orais.

Diversos autores (SOBOTTKA *et al.*, 2002; CHAN; CHAN, 2003; BASCONES *et al.*, 2004; WARNKE *et al.*, 2008) citam moxifloxacino, levofloxacino, claritromicina, travofloxino, minociclina e espiramicina associado(s) a metronidazol e doxiciclina como possibilidades terapêuticas no tratamento das infecções odontogênicas graves. Para Zeitoun e Dhanarajani (1995) e Morey-Mas *et al.*(1996), os aminoglicosídeos também têm sua indicação clínica nos casos de infecções odontogênicas disseminadas para os espaços cervicais.

O metronidazol é uma droga sintética, bactericida, do grupo dos nitroimidazóis, altamente ativa contra bactérias Gram negativas anaeróbias obrigatórias e espiroquetas. Usualmente, é administrado em associação com outras drogas que são ativas contra bactérias anaeróbias facultativas Gram positivas, como amoxicilina e amoxicilina + ácido clavulânico (KARLOWSKY *et al.*, 1993; ROCHE; YOSHIMORI, 1997; MAESTRE JR., 2002; KURIYAMA *et al.*, 2007).

O metronidazol é considerado como uma droga de baixo custo, propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas favoráveis e poucos efeitos adversos menos evidentes. Embora ainda seja o antimicrobiano de escolha para a terapia de infecções por anaeróbios, tem sido relatada diminuição da suscetibilidade de algumas bactérias, como *Bacteroides* (LUBBE *et al.*, 1999; PAPAPARASKEVAS *et al.*, 2008; LOFMARK *et al.*, 2009; XIE *et al.*, 2013).

Dados epidemiológicos gerados por investigação conduzida por Jenks *et al.* (1999) sugerem que a variação terapêutica no uso do metronidazol parece ser um dos principais fatores que contribuem para as diferenças entre o perfil de resistência observado em diferentes regiões geográficas. Tem sido proposto que os níveis elevados de resistência relatados em países em desenvolvimento também podem estar relacionados com a utilização de metronidazol para tratamento de doenças causadas por protozoários. Ainda, a alta prevalência de

microrganismos resistentes recuperados de mulheres poderia estar relacionada com a utilização de metronidazol para o tratamento de infecções do trato genital.

5 Lee *et al.* (2010) determinaram o perfil de suscetibilidade a antimicrobianos de 255 bactérias anaeróbias coletadas em 2007 e 2008 em um hospital da Coréia do Sul. A piperacilina-tazobactam, cefoxitina, imipenem, e meropenem foram os agentes mais ativos contra a maioria das amostras testadas. Para os autores, o contínuo monitoramento é necessário para detectar mudanças no padrão regional.

10 Para Poeschl *et al.* (2010), normalmente, bactérias anaeróbias precisam de mais tempo em cultura e são mais sensíveis às alterações durante o seu transporte a partir do local de coleta até o laboratório. Portanto, pode se presumir que muitos anaeróbios não sobrevivam ao processo de coleta e de transporte e, desta forma, não são detectados. A antissepsia meticulosa da pele ou mucosa antes de punção e aspiração ou raspagem, bem como um curto tempo de  
15 transporte em meios adequados, são necessárias para o diagnóstico acurado.

Os testes de suscetibilidade aos microrganismos anaeróbios apresentam dificuldades técnicas quando comparados àqueles realizados para bactérias facultativas, pelos seguintes motivos gerais: (1) manipulação especial, evitando o contato com oxigênio; (2) a cultura anaeróbia é necessária; (3) o padrão de  
20 crescimento da cultura varia muito entre os diferentes tipos de anaeróbios; e (4) muitos anaeróbios têm muitas exigências nutricionais. Processos infecciosos envolvendo anaeróbios geralmente têm etiologia polimicrobiana, envolvendo, em média, três a cinco espécies, no caso de infecção anaeróbia supurativa. (SOCIEDADE JAPONESA DE QUIMIOTERAPIA E DOENÇAS INFECCIOSAS,  
25 2011).

As bactérias anaeróbias compreendem uma grande proporção da microbiota indígena de seres humanos. Estes microrganismos evoluíram na capacidade de adquirir e disseminar, por conjugação, elementos genéticos “móveis”, muitos dos quais abrigam marcadores de resistência a drogas  
30 antimicrobianas. Ainda, apresentam capacidade de sobrevivência em ambiente hipóxico/anóxico e contribuem para a formação de abscessos. Assim, são considerados patógenos importantes (VEDANTAM, HECHT 2003).

Gilmore *et al.* (1998) relataram que, entre os anaeróbios obrigatórios, a resistência às penicilinas pode variar de 8,9% a 16%, dependendo do gênero envolvido. A amoxicilina ainda apresenta um elevado nível de atividade contra a maioria dos anaeróbios orais, enquanto que a suscetibilidade reduzida de *Prevotella* pode ser uma questão de preocupação em relação ao perfil de suscetibilidade às penicilinas.

Estudo realizado por Sousa *et al.* (2003), que incluiu bactérias provenientes de canais radiculares com abscessos periapicais, demonstrou que 20% e 80% das amostras de *F. necrophorum* e *P. prevotii*, respectivamente, foram suscetíveis à eritromicina. Os autores detectaram, ainda, suscetibilidade a benzilpenicilina, amoxicilina, amoxicilina + ácido clavulânico, metronidazol e clindamicina. Os autores recomendaram o uso destes antimicrobianos para pacientes com alto risco de infecções bacterianas e endocardite ou para aqueles com abscessos periapicais. A penicilina ainda parece ser a droga de escolha para o tratamento infecções odontogênicas. Para pacientes alérgicos a este antimicrobiano, a clindamicina pode ser boa alternativa.

Poeschl *et al.* (2010) avaliaram, em um estudo retrospectivo, os microrganismos presentes em infecções de cabeça e pescoço e o perfil de suscetibilidade a antimicrobianos utilizados na rotina de tratamento. Um total de 206 pacientes que apresentaram infecções odontogênicas de espaço profundo foram recrutados. Os microrganismos predominantes foram *Streptococcus* do grupo viridans, *Staphylococcus*, *Prevotella*, *Peptostreptococcus* e *Bacteroides*. Em se tratando dos anaeróbios facultativos, as taxas de resistência foram de 18%, 14% e 7% para clindamicina, macrolídeos e penicilina G, respectivamente. No que se refere aos anaeróbios obrigatórios, resistência a clindamicina, metronidazol e penicilina G foi detectada em 11%, 6% e 8% das amostras, respectivamente.

Gomes *et al.* (2011) realizaram um estudo com objetivo de analisar a suscetibilidade de microrganismos anaeróbios obrigatórios isolados em diferentes períodos de tempo, para avaliar o perfil de desenvolvimento de resistência aos antimicrobianos frequentemente prescritos em endodontia. Para tanto, as amostras de canal radicular foram coletadas a partir dentes infectados em diferentes períodos de tempo (2000-2002, 2003-2005 e 2007-2008). Os autores

concluíram que amoxicilina e amoxicilina + clavulanato foram eficazes contra a maioria das espécies no diferentes períodos de estudo. No geral, houve pouca diferença quanto à susceptibilidade microbiana quando observados os diferentes intervalos de tempo avaliados. No entanto, foi notado aumento da resistência à penicilina G e à clindamicina. A resistência à eritromicina também foi observada em todas as espécies.

Xie *et al.* (2013) testaram o padrão de suscetibilidade de 41 bactérias anaeróbias isoladas a partir de um abscesso periodontal às drogas clindamicina, doxiciclina, amoxicilina, imipenem, cefradina, cefixima, roxitromicina e metronidazol. O antimicrobiano mais eficaz foi imipenem, ao qual todos os microrganismos foram sensíveis. Observou-se resistência a doxiciclina, metronidazol, amoxicilina e cefixima em 6,7%, 3,3%, 16,7% e 25% das amostras, respectivamente. Os fármacos menos eficazes foram clindamicina e roxitromicina, para os quais taxa de resistência de 31,7% foi detectada, o que limita sua utilização para tratamento empírico de pacientes com abscessos periodontais.

Kuriyama *et al.* (2002) relatam suscetibilidade a minociclina de 90% e 77% das amostras de *Streptococcus* do grupo viridans em 1991 e 2002, respectivamente. Com base nestes resultados, os autores reforçam a necessidade de monitoramento da suscetibilidade antimicrobiana.

Limeres *et al.* (2005), na Espanha, isolaram 50 amostras de *Streptococcus* do grupo viridans de abscessos odontogênicos em estágio inicial. A maioria das amostras foi suscetível aos  $\beta$ -lactâmicos, incluindo penicilina, ampicilina e amoxicilina (cerca de 95%). Resistência à eritromicina e à clindamicina foi observada para 60% e 12% das amostras, respectivamente.

Farmahan *et al.* (2014), em um estudo de suscetibilidade de amostras isoladas de processos infecciosos de cabeça e pescoço, observaram que a origem dental foi a mais prevalente. Entre os microrganismos isolados, 70% dos *Streptococcus* foram suscetíveis à amoxicilina e 84% à associação amoxicilina/metronidazol. Entre as amostras de *Staphylococcus aureus*, 14% foram resistentes à penicilina. Os autores não encontraram nenhuma mudança significativa no perfil de suscetibilidade quando os dados foram comparados com estudos anteriores e concluem que a amoxicilina ainda pode ser utilizada nestas infecções de forma eficaz.

Brenciani *et al.* (2014), em estudo que incluiu 263 amostras de *Streptococcus* do grupo viridans isoladas do trato aéreo superior, encontraram taxa de resistência à eritromicina de 56,3%. Os autores relataram resistência à tetraciclina e ao cloranfenicol de 27,4% e 2,7%, respectivamente. Segundo os  
5 autores, as taxas elevadas de *Streptococcus* do grupo viridans resistentes aos macrolídeos confirmam a persistência de uma prevalência acentuada desta resistência na Europa.

## 10 1.6 **RESPOSTA IMUNO-INFLAMATÓRIA NAS INFECÇÕES ORAIS**

### 1.6.1 ASPECTOS GERAIS

15

Os leucócitos são integrantes do sistema imunitário humano e são capazes de circular para locais de infecção e retornar para órgãos linfoides secundários, favorecendo a elaboração de uma resposta imunológica adequada. Embora certos leucócitos, por exemplo, fagócitos ou células citotóxicas, possam  
20 exercer seus papéis diretamente no local da infecção, algumas células precisam retornar para os gânglios linfáticos ou ao baço, onde podem apresentar antígeno ou sinais para outras células efetoras. Esta comunicação ocorre por meio de receptores da superfície celular com subsequente ativação de outras células efetoras (BRYANT; SLADE, 2015).

25

A resposta de um hospedeiro ao contato com agentes microbianos envolve a liberação de inúmeros mediadores (TAKAHASHI, 1998). Sabe-se que o desenvolvimento, bem como o controle da resposta imunológica, dependem, em grande parte, da produção local de citocinas, que direcionam o processo (DALE *et al.*, 2001).

30

A resposta imune pode ser dividida em inata e adaptativa. A imunidade inata está associada às fases iniciais da resposta imune e atua contra o agente agressor de maneira inespecífica, não se alterando com a exposição repetida a este agente (MEDZHITOV; JANEWAY, 2000). A imunidade adaptativa acentua

mecanismos efetores similares àqueles da resposta inata, direcionando-os com maior precisão. Esta resposta é determinada pela ativação de macrófagos ou pela produção de anticorpos (MOSER; MURPHY, 2000).

5 A imunidade inata proporciona resistência a doenças sem reconhecer antígenos específicos. Fazem parte desta resposta, as barreiras anatômicas, como a pele e mucosas, proteínas solúveis antimicrobianas (como, sistema de complemento e lisozima), células fagocitárias (macrófagos, neutrófilos e células dendríticas) e células NK. A resposta inflamatória envolve proteínas de fase aguda e o recrutamento de células fagocíticas para o local da lesão ou infecção.  
10 Esta é considerada um componente importante da defesa imune inata contra uma vasta gama de agentes patogênicos (McDADE *et al.*, 2016).

A imunidade adaptativa inclui a capacidade de reconhecer os antígenos alvo com especificidade, de forma mais ágil e com respostas eficazes. A natureza da resposta imune adaptativa é dependente de uma interação complexa entre as  
15 várias via imunológicas. Os linfócitos T e B são os centros mediadores celulares da imunidade específica e isto é determinado pela exposição prévia destas células a estes antígenos. A seleção clonal é importante para o desenvolvimento desta resposta. Para o controle da resposta imune, o equilíbrio entre as chamadas respostas Th1 e Th2 é crucial (MODLIN *et al.*, 1993; McDADE *et al.*,  
20 2016).

As células T expressam diferentes conjuntos de citocinas, quimiocinas e receptores, os quais são considerados importantes mediadores de recrutamento de leucócitos para o local da injúria, como, por exemplo, a lesão periapical (SILVA  
25 *et al.*, 2005). Algumas quimiocinas são constitutivamente secretadas e regulam o trânsito de linfócitos, enquanto outras são produzidas como consequência do estímulo pró-inflamatório ou infecção. Coordenam a migração de leucócitos imaturos e células dendríticas para estes locais. Outra habilidade das quimiocinas é contribuir para a cicatrização de feridas (ROSSI; ZLOTNIK, 2000). As citocinas e quimiocinas, além do recrutamento e da regência do processo inflamatório,  
30 podem também estar envolvidas na promoção de danos ao hospedeiro (KAWASHIMA *et al.*, 1996; KAWASHIMA ; STASHENKO, 1999).

De acordo com o conceito atual de desenvolvimento das células Th CD4+, existem, pelo menos, quatro subtipos diferentes de resposta: Th1, Th2,

Th17 e Treg (DIVEU *et al.*, 2008; MCGEACHY; CUA, 2008; GARLET, 2010; QUEIROZ-JUNIOR *et al.*, 2010) (FIG. 2). Estas respostas possuem regulação cruzada e as citocinas produzidas em cada uma delas são antagônicas. (RIBEIRO-SOBRINHO *et al.*, 2002; COLIC *et al.*, 2009; TEIXEIRA-SALUM *et al.*, 2010).

### 1.6.2 CÉLULAS T HELPER

10

Os linfócitos T auxiliares, Th1 e Th2, foram descritos, pela primeira vez, há cerca de 30 anos por Mosmann e colaboradores na década de 80. As células Th1 promovem respostas inflamatórias e apresentam, ainda, a função de supressão de células B. A resposta Th1 é especialmente importante no controle de infecções intracelulares (MODLIN *et al.*, 1993).

Em contraste, as células Th2 induzem resposta humoral, pela ativação dos linfócitos B e, como função secundária, atuam na supressão da resposta Th1 (MODLIN *et al.*, 1993). As células Th2 medeiam a defesa contra patógenos extracelulares, incluindo helmintos, e estão relacionadas à progressão da asma e outras doenças alérgicas (MOSMANN; COFFMAN, 1989; LE GROS *et al.*, 1990;; PAUL; SEDER 1994).

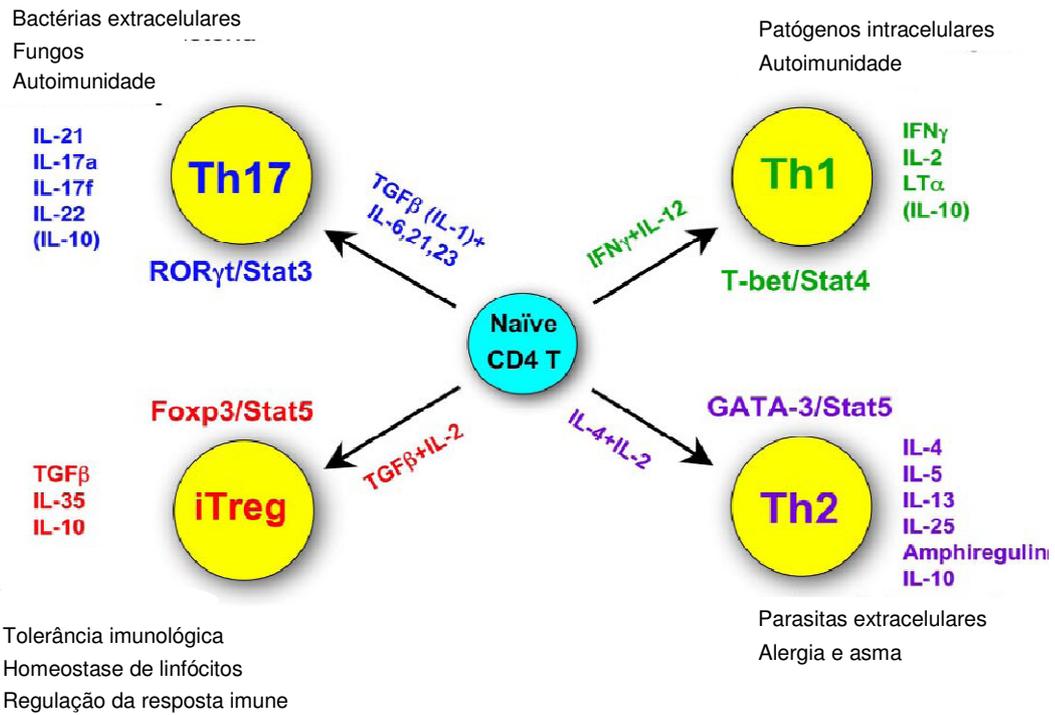


FIGURA 2

Subtipos de linfócitos T CD4+: citocinas e tipo de resposta relacionadas (Adaptado de ZHU; PAUL, 2008, p. 1562.).

O subconjunto de células Treg é representado pelos linfócitos T CD4+ Foxp3+. Estas células desempenham um papel crítico na manutenção da auto-tolerância, bem como na regulação da resposta imune (SAKAGUCHI, 2011). A ativação das células Treg pode trazer benefícios para o tratamento de doenças autoimunes e para a prevenção da rejeição de aloenxertos (JOFFRE *et al.*, 2008). Suas funções de supressão são exercidas por meio de diversos mecanismos, alguns dos quais requerem contato célula-célula (SHEVACH, 2006).

A ausência de células Treg ou do fator de transcrição Foxp3 levam ao rápido desenvolvimento da auto-imunidade fulminante em múltiplos órgãos. Os mecanismos supressores utilizados por Treg incluem a produção de citocinas, tais como IL-10, TGF- $\beta$  e IL-35 e outras proteínas de superfície celular que modulam outros subconjuntos de T convencionais. (GEIGER; TAURO, 2012). As células Treg suprimem os efeitos inflamatórios da osteólise, por ação de citocinas como TGF- $\beta$  e IL-10 (BELKAID;TARBELL, 2009; GARLET *et al.*,. 2010; GLOWACKI *et al.*,. 2013).

A caracterização das células Th17 como uma linhagem distinta de células CD4+ contribuiu para um melhor conhecimento sobre a resposta imune, anteriormente baseada na dicotomia Th1/Th2. As células Th17 estão relacionadas com a indução da expressão de citocinas pró-inflamatórias (GUGLANI; KHADER, 2010). A resposta Th17 está envolvida em uma série de doenças infecciosas, autoimunes e processos osteolíticos (SUNDRUD, 2013).

Cada tipo de resposta está associado a um conjunto de citocinas e quimiocinas, que serão discutidas a seguir.

25

### 1.6.3 CITOCINAS

As citocinas são proteínas regulatórias que desempenham papel importante na resposta imune, incluindo ativação, proliferação, diferenciação, sobrevivência e apoptose de linfócitos. Agem, também, na modulação do sistema imune, por meio de sua ação anti-inflamatória. São secretadas por diferentes tipos celulares (linfócitos, células apresentadoras de antígenos, monócitos, células

endoteliais e fibroblastos), da imunidade inata e adaptativa (ABBAS *et al.*, 2011). As citocinas são mensageiros intercelulares, representando um mecanismo chave pelo qual as células envolvidas nas respostas imunológicas se comunicam (SEYMOUR; TAYLOR, 2004).

5 A resposta tipo Th1 é caracterizada pela produção de, entre outros, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-2 e IL-1, enquanto a resposta Th2 envolve a produção de IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13 e IL-25. Como mencionado, estas respostas possuem regulação cruzada e as citocinas produzidas em cada uma delas são antagônicas. As células Th17 produzem as citocinas IL-17, IL-21 e IL-22 (RIBEIRO-SOBRINHO *et al.*, 2002; COLIC *et al.*, 2009; TEIXEIRA-SALUM *et al.*, 2010).

A IL-4 também ativa a diferenciação alternativa de macrófagos (conhecidos como macrófagos M2), que produzem IL-10, TGF- $\beta$ , poliaminas e prolinas e são importantes no reparo dos tecidos e fibrose (ABBAS *et al.*, 2011).

15 O TNF- $\alpha$  é um potente mediador imunológico das respostas inflamatórias agudas e crônicas, com capacidade de aumentar a reabsorção óssea (BIRKDAL-HANSEN, 1993). É considerado o principal mediador da resposta inflamatória aguda induzida por bactérias Gram negativas e outros microrganismos infecciosos. O estímulo mais importante para ativar a produção de TNF- $\alpha$  pelos macrófagos é o LPS. Esta célula é a principal fonte da citocina, que também pode ser secretada por células Th1, NK e mastócitos (PRSO *et al.*, 2007; ABBAS *et al.*, 2011).

25 O TNF- $\alpha$  desempenha papel importante na resposta a danos do tecido ou infecção, por promover a inflamação, recrutando linfócitos e monócitos para os locais de infecção e estimular células endoteliais que expressarão moléculas de adesão e secretarão quimiocinas (PFEFFER, 2003).

30 O IFN  $\gamma$  é produzido tanto por células da resposta inata, células NK, macrófagos e células mielomonocíticas, como por células da resposta adaptativa, células Th1, linfócitos T citotóxicos e células B. É um mediador chave na ativação e diferenciação de macrófagos, potencializando a ação microbicida e de fagocitose destas células e regula a expressão de IL-1 e TNF- $\alpha$ . Contribui para a eliminação de microrganismos, promove atividade citotóxica e induz apoptose de células epiteliais, da pele e da mucosa (KAWASHIMA *et al.*, 2007; BASINSKI *et al.*, 2009 ; COLIC *et al.*, 2009; GAZIVODA *et al.*, 2009; ABBAS *et al.*, 2011). Além

da ativação de macrófagos, a citocina exerce funções críticas na imunidade inata e adaptativa mediada por células (ABBAS *et al.*, 2011). A secreção de IFN- $\gamma$  é desencadeada pela IL-12 e regulada pela IL-10 (COLIC *et al.*, 2010).

5 A IL-1 foi descrita como uma proteína que induzia febre, os chamados  
pirógenos com habilidade leucocitária. Existem duas grandes proteínas, IL-1 $\alpha$  e  
IL-1 $\beta$ , que apresentam baixa homologia entre suas sequências, mas exibem  
propriedades biológicas semelhantes. Entretanto, existem diferenças  
fundamentais em sua localização, maturação e secreção. A IL-1 $\alpha$  é traduzida em  
10 uma forma biologicamente ativa, enquanto que a IL-1 $\beta$  é traduzida como pró-IL-  
1 $\alpha$ , que não possui nenhuma atividade biológica, até que seja processada pela  
caspase 1. A IL-1 é uma citocina pró-inflamatória potente, que age como um  
pirógeno endógeno. Expressa diversos efeitos potencializadores de proliferação  
celular, diferenciação e função de muitas células imunocompetentes da resposta  
inata e específica (AKDIS *et al.*, 2011).

15 IL-10 é um fator anti-inflamatório, importante regulador de várias vias da  
resposta imunitária. A citocina é produzida, principalmente, por monócitos, células  
T, células B, células NK, macrófagos e células dendríticas (MOORE *et al.*, 1993;  
MOSMANN *et al.*, 1994; ABBAS *et al.*, 2011). A IL-10 foi originalmente  
identificada pela sua habilidade em antagonizar a imunidade celular (DE WAAL *et al.*  
20 *et al.*, 1991; FIORENTINO *et al.*, 1991; DE WAAL *et al.*, 1991). Limita a taxa de  
infiltração de leucócitos e de inflamação, as células apresentadoras de antígenos  
e a expressão de MHC de classe II, além de outras moléculas co-estimulatórias  
na superfície de macrófagos e monócitos (AKDIS *et al.*, 2011). A IL-10 inibe a  
expressão de muitas citocinas e quimiocinas pró-inflamatória, além de receptores  
25 de quimiocinas (DE WAAL MALEFYT *et al.*, 1991). Além destes efeitos, a IL-10  
também afeta diretamente a ativação de células T, por meio da supressão de  
CD28 e CD2 (TAYLOR *et al.*, 2007). Em contraste com seus efeitos inibitórios  
sobre as células T, a IL-10 promove a proliferação e a diferenciação das células B  
e aumenta a produção de IgG (KANG *et al.*, 2005; AKDIS *et al.*, 2011).

30 A citocina multifuncional TGF- $\beta$  foi descoberta no início dos anos 80  
(GARBER, 2009). Suas funções incluem regulação e diferenciação celular,  
proliferação, cicatrização de feridas e angiogênese (FERRARI *et al.*, 2009;  
KAMINSKA *et al.*, 2013). Esta citocina também desempenha papel importante na

regulação da homeostase do sistema imunológico (FACCIABENE *et al.*, 2012). Promove a expressão de genes *foxp3* e produção de células Treg (SAINI *et al.*, 2014). Por outro lado, TGF- $\beta$  inibe a ativação de linfócitos e monócitos (DENHARTOG *et al.*, 2013). A superfamília TGF- $\beta$  inclui as proteínas morfogenéticas do osso, fatores de diferenciação do crescimento (SHI *et al.*, 2016). Existem pelo menos três isoformas de TGF- $\beta$ : TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, e TGF- $\beta$ 3. O TGF- $\beta$ 1 é expresso em células epiteliais, endoteliais e hematopoiéticas, o TGF- $\beta$ 2, em células epiteliais e neuronais e o TGF- $\beta$ 3, primariamente em células mesenquimais (PAPAGEORGIS, 2015). TGF- $\beta$ 1 é armazenado em uma forma biologicamente inativa, que contém um peptídeo sinal, associado à latência, e o peptídeo maduro. Após digestão pela protease intracelular, TGF- $\beta$  é produzido (HORIGUCHI *et al.*, 2012)

A IL-17A, inicialmente chamada IL-17, foi a citocina inicialmente descrita neste subconjunto, que abrange citocinas estruturalmente distintas. É expressa por células ativadas CD41 Th17 (HARRINGTON *et al.*, 2005), mas, sua expressão também tem sido detectada em células T, células CD81, células NK e neutrófilos (SCHMIDT-WEBER *et al.*, 2007). A IL-17A e conseqüentemente as células Th17 estão envolvidas em diversas doenças inflamatórias, incluindo esclerose múltipla e artrite (NAKAE *et al.*, 2003) O aumento níveis de IL-17A também foram encontrados em pacientes com psoríase e doenças alérgicas, tais como asma e dermatite atópica. Esta citocina atua nas células apresentadoras de antígeno, como macrófagos e células dendríticas, induzindo a produção de citocinas e quimiocinas. Além disso, é responsável pelo recrutamento de neutrófilos e pela granulopoiese (YU *et al.*, 2007; GUGLANI; KHADER, 2010). Embora produzida principalmente pelas células T, a IL-17 ativa muitos dos eventos sinalizados por citocinas da resposta imune inata, tais como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , sendo considerada uma molécula de ligação entre esta resposta e a resposta imune adaptativa (YU *et al.*, 2007).

30

#### 1.6.4 QUIMIOCINAS

As quimiocinas constituem um grupo especializado de citocinas que coordenam o movimento de leucócitos dentro e através de tecidos, logo, envolvidas em uma grande variedade de processos biológicos, incluindo desenvolvimento de órgãos e homeostase, angiogênese e ativação e regulação imunológica. O papel das quimiocinas e os seus receptores cognatos na resposta imune são realizados através do tráfico de leucócitos (BRYANT; SLADE, 2015).

Os membros da superfamília das quimiocinas são polipeptídios secretados, que variam em massa molecular de cerca de 5 a 20 kDa. Historicamente, estes foram nomeados com base na sua função, mas, a nomenclatura genérica é atualmente utilizada. Esta categoriza as quimiocinas em quatro subfamílias, com base na posição relativa dos resíduos de cisteína conservados na cadeia polipeptídica. Assim, quimiocinas C, CC, CXC e CX<sub>3</sub>C são reconhecidas (FIG 3). Em geral, as quimiocinas têm habilidades características. Assim, as quimiocinas CXC podem ativar neutrófilos, as quimiocinas CC são, principalmente, quimiotáticas para monócitos/macrófagos e linfócitos, bem como cruciais no desenvolvimento da imunidade adaptativa, promovendo recrutamento de linfócitos e apresentação de antígenos (SAHINGUR; YEUDALL, 2015).



FIGURA 3

Estrutura das quimiocinas. Diagrama esquemático indicando as relações dos resíduos conservados de cisteína (C) e pontes dissulfeto. As subfamílias C, CC, CXC e CX<sub>3</sub>C de quimiocinas estão representadas. (Adaptado de SAHINGUR; YEUDALL, 2015, p. 3).

A IL-8 foi identificada como um fator quimiotático neutrófilo específico, sendo, posteriormente, classificada como um membro da família de quimiocinas

CXC. É produzida por uma variedade de células, tais como monócitos e macrófagos, neutrófilos, linfócitos, células endoteliais e epiteliais após estímulo com IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-17 e TNF- $\alpha$  (COELHO *et al.*, 2005). Os receptores para IL-8 são CXCR1 (IL-8RA) e CXCR2 (IL-8RB) (HOLMES *et al.*, 1991). As principais  
5 funções efectoras de IL-8 são ativação e recrutamento de neutrófilos para o local da infecção. Além de neutrófilos, a IL-8 também atrai células NK, células T, basófilos e eosinófilos (BURKE *et al.*, 2008). Concentrações aumentadas de IL-8 foram encontradas em processos inflamatórios locais em pacientes com doenças como psoríase, infecção viral de vias aéreas superiores e doença pulmonar  
10 obstrutiva crônica (SEITZ *et al.*, 1991; HOLCK *et al.*, 2003).

A CCL2 é membro da subfamília de quimiocinas CC, caracterizada pela ausência de aminoácidos entre cisteínas conservadas na extremidade amino-terminal da molécula. Esta quimiocina é produzida por uma variedade de células, incluindo macrófagos, linfócitos, neutrófilos, fibroblastos e células endoteliais. A  
15 CCL2 é responsável pela quimiotaxia de células mononucleares, sobretudo macrófagos/monócitos, para os locais de inflamação. O aumento da expressão de CCL2 em locais inflamados sugere seu papel na defesa contra processos infecciosos de origem bacteriana (DISTLER *et al.*, 2001; YOSHIE *et al.*, 2001; ARNDT *et al.*, 2004; SILVA *et al.*, 2005; MARÇAL *et al.*, 2010).

A quimiocina CCL5 desempenha papel no recrutamento de uma variedade de leucócitos, incluindo células T, macrófagos, eosinófilos e basófilos. Em colaboração com determinadas citocinas, tais como IL-2 e IFN- $\gamma$ , a CCL5 também induz a proliferação e ativação de células (SORIA *et al.*, 2008). Além disso, esta quimiocina pode ter um efeito indireto sobre a progressão de tumoral,  
20 controlando a resposta imunitária anti-tumoral, uma vez que foi demonstrado que a sua expressão pode promover o crescimento do tumor e contribui para a metástase, em diferentes tipos de tumores malignos (OLIVEIRA *et al.*, 2014).

Em relação ao método empregado para avaliação do perfil de citocinas e quimiocinas, o PCR em tempo real tem sido amplamente utilizada. A técnica,  
30 precedida por transcrição reversa, permite a quantificação de mRNA de forma rápida, sensível e específica. Por meio de PCR em tempo real é possível a observação da cinética de amplificação em tempo real, através da mensuração dos sinais de fluorescência específica em cada ciclo (SCHEFE *et al.*, 2006).

#### 1.6.5 RESPOSTA IMUNO-INFLAMATÓRIA ASSOCIADA AOS PROCESSOS INFECCIOSOS ODONTOGÊNICOS

Lesões periapicais de origem endodôntica e doença periodontal são condições comumente encontradas na cavidade oral, que compartilham mecanismos patológicos, envolvendo interações entre células do sistema imunológico e osso. Ambas demonstram padrões semelhantes de desenvolvimento e absorção óssea associada a bactérias que aderem e invadem os tecidos moles e estimulam uma resposta imuno-inflamatória e osteoclástica subsequente. Contudo, existem algumas diferenças entre a infecção periapical e periodontal (GRAVES *et al.*,2011).

No modelo de desenvolvimento da doença periodontal, a presença de bactérias é necessária, mas não o suficiente para provocar o desenvolvimento de periodontite. O reconhecimento de componentes microbianos como "sinais de perigo" por células hospedeiras e a subsequente produção de mediadores inflamatórios são passos essenciais na patogênese desta doença inflamatória (GRAVES *et al.*,2011).

As doenças periodontais têm sido associadas a uma variedade de desequilíbrios na regulação da resposta imuno-inflamatória. A ativação de células ocorre localmente em resposta aos antígenos da placa subgengival. O número de células T CD4+ ativadas aumenta com a gravidade da doença e o grau de inflamação gengival (MATHUR; MICHALOWICZ, 1997).

Para a doença periodontal, como regra geral, as citocinas Th1 têm sido associadas com destruição óssea, enquanto seus antagonistas clássicos, citocinas do subconjunto Th2, são descritas para minimizar esta perda óssea. As células Th17 foram descritas como um subconjunto de células T, com propriedades inflamatórias, envolvidas numa série de doenças infecciosas, autoimunes e osteolíticas. Logo, a IL-17 está associada com lesões periodontais ativas. Já as células Treg têm efeito supressor da osteólise inflamatória, mediado pela IL-10 e pelo TGF- $\beta$ . (SILVA *et al.*,2015).

Com relação às citocinas das respostas Th1 e Th17, as mesmas podem agir sozinhas ou associadas, por meio da ativação de monócitos/macrófagos, linfócitos, fibroblastos e outros elementos celulares, o que leva à destruição do

colágeno e à reabsorção do tecido ósseo, através do estímulo aos osteoblastos periodontais em RANKL (MOSMANN; SAD, 1996; GAFFEN; HAJISHENGALLIS, 2008; GRAVES, 2008). Dutzan *et al.* (2009) demonstraram que em lesões periodontais ativas, os níveis de citocinas relacionadas ao subconjunto Treg estavam inversamente relacionados àqueles de RANKL, reforçando, desta forma, seu papel contra a reabsorção óssea.

De acordo com Garlet *et al.* (2010), existe uma relação de causa/efeito entre as células Treg e gravidade da periodontite. Observou-se que a migração de células T CD4+ Foxp3+ para tecidos periodontais, após a infecção experimental, está associada a um declínio na taxa de progressão da doença, e sua inibição resultou num aumento da perda de osso alveolar e migração de células inflamatórias.

Para Claudino *et al.* (2010), além da atenuação da destruição de tecidos, as citocinas do subconjunto Treg, tais como IL-10 e TGF- $\beta$  estão associadas com a reparação de tecidos. Na doença periodontal, também observou-se que a IL-4, citocina da resposta Th2, no fluido do sulco gengival diminui a intensidade da doença periodontal, sugerindo que esta citocina pode mediar a remissão ou melhora deste processo (PRADEEP *et al.*, 2008). A IL-4 também induz a produção de citocinas com propriedades supressivas semelhantes ou complementares, tais como a IL-10 (PESTKA *et al.*, 2004).

Já as lesões periapicais de origem endodôntica têm sido associadas com múltiplas citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias. Sob condições normais, citocinas pró-inflamatórias estão ausentes ou presentes em níveis muito baixos nos tecidos periapicais, sendo induzidas pela ação bacteriana. A expressão destas citocinas desempenha papel central na patogênese da formação de lesão lítica perirradicular (WANG *et al.*, 1997).

O papel da IL-1 na estimulação da destruição óssea periapical foi demonstrada usando antagonistas do receptor de IL-1, observando-se uma redução de 60% no desenvolvimento da lesão (STASHENKO *et al.*, 1994).

Similarmente ao IL-1 $\beta$ , o TNF- $\alpha$  induz inflamação da polpa e reabsorção tecidual óssea (STASHENKO *et al.*, 1987). Segundo Zakharova *et al.* (2005), durante a resposta inflamatória, o TNF- $\alpha$  tem um efeito pró-inflamatório inicial,

seguido por um efeito regulador nas fases posteriores da inflamação, reduzindo, assim, a atividade imunológica.

Ainda com relação aos processos infecciosos periapicais, Fukada *et al.* (2009) realizaram um estudo com o objetivo de avaliar o equilíbrio das respostas Th1, Th2 e Treg, além de fatores envolvidos na quimiotaxia e ativação dos osteoclastos, empregando amostras obtidas a partir de gengiva saudável, granulomas periapicais e cistos periapicais. Os autores avaliaram expressão dos genes de Foxp3, IL-10, GATA-3, IL-4, TGF- $\beta$  e das quimiocinas CCR1, SDF-1 $\alpha$ /CXCL12, CXCR4 e CK $\beta$ 8/CCL23 por PCR em tempo real. Os autores concluíram que há um predomínio da atividade dos osteoclastos em granulomas e que esta atividade se correlaciona com a resposta Th1. Contudo, a expressão de marcadores de células Treg sugere uma possível supressão da resposta Th1 nestes processos. Por outro lado, foi demonstrado que a atividade de Th2 é aumentada nos cistos periapicais.

Xiong *et al.* (2009) realizaram um estudo com a finalidade de investigar a localização imuno-histoquímica de IL-17 durante o desenvolvimento de lesões periapicais, utilizando modelo animal. Os autores encontraram aumento do número de células IL-17-positivas e neutrófilos a partir do dia zero até o dia 28, quando o pico máximo foi atingido. Observaram ainda, que o número de osteoclastos aumentou até o dia 14, e, então, diminuiu gradualmente, até o dia 28. Houve, neste caso, uma relação inversa entre número de osteoclastos e células IL-17+, além de neutrófilos. Estes resultados, segundo os autores, evidenciam que a IL-17 pode ser observada e possivelmente envolvida na resposta inflamatória e reabsorção óssea dos tecidos periapicais, assim como parece estar relacionada com a patogênese da lesão periapical. Marçal *et al.* (2010) e Okamoto; Takayanagi (2011) relatam uma forte evidência de que a IL-17 pode induzir a produção de RANKL, ativando os osteoclastos, com consequente reabsorção óssea.

Araujo-Pires *et al.* (2014) realizaram um estudo comparando a expressão de algumas citocinas em granulomas periapicais ativos e inativos. Uma alta expressão de mRNA de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-17A e IL-21 foi observada em granulomas ativos, ao passo que nos granulomas periapicais inativos, foi detectada maior expressão de IL-4, IL-9, IL-10 e IL-22. Para Kabashima *et*

*al.*(2001), também nas alterações periapicais, IL-4 parece exercer efeito inibidor sobre a reabsorção óssea, diminuindo a atividade osteoclástica.

Associação entre expressão elevada de IFN- $\gamma$  e alterações periapicais foi relatada por Teixeira-Salum *et al.* (2010), observando-se associação com  
5 prevalência de resultados positivos em testes de percussão e palpação. A presença de edema também foi associada a níveis elevados de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ .

Os membros da família TGF- $\beta$  são reguladores críticos do crescimento celular, diferenciação, reparação e inflamação. TGF- $\beta$  é uma das citocinas envolvidas no processo de reparação de lesões periradiculares e pertence ao  
10 grupo das citocinas anti-inflamatórias (DANIN *et al.*, 2000). Teixeira-Salum *et al.* (2010) relataram que os níveis de TGF- $\beta$  divergem, quando granulomas e cistos radiculares são comparados. Os autores sugerem que os granulomas periapicais exibem um padrão de regulação com níveis mais elevados de TGF- $\beta$  e baixos níveis de citocinas pró-inflamatórias.

15 Sasaki *et al.* (2000) concluíram que a IL-10 é um supressor endógeno importante de reabsorção óssea induzida pela infecção, agindo, provavelmente, pela inibição da expressão de IL-1 $\alpha$ .

Quimiocinas também estão presentes nas alterações periapicais. O recrutamento de monócitos para granulomas periapicais pode ser devido à  
20 presença de CCL2/MCP-1 Esta quimiocina está associada com a quimiotaxia e a diferenciação de osteoclastos, provavelmente, através da interação com o receptor CCR2 (MARTON *et al.*, 2000; SILVA *et al.*, 2007) e sua expressão está aumentada em lesões periapicais (MARÇAL *et al.*, 2010; HENRIQUES *et al.*, 2011.

Feitosa *et al.* (2011) observaram um aumento significativo da expressão  
25 de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-17A e da quimiocina CCL2/ MCP-1 em lesões periapicais refratárias ao tratamento endodôntico. Estes achados, segundo os autores, sugerem perfil de resposta predominantemente pró-inflamatória nestes tipos de lesões dentárias.

Brito *et al.* (2012) realizaram um estudo com o objetivo de avaliar a  
30 expressão de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-17A, IL-10, CCL2/ MCP-1, CCL-4, CCL-5, CXCR4, CCR5 e RANKL em amostras do fluido intersticial periapical em dois momentos, quais sejam, imediatamente após limpeza e instrumentação do canal radicular e sete dias depois do procedimento. Os autores observaram aumento da

expressão de IL-10 e CXCR4 e diminuição de citocinas pró-inflamatórias, tais como RANKL, IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$  e CCL5. Os autores sugerem que a expressão desta quimiocina esteja ligada e dependente da expressão de citocinas da resposta Th1.

- 5           A quimiocina IL-8/CXCL8 foi encontrada em exsudados periapicais coletados de canais radiculares durante tratamento endodôntico de lesões periapicais, o que sugere papel central na migração de neutrófilos em fases agudas da doença apical (SILVA *et al.*, 2007). A fonte desta quimiocina são as células periapicais mononucleares CD4<sup>+</sup> (Th1) e CD11c<sup>+</sup> (monócitos, como,
- 10           macrófagos e células dendríticas) (LUKIĆ *et al.*, 2006).

## 2 JUSTIFICATIVA

Infecções odontogênicas são processos infecciosos originados nos tecidos dentais ou de suporte. São de natureza polimicrobiana, envolvendo a participação de uma variedade de microrganismos anaeróbios obrigatórios e anaeróbios facultativos indígenas da cavidade oral. Podem variar desde processos bem localizados, circunscritos aos tecidos adjacentes ao dente envolvido, que são de manejo simples e requerem, habitualmente, apenas tratamento ambulatorial, até quadros disseminados de alta complexidade, frequentemente de difícil abordagem, que exigem, muitas vezes, internação e envolvimento de equipe multidisciplinar.

As infecções odontogênicas são extremamente prevalentes, principalmente em países menos desenvolvidos, nos quais o atendimento odontológico adequado não está acessível para grande parte da população. Embora um grande volume de conhecimento relativo a estas infecções já tenha sido gerado, há ainda muito a se conhecer, especialmente, relativos às infecções odontogênicas graves. O diagnóstico e o tratamento da doença ainda constituem um desafio para o profissional clínico.

Os avanços tecnológicos têm possibilitado o desenvolvimento de métodos diagnósticos extremamente eficazes e acurados. Entre eles, destacam-se as técnicas de genética molecular, altamente sensíveis e específicas, cada vez mais amplamente empregadas na Microbiologia e na Imunologia, tanto na área de pesquisa como na rotina clínica. Assim como as demais áreas, também a Microbiologia Oral tem se beneficiado dos conhecimentos gerados por este conjunto de técnicas. Porém, seu emprego neste campo permanece restrito, sendo observado, principalmente, em estudos que visam esclarecer a etiopatogenia de infecções endodônticas e periodontais. No que se refere a infecções odontogênicas graves, sua aplicação é, ainda, muito limitada.

Dados gerados por métodos microbiológicos convencionais destacam *Streptococcus* do grupo viridans, *Prevotella*, cocos anaeróbios, *Fusobacterium*, *Porphyromonas* e *Staphylococcus* como agentes da doença. Entretanto, diversos outros microrganismos, inclusive não cultiváveis, parecem desempenhar papel relevante no desenvolvimento do quadro. Técnicas de genética molecular podem,

certamente, contribuir para esclarecer o perfil microbiológico das infecções odontogênicas graves, contribuindo para a melhor compreensão da patogênese das mesmas.

5 A caracterização dos organismos associados às infecções odontogênicas é, também, de grande relevância. Deve-se mencionar, especialmente, a necessidade de se conhecer o perfil de suscetibilidade a drogas antimicrobianas dos agentes envolvidos na etiologia do quadro, principalmente considerando-se pacientes internados, ainda pouco estudados, inclusive no Brasil. Este dado é de importância fundamental para a prática clínica, quando se considera a gravidade da doença e a necessidade premente de estabelecimento de antibioticoterapia adequada.

10 Assim, com base na relevância básica e aplicada do tema, na escassez de dados, especialmente nacionais, relativos à etiopatogenia e à caracterização dos agentes associados a infecções odontogênicas graves e tendo em mente a acurácia das técnicas de genética molecular e sua aplicabilidade a estudos desta natureza, vimos desenvolvendo este projeto. A nosso ver, dados relevantes, que contribuirão para o melhor conhecimento da microbiota envolvida no desenvolvimento da doença, no que tange ao agente etiológico e à resposta do hospedeiro frente à agressão, bem como para o estabelecimento de antibioticoterapia adequada, poderão ser gerados a partir desta investigação.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

5

- ◆ Avaliar e caracterizar a microbiota associada a infecções odontogênicas graves e a resposta imuno-inflamatória em pacientes hospitalizados em decorrência do quadro.

10

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 15 ◆ Avaliar, por meio de abordagem metagenômica, a microbiota associada a infecções odontogênicas graves.
- ◆ Determinar o perfil de suscetibilidade a drogas antimicrobianas das amostras bacterianas recuperadas.
- ◆ Avaliar os níveis de transcrição dos genes que codificam a síntese das citocinas IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-10, IL-17A, TGF- $\beta$  e TNF- $\alpha$  e das quimiocinas CCL2/MCP-1, CCL5 e IL-8.

20

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

5 Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da  
Universidade Federal de Minas Gerais (Parecer nº 374/08 e adendos) e do  
Hospital Odilon Behrens. Todos os pacientes recrutados para o estudo assinaram  
termo de consentimento informado.

10 Nosso estudo divide-se em três partes, de acordo com os objetivos  
específicos apresentados. Assim, as seções “Material e Métodos” e “Resultados e  
Discussão” serão apresentadas obedecendo esta divisão, inclusive, a descrição  
dos grupos de estudo, que são diferentes para cada parte.

### 15 4.1 ***PARTE I: AVALIAÇÃO DA MICROBIOTA ASSOCIADA A INFECÇÕES ODONTOGÊNICAS GRAVES POR ABORDAGEM METAGENÔMICA***

#### 4.1.1 *GRUPO DE ESTUDO E OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS*

20 Os espécimes avaliados nesta etapa do estudo foram obtidos de 38  
pacientes não consecutivos internados no Hospital Odilon Behrens em  
decorrência de infecções odontogênicas graves.

25 A coleta dos espécimes clínicos foi realizada como descrito na Parte III do  
estudo, porém três cones foram utilizados. Após 1 min, os cones foram  
transferidos para um tubo de criopreservação esterilizado e o material foi  
imediatamente acondicionado em *cooler* a -20 °C. Num prazo máximo de 1 h, os  
tubos foram armazenados em *freezer* a -80 °C até o envio para processamento no  
*The Forsyth Institute* (Cambridge, Massachusetts, EUA).

30

#### 4.1.2 EXTRAÇÃO DE DNA

O DNA foi extraído empregando-se o *MasterPure™ DNA Purification Kit*<sup>1</sup>, de acordo com as instruções do fabricante. A concentração e qualidade do DNA foram determinadas em NanoDrop 8000 UV-Vis<sup>2</sup> e, posteriormente, a concentração de DNA foi ajustada para 20 ng/μL. Em seguida, as amostras foram submetidas ao protocolo do *Human Next Generation Sequencing* (HOMINGS).

10

#### 4.1.3 PROTOCOLO HOMINGS

As amostras foram amplificadas seguindo o protocolo estabelecido pelo HOMINGS. Para a análise da comunidade bacteriana, foi realizada amplificação utilizando os iniciadores (F) 5'-CCTACGGGAGGCAGCAG -3' e (R) 5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT -3', que têm como alvo as regiões hipervariáveis V3 e V4 do rDNA 16S, segundo Caporaso *et al.* (2011), com algumas modificações. O alvo possibilita a detecção de microrganismos dos domínios Bacteria e Archaea.

Os *primers* foram marcados com as sequências adaptadoras 5'-AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTATGGTAATTGT -3' e 5'-CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATNNNNNNNNNNNNAGTCAGTCAGC -3', necessárias para a etapa seguinte do procedimento. Adicionalmente, o *primer* R foi marcado com sequências *barcode* (N; ver sequência acima).

A amplificação foi realizada em mistura contendo 10-50 ng de DNA e 5 *PRIME HotMasterMix*<sup>3</sup>, com volume final de 50 μL. O protocolo da reação de amplificação foi: desnaturação inicial a 94 °C por 3 min; 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 45 s, anelamento a 50 °C por 1 min e extensão a 72 °C por 90 s; e extensão final a 72 °C por 10 min.

---

<sup>1</sup>Illumina, San Diego, CA, EUA

<sup>2</sup>Thermo Scientific, Wilmington, DE, EUA

<sup>3</sup>5Prime GmbH, Gaithersburg, MD, EUA

Os produtos da PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose (1,5%), para análise da qualidade dos *amplicons*. Posteriormente, as amostras foram purificadas utilizando-se o Agencourt AMPure XP<sup>4</sup>.

5 Como última etapa, os *amplicons* purificados foram quantificados por PCR em tempo real<sup>5</sup> e preparados para o sequenciamento. Utilizou-se 20% do controle interno PhiX Control<sup>6</sup>. Finalmente, a biblioteca foi sequenciada no Miseq Desktop Sequencer<sup>7</sup>.

#### 10 4.1.4 SEQUENCIAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS

Após realização do sequenciamento, as sequências não utilizáveis e sequências quiméricas foram removidas. As sequências obtidas foram alinhadas  
15 *in silico* pelo programa BLAST com um banco de sequências espécie-específicas de bactérias da cavidade oral, originalmente desenhadas por Cotton *et al.* (2014). O banco inclui 767 sequências de 17 a 40 bases que reconhecem microrganismos da cavidade oral e filogeneticamente relacionados.

## 20 4.2 **PARTE II - AVALIAÇÃO DO PERFIL DE SUSCETIBILIDADE A DROGAS ANTIMICROBIANAS DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE PACIENTES COM INFECÇÕES ODONTOGÊNICAS GRAVES**

### 25 4.2.1 AMOSTRAS BACTERIANAS

A amostragem incluída nesta etapa da investigação foi obtida durante  
30 realização de estudo desenvolvido previamente pelo nosso grupo de pesquisa, que constituiu dissertação de mestrado intitulada “Epidemiologia e perfil microbiológico das infecções odontogênicas de pacientes internados em um hospital público de Belo Horizonte”.

---

<sup>4</sup>Beckman Coulter Genomics, Danvers, MA EUA

<sup>5</sup>LightCycler 96 Real-Time PCR System; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanha

<sup>6</sup>Illumina

<sup>7</sup> Illumina

Para avaliação do perfil de suscetibilidade a drogas antimicrobianas, foram estudadas 74 amostras bacterianas (QUADRO 1) isoladas a partir de secreções obtidas de abscessos de 30 pacientes internados no Hospital Odilon Behrens, em decorrência de infecções odontogênicas graves. Após obtenção de cultura pura e identificação bioquímico-fisiológica, as culturas foram armazenadas em criotubos contendo 1 ml de Brucella Broth<sup>8</sup> acrescido de glicerol a 10%, em freezer -80 °C.

#### 10 4.2.2 ANTIBIOGRAMA

Os testes de suscetibilidade a drogas antimicrobianas foram realizados de acordo com recomendações do CLSI (2013). O método de disco-difusão foi empregado para *Staphylococcus* e cocos Gram positivos catalase negativos e a avaliação de CIM foi utilizada para cocos Gram positivos catalase negativos e bactérias anaeróbias obrigatórias. As drogas antimicrobianas<sup>9</sup> que foram testadas para cada grupo bacteriano estão listadas no Quadro 2.

---

<sup>8</sup> BBL, Sparks, MD, EUA

<sup>9</sup> Cecon, São Paulo, SP, Brasil

QUADRO 1. Amostras bacterianas isoladas de abscessos de pacientes hospitalizados com infecção odontogênica grave submetidas a antibiograma.

		Bactéria	Número de amostras	
Anaeróbios facultativos e aeróbios obrigatórios	Cocos Gram positivos	Catalase positivos	<i>Staphylococcus</i>	10
		Catalase negativos	<i>Streptococcus anginosus</i>	16
			<i>Streptococcus</i> α-hemolítico	6
			<i>Streptococcus mitis</i>	8
			<i>Gemela</i>	1
			<i>Aerococcus</i>	1
			<i>Leuconostoc</i>	1
			<i>Micrococcus</i>	1
			<i>Streptococcus</i> β-hemolítico	1
			<i>Streptococcus salivarius</i>	1
Anaeróbios obrigatórios	Bastonetes Gram negativos	<i>Fusobacterium</i>	4	
		<i>Prevotella</i>	4	
		<i>Campylobacter gracillis</i>	2	
		<i>Bacteroides</i>	1	
		<i>Wolinella</i>	2	
	Bastonetes Gram positivos	<i>Propionibacterium</i>	2	
		<i>Tissierella</i>	2	
		<i>Clostridium</i>	4	
		<i>Actinomyces meyeri</i>	1	
	Cocos Gram positivos	<i>Peptostreptococcus</i>	6	

#### 4.2.2.1 DISCO-DIFUSÃO

A superfície de cerca de cinco colônias de cada amostra foi tocada com  
5 alça bacteriológica e os microrganismos foram transferidos para tubo contendo 1  
mL de solução salina estéril. A concentração da suspensão foi ajustada de modo  
a se obter turbidez correspondente ao padrão 0,5 da escala de *McFarland*. Com o  
auxílio de *swab*, a cultura foi inoculada, de forma homogênea, na superfície de  
Mueller Hinton Agar<sup>10</sup>. A seguir, os discos de antimicrobianos foram depositados  
10 na superfície do meio, exercendo-se uma leve pressão sobre os mesmos. Após  
cerca de 18 h de incubação, a 37 °C, em atmosfera de aerobiose  
(*Staphylococcus*) ou 24 h de incubação, a 37 °C, em microaerofilia  
(*Streptococcus*), foi realizada a leitura. O diâmetro dos halos de inibição da  
amostra bacteriana foi mensurado com o auxílio de paquímetro e os resultados  
15 foram interpretados de acordo tabelas padrão. Como controle, foi empregada a  
amostra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (CLSI, 2013).

---

<sup>10</sup> Difco, Sparks, MD, EUA

QUADRO 2  
Drogas antimicrobianas utilizadas para os antibiogramas<sup>1</sup>.

<i>Staphylococcus</i>	Cocos Gram positivos catalase negativos	Anaeróbios obrigatórios
<b>Disco-difusão</b>	<b>Disco-difusão</b>	<b>CIM</b>
Amoxicilina	Cefepima	Ampicilina
Ampicilina	Cefotaxima	Cefoxitina
Cefalotina	Ceftriaxona	Ceftriaxona
Ceftriaxona	Clindamicina	Clindamicina
Ciprofloxacino	Cloranfenicol	Cloranfenicol
Clindamicina	Eritromicina	Imipenem
Cloramfenicol	Vancomicina	Metronidazol
Dicloxacilina		Tetraciclina
Eritromicina	<b>CIM</b>	
Gentamicina	Ampicilina	
Oxacilina	Daptomicina	
Penicilina	Levofloxacina	
Rifampicina	Linezolida	
Sulfazotrim	Penicilina	
Teicoplanina		
Tetraciclina		

<sup>1</sup>, CLSI, 2013; <sup>2</sup>, concentração inibitória mínima.

#### 4.2.2.2 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA

Para determinação da CIM das amostras de *Staphylococcus*, foi empregado o método da diluição em ágar, segundo recomendações do CLSI (2015). A partir de soluções estoque esterilizadas por filtração<sup>11</sup>, concentrações crescentes das drogas antimicrobianas foram adicionadas a frascos contendo Brucella Agar<sup>12</sup> acrescido de 0,1% de hemina<sup>13</sup> e 0,1% de menadiona<sup>14</sup> fundido (45 °C) e, após homogeneização, o meio foi vertido em placas de Petri estéreis. As amostras a serem testadas foram inoculadas, com o auxílio de replicador de Steers, em duplicata, sequencialmente, em ordem crescente de concentração do antimicrobiano. O material foi incubado em anaerobiose (câmara anaeróbica<sup>15</sup> - N<sub>2</sub> 85%, H<sub>2</sub> 10%, CO<sub>2</sub> 5%), a 37 °C, por 48 h. Placas controle, sem adição de antimicrobianos, foram inoculadas no início e no final de cada série. A amostra *Bacteroides fragilis* ATCC 25285 foi empregada como controle de qualidade dos testes.

No que se refere às amostras de cocos Gram positivos catalase negativos, a CIM foi investigada paralelamente à identificação das mesmas, empregando-se o aparelho MicroScan WalkWay<sup>16</sup>. O procedimento foi realizado no Hermes Pardini.

25

---

<sup>11</sup> Millipore, Darmstadt, Alemanha

<sup>12</sup> BBL, Sparks, MD, EUA

<sup>13</sup> Inlab Diadema, SP, Brasil

<sup>14</sup> Inlab

<sup>15</sup> Forma Scientific, Marietta, GA, EUA

<sup>16</sup> Siemens Healthcare, Malvern, PA, EUA

#### 4.3 **PARTE III - AVALIAÇÃO DO PERFIL IMUNO-INFLAMATÓRIO: NÍVEL DE TRANSCRIÇÃO DE CITOCINAS E QUIMIOCINAS**

##### 5 4.3.1 **GRUPO DE ESTUDO E OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS**

Para avaliação do perfil imuno-inflamatório de pacientes acometidos por infecções odontogênicas graves, empregou-se estudo no formato caso-controle. Assim, as amostras foram obtidas de dois grupos distintos de indivíduos, quais sejam, pacientes portadores de infecções agudas de origem odontogênica internados no Hospital Odilon Behrens em consequência da doença (n = 12) e pacientes considerados saudáveis, sem infecção associada à cavidade oral, encaminhados para tratamento endodôntico de dente com polpa vital, com indicação de prótese, na Faculdade de Odontologia da UFMG (n = 12). Pacientes com outras doenças de natureza infecciosa foram excluídos do estudo.

No que se refere ao grupo caso, as amostras foram coletadas do ponto de drenagem extraoral ou intraoral da coleção purulenta. Após antissepsia com álcool 70% (extraoral) ou solução de clorexidina 0,12% (intraoral), dois cones de papel absorvente # 30<sup>17</sup> esterilizados foram inseridos no ponto de drenagem.

Para coleta das amostras dos indivíduos incluídos no grupo controle, empregou-se metodologia previamente desenvolvida (BRITO *et al.*, 2011; HENRIQUES *et al.*, 2011; TAVARES *et al.*, 2012; TAVARES *et al.*, 2013). De maneira sucinta, a instrumentação e a antissepsia foram realizadas com limas # 20<sup>18</sup> e hipoclorito de sódio 5,2%. Então, três cones de papel absorvente foram inseridos no interior do sistema de canal radicular, ultrapassando o forame radicular (2 mm), para que entrassem em contato com os tecidos perirradiculares.

Para ambos os grupos, os cones foram removidos após 1 min. Então, as extremidades dos cones foram cortadas (4 mm), o material foi transferido para microtubos contendo 150 µL de Trizol<sup>19</sup>, transportados para o Laboratório, no

---

<sup>17</sup>Dentsply Maillefer, Ballaigues, Suíça

<sup>18</sup>ProTaper; Dentsply Maillefer

<sup>19</sup>Gibco BRL, Grand Island, NY, EUA

prazo máximo de 1 h, em *cooler* a -20 °C, e armazenados em *freezer* a -80 °C, até o momento de sua utilização para extração de RNA.

5

#### 4.3.2 EXTRAÇÃO DE RNA

As amostras foram homogeneizadas e centrifugadas (IKA T10 Basic<sup>20</sup>), a  
10 12.000 g, por 15 min, a 4 °C. Os sobrenadantes foram transferidos para  
microtubos contendo 200 µL de clorofórmio, o material foi homogeneizado em  
vórtex e mantido em banho de gelo por 15 min. A seguir, as amostras foram  
centrifugadas a 13.000 g, por 15 min, a 4° C, os sedimentos foram suspensos  
em isopropanol e incubados a 4 °C, *overnight*. Então, o material foi novamente  
15 centrifugado a 12.000 g, por 10 min, a 4 °C e os *pellets* foram solubilizados em 1  
mL de etanol 95%. As amostras foram homogeneizadas em vórtex, centrifugadas  
a 12.000 g, por 15 min, a 4 °C, ressuspensas em 50-100 µL de água tratada  
com DEPC<sup>21</sup> e armazenadas em *freezer* a -80 °C.

20

#### 4.3.3 QUANTIFICAÇÃO DO RNA

A quantificação do RNA foi realizada em espectrofotômetro<sup>22</sup>,  
25 empregando-se comprimento de onda 260/280 nm (HENRIQUES *et al.*, 2011;  
BRITO *et al.*, 2012).

30

---

<sup>20</sup> Merse, São Paulo, SP, Brasil

<sup>21</sup> Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA

<sup>22</sup> Nanodrop® ND 1000; Wilmington, DE, EUA

#### 4.3.4 SÍNTESE DE cDNA

O cDNA foi sintetizado por transcrição reversa, utilizando-se 1 µg de RNA, seguindo-se o protocolo descrito por Silva *et al.* (2008). As condições de reação foram: 70 °C/5 min, 4 °C/5 min, adição da enzima, 23 °C/5 min, 37 °C/1 h e 90 °C/5 min.

#### 4.3.5 QUANTIFICAÇÃO DE MRNA DE CITOCINAS E QUIMIOCIAS

A quantificação do mRNA das citocinas IFN-γ, IL-1β, IL-10, IL-17A, TGF-β e TNF-α e das quimiocinas CCL2/MCP-1, CCL5 e IL-8 foi realizada por PCR em tempo real. Os *primers* foram desenhados com o auxílio do *software Primer Express*<sup>23</sup>, com base na sequência de nucleotídeos disponíveis no GenBank (FEITOSA *et al.*, 2011; BRITO *et al.*, 2012). A análise dos dados também foi realizada empregando-se o *software Primer Express*. A sequência dos *primers* utilizados nas reações de amplificação estão descritas no Quadro 3. As reações foram realizadas no aparelho StepOne Real-time PCR System<sup>24</sup>, empregando-se o *SYBR-green detection system*<sup>25</sup>.

Seguindo-se à amplificação, a análise da curva de dissociação foi realizada para determinação da especificidade dos produtos amplificados. Obteve-se a curva de dissociação na faixa de 60°C a 95°C, medindo-se a fluorescência contínua a cada 1% de aumento da temperatura.

O gene GAPDH foi amplificado e utilizado para normalizar os níveis de mRNA. Todas as amostras foram testadas em duplicata, em um volume de reação de 20 µL, com 1 µg de cDNA. Utilizou-se o *software Sequence Detection* versão 2.0<sup>26</sup> para a análise dos dados gerados pelas reações de amplificação. Os resultados foram obtidos como valores do limiar do Ct, que representa quantas

---

<sup>23</sup> Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA

<sup>24</sup> Applied Biosystems

<sup>25</sup> Applied Biosystems

<sup>26</sup> Applied Biosystems

vezes cada sinal de fluorescência passa por um limiar fixo. O nível de mRNA de cada citocina e quimiocina estudada foi calculado pelo método do  $\Delta\Delta Ct$ . Os valores de Ct são a média de duas medidas independentes e os níveis de mRNA são obtidos pela razão entre os dados relativos ao gene de interesse e ao GAPDH.

#### 4.3.6 *ANALISE ESTATÍSTICA*

10

Os resultados foram analisados com o auxílio do programa SPSS para Windows (versão 15.0; SPSS, Chicago, IL, USA). Os dados foram submetidos ao teste Shapiro-Wilk para caracterizar a normalidade. Como as amostras não apresentavam distribuição normal, o teste de Wilcoxon foi utilizado para determinar as diferenças estatísticas, sendo estabelecido como nível de significância  $p < 0,05$ .

QUADRO 3

Sequência dos *primers*, temperatura de desnaturação e tamanho do *amplicon* das reações de amplificação empregadas no estudo.

Alvo	Primer (5'-3')	T <sub>m</sub> <sup>1</sup>	Amplicon (pb)
GAPDH	F: GCA CCA CCA ACT GCT TAG CA R: TGG CAG TGA TGG CAT GGA GGA	80	96
IFN- $\gamma$	F: GAA CTG TCG CCA GCA GCT AAA R: TGC AGG CAG GAC AAC CAT TA	80	95
IL-1 $\beta$	F: TGG CAG AAA GGG AAC AGA A R: ACA ACA GGA AAG TCC AGG CTA	73	59
TNF- $\alpha$	F: TTC TGG CTC AAA AAG AGA ATT G R: TGG TGG TCT TGT TGC TTA AGG	76	73
IL-17A	F: CAA TGACCT GGA ATT ACC CAA R: TGA AGG CAT GTG AAA TCG AGA	70	52
IL-8	F: GAA TGG GTT TGC TAG AAT GTG ATA R: CAG ACT AGG GTT GCC AGA TTT AAC	60	129
IL-10	F: GGT TGC CAA GCC TTG TCT GA R: TCC CCC AGG GAG TTC ACA T	81	107
TGF- $\beta$	F: TCT GCT GAG GCT CAA GTT AAA R: ATC GCC AGG AAT TGT TGC	54	74
CCL2/MCP-1	F: AAG ACC ATT GTG GCC AAG GA R: CGG AGT TTG GGT TTG CTT GT	80	93
CCL5	F: CGT GCC CAC ATC AAG GAG TA R: CAC ACA CTT GGC GGT TCT TTC	80	91

<sup>1</sup>, temperatura de desnaturação.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 PARTE I: AVALIAÇÃO DA MICROBIOTA ASSOCIADA A INFECÇÕES ODONTOGÊNICAS GRAVES POR ABORDAGEM METAGENÔMICA

O avanço científico e metodológico tem trazido importantes contribuições ao estudo dos microrganismos, agregando as ferramentas moleculares independentes de cultivo aos métodos convencionais, no sentido de caracterizar mais precisamente a microbiota associada às infecções (ROBERSTON; SMITH 2009). Este trabalho inédito utilizou o sequenciamento de nova geração para caracterizar a microbiota associada às infecções odontogênicas complexas de 37 pacientes hospitalizados em decorrência destes processos. As sequências obtidas foram em média 107.571 por espécime clínico, perfazendo um total de 3.979.770, sendo cada sequência com aproximadamente 441 pares de bases.

O resultado do sequenciamento demonstrou uma riqueza de microrganismos presente nas infecções odontogênicas graves (FIG 4). Aproximadamente 60% dos processos infecciosos apresentaram uma média de 88 microrganismos (desvio padrão 31,0). Quando observado a presença de microrganismos em relação aos pacientes observou-se que 49 microrganismos apresentaram uma prevalência maior que 60% nestes pacientes (FIG. 5), o que remete ao caráter polimicrobiano e de interação entre as espécies. Este resultado discorda com Warnke *et al.* (2008) que demonstraram que estas infecções, apesar de serem polimicrobianas, são compostas, em média, por no máximo dois a cinco microrganismos.

Além disso, apesar da presença de uma variedade de microrganismos, as infecções odontogênicas estudadas apresentam um padrão de dominância de algumas espécies. A maioria das sequências dos espécimes clínicos evidencia a predominância de apenas um microrganismo (FIG. 6). Desta forma se torna imprescindível, a partir do conhecimento gerado em nossa pesquisa, o aprofundamento destas relações com o intuito de entendimento do processo

infeccioso, já que o conhecimento dos mecanismos específicos que medeiam essas interações é limitado (STACY *et al.*, 2014).

Levando em consideração o total de sequências encontradas em todos os pacientes, os microrganismos mais abundantes foram *Rothia dentocariosa* (28,0%), *Parvimonas micra* (10,25%), *Peptostreptococcus stomatis* (6,0%) e *Atopobium rimae* (5,6%) (FIG 7).

Curiosamente a *Rothia dentocariosa* é um microrganismo cocobacilo Gram positivo, anaeróbio facultativo da microbiota da cavidade oral, cultivável, com característica anfibiônica. Tem envolvimento em processos cariosos da dentina e também está relacionado com processos endodônticos (BIZHANG *et al.*, 2011). É considerado como um patógeno oportunista, em diversos outros processos tais como endocardite bacteriana (SADHU *et al.*, 2005), pneumonia, artrite séptica (FAVERO *et al.*, 2009) e tonsilite (OHASHI *et al.*, 2005). Este microrganismo, juntamente com os *Actinomyces* e *Streptococcus* são considerados colonizadores primários (KOLENBRANDER *et al.*, 2006). Contrapondo a literatura, esse microrganismo não tem sido relacionado a processos infecciosos odontogênicos complexos (HEIMDAHL *et al.* 1985, BOYANOVA *et al.* 2006; FLYNN *et al.*, 2006, SETTE-DIAS *et al.*, 2010). Estudos futuros serão necessários para esclarecer esta dicotomia.

*Parvimonas micra*, *Mogibacterium timidum*, *Atopobium rimae* e as *Seimonas* são microrganismos anaeróbios obrigatórios fastidiosos que também são cultiváveis e frequentemente encontrados na microbiota de doença periodontal e infecções endodônticas (MURAD *et al.*, 2014; SATO *et al.*, 2012). Os resultados aqui apresentados contradizem ao de Fating *et al.* (2014) e outros (HEIMDAHL *et al.*, 1985; LEWIS *et al.*, 1990; KURIYAMA *et al.*, 2000; FLYNN *et al.*, 2006; SOBOTTKA *et al.*, 2002; STEFANOPOULOS; KOLOKOTRONIS, 2004) que não recuperaram estes microrganismos em infecções odontogênicas. Tal contradição pode ser explicada pela característica fastidiosa destes microrganismos, condição de cultivo, volume no inóculo, além dos pacientes estarem em uso maciço de antimicrobianos.

O uso de antimicrobianos pode alterar os microrganismos tanto na técnica de cultivo (BOYANOVA *et al.*, 2006) quanto na avaliação pelas técnicas moleculares, fato descrito por Junemann *et al.*, 2012 Ji *et al.*, 2012. Estes últimos

autores (Jl *et al.*, 2012) encontraram em análise de microbioma pacientes com osteonecrose uma maior abundância do filo *Firmicutes*, bem como, *Streptococcus intermedius*, *Lactobacillus gasserii*, *Mogibacterium timidum*, e *Solobacterium moorei* em pacientes que estavam em tratamento com antimicrobianos, ao passo  
5 que em pacientes sem o uso destas drogas foi observado maior abundância de *Parvimonas micra* e *Streptococcus anginosus*. Estes resultados divergem daqueles encontrados em nossa pesquisa, onde encontramos maior abundância de *Rothia detocariosa* *Parvimonas micra*, *Mogibacterium timidum* e *Streptococcus*. Tal observação pode ser explicada de algumas variáveis tais  
10 como o sítio envolvido, a característica do antimicrobiano e das técnicas de genética molecular.

Outro interessante achado neste estudo é o entendimento da complexidade da microbiota relacionada às infecções odontogênicas complexas, o que destoa dos trabalhos anteriores relacionados com essas infecções utilizando a técnica de  
15 cultivo (HEIMDAHL *et al.*, 1985; LEWIS *et al.*, 1990;; KURIYAMA *et al.*, 2000; SOBOTTKA *et al.*, 2002; FLYNN *et al.*, 2006;). Contudo a abundância e a riqueza dos microrganismos aqui encontrados se aproximam de trabalhos similares, utilizando seqüenciamento de nova geração, em processos infecciosos endodônticos e periodontais (LIU *et al.*, 2014; GOMES *et al.*, 2015). Este trabalho  
20 corrobora com Siqueira e Roças (2009), quanto à melhora no entendimento dos processos infecciosos através da aplicação de métodos moleculares, não apenas aumenta drasticamente a quantidade de informação disponível na infecção relacionada, mas também leva a mudanças em relação à compreensão da etiologia dos mesmos.

Enfim, este estudo representa um novo passo no sentido de caracterizar o perfil das comunidades microbianas associadas às infecções odontogênicas complexas. Foi possível mostrar que o microbioma presente na secreção purulenta destas infecções pode ser efetivamente estudada através  
25 seqüenciamento de nova geração. Esta abordagem propicia um amplo estudo da estrutura da comunidade nesta doença, abrindo o caminho para o entendimento, no futuro, das relações intermicrobianas na composição e na relação com o hospedeiro. Devido ao grande número de espécies encontradas, estudos  
30 longitudinais podem ser necessários para caracterizar as mudanças dinâmicas

que ocorrem neste microbioma em resposta à pressão do ambiente, tais como pressão pelo uso de antimicrobianos e o procedimento terapêutico de drenagem e aeração, compreendendo assim, em última análise, a progressão da doença e o tratamento do ponto de vista microbiológico.

5

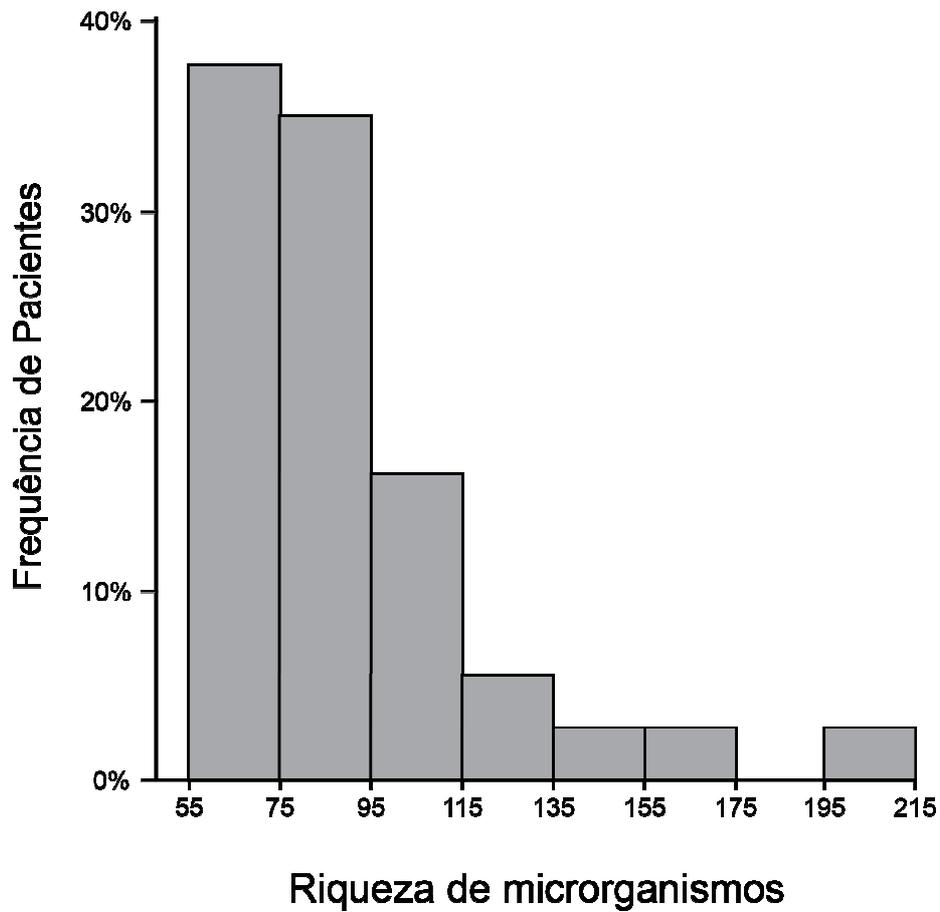


FIGURA 4  
Relação entre riqueza de microrganismos e frequência nos 37 pacientes avaliados (%).

10

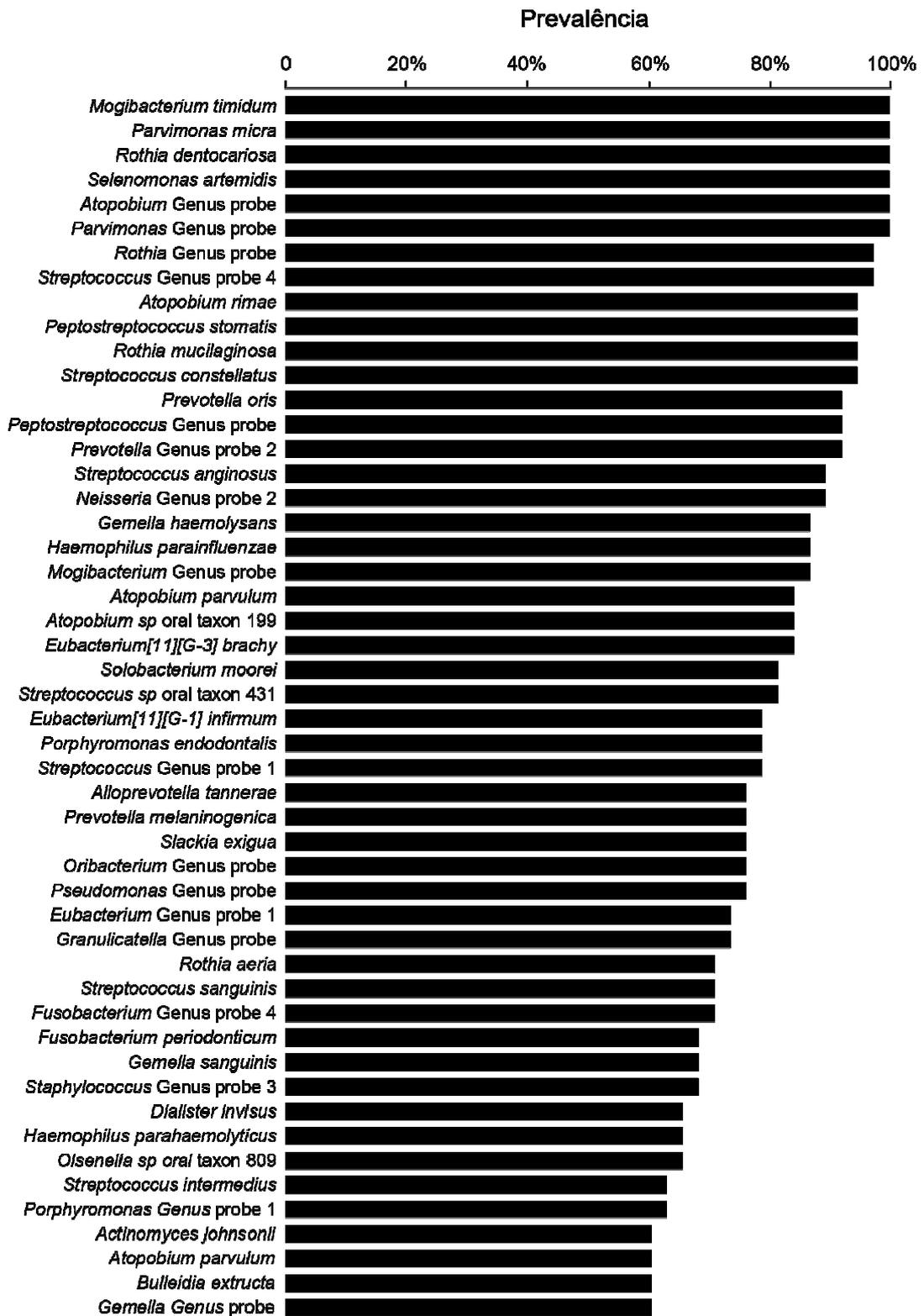


FIGURA 5  
Prevalência de microrganismos nos 37 pacientes avaliados (%).

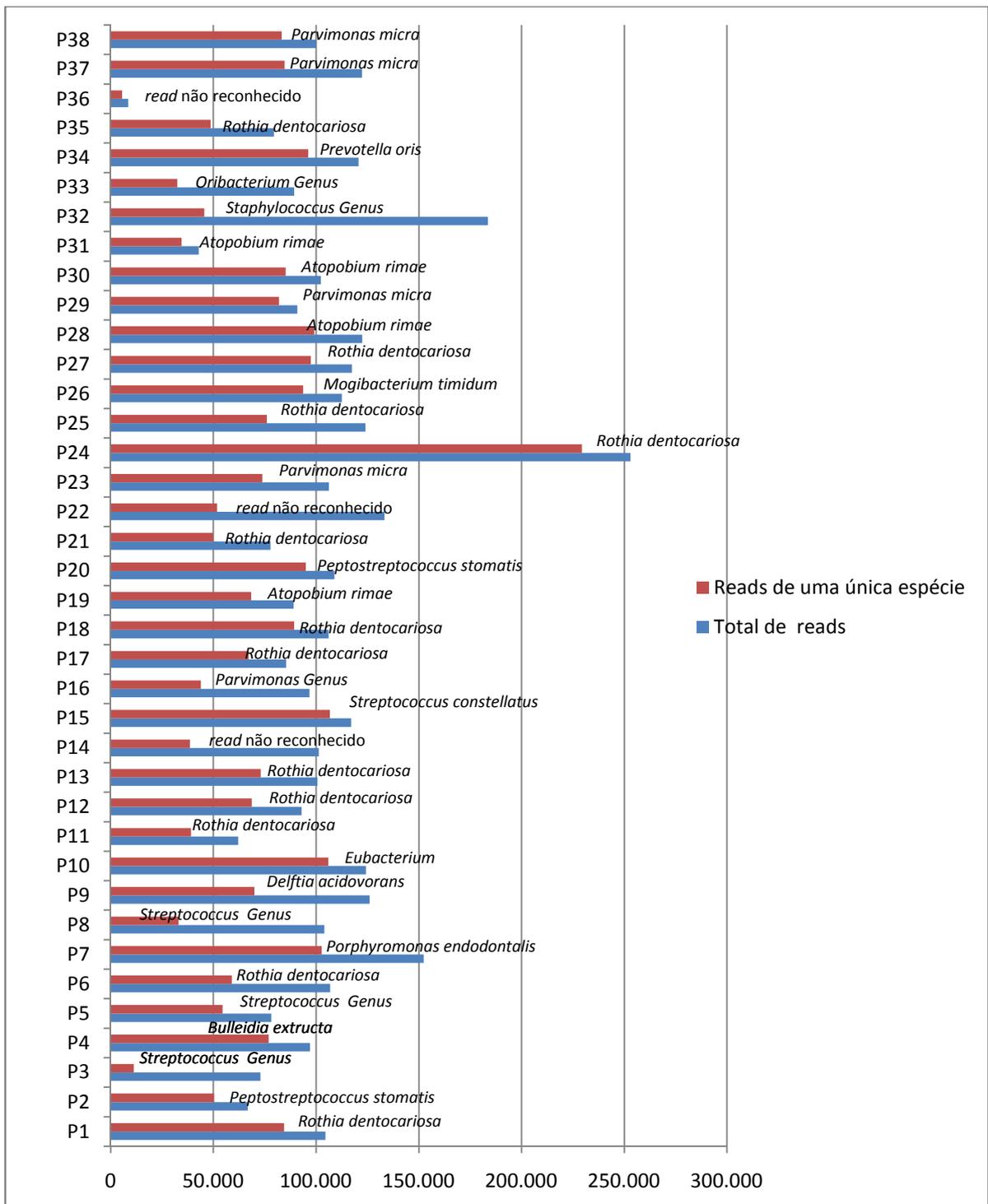


FIGURA 6

Relação entre o total de *reads* encontrados nos pacientes e os *reads* de uma única espécie.

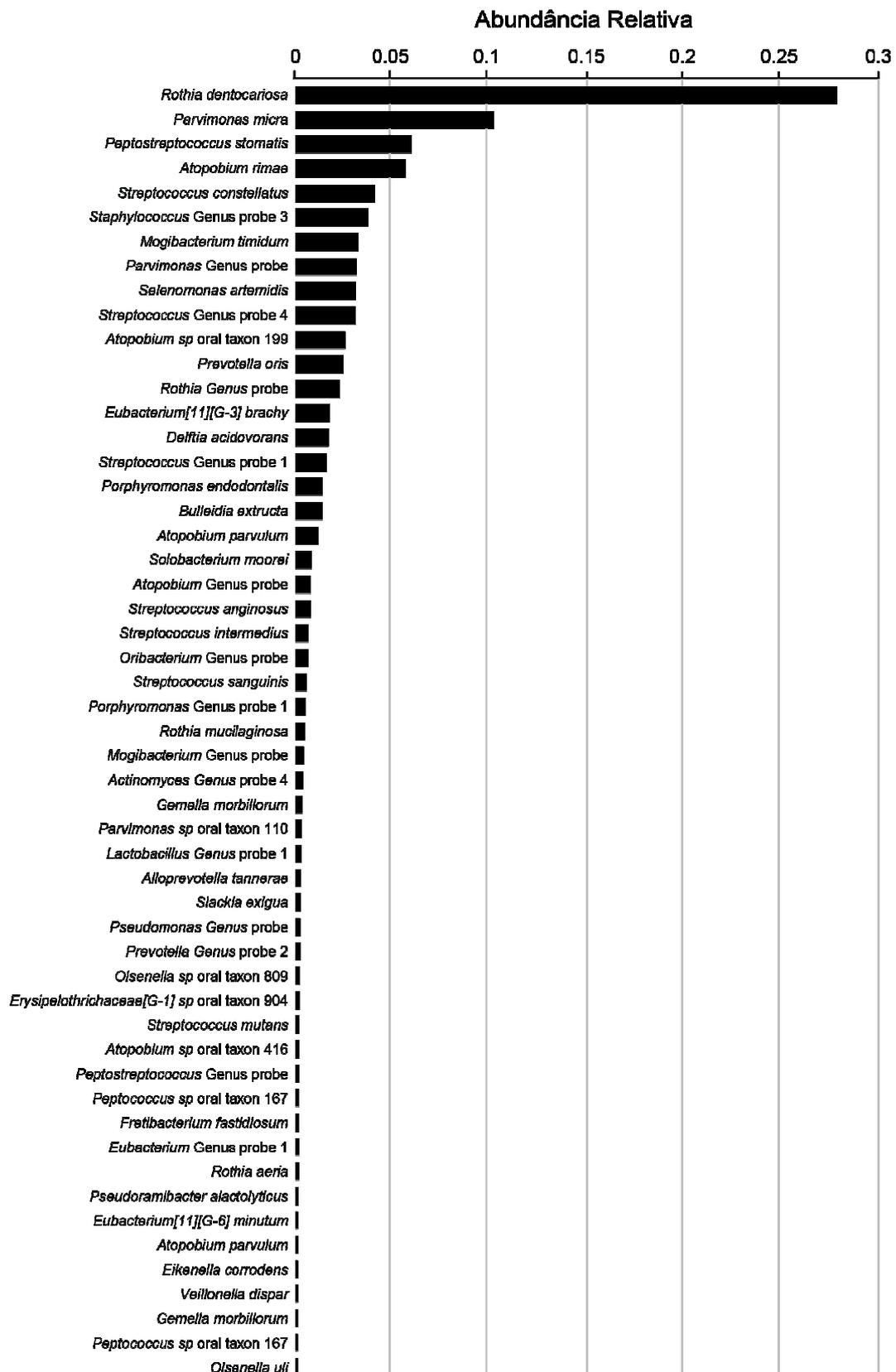


FIGURA 7  
Abundância relativa dos microrganismos nos 37 pacientes avaliados.

5.2 **PARTE II - AVALIAÇÃO DO PERFIL DE SUSCETIBILIDADE A DROGAS  
ANTIMICROBIANAS DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE PACIENTES COM INFECÇÕES  
ODONTOGÊNICAS GRAVES**

5

A resistência a drogas antimicrobianas é um problema extremamente relevante para a área de saúde, inclusive para a Odontologia. Para aumentar as chances de sucesso terapêutico, dados laboratoriais, referentes à identificação e caracterização dos agentes envolvidos na etiopatogenia de doenças infecciosas, incluindo o perfil de suscetibilidade a antimicrobianos, é crucial para o clínico que está considerando a instituição de antibioticoterapia. Sabe-se que este perfil pode variar de acordo com a região geográfica, influenciado por diversos fatores, entre eles, consumo diferenciado de drogas antimicrobianas (LIMERES *et al.*, 2005; VAN-WINKELHOF *et al.*, 2005; CHARDIN *et al.*, 2009; VELOO *et al.*,2012). Assim, a obtenção de dados locais é fundamental.

Tendo em conta as características dos microrganismos envolvidos na etiologia das infecções da cavidade oral, o procedimento microbiológico convencional para isolamento, identificação e caracterização do agente, quando possível, é oneroso, pode requerer condições muito específicas e um período de tempo muito longo até a obtenção do resultado. Considerando que, na Odontologia, propedêutica laboratorial não é, na imensa maioria das vezes, considerada, concordamos com Kuriyama *et al.*(2000), que defende uma abordagem racional e pragmática para a seleção empírica de uma droga antimicrobiana adequada. Esta escolha deve ser baseada em dados científicos, levando-se em conta a constante evolução da microbiota associada a infecções orofaciais no que tange ao padrão de suscetibilidade a antimicrobianos. Assim, estudos locais, de cunho epidemiológico, que visem avaliar o perfil de suscetibilidade a drogas antimicrobianas de bactérias envolvidas em infecções orais, revestem-se de grande relevância.

Apesar de avanços no campo da genética molecular terem possibilitado uma abordagem alternativa para o estudo da resistência bacteriana a antimicrobianos, ainda é considerado de grande relevância o emprego do método clássico, a avaliação fenotípica da propriedade por meio de antibiograma. Esta é,

ainda, aceita como a metodologia de escolha para caracterização de patógenos odontogênicos, com o objetivo de dar suporte à clínica, no estabelecimento do tratamento mais adequado de pacientes com infecções orofaciais (SKUCAITE *et al.*, 2010; VELOO *et al.*, 2012).

5           Diferenças significativas no perfil de suscetibilidade a drogas antimicrobianas relevantes foram documentadas em diferentes áreas geográficas. Considerando-se que o ambiente tem papel fundamental na estrutura da população bacteriana, no que se refere à expressão de resistência antimicrobiana, estas variações podem ser explicadas por diferenças no emprego  
10 dos antimicrobianos entre as regiões. Certamente, o uso abusivo e indiscriminado dos mesmos, assim como a não adesão ao esquema de tratamento proposto influenciam, de maneira importante, no equilíbrio resistência/suscetibilidade na população bacteriana. Desta forma, a vigilância regular do perfil de suscetibilidade antimicrobiana em diferentes localizações geográficas é fundamental para o  
15 estabelecimento de antibioticoterapia adequada (LIMERES *et al.*, 2005; VAN-WINKELHOFF *et al.*, 2005, CHARDIN *et al.*, 2009; VELOO *et al.*, 2012). Pelas mesmas razões discutidas, a condução de estudos que visem à caracterização de bactérias envolvidas na etiopatogenia de doenças infecciosas, no que se refere ao perfil de suscetibilidade a antimicrobianos é desejável. Os dados gerados  
20 podem contribuir para o estabelecimento de antibioticoterapia empírica com maiores chances de sucesso.

Neste estudo, o perfil de suscetibilidade a drogas antimicrobianas de amostras bacterianas isoladas de 30 pacientes com infecções odontogênicas graves foi determinado. Todos os pacientes estavam hospitalizados em  
25 decorrência do quadro, alguns deles em unidade de terapia intensiva, submetidos a diversos procedimentos específicos, como manutenção das vias aéreas e outros cuidados de suporte, quando necessário, além de administração de antimicrobianos.

Foram avaliadas 74 amostras bacterianas, cocos Gram positivos, anaeróbios facultativos, catalase positivos e coagulase negativos  
30 (*Staphylococcus*; n = 10). Os cocos Gram positivos anaeróbios facultativos catalase negativos (n = 36) e bactérias anaeróbias obrigatórias (n = 28). Segundo Limeres *et al.* (2005), a terapia antimicrobiana recomendada para pacientes com

infecções odontogênicas é dirigida contra cocos Gram positivos, anaeróbios facultativos e bactérias anaeróbias.

De maneira geral, os resultados indicaram percentuais elevados de suscetibilidade aos antimicrobianos testados. Resistência a eritromicina (43,5%) e clindamicina (29,7%) foram mais comumente detectadas.

Eritromicina é um antimicrobiano da classe dos macrolídios, com espectro de ação comparável ao da penicilina, considerando-se as infecções odontogênicas. Apresenta maior atividade contra bactérias Gram positivas, inclusive cocos anaeróbios orais, mas, há indícios de aumento das taxas de resistência (SANDS, 1995; BROOK, 2015). Possui atividade também contra organismos intracelulares, tais como *Chlamydia* e *Legionella* (WHITMAN & TUNKEL, 1992). Apesar dos níveis de resistência elevados, esta droga pode ser utilizada como segunda alternativa para o tratamento de infecções odontogênicas em pacientes alérgicos à amoxicilina (ROBERTSON; SMITH, 2009; TANCAWAN *et al.*, 2015).

Atualmente, outros macrolídios, como a claritromicina e a azitromicina, vêm sendo considerados como uma boa alternativa para o tratamento de pacientes com infecções odontogênicas, devido à maior eficácia dos mesmos (PINTO, 2015). Estas drogas têm melhor atividade contra anaeróbios da cavidade oral, incluindo *Actinomyces spp.*, *Propionibacterium spp.*, *Lactobacillus spp. dentium* e *Bifidobacterium*, *Fusobacterium*, *Bacteroides* e *Wolinella spp.*, e *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, incluindo aqueles resistentes a eritromicina (BROOK, 2015).

No que se refere à clindamicina, os dados da literatura indicam resistência média de 36% para amostras isoladas de processos infecciosos orais (LEWIS *et al.*, 1995; POESCHL *et al.*, 2010; POESCHL *et al.*, 2011 GÓMEZ-ARÁMBULA *et al.*, 2015). Embora os níveis de resistência sejam considerados elevados, seu uso ainda é indicado na Odontologia (DAHLEN *et al.*, 2000; KHEMALEELAKU *et al.*, 2002; KURIYAMA *et al.*, 2002; TANCAWAN *et al.*, 2015). A droga é recomendada para o tratamento de infecções dentais nos casos de pacientes alérgicos à penicilina ou quando a penicilina não foi eficaz, devendo ser evitada como droga de primeira escolha (SKUCAITE *et al.*, 2010, FATING *et al.*, 2014, TANCAWAN *et al.*, 2015).

É importante lembrar que, neste estudo, todas as amostras bacterianas foram obtidas de pacientes internados com infecções odontogênicas graves e, pela necessidade clínica, estavam em uso de antimicrobianos. O esquema adotado para a antibioticoterapia consistia na administração da associação  
5 clindamicina-gentamicina. É plausível supor que este fato contribua para os índices elevados de resistência à clindamicina detectados (VELOO *et al.*, 2012).

Analisando os dados obtidos por grupo bacteriano, em relação às amostras de *Staphylococcus spp*, as taxas de resistência mais elevadas foram observadas para penicilina (70,0%), ampicilina (60,0%), eritromicina (40,0%) e  
10 oxacilina (30,0%) (FIG 8). Rega *et al.*(2006), avaliando espécimes oriundos de infecções de cabeça e pescoço de origem dentária,relataram resultados similares aos obtidos no presente estudo. Índices de resistência a penicilina, ampicilina, cirpofloxacino e clindamicina de 72,7%, 58,5%, 5,0 % e 10,5%, respectivamente, foram observados.

15 Quanto aos cocos Gram positivos catalase negativos, os percentuais de resistência mais elevados foram detectados para eritromicina (44,1%) e cefotaxima, ceftriaxona e clindamicina (todas 38,2%) (FIG 9). As taxas de resistência a cefalosporinas, clidamicina e eritromicina divergem daquelas relatadas por diversos autores para espécimes coletados de processos infecciosos  
20 orais(KURIYAMA *et al.*, 2000; KURIYAMA *et al.*, 2002; REGA *et al.*, 2006). No que se refere à penicilina, o resultado deste estudo foi semelhante ao descrito por Skucaite *et al.* (2010), que observaram 2,3% de resistência entre amostras de *Streptococcus* isolados de pacientes com periapicopatia infecciosa. Rega *et al.* (2006) relataram, para espécimes obtidos de infecções de cabeça e pescoço de  
25 origem dentária, altos índices de resistência ao antimicrobiano (12,9%).Taxas elevadas de suscetibilidade de *Streptococcus* do grupo Viridans também foram observadas para ampicilina (98,4%), cefazolina (100%), ciprofloxacino (100%), clindamicina (86,3%), eritromicina (83,4%), levofloxacina (98,6%) e vancomicina (100%), por estes autores e que divergem dos dados aqui encontrados. Chunduri  
30 *et al.* (2012), em um estudo com espécimes isolados de processos infecciosos orofaciais, detectaram suscetibilidade de 85% e 59% à clindamicina e à eritromicina em amostras de *Streptococcus*.

Limeres *et al.* (2005) afirmaram que os genes *erm* são responsáveis por conferir resistência aos macrolídeos que os mesmos podem conferir resistência cruzada às lincosamidas. Estes autores ressaltaram, ainda, que amostras de *Streptococcus* atuam como reservatórios e podem transferir estes genes para outros microrganismos. Para Uh *et al.* (2004), embora os níveis de resistência possam variar devido à amostra clínica e à população estudada, um ponto comum entre os diferentes relatos é o aumento das taxas de resistência aos macrolídeos ao longo dos anos, como evidenciado por diversos estudos (KURIYAMA *et al.*, 2000; KURIYAMA *et al.*, 2002, REGA *et al.*, 2006). O dado reforça a necessidade de monitoramento rotineiro do perfil de suscetibilidade bacteriana a antimicrobianos.

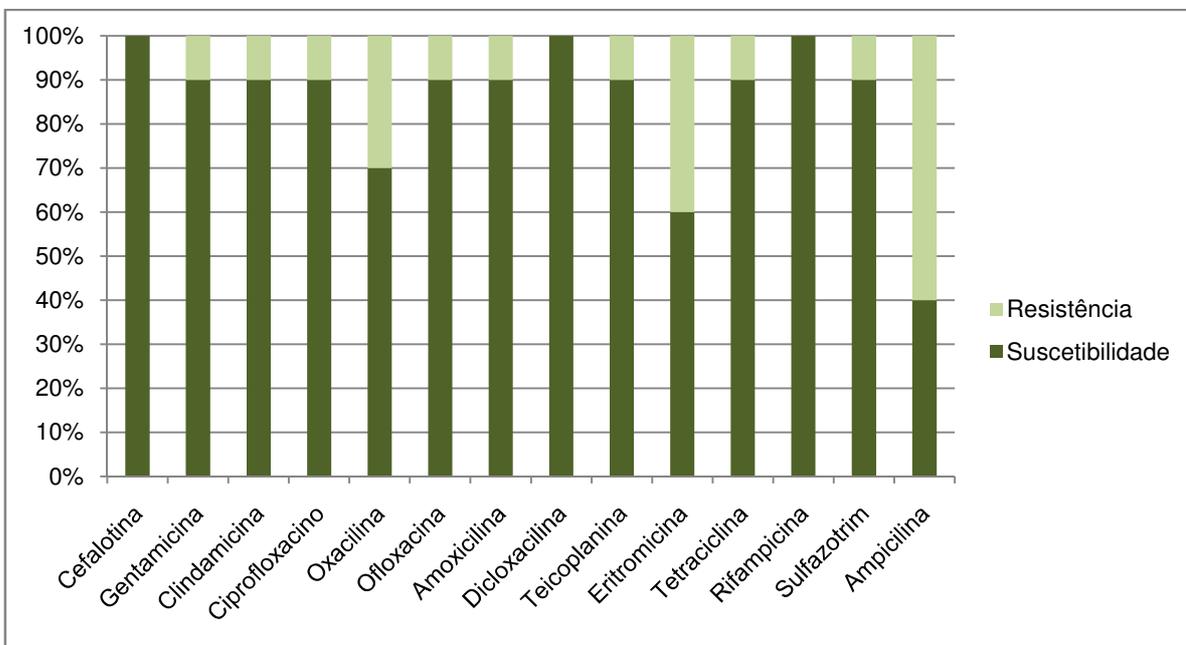


FIGURA 8

Perfil de suscetibilidade a antimicrobianos de 10 amostras de *Staphylococcus* isoladas de pacientes com infecções odontogênicas graves, avaliado pelo método de disco-difusão.

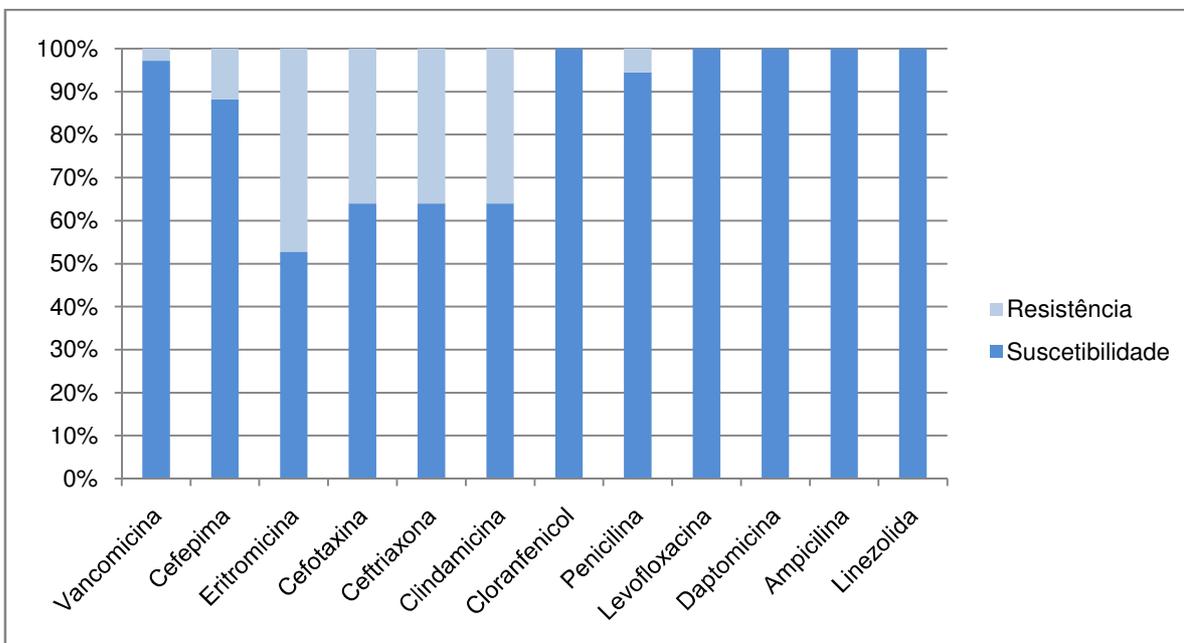


FIGURA 9

Perfil de suscetibilidade a antimicrobianos de 36 amostras de cocos Gram positivos catalase negativos isoladas de pacientes com infecções odontogênicas graves, avaliado pelo método de disco-difusão (cefepima, cefotaxima, ceftriaxona, clindamicina, cloranfenicol, eritromicina e vancomicina) e por determinação da concentração inibitória mínima (ampicilina, daptomicina, levofloxacino, linezolida e penicilina).

Neste estudo, *S. anginosus* apresentou índice de resistência a eritromicina de 14,3%, superior ao observado em outras investigações. Na Alemanha, a taxa detectada foi de 5,7% (ASMAH *et al.*, 2009) e nos Países Baixos foi de 2,6% (JACOBS & STOBBERINGH, 1996). Na Espanha, índice de  
5 resistência de 17,1% foi relatado para amostras isoladas de processos infecciosos em seres humanos (LIMIA *et al.*, 1999).

No que se referem à cefalosporinas, os resultados desta investigação diferem daqueles descritos para os EUA e Espanha. Investigações conduzidas nestas localidades apontaram para a ausência de resistência à penicilina e a  
10 cefalosporinas de terceira geração (ARACIL *et al.*, 1999; TRACY *et al.*, 2001; ASMAH *et al.*, 2008) em espécimes obtidos de processos infecciosos humanos.

Em relação às bactérias anaeróbias obrigatórias, concordamos com Hecht (1999), quanto às dificuldades e indicações dos testes de suscetibilidade a drogas antimicrobianas. Os testes não são realizados como rotina para este grupo  
15 microbiano, porque são caros e tecnicamente complexos. Contudo, as recentes e rápidas mudanças nos padrões de resistência antimicrobiana entre as bactérias anaeróbias, além da correlação destas com falhas terapêuticas, demonstram a necessidade de urgente reavaliação desta conduta.

Os dados relativos ao perfil de suscetibilidade a drogas antimicrobianas de anaeróbios estão apresentados na FIG. 10. Merecem destaque os resultados obtidos para metronidazol e clindamicina, que indicam índices de resistência de  
20 43,8% e 25,0%, respectivamente. Skucaite *et al.* (2010) observaram percentual semelhante no que se refere ao metronidazol. Por outro lado, Khemaleelakul *et al.* (2002) observaram frequência bem inferior de anaeróbios obrigatórios resistentes ao metronidazol (12,0%). Baumgartner & Xia (2003) relataram, para espécimes  
25 recuperados de abscessos endodônticos, taxas de resistência ao metronidazol superiores a 50%.

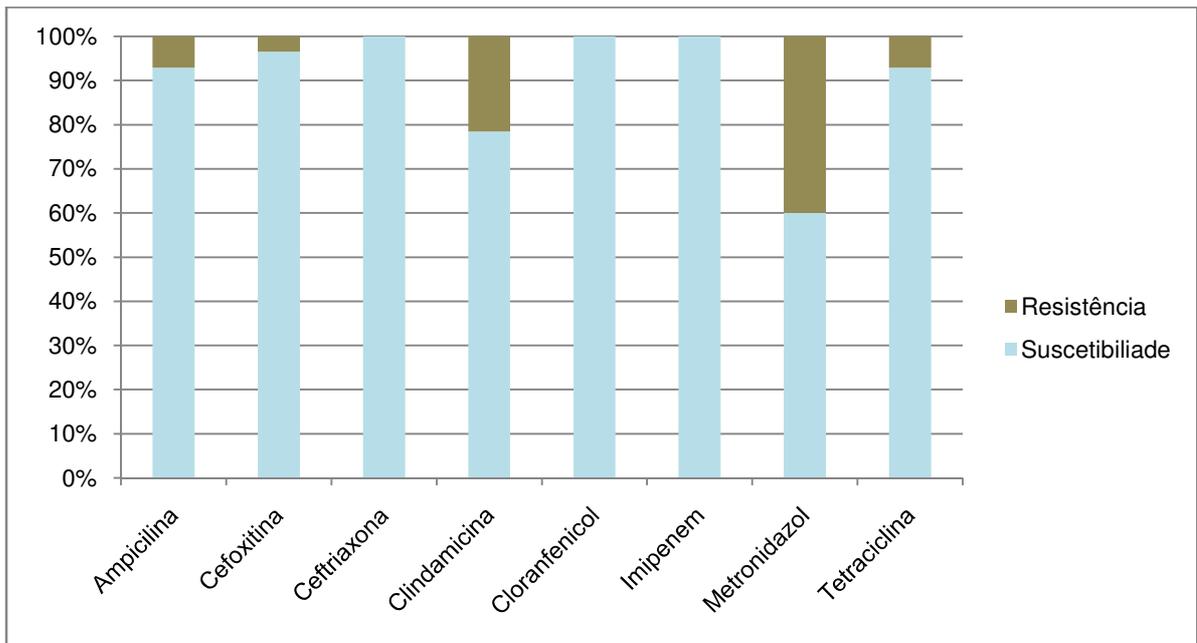


FIGURA 10

Perfil de suscetibilidade a antimicrobianos de 28 amostras de bactérias anaeróbias obrigatórias isoladas de pacientes com infecções odontogênicas graves, avaliado por meio da determinação da concentração inibitória mínima.

As combinações de carbapenêmicos e inibidores de  $\beta$ -lactamases podem ser utilizadas como agentes para combater processos infecciosos mistos envolvendo anaeróbios. Para emprego do metronidazol, o fármaco deve ser combinado com um dos vários antimicrobianos ativos contra bactérias aeróbias, já  
5 que o mesmo não tem atividade contra este grupo. O cloranfenicol é raramente utilizado na prática clínica, devido à sua toxicidade potencial. Deve-se lembrar que, como já mencionado, em decorrência da evolução dos padrões de resistência antimicrobiana entre bactérias anaeróbias clinicamente relevantes, comumente associada a fracassos clínicos, a realização de antibiograma é  
10 desejável (ROCHE *et al.*, 1997; HECHT, 1999; BRENCIANI *et al.*, 2014).

Apesar dos níveis de resistência observados neste estudo, a clindamicina ainda é considerada como o fármaco de escolha para tratamento de pacientes com infecções associadas a bactérias anaeróbias obrigatórias. Isto se deve ao fato de que, habitualmente, concentrações inibitórias mínimas baixas ainda são  
15 observadas para amostras incluídas no grupo, como, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* e *Fusobacterium*, o fármaco apresenta boa absorção e concentrações elevadas são atingidas em tecido ósseo (KIRKWOOD, 2003, GOMES *et al.*, 2011, BROOK, 2016).

Quando os resultados para bactérias anaeróbias foram avaliadas separadamente, de acordo com a reação à coloração pelo método de Gram, observou-se que as taxas de resistência à clindamicina foram de 10,5% e 14,5% para amostras Gram positivas e Gram negativas, respectivamente. Para metronidazol, os valores foram de 17,8% e 26,0%. Os resultados contradizem alguns autores, que consideraram resistência ao metronidazol comum entre os  
20 anaeróbios Gram positivos (PANKUCH *et al.*, 1993; KOETH *et al.*, 2004).

Em conclusão, os resultados da presente investigação indicaram que as bactérias recuperadas de abscessos de pacientes com infecções odontogênicas graves apresentaram, de forma geral, altos níveis de suscetibilidade aos agentes antimicrobianos avaliados. No entanto, frequência elevada de resistência a  
30 eritromicina e clindamicina foram detectados. Entre as bactérias anaeróbias obrigatórias, altas taxas de resistência ao metronidazol e à clindamicina foram observadas. Os dados contribuem para o conhecimento do perfil de suscetibilidade antimicrobiana de bactérias possivelmente envolvidas na

etiopatogenia de uma doença oral grave, podendo contribuir para a instituição de antibioticoterapia mais eficaz.

### 5 5.3 **PARTE III - AVALIAÇÃO DO PERFIL IMUNO-INFLAMATÓRIO: NÍVEL DE TRANSCRIÇÃO DE CITOCINAS E QUIMIOCINAS**

10 As alterações odontogênicas caracterizam-se pelo acúmulo de células imunocompetentes, principalmente macrófagos e linfócitos, promovendo uma resposta protetora do organismo contra a disseminação microbiana para os tecidos circunvizinhos (STASHENKO *et al.*, 1998). No que se referem às células T, quando as mesmas são ativadas por células apresentadoras de antígenos ou por citocinas, elas rapidamente secretam citocinas e se diferenciam em vários  
15 grupos de células efetoras, como, células T CD4<sup>+</sup>, T CD8<sup>+</sup> e células de memória (HAHN;LIEWEHR, 2007).

As células T efetoras são divididas em, pelo menos, quatro grupos, como mencionado anteriormente, quais sejam, Th1, Th2, Th17 e Treg (DIVEU *et al.*, 2008; MCGEACHY; CUA, 2008; GARLET, 2010; QUEIROZ-JUNIOR *et al.*, 2010).  
20 Neste estudo, avaliou-se a expressão gênica das citocinas IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ (Th1), IL-17A (Th17), IL-10 e TGF- $\beta$ (Treg) e das quimiocinas CCL2/MCP-1, CCL5 e IL-8 em pacientes internados em consequência de infecções odontogênicas graves, num estudo caso-controle.

Observou-se a expressão gênica de todas as citocinas avaliadas e  
25 quimiocinas avaliadas, tanto nas amostras dos indivíduos do grupo controle (fluido intersticial de dentes com polpa vital, sem infecção), como naquelas de pacientes com abscessos periapicais agudos. A transcrição dos genes que codificam as citocinas pró-inflamatórias IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-17A e TNF- $\alpha$  e as quimiocinas CCL2/MCP-1 e IL-8 estava significativamente aumentada nas amostras do grupo  
30 caso. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os níveis de mRNA das citocinas reguladoras IL-10 e TGF- $\beta$  e da quimiocina CCL5 entre os dois grupos avaliados. Os dados estão apresentados na FIG 11.

TNF- $\alpha$  é um mediador imunológico potente nas respostas inflamatórias agudas e crônicas. A citocina estimula a produção de colagenase, quimiocinas, citocinas e moléculas de adesão celular, fatores relacionados com a reabsorção óssea (MANOLAGAS, 1995). A detecção de níveis de mRNA de TNF- $\alpha$  está de acordo com dados da literatura relatados para exsudato de lesões periapicais agudas e crônicas (SAFAVI *et al.*, 1991; ATAUGLU *et al.*, 2002). Expressão gênica aumentada de TNF- $\alpha$  também foi observada para pacientes com lesões periapicais refratárias ao tratamento endodôntico, quando comparadas com tecido periapical saudável (HENRIQUES *et al.*, 2011, BRITO *et al.*, 2012).

10 A IL-1 $\beta$  desempenha papel central em várias doenças crônicas, sendo um dos estimuladores mais ativos da reabsorção óssea (LANG *et al.*, 2000; DE-SÁ *et al.*, 2007). Além disto, em seres humanos, observou-se redução dos níveis de IL-1 $\beta$  em lesões periapicais após a realização do tratamento endodôntico (SAFAVI & ROSSOMANDO, 1991). No presente estudo, observou-se expressão gênica mais elevada de IL-1 $\beta$  no grupo caso. Estudos que avaliaram temporalmente o desenvolvimento de alterações perirradiculares indicaram que os níveis de citocinas do tipo 1, como, por exemplo, a IL-1 $\beta$ , apresentam-se aumentados na fase ativa da doença (KAWASHIMA & STASHENKO, 1999; MARTINEZ *et al.*, 2007).

20 A IL-17A atua, principalmente, nas células endoteliais e nos monócitos, induzindo a secreção de mediadores pró-inflamatórios. Esta citocina é produzida pelas células T CD4+/Th17, localizadas, predominantemente, em tecidos inflamados (WEAVER *et al.*, 2006), e relacionada com a exacerbação da inflamação (TESMER *et al.*, 2008). As células Th17 são controladas pelas citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-21, IL-23 e TGF- $\beta$  (XIONG *et al.*, 2009). Os resultados do presente estudo, relativos à expressão gênica aumentada de IL-17A, são similares ao reportados por Henriques *et al.* (2011) e Brito *et al.* (2012), que estudaram processo infecciosos periapicais.

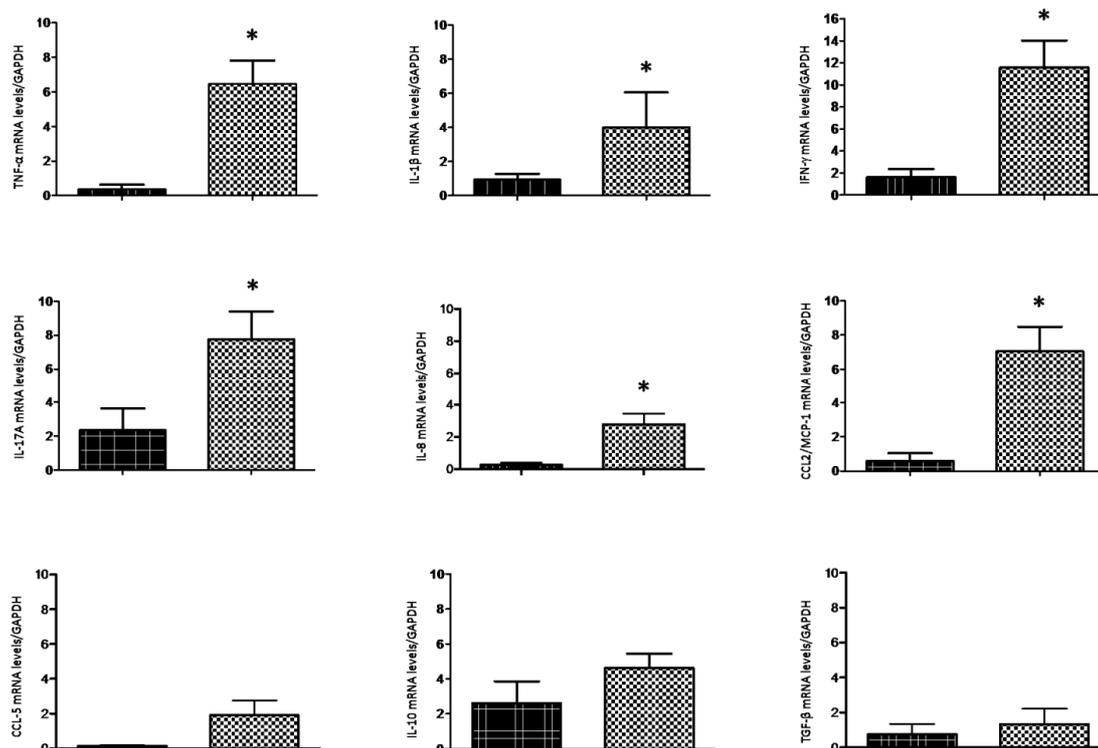


FIGURA 11

Expressão de mRNA das citocinas IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-10, IL-17A, TGF- $\beta$  e TNF- $\alpha$  e das quimiocinas CCL2/MCP-1, CCL5 e IL-8 em amostras recuperadas de abscessos periapicais agudos de dentes com polpa vital de pacientes saudáveis (grupo controle ■, n = 12) e fluido intersticial de dentes com infecções odontogênicas graves (grupo caso ▨, n = 12). Os níveis de mRNA foram quantificados por PCR em tempo real, empregando-se GAPDH como controle interno. As barras representam a média dos valores obtidos para cada grupo; as barras representam o erro padrão das médias. O nível de significância estabelecido foi  $p < 0,05$ , determinado pelo teste de Wilcoxon.

5

10

15

20

O IFN- $\gamma$  é o principal ativador de macrófagos, que, subsequentemente, produzem citocinas, e de outros mediadores que desempenham papel significativo no desenvolvimento de doenças periradiculares (COLIC *et al.*, 2006). Colic *et al.* (2008) observaram correlação positiva entre a expressão de IL-17A e IFN- $\gamma$ , em lesões periapicais crônicas, e sugeriram que ambas as citocinas são importantes na exacerbação da inflamação.

As quimiocinas, potentes mediadores ou reguladores da inflamação, pela habilidade de recrutar e ativar subpopulações específicas de leucócitos, que atuam no recrutamento de células Th1 e Th2 (SILVA *et al.*, 2005). Entre elas, a IL-8 atrai e ativa neutrófilos polimorfonucleares, tornando-os mais disponíveis e mais competentes para eliminar microrganismos. Esta quimiocina também estimula o recrutamento e a atividade de osteoclastos. Patel *et al.* (2003) demonstraram expressão gênica elevada de IL-8 em células da polpa dental e em lesões periapicais ativas após estimulação. Na presente investigação, associação entre níveis de mRNA de IL-8 e doença oral grave também foi observada.

Ainda sobre IL-8, Graunaite *et al.* (2012) relataram correlação positiva entre níveis de expressão e dor em pacientes com doença periodontal. Patógenos orais, como *Porphyromonas endodontalis*, *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia* são capazes de estimular a produção de IL-8 por fibroblastos da polpa (YANG *et al.*, 2003). Os níveis sistêmicos de IL-8 são também correlacionados com falha de múltiplos órgãos, sepse e mortalidade (KRAFT *et al.*, 2015).

A quimiocina CCL2/MCP-1 está envolvida no recrutamento de monócitos para o sítio da inflamação (SILVA *et al.*, 2005; DE ROSSI *et al.*, 2008). Estas células promovem a eliminação microbiana dos sítios infectados e, posteriormente, atuam apresentando os antígenos às células B e T, tendo papel de relevância nas respostas imune inata e adaptativa. A expressão aumentada desta quimiocina em pacientes portadores de infecções orais graves em relação a indivíduos controle é um achado esperado. Previamente, Marçal *et al.* (2010) relataram expressão elevada de CCL2/MCP-1 em granulomas periapicais e cistos, quando comparados a tecidos saudáveis.

A citocina IL-10 tem, como principal função, a regulação da resposta imunológica (ALEXANDER *et al.*, 2004, RAKESH *et al.*, 2005). É interessante observar que resultados de estudos que procuraram analisar o desenvolvimento

das alterações perirradiculares em modelos animais demonstraram que a síntese da IL-10 encontrava-se aumentada em períodos tardios, após a indução da lesão periapical, inibindo a síntese de citocinas pró-inflamatórias, expressas nos períodos iniciais do processo inflamatório (SASAKI *et al.*, 2000; MACIEL *et al.*, 5 2011). Nestes modelos, a IL-10 reduziu a resposta pró-inflamatória, impedindo que seus efeitos fossem deletérios ao hospedeiro.

De forma similar, em seres humanos, Brito *et al.* (2012) demonstraram que, após a redução do conteúdo microbiana em sistemas de canais radiculares infectados, há aumento da expressão de IL-10. A citocina, que possui caráter 10 modulador da resposta imune, reduz a expressão das citocinas pró-inflamatórias inicialmente detectadas. É interessante observar que, na presente investigação, detectou-se semelhança entre os níveis de expressão gênica de IL-10 nos pacientes com infecções odontogênicas graves e nos indivíduos controle. O dado sugere que, no momento da coleta dos espécimes, a regulação do processo 15 imuno-inflamatório ainda não estava ocorrendo de forma significativa, ou seja, a resposta à doença estava na sua fase aguda, predominando de maneira significativa, inibindo, por meio da regulação cruzada, a instalação de uma resposta anti-inflamatória (MOSMAN, 1994).

No que se refere à quimiocina CCL5, Ness *et al.* (2004) propuseram que a 20 mesma desempenha papel de modular a resposta imune inata durante a sepse. Chensue *et al.* (1999) sugeriam uma associação entre CCL5 e resposta celular do tipo Th1 em granulomas. Brito *et al.* (2012) observaram que a expressão de CCL5, juntamente com algumas citocinas Th1, foi reduzida após procedimentos endodônticos. Funções como quimioatração de monócitos, eosinófilos e células T 25 de memória sugerem que a síntese desta quimiocina esteja ligada e seja dependente da expressão de citocinas da resposta Th1, conforme demonstrado por Barbosa *et al.* (2008) e Brito *et al.* (2012).

Resultados divergentes também já foram relatados. Ferreira *et al.* (2015) 30 relataram níveis semelhantes de mRNA de CCL5 em fluido intersticial periapical de indivíduos portadores ou não de anemia falciforme, uma condição associada à ativação da resposta imuno-inflamatória. Nossos dados indicaram níveis semelhantes de mRNA de CCL5 em pacientes com infecções odontogênicas graves e indivíduos controle.

A citocina TGF- $\beta$  regula o crescimento e a diferenciação celular, assim como a produção de matriz extracelular. É considerado também um fator imunossupressor potente, que regula negativamente a transcrição dos fatores pró-inflamatórios, tais como IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  (KHALAF *et al.*, 2014). Tem sido demonstrado que TGF- $\beta$  e IL-10 modulam a resposta pró-inflamatória em processos imuno-inflamatórios periapicais e periodontais (KHALAF *et al.*, 2014; MACIEL *et al.*, 2012). Tal como observado para IL-10, os nossos resultados indicam níveis basais de expressão gênica de TGF- $\beta$  no grupo estudado.

Em síntese, os resultados deste estudo demonstram correlação direta entre o quadro clínico agudo e a expressão de citocinas pró-inflamatórias. Indicam, ainda, que, nestes quadros graves em que a infecção ainda não foi controlada, a modulação promovida pelas células Treg encontra-se inibida, de acordo com o conceito estabelecido (COFFMAN; MOSMANN 1991).

Embora este estudo não estabeleça uma relação causal entre a transcrição dos genes que codificam as citocinas e quimiocinas avaliadas e a presença de uma dada microbiota, estudos futuros deverão se ater a este aspecto. Por sua vez, os resultados deste estudo permitem compreender a interrelação entre uma microbiota patogênica e a resposta orquestrada pelo hospedeiro em um quadro de infecção oral grave.

20

25

30

## 6 SÍNTESE DE RESULTADOS E CONCLUSÕES

- 5       • O resultado do sequenciamento demonstrou uma riqueza de microrganismos presente nas infecções odontogênicas graves.
- Quando observado a presença de microrganismos em relação aos pacientes observou-se que 49 microrganismos apresentaram uma prevalência maior que 60% nestes pacientes.
- 10       • Apesar da presença de uma variedade de microrganismos, as infecções odontogênicas estudadas apresentam um padrão de dominância de algumas espécies.
- Do total de 3.979.770 sequências encontradas do total de pacientes, os microrganismos mais abundantes foram *Rothia dentocariosa* (28,0%), *Pavimona micra* (10,25%), *Peptostreptococcus stomatis*(6,0%) e *Atopobium rima*e (5,6%).
- 15       • A abundância e a riqueza dos microrganismos aqui encontrados se aproximam de trabalhos similares, utilizando seqüenciamento de nova geração, em processos infecciosos endodônticos e periodontais.
- A melhora no entendimento dos processos infecciosos através da aplicação de métodos moleculares, não apenas aumenta drasticamente a  
20       quantidade de informação disponível na infecção relacionada, mas também leva a mudanças em relação à compreensão da etiologia dos mesmos.
- Apesar de avanços no campo da genética molecular terem possibilitado uma abordagem alternativa para o estudo da resistência bacteriana a antimicrobianos, ainda é considerado de grande relevância o emprego do método  
25       clássico, a avaliação fenotípica da propriedade por meio de antibiograma.
- De maneira geral, os resultados indicaram percentuais elevados de suscetibilidade aos antimicrobianos testados. Resistência a eritromicina (43,5%) e clindamicina (29,7%) foram mais comumente detectadas.

• No que se refere aos cocos Gram positivos catalase negativos, os percentuais de resistência mais elevados foram detectados para eritromicina (44,1%) e cefotaxima, ceftriaxona e clindamicina (todas 38,2%).

• O *Streptococcus anginosus* apresentou índice de resistência a eritromicina de 14,3%, superior ao observado em outras investigações.

• No que se referem à cefalosporinas, os resultados desta investigação diferem daqueles descritos para os EUA e Espanha.

• Quando os resultados para bactérias anaeróbias foram avaliadas separadamente, de acordo com a reação à coloração pelo método de Gram, observou-se que as taxas de resistência à clindamicina foram de 10,5% e 14,5% para amostras Gram positivas e Gram negativas, respectivamente. Para metronidazol, os valores foram de 17,8% e 26,0%.

• A presente investigação indicou que as bactérias recuperadas de abscessos de pacientes com infecções odontogênicas graves apresentaram, de forma geral, altos níveis de suscetibilidade aos agentes antimicrobianos avaliados.

• Observou-se a expressão gênica de todas as citocinas e quimiocinas avaliadas, tanto nas amostras dos indivíduos do grupo controle (fluido intersticial de dentes com polpa vital, sem infecção), como naquelas de pacientes com abscessos periapicais agudos.

• A transcrição dos genes que codificam as citocinas pró-inflamatórias IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-17A e TNF- $\alpha$  e as quimiocinas CCL2/MCP-1 e IL-8 estava significativamente aumentada nas amostras do grupo caso.

• Não houve diferença estatisticamente significativa entre os níveis de mRNA das citocinas reguladoras IL-10 e TGF- $\beta$  e da quimiocina CCL5 entre os dois grupos avaliados.

• Os resultados deste estudo demonstram correlação direta entre o quadro clínico agudo e a expressão de citocinas pró-inflamatórias. Indicam, ainda, que, nestes quadros graves em que a infecção ainda não foi controlada, a modulação promovida pelas células Treg encontra-se inibida, de acordo com o conceito estabelecido.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 5 ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. *Imunologia Celular e Molecular*, 7ª edição. Editora Elsevier Ltda; Rio de Janeiro, 2011, 469p.
- AKDIS, M.; BURGLER, S.; CRAMERI, R.; EIWEGGER, T.; FUJITA, H.; GOMEZ, E.; et al. Interleukins, from 1 to 37, and interferon- $\gamma$ : receptors, functions, and roles in diseases. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. v. 127, n. 3, p. 701-70, 2011.
- 10 ALEXANDER, W.S.; HILTON, D.J. The role of suppressors of cytokine signaling (SOCS) proteins in regulation of the immune response. *Annual Review of Immunology*. v. 22, p.503-29, 2004.
- AL-QAMACHI, L.H.; AGA, H.; MCMAHON, J.; LEANORD, A.; HAMMERSLEY, N. Microbiology of odontogenic infections in deep neck spaces: a retrospective study. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. v.48, n.1, p.37-39, 2010.
- 15 ANGELAKIS, E.; ROUX, V.; RAOULT, D.; DRANCOURT, M. Human case of *Atopobium rimae* bacteremia. *Emerging Infectious Diseases Journal* . v.15, n.2, p.345-355, 2009.
- ARACIL, B.; MIÑAMBRES, M.; OTEO, J.; TORRES, C.; GÓMEZ-GARCÉS, J.L.;  
20 ALÓS, J.I. High prevalence of erythromycin-resistant and clindamycin-susceptible (M phenotype) viridans group streptococci from pharyngeal samples: a reservoir of *mef* genes in commensal bacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. v. 48, n. 4, p. 592-594, 2001.
- ARACIL. B.; GOMEZ-GARCES, J.L.; ALOS, J.I. A study of susceptibility of 100  
25 clinical isolates belonging to the *Streptococcus milleri* group to 16 cephalosporins. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. v. 43,n.3, p.339-402, 1999.
- ARAUJO-PIRES, A.C.; FRANCISCONI, C.F.; BIGUETTI, C.C.; CAVALLA, F.; ARANHA, A.M.; LETRA, A.; et al. Simultaneous analysis of T helper subsets (Th1, Th2, Th9, Th17, Th22, Tfh, Tr1 and Tregs) markers expression in periapical

- lesions reveals multiple cytokine clusters accountable for lesions activity and inactivity status. *Journal of Applied Oral Science*. v. 22, n. 4, p. 336-4, 2014.
- ARNDT, P.G.; AVDI, N.J.; MALCOLM, K.C.; WORTHEN, G.S. Lipopolysaccharide-induced c-Jun NH2-terminal kinase activation in human neutrophils: role of phosphatidylinositol 3-Kinase and Syk-mediated pathways. *Journal of Biological Chemistry*. v. 279, p. 10883–91, 2004.
- ASMAH, N.; EBERSPÄCHER, B.; REGNATH, T.; ARVAND, M. Prevalence of erythromycin and clindamycin resistance among clinical isolates of the *Streptococcus anginosus* group in Germany. *Journal of Medical Microbiology*. v. 58, n. 2, p. 222-7, 2009.
- ATAOĞLU, T.; UNGÖR, M.; SERPEK, B.; HALILOĞLU, S.; ATAOĞLU, H.; ARI, H. Interleukin-1b and tumour necrosis factor-a levels in periapical exudates. *International Endodontic Journal*. v. 35, n. 2, p. 181-5, 2002.
- BARBOSA, R.E.; DO NASCIMENTO, C.; ISSA, J.P.; WATANABE, E.; ITO, I.Y.; DE ALBUQUERQUE, R.F. Bacterial culture and DNA Checkerboard for the detection of internal contamination in dental implants. *Journal of Prosthodontics*. v. 18, n.5, p.376-81, 2009.
- BASCONES, A.; AGUIRRE, J.M.; BERMEJO, A.; BLANCO, A.; GAY-ESCODA, C.; GÓNZÁLEZ-MOLES, M.A.; et al. Documento de consenso sobre el tratamiento antimicrobiano de las infecciones bacterianas odontogénicas. *Medicina Oral Patología Oral e Cirugía Bucal*, v. 9, n.1, p.363-76, 2004.
- BASINSKI T.M.; HOLZMANN, D.; EIWEGGER, T.; ZIMMERMANN, M.; KLUNKER, S.; MEYER, N.; SCHMID-GRENDELMEIER, P.; JUTEL, M.; AKDIS, C.A. Dual nature of T cell-epithelium interaction in chronic rhinosinusitis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. v. 124, n.1, p.74-80, 2009.
- BAUMGARTNER J.C.; XIA T. Antibiotic susceptibility of bacteria associated with endodontic abscesses. *Journal of Endodontics*. v. 29, n.1, p. 44-7, 2003.
- BELKAID Y. TARBELL K.V. Arming Treg cells at the inflammatory site. *Immunity*. v. 30, n. 3, p. 322-3, 2009,
- BELSTRØM, D.; PASTER, B.J.; FIEHN, N.E.; BARDOW, A. Salivary bacterial fingerprints of established oral disease revealed by the Human Oral Microbe

- Identification using Next Generation Sequencing (HOMINGS) technique. *Journal of Oral Microbiology*. v. 14, n. 8, p. 3017, 2016a.
- BELSTRØM, D.; PASTER, B.J.; FIEHN, N-E.; BARDOW, A.; HOLMSTRUP, P. Salivary bacterial fingerprints of established oral disease revealed by the Human Oral Microbe Identification using Next Generation Sequencing (HOMINGS) technique. *Journal of Oral Microbiology*. v.8, p. 1-7, 2016b.
- BENTLEY, D.R.; BALASUBRAMANIAN, S.; SWERDLOW, H.P.; SMITH, G.P.; MILTON, J.; BROWN, C.G., et al. Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. *Nature* . v. 456, n. 3, p. 53–59, 2008.
- 10 BIRKEDAL-HANSEN, H. Role of matrix metalloproteinases in human periodontal diseases. *Journal of Periodontology*. v. 64, n.5, p.474-84, 1993.
- BIZHANG, M.; ELLERBROCK, B.; PREZA, D.; RAAB, W.; SINGH, P.; BEIKLER, T.; HENRICH, B.; ZIMMER, S. Detection of nine microorganisms from the initial carious root lesions using a TaqMan-based real-time PCR. *Journal of Oral*
- 15 *Diseases*. v. 17, n. 7, p.642-52, 2011.
- BOYANOVA, L.; KOLAROV, R.; GERGOVA, G.; DELIVERSKA, E.; MADJAROV, J.; MARINOV, M.; MITOV, I. Anaerobic bacteria in 118 patients with deep-space head and neck infections from the University Hospital of Maxillofacial Surgery. *Journal of Medical Microbiology*. v. 55, n.9, p.1285-9, 2006.
- 20 BRENCIANIN, A.; TIBERI, E.; TILI, E.; MINGOIA, M.; PALMIERI, C.; VARALDO, P.E.; GIOVANETTI, E. Genetic determinants and elements associated with antibiotic resistance in viridans group *Streptococci*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* . v. 69, n. 6, p. 1197-204, 2014.
- BRESCÓ-SALINAS, M.; COSTA-RIU, N.; BERINI-AYTÉS, L, GAY-ESCODA, C.
- 25 Antibiotic susceptibility of the bacteria causing odontogenic infections. *Medina Oral Patologia Oral e Cirurgia Bucal*. v. 11, n.1, p.70-5, 2006.
- BRITO, L.C.; TELES, F.R.; TELES, R.P.; TOTOLA, A.H.; VIEIRA, L.Q.; SOBRINHO, A.P. T-lymphocyte and cytokine expression in human inflammatory periapical lesions. *Journal of Endodontics*. v.38, n. 4, p.481-5, 2012.
- 30 BROOK, I. Antimicrobials therapy of anaerobic infections. *Journal of Chemotherapy*. v. 00, n. 0, p. 1-9, 2015.

- BROOK, I. Encapsulated anaerobic bacteria in synergistic infections. *Microbiological Reviews*. v.50, n.4 p.452-457, 1986.
- BROOK, I. Spectrum and treatment of anaerobic infections. *Journal of Infection and Chemotherapy*. v. 22, n.1, p. 1-13, 2016.
- 5 BROOK, I.; LEWIS, M.A.; SÁNDOR, G.K.; JEFFCOAT, M.; SAMARANAYAKE, L.P.; VERA ROJAS, J. Clindamycin in dentistry: more than just effective prophylaxis for endocarditis? *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology*. v. 100, n. 5, p. 550-8, 2005.
- BRYANT, V.L.; SLADE, C.A. Chemokines, their receptors and human disease: the  
10 good, the bad and the itchy. *ImmunolCellBiol*. v. 93, n.2 , p. 364-371, 2015.
- BURKE, S.M.; ISSEKUTZ, T.B.; MOHAN, K.; LEE, P.W.; SHMULEVITZ, M.; MARSHALL. J.S. Human mast cell activation with virus-associated stimuli leads to the selective chemotaxis of natural killer cells by a CXCL8-dependent mechanism. *Blood*. v. 111, n. 12, p. 5467-76, 2008.
- 15 CAPORASO J.G.; LAUBER C.L.; WALTERS, W.A., BERG-LYONS, D.; HUNTLEY, J.; FIERER N, *et al*. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *Journal of International Society for Microbial Ecology*. v. 6, n.8, p. 1621-4, 2012.
- CHAN, Y.; CHAN, C.H. Antibiotic resistance of pathogenic bacteria from  
20 odontogenic infections in Taiwan. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. v36, n.2, p.105-10, 2003.
- CHARDIN, H.; YASUKAWA, K.; NOUACER, N.; PLAINVERT, C.; AUCOUTURIER, P.; ERGANI, A.; *et al*. Reduced susceptibility to amoxicillin of oral streptococci following amoxicillin exposure. *Journal of Medical Microbiology*.  
25 v. 58, n. 8, p.1092-7, 2009.
- CHARDIN, H.; YASUKAWA, K.; NOUACER, N.; PLAINVERT, C.; AUCOUTURIER, P.; ERGANI, A.; DESCROIX, V.; TOLEDO-ARENAS, R.; AZERAD, J.; BOUVET, A. Reduced susceptibility to amoxicillin of oral streptococci following amoxicillin exposure. *Journal of Medical Microbiology*. v. 58,  
30 n. 8, p. 1092-7, 2009.

- CHAVEZ DE PAZ, L.E.; MOLANDER, A.; DAHLEN, G. Gram-positive rods prevailing in teeth with apical periodontitis undergoing root canal treatment. *International Endodontic Journal*. v.37, n. 9, p. 579-587, 2004.
- CHEN, T.; YU, W.H.; IZARD, J.; BARANOVA, O.V.; LAKSHMANAN, A.;  
5 DEWHIRST, F.E. The human oral microbiome database: a web accessible resource for investigating oral microbe taxonomic and genomic information. *Database*. v.6 ,p.1-9 , 2010.
- CHENSUE, S.W.; WARMINGTON, K.S.; ALLENSPACH, E.J. Differential expression and crossregulatory function of RANTES during mycobacterial (type 1)  
10 and schistosomal (type 2) antigen-elicited granulomatous inflammation. *Journal of Immunology*. v. 163, p. 165-73, 1999.
- CHHOUR, K.L.; NADKARNI, M.A; BYUN, R.; MARTIN, F.E.; JACQUES, N.A.; HUNTER, N. Molecular analysis of microbial diversity in advanced caries. *Journal of Clinical Microbiology*. v.43, n.2, p.843-849, 2005.
- 15 CHUNDURI, N.S.; MADASU.; K.; GOTEKI, V.R.; KARPE, T. REDDY, H. Evaluation of bacterial spectrum of orofacial infections and their antibiotic susceptibility. *Annals of Maxillofacial Surgery Journal*. v. 2, n.1, p.46-50, 2012.
- CHUNG, H.Y.; SUNG, H.; LEE, M.Y.; YOON, N.S.; LEE, S.G.; SUH, D.J. et al.A case of bacteremia by *Atopobium rimae* in a patient with liver cirrhosis. *Journal of  
20 Laboratory Medicine*. V.27, n.5, p.351-354, 2007.
- CLAUDINO, M.; GARLET. T.P.; CARDOSO, C.R.; ASSIS, G.F.; TAGA, R.; CUNHA, F.Q.; *et al.* Down-regulation of expression of osteoblast and osteocyte markers in periodontal tissues associated with the spontaneous alveolar bone loss of interleukin-10 knockout mice. *European Journal of Oral Sciences*. v.118, p. 19-  
25 28, 2010.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Twenty-Third Informational Supplement , M100-S23,2013.
- COELHO, A.L.; DE FREITAS, M.S.; MARIANO-OLIVEIRA, A.; RAPOZO, D.C.;  
30 PINTO, L.F.; NIEWIAROWSKI, S.; *et al.* RGD- and MLD-disintegrins, jarastatin and EC3, activate integrin-mediated signaling modulating the human neutrophils

chemotaxis, apoptosis and IL-8 gene expression. *Experimental Cell Research*. v. 292, n. 2, p. 371-84, 2004.

5 COGULU, D.; UZEL, A.; ONCAG, O. ; ERONAT. C. PCR-based identification of selected pathogens associated with endodontic infections in deciduous and permanent teeth. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*. v.106, n. 3, p. 443-449, 2008.

COLIC, M.; GAZIVODA, D.; VUCEVIC, D.; VASILIJIC, S.; RUDOLF, R.; LUKIC, A. Proinflammatory and immunoregulatory mechanisms in periapical lesions. *Molecular Immunology*. v. 47, n. 1, p. 101-13, 2009.

10 COLIĆ, M.; LUKIĆ, A.; VUCEVIĆ, D.; MILOSAVLJEVIĆ, P.; MAJSTOROVIĆ, I.; MARJANOVIĆ, M.; DIMITRIJEVIĆ, J. Correlation between phenotypic characteristics of mononuclear cells isolated from human periapical lesions and their in vitro production of Th1 and Th2 cytokines. *Archives of Oral Biology*. v. 51, n. 12, p. 1120-30, 2006.

15 COLLINS, M.D.; WALLBANKS, S. Comparative sequence analyses of the 16S rRNA genes of *Lactobacillus minutus*, *Lactobacillus rima*e and *Streptococcus parvulus*: proposal for the creation of a new genus *Atopobium*. *FEMS Microbiology Letters*. v. 74, n. 2-3, p. 235-40, 1992.

20 DAHLEN, G.; LEONHARDT, A. A new checkerboard panel for testing bacterial markers in periodontal disease. *Oral Microbiology and Immunology*. v. 21, n. 1, p. 6-11, 2006.

DALE, B.A.; KRISANAPRAKORNKIT, S. Defensin antimicrobial peptides in the oral cavity. *Journal of Oral Pathology and Medicine*. v. 30, n. 6, p. 321-7, 2001.

25 DANIN, J.; LINDER, L.E.; LUNDQVIST, G.; ANDERSSON, L. Tumor necrosis factor-alpha and transforming growth factor-beta1 in chronic periapical lesions. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*. v. 90, n. 4, p. 514-417, 2000.

30 DARAMOLA, O.O.; FLANAGAN, C.E.; MAISEL, R..H.; ODLAND, R..M. Diagnosis and treatment of deep neck space abscesses. *Journal of Otolaryngology – Head and Neck Surgery*. v. 141, n. 1, p. 123-30, 2009.

DAVID, M.; LEMONICK, M.D. Ludwig's Angina: Diagnosis and Treatment. *Hospital Physician*. v.38, n. 7, p. 31-37, 2002.

- DE ROSSI, A.; ROCHA, L.B.; ROSSI, M.A. Interferon-gamma, interleukin-10, Intercellular adhesion molecule-1, and chemokine receptor 5, but not interleukin-4, attenuate the development of periapical lesions. *Journal of Endodontics*. v. 34, n. 1, p. 31-8, 2008.
- 5 DE SA, A.R.; PIMENTA, F.J.; DUTRA, W.O.; GOMEZ, R.S. Immunolocalization of interleukin-4,interleukin-6, and lymphotaxin alpha in dental granulomas. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*. v. 96, n. 3, p. 356-60, 2007.
- DE WAAL, R.M.; HAANEN, J.; SPITS, H.; RONCAROLO, M.G.; TE VELDE, A.;  
10 FIGDOR, C. *et al.* Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. *Journal of Experimental Medicine*. v. 174, n. 4, p. 915-924, 1991.
- DE OLIVEIRA, C.E.; ODA, J.M.; LOSI GUEMBAROVSKI, R.; DE OLIVEIRA, K.B.;  
15 ARIZA, C.B.; NETO, J.S.; BANIN HIRATA B.K.; WATANABE, M.A. CC chemokine receptor 5: the interface of host immunity and cancer. *Disease Markers*. 2014.
- DEN HARTOG, G.; VAN ALTENA, C.; SAVELKOUL, H.F.; VAN NEERVEN, R.J. The mucosal factors retinoic acid and TGF- $\beta$ 1 induce phenotypically and functionally distinct dendritic cell types. *International Archives of Allergy and*  
20 *Immunology*. v. 162, n. 3, p. 225-36, 2013.
- DEWHIRST, F.; PASTER, B.J.; DEWHIRST, F.; VAN DYKE, T.E.; HASTURK, H.; SOCRANSKY, S.S.; HAFFAJEE, A.D.; KENT, R.; GOODSON, J.M.; COTTON, S.L.; BOCHES, S.K.; COLOMBO, A.P. Comparisons of subgingival microbial profiles of refractory periodontitis, severe periodontitis, and  
25 periodontal health using the human oral microbe identification microarray. *Journal of Periodontology*. v.80, n. 9, p. 1421-32, 2009.
- DEWHIRST, F.E.; CHEN, T.; IZARD, J.; PASTER, B.J.; TANNER, A.C.R.; YU, W.; LAKSHMANAN, A.; WADE W.G. The Human Oral Microbiome: database: a web accessible resource for investigating oral microbe taxonomic and genomic  
30 information . *Journal of bacteriology*. v. 192, n. 19, p. 5002–5017, 2010.
- DIAZ, P.I.; CHALMERS, N.I.; RICKARD, A.H.; KONG, C.; MILBURN, C.L.; PALMER, R.J.; *et al* . Molecular characterization of subject-specific oral

- microflora during initial colonization of enamel. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 72, n. 4, p. 2837-48, 2006.
- DISTLER, O.; PAP, T.; KOWAL-BIELECKA, O.; MEYRINGER, R.; GUIDUCCI, S.; DIVEU, C.; MCGEACHY, M.J.; CUA, D.J. Cytokines that regulate autoimmunity. 5 *Curr Opin Immunol*, v.20, n.6, p.663-668, 2008.
- DJAIS, A.; NAKAZAWA, F.; SATO, M.; SATO, N.; SUNDQVIST, G.; HOSHINO, E. Asaccharolytic anaerobic gram-negative coccobacilli (AAGNC) isolated from infected root canals and periodontal pockets. *Oral Microbiology and Immunology*. v. 21, n.1, p.28-31, 2006.
- 10 DOAN, N.; CONTRERAS, A.; FLYNN, J.; SLOTS, J.; CHEN, C. Molecular identification of *Dialister pneumosintes* in subgingival plaque of humans. *Journal of Clinical Microbiology*. v.38, n.8, p. 3043-3047, 2000.
- DOMANN, E.; HONG, G.; IMIRZALIOGLU, C.; TURSCHNER, S.; KÜHLE, J.; WATZEL C.; *et al.* Culture-independent identification of pathogenic bacteria and polymicrobial infections in the genitourinary tract of renal transplant recipients. 15 *Journal of Clinical Microbiology*. v.41, n.12, p.5500-5510, 2003.
- DOWNES, J.; MUNSON, M.; WADE, W.G. *Dialister invisus* sp. nov., isolated from the human oral cavity. *Int J Syst Evol Microbiol*. v. 53, n. 6, p. 1937-40, 2003.
- DRESCHER, J.; SCHLAFER, S.; SCHAUDINN, C.; RIEP, B.; NEUMANN, K.; FRIEDMANN, A.; PETRICH, A.; GÖBEL, U.B.; MOTER, A. Molecular 20 epidemiology and spatial distribution of *Selenomonas* spp. in subgingival biofilms. *European Journal of Oral Science*. v. 118, n. 5, p. 466-74, 2010.
- DUTZAN, N.; GAMONAL, J.; SILVA, A.; SANZ, M.; VERNAL, R. Over-expression of forkhead box P3 and its association with receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand, interleukin (IL) -17, IL-10 and transforming growth factor-beta 25 during the progression of chronic periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*. v. 36, n. 5, p. 396-403, 2009.
- EICK, S.; PFISTER, W.; KORN-STEMME, S.U.; MÄGDEFESSEL-SCHMUTZER, U.; STRAUBE E. Erreger- und Resistenzspektrum bei intraoralen Infektionen des 30 Kiefer-Gesichts-Bereichs unter besonderer Berücksichtigung der anaeroben Keimflora Mund Kiefer. *GesichtsChir*. v.4, n.4 p. 234-239,1999.

- FACCIABENE, A.; MOTZ, G.T.; COUKOS, G. T-regulatory cells: key players in tumor immune escape and angiogenesis. *Cancer Research*. v. 72, n. 9, p. 2162-71, 2012.
- FADROSH, D.W.; MA, B.; GAJER, P.; SENGAMALAY, N.; OTT, S.; BROTMAN, R.M.; RAVEL, J. An improved dual-indexing approach for multiplexed 16S rRNA gene sequencing on the Illumina MiSeq platform. *Microbiome*. v. 2, n. 24, p. 2-7, 2014 .
- FARMAHAN, S.; TUOPAR, D.; AMEERALLY, P.J.; KOTTECHA, R.; SISODIA, B. Microbiological examination and antibiotic sensitivity of infections in the head and neck. Has anything changed? *British Journal of Oral Maxillofacial Surgery*. v. 52, n. 7, p. 632-5, 2014.
- FATING, N.S.; SAIKRISHNA, D.; VIJAY KUMAR, G.S.; SHETTY, S.K.; RAGHAVENDRA RAO, M. Detection of Bacterial Flora in Orofacial Space Infections and Their Antibiotic Sensitivity Profile. *Journal of Maxillofacial Oral Surgery*. v. 13, n. 4, p. 525-32, 2014.
- FAVERO, M.; RAFFEINER, B.; CECCHIN, D.; SCHIAVON, F. Septic arthritis caused by *Rothia dentocariosa* in a patient with rheumatoid arthritis receiving etanercept therapy. *Journal of Rheumatology*. v. 36, n. 12, p. 2846-7, 2009.
- FERRARI, G.; COOK, B.D.; TERUSHKIN, V.; PINTUCCI, G.; MIGNATTI, P. Transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta1) induces angiogenesis through vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated apoptosis. *Journal of Cellular Physiology*. v. 219, n. 2, p. 449-58, 2009.
- FERREIRA, S.B.; DE BRITO, L.C.; OLIVEIRA, M.P. Periapical cytokine expression in sickle cell disease. *Journal of Endodontics*. v. 41, p. 358-62, 2015.
- FIORENTINO, D. F.; ZLOTNIK, A.; MOSMANN, T.R, HOWARD, M.; O'GARRA, A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *Journal of Immunology*. v.147, n.11, p.3815-3822, 1991.
- FLYNN, T.R.; SHANTI, R.M.; HAYES, C. Severe odontogenic infections, part 2: prospective outcomes study. *Journal of Oral Maxillofacial Surgery*. v. 64, n. 7, p. 1104-13, 2006.

- FLYNN, T.R.; SHANTI, R.M.; LEVI, M.H, ADAMO, A.K.; KRAUT, R.A.; TRIEGER, N. Severe odontogenic infections, part 1: prospective report. *Journal of Oral Maxillofacial Surgery*. v.64, n.7, p. 1093-103, 2006.
- FRANCISCONI, C.F.; VIEIRA, A.E.; BIGUETTI, C.C.; GLOWACKI, A.J.;  
5 TROMBONE, A.P.; LETRA, A.; *et al.*,. Characterization of the Protective Role of Regulatory T Cells in Experimental Periapical Lesion Development and Their Chemoattraction Manipulation as a Therapeutic Tool. *Journal of Endodontics*. v. 42, n. 1, p.:120-6, 2016.
- FREDRICKS, D.N.; FIEDLER, T.L.; MARRAZZO, J.M. Molecular identification of  
10 bacteria associated with bacterial vaginosis. *New England Journal of Medicine*. v. 353, n.18, p. 1899-911, nov, 2005.
- FUKADA, S.Y.; SILVA, T.;A.; GARLET, G.P.; ROSA, A.L.; DA SILVA, J.S.; CUNHA, F,Q. Factors involved in the T helper type 1 and type 2 cell commitment and osteoclast regulation in inflammatory apical diseases. *Oral Microbiology and*  
15 *Immunology*. v. 24, n.1 , p.25-31, 2009.
- GAETTI-JARDIM, E.C.; MARQUETI, A.C.; FAVERANI, L.P.; GAETI-JARDIM JÚNIOR, E. Antimicrobial resistance of aerobes facultative anaerobes isolated from the oral cavity. *Journal of Applied Oral Science*. v. 18, n. 6, p. 551-9, 2010.
- GAFFEN, S.L.; HAJISHENGALLIS, G. A new inflammatory cytokine on the block:  
20 re-thinking periodontal disease and the Th1/Th2 paradigm in the context of Th17 cells and IL-17. *Journal of Dental Research*. v. 87, p.817-28, 2008.
- GARBER, K. Companies waver in efforts to target transforming growth factor beta in cancer. *Journal of National Cancer Institute*. v. 101, n. 24, p. 1664-7, 2009.
- GARCIA-ROCO PEREZ, O.; *et al.* Infección odontogénica grave: Posibles  
25 factores predictores. *Havana*. v.40, n.1, 2003.
- GARCIA-ROCO PEREZ, O.; *et al.* Infección odontogénica grave: Posibles factores predictores. *Cubana Estomato, Havana* v.40, n.1, 2003.
- GARLET, G.P.; CARDOSO, C.R.; MARIANO, F.S.; CLAUDINO, M.; DE ASSIS, G.F.; CAMPANELLI, A.P.; *et al.* Regulatory T cells attenuate experimental  
30 periodontitis progression in mice. *Journal of Clinical Periodontology*. v. 37, n. 7, p. 591-600, 2010.
- GAZIVODA, D.; DZOPALLIC, T.; BOZIC, B.; TATOMIROVIC, Z.; BRKIC, Z.; COLIC, M. Production of proinflammatory and immunoregulatory cytokines by

- inflammatory cells from periapical lesions in culture. *Journal of Oral Pathology and Medicine*. v 38, n.7, p.605-11, 2009.
- GEIGER, T.L.; TAURO, S. Nature and nurture in Foxp3(+) regulatory T cell development, stability, and function. *Human Immunology*. v. 73, n. 3, p. 232-9, 2012.
- GILMORE, W.C.; JACOBUS, N.V.; GORBACH, S.L.; DOKU, H.C.; TALLY, F.P. A prospective double-blind evaluation of penicillin versus clindamycin in the treatment of odontogenic infections. *Journal of Oral Maxillofacial Surgery*. v. 46, n. 12, p. 1065-70, 1988.
- GOLDSTEIN, E.J.; CITRON, D.M.; GOLDMAN, R.J.; CLAROS, M.C.; HUNT-GERRADO, S. United States National Hospital Survey of anaerobic culture and susceptibility methods, II. *Anaerobe*. v. 1, n. 6, p. 309-14, 1995.
- GOMES, B.P.; BERBER, V.B.; KOKARAS, A.S.; CHEN, T.; PASTER, B.J. Microbiomes of endodontic- Periodontal lesions before and after chemomechanical preparation. *Journal of Endodontics*. v.41, n. 12, p. 1975-84, 2015.
- GOMES, B.P.; JACINTO, R.C.; MONTAGNER, F.; SOUSA, E.L.; FERRAZ, C.C. Analysis of the antimicrobial susceptibility of anaerobic bacteria isolated from endodontic infections in Brazil during a period of nine years. *Journal of Endodontics*. v. 37, n. 8, p. 1058-62, 2011.
- GÓMEZ-ARÁMBULA, H.; HIDALGO-HURTADO, A.; RODRÍGUEZ-FLORES, R.; GONZÁLEZ-AMARO, A.M.; GARROCHO-RANGEL, A.; POZOS-GUILLÉN, A. Moxifloxacin versus Clindamycin/Ceftriaxone in the management of odontogenic maxillofacial infectious processes: A preliminary, intrahospital, controlled clinical trial. *Journal of Clinical Experimental Dentistry*. v. 7, n. 5, p. 634-9, 2015.
- GRAUNAITE, I.; LODIENE, G.; MACIULSKIENE, V. Pathogenesis of Apical Periodontitis: a Literature Review. *Journal of Oral and Maxillofacial Research*. v. 2, n. 4, p. e1, 2012.
- GRAVES, D. Cytokines that promote periodontal tissue destruction. *Journal of Periodontology*. v. 79, p. 1585-91, 2008.
- GRAVES, D.T.; OATES, T.; GARLET, G.P. Review of osteoimmunology and the host response in endodontic and periodontal lesions. *Journal of Oral Microbiology*. v. 17, n. 3, 2011.

- GREEN, A.W.; FLOWER, E.A.; NEW, N.E. Mortality associated with odontogenic infection! *British Dental Journal*. v.190, n.10, p.529-30, 2001.
- GROPPO, F.C.; CASTRO, F.M.; PACHECO, A.B.; MOTTA, R;H.; FILHO, T.R.; RAMACCIATO, J.C.; FLORIO, F.M.; MEECHAN, J.G. Antimicrobial resistance of  
5 Staphylococcus aureus and oral streptococci strains from high-risk endocarditis patients. *European Journal of General Dentistry*. v. 53, n. 6, p. 410-3, 2005.
- GUGLANI, L.; KHADER, S.A. Th17 cytokines in mucosal immunity and inflammation. *Current Opinion in HIV and AIDS*. v. 5, n .2, p. 120-127, 2010.
- HAHN, C.L.; LIEWEHR, F.R. Update on the adaptive immune responses of the  
10 dental pulp. *Journal of Endodontics*. v. 33, n. 7, p. 773-781, 2007.
- HAN, J. K.; KERSCHNER, J. E. Streptococcus milleri: an organism for head and neck infections and abscess. *Archives of Otolaryngology – Head and Neck Surgery*. v. 127, n. 6, p. 650–654, 2001.
- HECHT, D.W.; VEDANTAM, G.; OSMOLSKI, J.R. Antibiotic resistance among  
15 anaerobes: What does it mean? *Anaerobe*. v.5, n. 1, p. 421-9, 1999.
- HEIMDAHL, A.; VON KONOW, L.; SATOH, T.; NORD, C.E. Clinical appearance of orofacial infections of odontogenic origin in relation to microbiological findings. *Journal of Clinical Microbiology*. v. 22, n. 2, p. 299-302,1985.
- HENRIQUES, L.C.; DE BRITO, L.C.; TAVARES, W.L.; VIEIRA, L.Q.; RIBEIRO  
20 SOBRINHO, A.P.; Cytokine analysis in lesions refractory to endodontic treatment. *Journal of Endodontics*. v. 37, n. 12, p.1659-62, 2011.
- HIBBING, M.E.; FUQUA, C.; PARSEK, M.R.; PETERSON, S.B. Bacterial competition: Surviving and thriving in the microbial jungle. *Nature Reviews Microbiology*. v. 8, n. 1, p. 15–25, 2010.
- 25 HOLMES, W.E.; LEE, J.; KUANG, W.J.; RICE, G.C.; WOOD, W.I. Structure and functional expression of a human interleukin-8 receptor. *Science*. v. 253, n. 5025, p. 1278-80, 1991.
- HORIGUCHI, M.; OTA, M.; RIFKIN, D.B. Matrix control of transforming growth factor- $\beta$  function. *Journal of Biochemistry*. v. 152, n. 4, p. 321-9, 2012.
- 30 HUGENHOLTZ, P.; PITULLE, C.; HERSHBERGER, K.L.; PACE, N.R. Novel division level bacterial diversity in a Yellowstone hot spring. *Journal of Bacteriology*. v. 180, n. 2 , p. 366– 376, 1998.

- HUTTER, G.; SCHLAGENHAUF, U.; VALENZA, G.; HORN, M.; BURGEMEISTER, S.; CLAUS, H.; VOGEL, U. Molecular analysis of bacteria in periodontitis: evaluation of clone libraries, novel phylotypes and putative pathogens. *Microbiology*. v. 149, pt. 1, p. 67-75, 2003.
- 5 JACINTO, R.C.; GOMES, B.P.; DESAI, M.; RAJENDRAM, D.; SHAH, H.N. Bacterial examination of endodontic infections by clonal analysis in concert with denaturing high-performance liquid chromatography. *Oral Microbiology and Immunology*. v. 22, n. 6, p. 403-410, 2008.
- JACOBS, J.A.; STOBBERINGH, E.E. In vitro antimicrobial susceptibility of the  
10 "Streptococcus milleri" group (*Streptococcus anginosus*, *Streptococcus constellatus* and *Streptococcus intermedius*). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. v. 37, n. 2, p. 371–375, 1996.
- JALAVA, J.; EEROLA, E. Phylogenetic analysis of *Fusobacterium alocis* and *Fusobacterium sulci* based on 16S rRNA gene sequences: proposal of *Filifactor alocis* (Cato, Moore and Moore) comb. nov. and *Eubacterium sulci* (Cato, Moore and Moore). *International Journal of Systematic Bacteriology*. v. 49, n. 4, p. 1375-9. 1999.
- 15 JAPANESE ASSOCIATION FOR ANAEROBIC INFECTION RESEARCH. Chapter 3-4. Appendix: Antimicrobial agents indicated for anaerobes (listed by dosing route and chemical class). Japanese Society of Chemotherapy Committee on guidelines for treatment of anaerobic infections. *Journal of Infection Chemotherapy*. p. 165-75, 2011.
- 20 JENKS, P.J.; LABIGNE, A.; FERRERO, R.L. Exposure to metronidazole in vivo readily induces resistance in *Helicobacter pylori* and reduces the efficacy of eradication therapy in mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. v. 43, n. 4, p. 777-81, 1999.
- 25 JI, X.; PUSHALKAR, S.; LI, Y.; GLICKMAN, R.; FLEISHER, K.; SAXENA, D. Antibiotic effects on bacterial profile in osteonecrosis of the jaw. *Oral Diseases*. v. 18, n. 1, p. 85-95, 2012.
- 30 JIMÉNEZ, Y.; BAGÁN, J.V.; MURILLO, J.; POVEDA, R. Infecciones odontogénicas. Complicaciones. Manifestaciones sistémicas. *Medicina Oral Patología Oral e Cirugía Bucal*. v. 9, p.139-43, 2004.

- JOFFRE, O.; SANTOLARIA, T.; VAN MEERWIJK, J.P. Tregs-based immunotherapy: an efficient way to fully inhibit acute and chronic rejection. *International Journal of Medical Sciences (Paris)*. v. 24, n. 8-9, p. 689-91, 2008.
- JÜNEMANN, S.; PRIOR, K.; SZCZEPANOWSKI, R.; HARKS, I.; EHMKE, B.;  
5 GOESMANN, A.; STOYE, J.; HARMSSEN, D. Bacterial community shift in treated periodontitis patients revealed by ion torrent 16S rRNA gene amplicon sequencing. *Plos One*. v. 7, n. 8, p. e41606.
- KABASHIMA, H.; NAGATA, K.; MAEDA, K.; IJIMA, T. Presence of IFN-gamma and IL-4 in human periapical granulation tissues and regeneration tissues.  
10 *Cytokine*. v. 14, n. 5, p. 289-293, 2001.
- KAMINSKA, B.; KOCYK, M.; KIJEWSKA, M. TGF beta signaling and its role in glioma pathogenesis. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. p. 171-87, 2013.
- KANG, K.H.; IM, S.H. Differential regulation of the IL-10 gene in Th1 and Th2 T  
15 cells. *Annals of New York Academy of Science*. p. 97-107, 2005.
- KARLOWSKY, J.; FERGUSON, J.; ZHANEL, G. A review of commonly prescribed oral antibiotics in general dentistry. *Journal Canadian Dental Association*. v.59, n.3, p.292-318, 1993.
- KAWASHIMA, N.; OKIJI, KOSAKA, T.; SUDA, H. Kinetics of macrophages and  
20 lymphoid cells during the development of experimentally induced periapical lesions in rat molars: a quantitative immunohistochemical study. *Journal of Endodontics*. v. 22, n. 6 , p. 311-6, 1996.
- KAWASHIMA, N.; STASHENKO, P. Expression of bone-resorptive and regulatory cytokines in murine periapical inflammation. *Archives of Oral Biology*. v.44, n.1 ,  
25 p.55-66, 1999.
- KAWASHIMA, N.; SUZUKI, N.; OHI, C.; OKUHARA, S.; NAKANO-KAWANISHI, H.; SUDA, H. Kinetics of RANKL, RANK and OPG expressions in experimentally induced rat periapical lesions. *Oral Surgery, Oral Medice, Oral Pathology and Oral Radiology*. v.103, n.5, p.707-11, 2007.
- 30 KAZOR, C.E.; MITCHELL, P.M.; LEE, A.M.; STOKES, L.N.; LOESCHE, W.J.; DEWHIRST, F.E.; *et al.* Diversity of bacterial populations on the tongue dorsa of patients with halitosis and healthy patients. *Journal of Clinical Microbiology*. v. 41, n.2, p. 558-563, 2003.

- KHALAF, H.; LÖNN, J.; BENGTSSON, T. Cytokines and chemokines are differentially expressed in patients with periodontitis: possible role for TGF- $\beta$ 1 as a marker for disease progression. *Cytokine* . v. 67, p. 29-35, 2014.
- 5 KHEMALEELAKUL, S.; BAUMGARTNER, J.C.; PRUKSAKORN, S. Identification of bacteria in acute endodontic infections and their antimicrobial susceptibility. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*. v. 94, n. 6, p. 746-55, 2002.
- 10 KHEMALEELAKUL, S.; BAUMGARTNER, J.C.; PRUKSAKORN, S. Identification of bacteria in acute endodontic infections and their antimicrobial susceptibility. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*. v. 94, n. 6, p. 746-55, 2002.
- KIRKWOOD, K.L. Update on antibiotics used to treat orofacial infections. *Alpha Omegan*. v. 3, p. 28-34 , 2003.
- 15 KOETH, L.M.; GOOD, C.E.; APPELBAUM, P.C.; GOLDSTEIN. E.J.; RODLOFF, A.C.; CLAROS DUBREUIL, L.J. Surveillance of susceptibility patterns in 1297 European and US anaerobic and capnophilic isolates to co-amoxiclav and five other antimicrobial agents. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. v. 53, n. 6 , p. 1039-1044, 2004.
- 20 KOZICH, J.J.; WESTCOTT, S.L.; BAXTER, N.T.; HIGHLANDER, S.K.; SCHLOSS, P.D. Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing platform. *Applied and Environmental Microbiology*. v.79, n.5 , p. 5112-30, 2013.
- 25 KRAFT, R.; HERNDON, D.N.; FINNERTY, C.C. Predictive value of IL-8 for sepsis and severe infections after burn injury - aclinical study. *Shock*. v. 43, p. 222-7, 2015.
- KUMAR, P.S.; GRIFFEN, A.L.; BARTON, J.A.; PASTER, B.J.; MOESCHBERGER, M.L.; LEYS, E.J. New bacterial species associated with chronic periodontitis. *Journal of Dental Research*. v.82, n.5, p. 338-344, 2003.
- 30 KUMAR, P.S.; GRIFFEN, A.L.; MOESCHBERGER, M.L.; LEYS, E.J. Identification of candidate periodontal pathogens and beneficial species by quantitative 16S clonal analysis. *Journal of Clinical Microbiology* . v.43, n.8, p. 3944-3955, 2005.

- KUMAR, P.S.; LEYS, E.J.; BRYK. J.M.; MARTINEZ, F.J.; MOESCHBERGER, M.L.; GRIFFEN, A.L. Changes in periodontal health status are associated with bacterial community shifts as assessed by quantitative 16S cloning and sequencing. *Journal of Clinical Microbiology*. v. 44, n. 10, p. 3665-3673, 2006.
- 5 KUNKEL, M.; MORBACH, T.; KLEIS, W.; WAGNER, W. Third molar complications requiring hospitalization. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*. v.102, n.3, p. 300-6, 2006.
- KURAMITSU, H.K.; HE, X.; LUX, R.; ANDERSON, M.H.; SHI, W. Interspecies interactions within oral microbial communities. *Microbiology and Molecular Biology*
- 10 *Reviews*. v. 71, n. 4, p. 653-670, 2007.
- KURIYAMA, T.; KARASAWA, T.; NAKAGAWA, K.; SAIKI, Y.; YAMAMOTO, E.; NAKAMURA, S. Bacteriologic features and antimicrobial susceptibility in isolates from orofacial odontogenic infections. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*. v. 90, n. 5, p. 600-8, 2000.
- 15 KURIYAMA, T.; KARASAWA, T.; NAKAGAWA, K.; YAMAMOTO, E.; NAKAMURA S. Bacteriology and antimicrobial susceptibility of gram-positive cocci isolated from pus specimens of orofacial odontogenic infections. *Oral Microbiology and Immunology*. v. 17, n.2, p. 132-5, 2002.
- KURIYAMA, T.; WILLIAMS, D.W.; YANAGISAWA, M.; IWAHARA, K.; SHIMIZU,
- 20 C.; NAKAGAWA, K.; YAMAMOTO, E.; KARASAWA, T. Antimicrobial susceptibility of 800 anaerobic isolates from patients with dentoalveolar infection to 13 oral antibiotics. *Oral Microbiology and Immunology*. v. 22, n. 4, p. 285-8, 2007.
- LANDTHALER, M.; *et al.* Overexpression of monocyte chemoattractant protein 1 in systemic sclerosis: role of platelet-derived growth factor and effects on
- 25 monocyte chemotaxis and collagen synthesis. *Arthritis and Rheumatology*. v. 44, p. 2665-78, 2001.
- LANG, N.P.; TONETTI, M.S.; SUTER, J.; SORRELL, J, DUFF, G.W; KORNMAN K.S. Effect of interleukin-1gene polymorphisms on gingival inflammation assessed by bleeding on probing in a periodontal maintenance population. *Journal of*
- 30 *Periodontal Research*. v. 35, n. 2, p. 102-7, 2000.
- LARAWIN, V.; NAIPAO, J.; DUBEY, S.P. Head and neck space infections. *Otolaryngology - Head and Neck Surgery*. v. 135, n. 6, p. 889-93, 2006.

- LE GROS, G.; BEN-SASSON, S.Z.; SEDER, R.; FINKELMAN, F.D.; PAUL, W.E. Generation of interleukin 4 (IL-4)-producing cells in vivo and in vitro: IL-2 and IL-4 are required for in vitro generation of IL-4-producing cells. *Journal of Immunology*. v. 181, n. 5, p. 2943-51.
- 5 LEE, Y.; PARK, Y.; KIM, M.S.; YONG, D.; JEONG, S.H.; LEE, K.; CHARDIN, H.; *et al* Reduced susceptibility to amoxicillin of oral streptococci following amoxicillin exposure. *Journal of Medical Microbiology*. v. 58, n. 8, p.1092-7, 2010.
- LEWIS, M.A.; MACFARLANE, T.W.; MCGOWAN, D.A. A microbiological and clinical review of the acute dentoalveolar abscess. *British Journal Maxillofacial*
- 10 *Surgery*. v. 28, n.6, p.359-66, 1990.
- LEWIS, M.A.; PARKHURST, C.L.; DOUGLAS, C.W.; MARTIN, M.V.; ABSI, E.G.; BISHOP, P.A.; JONES, S.A. Prevalence of penicillin resistant bacteria in acute suppurative oral infection. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. v. 35, n. 6, p. 785-91, 1995.
- 15 LI, Y.; HE, J.; HE, Z.; ZHOU, Y.; YUAN, M.; XU, X.; *et al*. Phylogenetic and functional gene structure shifts of the oral microbiomes in periodontitis patients. *ISME Journal*. v. 8, n. 9, p. 1879-91, 2014.
- LIMERES, J.; TOMÁS, I.; ALVAREZ, M.; DIZ, P. Empirical antimicrobial therapy for odontogenic infections. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral*
- 20 *Radiology*. v. 100, n.3, p. 263-4, 2005.
- LIMIA, A.; JIMÉNEZ, M.L.; ALARCÓ, N.T.; LÓPEZ-BREA, M. Five year analysis of antimicrobial susceptibility of the *Streptococcus milleri* group. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. v. 18, n.6, p. 440–444, 1999.
- LÖFMARK, S.; EDLUND, C.; NORD, C.E. Metronidazole is still the drug of choice
- 25 for treatment of anaerobic infections. *Clinical Infectious Diseases*. v.1, p. 16-23, 2010.
- LÓPEZ-PÍRIZ, R.; AGUILAR, L.; GIMÉNEZ, M.J. Management of odontogenic infection of pulpal and periodontal origin. *Medina Oral, Patología Oral e Cirurgia Bucal*. v. 12, n. 2, p. 154-9, 2007.
- 30 LUBBE, M.M.; STANLEY, K.; CHALKLEY, L.J. Prevalence of *nim* genes in anaerobic/facultative anaerobic bacteria isolated in South Africa. *FEMS Microbiology Letters*. v. 172, n. 1, p. 79-83, 1999.

- LUKIĆ, A.; VOJVODIC, D.; MAJSTOROVIĆ, I.; COLIĆ, M. Production of interleukin-8 in vitro by mononuclear cells isolated from human periapical lesions. *Oral Microbiology and Immunology*. v. 21, n. 5, p. 96-300, 2006.
- 5 IZAKHAROVA, M.; ZIEGLER, H.K. Paradoxical anti-inflammatory actions of TNF-alpha: inhibition of IL-12 and IL-23 via TNF receptor 1 in macrophages and dendritic cells. *Journal of Immunology*. v. 175, n. 8, p. 5024-33, 2005.
- MACHADO-DE-OLIVEIRA, J.C.; GAMA, T.G.; SIQUEIRA, J.F.Jr.; RÔÇAS, I.N.; PEIXOTO, R.S.; ROSADO, A.S. On the use of denaturing gradient gel electrophoresis approach for bacterial identification in endodontic infections.
- 10 *Clinical Oral Investigations*. v. 11, n. 2, p. 127-32, 2007.
- MACIEL, K.F.; NEVES DE BRITO, L.C.; TAVARES, W.L.; MOREIRA, G.; NICOLI, J.R.; VIEIRA, L.Q.; *et al.* Cytokine expression in response to root canal infection in gnotobiotic mice. *International Endodontic Journal*. v. 45, n.4, p.354-62, 2012.
- MAESTRE, JR. Infecciones bacterianas mixtas de la cavidad oral. *Enfermedades*
- 15 *Infeciosas y Microbiología Clínica*. v. 20, n.2, p. 98-101, 2002.
- MAESTRE-VERA, JR Treatment options in odontogenic infection. *Medicina Oral Patología Oral e Cirurgia Bucal*. v. 9, p 19-31, 2004.
- MANOLAGAS, S.C. Role of cytokines in bone resorption. *Bone Journal*. p. 63-67, 1995.
- 20 MARÇAL, J.R.; SAMUEL, R.O.; FERNANDES, D.; DE ARAUJO, M.S.; NAPIMOGA, M.H.; PEREIRA, S.A.; *et al.* T-helper cell type 17/regulatory t-cellimmunoregulatory balance in human radicular cysts and periapical granulomas. *Journal of Endodontics*. v. 36, n. 6, p. 995-9, 2010.
- MARDIS, E.R. Next-generation sequencing platforms. *Annual Review of Analytical*
- 25 *Chemistry (Palo Alto Calif)*. v.6, p. 287-30, 2013.
- MARDIS, E.R. Next-generation DNA sequencing methods. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*. v. 9, p. 387- 402, 2008.
- MARSH, P.; MARTIN, M. *Microbiologia Oral*. 4rd . Ed. Santos, 2005.
- MARTINEZ, Z.R.; NARUISHI, K.; YAMASHIRO, K.; MYOKAI, F.; YAMADA, T.;
- 30 MATSUURA, K.; *et al.* Gene profiles during root canal treatment in experimental rat periapical lesions. *Journal of Endodontics*. v. 33, n.8 , p. 936-43, 2007.

- MARTON, I.J.; ROT, A.; SCHWARZINGER, E.; SZAKÁLL, S.; RADICS, T.; VÁLYI-NAGY, I.; KISS, C. Differential in situ distribution of interleukin-8, monocyte chemoattractant protein-1 and Rantes in human chronic periapical granuloma. *Oral Microbiology and Immunology*. v. 15, n. 1, p. 63-5, 2000.
- 5 MATARAZZO, F.; FIGUEIREDO, L.C.; CRUZ, S.E.; FAVERI, M.; FERES, M. Clinical and microbiological benefits of systemic metronidazole and amoxicillin in the treatment of smokers with chronic periodontitis: a randomized placebocontrolled study. *Journal of Clinical Periodontology*. v. 35,n. 10, p. 885–96, 2008.
- 10 MATHUR, V.B.S.; MICHALOWIC, Z. Cell-mediated immune system regulation in periodontal diseases. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine* . v. 8, n. 1, p. 76-89, 1997.
- MCGEACHY, M.J.; CUA, D.J. Th17 cell differentiation: the long and winding road. *Immunity*. v. 28, n. 4, p. 445-53, 2008.
- 15 MEDZHITOV, R.; JANEWAY, C.A.. “How does the immune system distinguish self from nonself?”. *Seminars in Immunology* . v.12, n.3, p. 185-8, 2000.
- MODLIN, R.L. Th1-Th2 paradigm: insights from leprosy. *Journal of Investigative Dermatology*. v.102, n. 6, p. 828-32, 1994.
- MOORE, K.W.; O’GARRA, A.; DE WAAL, M.R.; VIEIRA, P.; MOSMANN, T.R.
- 20 Interleukin-10. *Annual Review of Immunology*. v. 11, n. 2, p. 165-190, 1993.
- MOREY-MAS, M.; CAUBET-BIAYNA, J.; IRIARTE-ORTABE, J.I. Mediastinitis as a rare complication of an odontogenic infection. Report of a case. *Acta Stomatologica Belgica Journal*. v.93, n.3, p.125-8, 1996.
- MOSER, M.; MURPHY, K.M. Dendritic cell regulation of TH1-TH2 development.
- 25 *Nature Reviews of Immunology*. v. 1, n. 3, p. 199-205, 2000.
- MOSMANN, T.R. Properties and functions of Interleukin-10. *Advances in Immunology*. v. 56, p. 1-26, 1994.
- MOSMANN, T.R.; SAD, S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today*. v. 17, p. 138-46,1996.
- 30 MOSMANN, T.R.; COFFMAN, R.L. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annual Review of Immunology*. v. 7, p. 145-73, 1989.

- MUNSON, M.A.; PITT-FORD, T.; CHONG, B.; WEIGHTMAN, A.; WADE, W.G. Molecular and cultural analysis of the microflora associated with endodontic infections. *Journal of Dental Research*. v.81, n.1, p. 761-766, 2002.
- MURAD, C.F.; SASSONE, L.M.; FAVERI, M.; HIRATA, R.JR.; FIGUEIREDO, L.; FERES, M. Microbial diversity in persistent root canal infections investigated by checkerboard DNA-DNA hybridization. *Journal of Endodontics*. v. 40, n. 7, p. 899-906, 2014.
- NAKAE, S.; IWAKURA, Y.; SUTO, H.; GALLI, S.J.; Phenotypic differences between Th1 and Th17 cells and negative regulation of Th1 cell differentiation by IL-17. *Journal of Leukocyte Biology*. v. 81, n. 5, p. 1258-68, 2007.
- OKAMOTO, K.; TAKAYANAGI, H. Osteoclasts in arthritis and Th17 cell development. *International Immunopharmacology*. v. 11, n. 5, p. 543-8, 2011.
- PAPAGEORGIS, P. TGF $\beta$  Signaling in Tumor Initiation, Epithelial-to-Mesenchymal Transition, and Metastasis. *Journal of Oncology*. 2015.
- PAPAPARASKEVAS, J.; PANTAZATOU, A.; KATSANDRI, A.; HOUHOULA, D.P.; LEGAKIS, N.J.; TSAKRIS, A.; AVLAMIS, A. Moxifloxacin resistance is prevalent among Bacteroides and Prevotella species in Greece. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. v. 62, n.1, p. 137-41, 2008.
- PARKER, M. I.; KHATEERY, S.M. Retrospective analysis of orofacial infections requiring hospitalization in Al Madinah, Saudi Arabia. *Saudi Dental Journal*. v.13, n.2, p.96-100, 2001.
- PASTER, B.J.; FALKLER, J.R.; WA, J.R; ENWONWU, C.O.; IDIGBE, E.O.; SAVAGE, K.O.; LEVANOS, V.A.; TAMER, M.A.; ERICSON, R.L.; LAU, C.N. DEWHIRST, F.E. Prevalent bacterial species and novel phylotypes in advanced noma lesions. *Journal of Clinical Microbiology*. v. 40, n. 6, p. 2187-91, 2002.
- PASTER, B.J; DEWHIRST, F.E. Molecular microbial diagnosis. *Periodontology 2000*. v. 51 n.1, p. 38-44, 2009.
- PATEL, T.; PARK, S.H.; LIN LMET, A.L. Substance P induces interleukin-8 secretion from human dental pulp cells. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*. v. 96, p. 478-85, 2003.
- PAUL, W.E.; SEDER, R.A. Lymphocyte responses and cytokines. *Cell*. v. 76, n. 2, p. 241-51, 1994.

- PESTKA, S.; KRAUSE, C.D.; SARKAR, D.; WALTER, M.R.; SHI, Y.; FISHER, P.B. Interleukin-10 and related cytokines and receptors. *Annual Review of Immunology*. v. 22, p. 929-79, 2004.
- PETERS, B.M.; JABRA-RIZK, M.A.; O'MAY, G.A.; COSTERTON, J.W.;  
5 SHIRTLIFF, M.E. Polymicrobial interactions: Impact on pathogenesis and human disease. *Clinical Microbiology Reviews*. v. 25, n. 1, p. 193–213, 2012.
- PETERS, E.S.; FONG, B.; WORMUTH, D.W.; SONIS S.T. Risk factors affecting hospital length of stay in patients with odontogenic maxillofacial infections. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. v.54, n.12, p. 1386-91,1996.
- 10 PETERSON, L.J. Contemporary management of deep infections of the neck. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. v.51, n.3, p. 226-31,1993.
- PETROSINO, J.F.; HIGHLANDER, S.; LUNA, R.A.; GIBBS, R.A.; VERSALOVIC, J. Metagenomic pyrosequencing and microbial identification. *Clinical Chemistry*. v.55, n. 3, p.856-66, 2009.
- 15 PFEFFER, K. Biological functions of tumor necrosis factor cytokines and their receptors. *Cytokine Growth Factor Review*. v 14, n. 3-4, p. 185-91, 2003.
- PINTO, M. A. Avaliação do perfil de suscetibilidade a antimicrobianos macrolídeos de amostras de streptococcus do grupo viridans isolados de pacientes com infecção odontogênica grave e internados em hospital municipal de Belo  
20 Horizonte. 2015. 39f. Monografia (Especialização em Cirurgia e Traumatologia Buco Maxilo Facial)- Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2015.
- POESCHL, P.W.; CREPAZ, V.; RUSSMUELLER, G.; SEEMANN, R.; HIRSCHL A.M.; EWERS, R. Endodontic Pathogens Causing Deep Neck Space Infections: Clinical Impact of Different Sampling Techniques and Antibiotic Susceptibility.  
25 *Journal of Endodontics*. v. 37, n. 9, p. 1201-05, 2011.
- POESCHL, P.W.; SPUSTA, L.; RUSSMUELLER, G.; SEEMANN, R.; HIRSCHL, A.; POESCHL, E.; *et al.* Antibiotic susceptibility and resistance of the odontogenic microbiological spectrum and its clinical impact on severe deep space head and  
30 neck infections. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*. v. 110, n.2, p. 151-6, 2010.

- PRADEEP, A.R.; ROOPA, Y.; SWATI, P.P. Interleukin-4, a T-helper 2 cell cytokine, is associated with the remission of periodontal disease. *Journal of Periodontal*. v. 43, p. 712-6, 2008.
- 5 PRSO, I.B.; KOCJAN, W.; SIMIĆ, H.; BRUMINI, G.; PEZELJ-RIBARIĆ, S.; BORCIĆ, J.; FERRERI, S.; KARLOVIĆ, I.M. Tumor necrosis factor-alpha and interleukin 6 in human periapical lesions. *Mediators of Inflammation*. v. 27, p. 1-4, 2007.
- 10 QUEIROZ-JUNIOR, C.M.; SILVA, M.J.; CORRÊA, J.D.; MADEIRA, M.F.; GARLET T.P.; GARLET, G.P.; *et al.* A controversial role for IL-12 in immune response and bone resorption at apical periodontal sites. *Clinical and Developmental Immunology*. 2010.
- RAKESH, K.; AGRAWAL, D.K. Controlling cytokine signaling by constitutive inhibitors. *Biochemical Pharmacology*. v.70, n .5, p. 649-57, 2005.
- 15 REGA, A.J.; AZIZ, S.R.; ZICCARDI, V.B. Microbiology and antibiotic sensitivities of head and neck space infections of odontogenic origin. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. v. 64, n. 9, p. 1377-80, 2006.
- RIBEIRO SOBRINHO, A.P.; DE MELO MALTOS, S.M.; FARIAS, L.M.; DE CARVALHO, M.A.; NICOLI JR, DE UZEDA, M.; *et al.* Cytokine production in response to endodontic infection in germ-free mice. *Oral Microbiology and*
- 20 *Immunology*. v.17, n.6, p. 344-53, 2002.
- RIGGIO, M.P.; AGA; H.; MURRAY, C.A.; JACKSON, M.S.; LENNON, A.; HAMMERSLEY, N.; *et al.* Identification of bacteria associated with spreading odontogenic infections by 16S rRNA gene sequencing. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*. v. 103, n. 5, p. 610-7, 2007.
- 25 ROBERTSON, D.; SMITH, A.J. The microbiology of the acute dental abscess. *Journal of Medical Microbiology*. v.58, n.2, p.155-162, 2009.
- ROCHE, Y.; YOSHIMORI, R.N. In-vitro activity of spiramycin and metronidazole alone or in combination against clinical isolates from odontogenic abscesses. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. v.40, n.3, p.353-7, 1997.
- 30 ROSSI, D.; ZLOTNIK, A. The biology of chemokines and their receptors. *Annual Review of Immunology*. v. 18, p. 217-42, 2000.

- ROUSÉE, J.M.; BERMOND, D. ; PIÉMONT, Y. ; TOURNOUD, C. ; HELLER, R. ; KEHRLI, P. ; *et al.* Dialister pneumosintes associated with human brain abscesses. *Journal of Clinical Microbiology*. v. 40, n. 10, p. 3871-3873, 2002.
- RUOFF, K.L. Miscellaneous catalase-negative, gram-positive cocci: emerging  
5 opportunists. *Journal of Clinical Microbiology*. v. 40, n. 4, p.1129-33, 2002.
- SADHU, A.; LOEWENSTEIN, R.; KLOTZ, S.A. Rothia dentocariosa endocarditis complicated by multiple cerebellar hemorrhages. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. v. 53, n. 3, p.239-40, 2005.
- SAFAVI, K.E.; ROSSOMANDO, E.R. Tumor necrosis factor identified in periapical  
10 tissue exudates of teeth with apical periodontitis. *Journal of Endodontics* . v. 17, n. 1, p. 12-4, 1991.
- SAHINGUR, S.E.; YEUDALL, W.A. Chemokine function in periodontal disease and oral cavity cancer. *Frontiers in Immunology*. N. 5, n.6, p.1-15, 2015.
- SAINI, C.; RAMESH, V.; NATH, I. Increase in TGF- $\beta$  secreting CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>  
15 FOXP3<sup>+</sup> T regulatory cells in anergic lepomatous leprosy patients. *Plos*. 2014 .
- SAITO, D.R.; DE TOLEDO LEONARDO, J.L.M.; RODRIGUES, S. M.; TSAI, J. F. Identification of bacteria in endodontic infections by sequence analysis of 16S rDNA clone libraries. *Journal of Medical Microbiology*. v. 55, n. 1, p.101–107, 2006.
- 20 SAKAGUCHI, S. Regulatory T cells: history and perspective. *Methods in Molecular Biology*. 2011.
- SAKAMOTO, M.; I. N. RÔÇAS J. F.; SIQUEIRA, JR.; BENNO Y. Molecular analysis of bacteria in asymptomatic and symptomatic endodontic infections. *Oral Microbiology and Immunology*. v. 21, n.2, p. 112–122, 2006.
- 25 SAKAMOTO, M.; SIQUEIRA, J.F. JR.; RÔÇAS, I.N.; BENNO, Y. Molecular analysis of the root canal microbiota associated with endodontic treatment failures. *Oral Microbiology and Immunology*. v. 23, n. 4, p. 275-81, 2008.
- SANDS, T.; PYNN, B.R.; KATSIKERIS, N. Odontogenic infections: microbiology, 10 antibiotics, and management. *Oral Health*. v.85, n.6, p.11-28. 1995.
- 30 SASAKI, H.; HOU, L.; BELANI, A.; WANG, C.Y.; UCHIYAMA, T.; MÜLLER, R.; *et al.* IL-10 but not IL-4, supresses infection-stimulated bone resorption in vivo. *The Journal of Immunology*. v.165, n. 7, p. 3626-30, 2000.

- SASSONE, L.M.; FIDEL, R.A.; FAVERI, M.; GUERRA, R.; FIGUEIREDO, L.; FIDEL, S.R.; FERES, M. A microbiological profile of symptomatic teeth with primary endodontic infections. *Journal of Endodontics*. v. 34, n.4, p. 541-5, 2008.
- SATO, T.; YAMAKI, K.; ISHIDA, N.; SHOJI, M.; SATO, E.; ABIKO, Y.; HASHIMOTO, K.; TAKEUCHI, Y.; MATSUYAMA, J.; SHIMAUCHI, H.; TAKAHASHI, N. Rapid quantification of bacteria in infected root canals using fluorescence reagents and a membrane filter: a pilot study on its clinical application to the evaluation of the outcomes of endodontic treatment. *International Journal of Dentistry*. 2012.
- 10 SCHEFE, J.H.; LEHMANN, K.E.; BUSCHMANN, I.R.; UNGER, T.; FUNKE-KAISER, H. Quantitative realtime RT-PCR data analysis: current concepts and the novel “gene expression’s CT difference” formula. *Journal of Molecular Medicine*. v. 84, n.2, p. 901-10, 2006.
- SCHLAFER, S.; RIEP, B.; GRIFFEN, A.L.; PETRICH, A.; HÜBNER, J.; BERNING, M.; *et al.* Filifactor alocis--involvement in periodontal biofilms. *BMC Microbiology*. v.1, n.10, p. 66, 2010.
- SCHLOSS, P.D.; GEVERS, D.; WESTCOTT, S.L. Reducing the effects of PCR amplification and sequencing artifacts on 16S rRNA-based studies. *Plos One*. v. 6, 2011.
- 20 SCHMIDT-WEBER, C.B.; AKDIS, M.; AKDIS, C.A. TH17 cells in the big picture of immunology. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. v. 120, n. 2, p. 247-54, 2007.
- SCHUMAN, N.J.; TURNER, J.E. The clinical significance of beta hemolytic streptococci of the milleri group in oral abscesses. *Journal of Clinical Pediatric Dentistry*. v. 23, n. 2, p. 137–142, 1999.
- 25 SEITZ, M.; DEWALD, B.; GERBER, N.; BAGGIOLINI, M. Enhanced production of neutrophil-activating peptide-1/interleukin-8 in rheumatoid arthritis. *Journal of Clinical Investigation*. v. 87, n. 2, p. 463, 1991.
- SENNE, L.U.; IMAMURA, R.; ANGÉLICO-JÚNIOR, F.V.; SIMOCELI, L.; TSUJI, D.H. Infecções dos espaços cervicais: estudo prospectivo de 57 casos. *Revista Brasileira de Otorrinolaringologia*. v.68, n.3, p.388-393. 2002.
- 30

- SEPPÄNEN, L.; RAUTEMAA, R.; LINDQVIST, C.; LAUHIO, A. Changing clinical features of odontogenic maxillofacial infections. *Clinical Oral Investigations*. v.14, n.4, p. 459-65, 2010.
- 5 SETTE-DIAS, A. C. Epidemiologia e perfil microbiológico das infecções odontogênicas de pacientes internados em um hospital público de Belo horizonte. 2010. 83f. Dissertação (Mestrado em Estomatologia)- Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.
- 10 SETTE-DIAS, AC.; MALDONADO, A.J.; AGUIAR, E.G.; CARVALHO, M.A.; MAGALHAES, P.P.; FARIAS, L.M.; ABDO, E.N. Profile of patients hospitalized with odontogenic infections in a public hospital in Belo Horizonte, Brazil. *Journal of Clinical and Experimental Dentistry* . v. 4, p. 271-274, 2012.
- SEYMOUR, G.J.; TAYLOR, J.J. Shouts and whispers: an introduction to immune regulation in periodontal disease. *Periodontology 2000*. v. 35, p. 9-13, 2004.
- 15 SHAKOOR, S.; FASIH, N.; JABEEN, K.; JAMIL, B. Rothia dentocariosa endocarditis with mitral valve prolapse: case report and brief review. *Infection*. v. 39, n.2, p. 177-9, 2011.
- SHEVACH, E.M.; DIPAOLO, R.A.; ANDERSSON, J.; ZHAO, D.M.; STEPHENS, G.L.; THORNTON, A.M. The lifestyle of naturally occurring CD4+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells. *Immunological Reviews*. p. 60-73, 2006 .
- 20 SHI, S.; WU, X.; WANG, X.; HAO, W.; MIAO, H.; ZHEN, L.; NIE, S. Differentiation of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells to Cardiomyocyte-Like Cells Is Regulated by the Combined Low Dose Treatment of Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 and 5-Azacytidine. *Stem Cells International*. 2016.
- 25 SILVA, M.J.B.; VIEIRA, L.Q.; RIBEIRO SOBRINHO, A.P. The effects of mineral trioxide aggregates on cytokine production by mouse pulp tissue. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics*. v. 105, n. 5, p. 70-6, 2008.
- SILVA, T.A.; GARLET, G.P.; FUKADA, S.Y. Chemokines in oral inflammatory diseases:apical periodontitis and periodontal disease. *Journal of Dental Research*. v. 86, p, 306-19, 2007.
- 30 SILVA, T.A.; GARLET, G.P.; LARA, V.S.; MARTINS, W. Jr.; SILVA, J.S.; CUNHA. F.Q. Differential expression of chemokines and chemokine receptors in

inflammatory periapical diseases. *Oral Microbiology and Immunology*. v. 20, n.5 , p. 310-6, 2005.

SIQUEIRA, J.F. Jr.; RÔÇAS, I.N. Culture-independent detection of *Eikenella corrodens* and *Veillonella parvula* in primary endodontic infections. *Journal of Endodontics*. v. 3, n. 6, p. 509-12, 2006.

SIQUEIRA, J.F. Jr.; RÔÇAS, I.N. Dialister pneumosintes can be a suspected endodontic pathogen. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*. v. 94, n. 4, p. 494-498, 2002.

SIQUEIRA, J.F. Jr.; RÔÇAS, I.N. Polymerase chain reaction detection of Propionibacterium propionicus and Actinomyces radicidentis in primary and persistent endodontic infections. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*. 96, n. 2, p. 215-22, 2003.

SIQUEIRA, J.F. Jr.; RÔÇAS, I.N. The microbiota of acute apical abscesses. *Journal of Dental Research*. v. 88, n.1 p. 61-65, 2009.

SIQUEIRA, J.F. Jr.; RÔÇAS, I.N. Uncultivated phylotypes and newly named species associated with primary and persistent endodontic infections. *Journal of Clinical Microbiology*. v. 43, n. 7, p. 3314-3319, 2005.

SIQUEIRA, J.F.; RÔÇAS, I.N. Community as the unit of pathogenicity: an emerging concept as to the microbial pathogenesis of apical periodontitis. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*. v. 107, n. 6, p. 870–878, 2009.

SKUCAITE, N.; PECIULIENE, V.; VITKAUSKIENE, A.; MACHIULSKIENE, V. Susceptibility of endodontic pathogens to antibiotics in patients with symptomatic apical periodontitis. *Journal of Endodontics*. v. 36, n.10, p. 1611-6, 2010.

SOBOTTKA, I.; CACHOVAN, G.; STURENBURG, E.; AHLERS, MO.; LAUFS, R.; PLATZER, U.; MACK, D. In vitro activity of moxifloxacin against bacteria isolated from odontogenic abscesses. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. v.46, n.12, p. 4019-21, 2002.

- SORIA, G.; BEN-BARUCH, A. The inflammatory chemokines CCL2 and CCL5 in breast cancer. *Cancer Letters*. v. 267, n. 2, p. 271–285, 2008.
- SOUSA, E.L.; FERRAZ, C.C.; GOMES, B.P.; PINHEIRO, E.T.; TEIXEIRA, F.B.; DE SOUZA-FILHO, F.J. Bacteriological study of root canals associated with periapical abscesses. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*. v.96, n.3, p. 332-339, 2003.
- 5
- STACKEBRANDT, E.; SPROER, C.; RAINEY, F.A.; BURGHARDT, J.; PÄUKER, O.; HIPPE, H. Phylogenetic analysis of the genus *Desulfotomaculum*: evidence for the misclassification of *Desulfotomaculum guttoideum* and description of
- 10 *Desulfotomaculum orientis* as *Desulfosporosinus orientis* gen. nov., comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*. v. 47, n. 4, p. 1134-9, out, 1997.
- STACY, A.; EVERETT, J.; JORTH, P.; TRIVEDI, U.; RUMBAUGH, K.P.; WHITELEY, M. Bacterial fight-and-flight responses enhance virulence in a polymicrobial infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*.
- 15 v. 111, n. 21, p. 7819-24, 2014.
- STASHENKO P.; DEWHIRST F.E.; ROONEY M.L.; DESJARDINS L.A.; HEELEY J. D. Interleukin-1 beta is a potent inhibitor of bone formation in vitro. *Journal Bone Miner Res*. v. 2, n. 5, p. 559-65, 1987.
- STASHENKO, P.; DEWHIRST, F.E.; PEROS, W.J.; KENT, R.L.; AGO, J.M.
- 20 Synergistic interactions between interleukin 1, tumor necrosis factor, and lymphotoxin in bone resorption. *Journal of Immunology*. v. 138, n.5, p. 1464-8, 1997.
- STASHENKO, P.; WANG, C.Y.; TANI-ISHII, N.; YU, S.M. Pathogenesis of induced rat periapical lesions. *Oral Surgery, Oral Medicine and Oral Pathology*. v. 78, p.
- 25 494-502, 1994.
- STASHENKO,P.; DEWHIRST, F.E.; ROONEY, M.L.; DESJARDINS, L.A.; HEELEY, J.D. Interleukin-1 beta is a potent inhibitor of bone formation in vitro. *Journal of bone and mineral research*. v. 2, n. 6, p. 559-65, 1987.
- STEFANOPOULOS, P.K.; KOLOKOTRONIS, A.E. The clinical significance of
- 30 anaerobic bacteria in acute orofacial odontogenic infections. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*. v.98, n. 4, p.398-408, 2004.

STEFANOPOULOS, P.K.; KOLOKOTRONIS, A.E. The clinical significance of anaerobic bacteria in acute orofacial odontogenic infections. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*. v. 98, n. 4, p. 398-408, 2004.

5 SUGATA, T.; FUJITA, Y.; MYOKEN, Y.; FUJIOKA Y. Cervical cellulitis with mediastinitis from an odontogenic infection complicated by diabetes mellitus: report of a case. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. v. 55, n.8, p.864-9. 1997.

10 SUMMANEN, P.; BARON, E.J.; CITRON, D.M.; STRONG, C.; WEXLER, H.M.,.; FINEGOLD, S.M. *Wadsworth anaerobic bacteriology manual*, 5th ed. Belmont, CA: Star Publishing Company, 1993.

SUNDQVIST, G.; JOHANSSON, E.; SJÖGREN, U. Prevalence of black-pigmented bacteroides species in root canal infections. *Journal of Endodontics*. v. 15, n.1, p. 13-9, 1989.

15 SUNDRUD, M.S.; TRIVIGNO, C. Identity crisis of Th17 cells: many forms, many functions, many questions. *Seminars in Immunology*. v. 25, n. 4, p. 263-72, 2013.

TAKAHASHI, K. Microbiological, pathological, inflammatory, immunological and molecular biological aspects of periradicular disease. *International Endodontic Journal*. v. 31, n.5, p.311-25 , 1998.

20 TANCAWAN, A.L.; PATO, M.N.; ABIDIN, K.Z.; ASARI, A.S.; THONG, T.X.; KOCHHAR, P.; *et al.* Amoxicillin/Clavulanic Acid for the Treatment of Odontogenic Infections: A Randomised Study Comparing Efficacy and Tolerability versus Clindamycin. *International Journal of Dentistry*. 2015.

25 TAVARES, W.L.; DE BRITO, L.C.; HENRIQUES, L.C.; OLIVEIRA, R.R.; MACIEL, K.F.; VIEIRA, L.Q.; SOBRINHO, A.P. The impact of chlorhexidine-based endodontic treatment on periapical cytokine expression in teeth. *Journal of Endodontics*. v. 39, n.7, p. 889-92, 2013.

30 TAVARES, W.L.; DE BRITO, L.C.; HENRIQUES, L.C.; TELES, F.R.; TELES, R.P.; VIEIRA, L.Q.; RIBEIRO SOBRINHO, A.P. Effects of calcium hydroxide on cytokine expression in endodontic infections. *Journal of Endodontics*. v. 38, n.10, p. 1368-71, 2012.

- TAYLOR, A.; AKDIS, M.; JOSS, A.; AKKOÇ, T.; WENIG, R.; COLONNA, M.; DAIGLE, I.; FLORY, E.; BLASER, K.; AKDIS, C.A. IL-10 inhibits CD28 and ICOS costimulations of T cells via src homology 2 domain-containing protein tyrosine phosphatase 1. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. v. 120, n. 1, p. 76-83, 2007.
- 5
- TEELING, H.; GLÖCKNER, F.O. Current opportunities and challenges in microbial metagenome analysis--a bioinformatic perspective. *Briefings in Bioinformatics*. v.13, n.6, p. 728-42, 2012.
- TEIXEIRA-SALUM, T.B.; RODRIGUES, D.B.R.; GERVÁSIO, A.M.; SOUZA, C.J.A.; RODRIGES Jr. V.; LOYOLA, A.M. Distinct Th1, Th2 and Treg cytokines balance in chronic periapical granulomas and radicular cysts. *Journal of Oral Pathology and Medicine*, v.39, n.3 , p. 250-6, 2010.
- 10
- TELES, F.R.; TELES, R.P.; SIEGELIN, Y.; PASTER, B.; HAFFAJEE, A.D.; SOCRANSKY, S.S.RNA-oligonucleotide quantification technique (ROQT) for the enumeration of uncultivated bacterial species in subgingival biofilms. *Molecular Oral Microbiology*. v. 26, n. 2, p. 127-39, 2011.
- 15
- TESMER, L.A.; LUNDY, S.K.; SARKAR, S.; FOX, D.A. Th17 cells in human disease. *Immunological Reviews*. v. 223, p. 87-113, 2008.
- THE HUMAN MICROBIOME CONSORTIUM. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*. v. 486, n.7402 p.207–214, 2012.
- 20
- TRACY, M.; WANAHITA, A.; SHUHATOVICH, Y.; GOLDSMITH, E.A.; CLARRIDGE. J.E.; MUSER, D.M. Antibiotic susceptibilities of genetically characterized *Streptococcus milleri* group strains. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. v. 45, n. 5, p. 1511-4, 2001.
- 25
- UH, Y.; SHIN, D.H.; JANG, I.H.; HWANG, G.Y.; LEE, M.K.; YOON, K.J.; *et al.* Antimicrobial susceptibility patterns and macrolide resistance genes of viridians streptococci from blood cultures in Korea. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. v. 53,n. 6, p 1095-1097, 2004.
- ULUIBAU, I.C.; JAUNAY, T.; GOSS, A.N. Severe odontogenic infections. *Australian Dental Journal*. v.50, n.4 , p.74-81. 2005.
- 30
- VAN WINKELHOFF, A.J.; HERRERA, D.; OTEO, A.; SANZ, M. Antimicrobial profiles of periodontal pathogens isolated from periodontitis patients in The

- Netherlands and Spain. *Journal of Clinical Periodontology*. v. 32, n. 8, p. 893-8, 2005.
- VAN-WINKELHOFF, A.J.; HERRERA, D.; OTEO, A.; SANZ, M. Antimicrobial profiles of periodontal pathogens isolated from periodontitis patients in The Netherlands and Spain. *Journal Clinical Periodontology*. V. 32, n.8, p.893-8, 2005.
- 5 VEDANTAM, G.; HECHT, D.W.; Antibiotics and anaerobes of gut origin. *Current Opinion in Microbiology*. v. 6, n. 5, p. 457-61, 2003.
- VELOO, A.C.; SEME, K.; RAANGS, E.; RURENGA, P.; SINGADJI, Z.; WEKEMA-MULDER, G.; VAN-WINKELHOFF, A.J. Antibiotic susceptibility profiles of oral pathogens. *International Journal Antimicrobial Agents*. v. 40, n. 5, p. 450- 4, 2012.
- 10 VICENTE-RODRÍGUEZ, J.C. Celulitis maxilofaciales. *Medicina Oral, Patología Oral e Cirugía Bucal*. v.9, p.126-38. 2004.
- VON-GRAEVENITZ, A. *Rothia dentocariosa*: taxonomy and differential diagnosis. *Clinical Microbiology Infection*. v. 10, n. 5, p. 399-402, 2004.
- 15 WANG, C.N.; TANI-ISHII, N.; STASHENKO, P.. Bone-resorptive cytokine gene expression in periapical lesions in the rat. *Oral Microbiol. Immunol*. v. 12, n.2 p. 65–71, 1997.
- WANG, L.; GANLY, I. The oral microbiome and oral cancer. *Clinics in Laboratory Medicine*. v. 34, n.4 , p. 711-719, 2014.
- 20 WANG, M.; AHRNÉ, S.; JEPPSSON, B.; MOLIN, G. Comparison of bacterial diversity along the human intestinal tract by direct cloning and sequencing of 16S rRNA genes. *FEMS Microbiology Ecology*. v. 54, n.2, p.219-231, 2005.
- WARNKE, P.H.; BECKER, S.T.; SPRINGER, I.N.; HAERLE, F.; ULLMANN, U.; RUSSO P,A. *et al*. Penicillin compared with other advanced broad spectrum antibiotics regarding antibacterial activity against oral pathogens isolated from odontogenic abscesses. *Journal of Cranio-maxillofacial Surgery*. v.36, n.8, p.462-467, 2008.
- 25 WEAVER, C.T.; ARRINGTON, L.E.; MANGAN, P.R.; GAVRIELI, M.; MURPHY, K.M. Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. *Immunity*. v. 24, n. 6, p. 677-88, 2006.
- 30

- WEIGER, R.; MANNCKE, B.; WERNER, H.; LOST, C. Microbial flora of sinus tracts and root canals of non-vital teeth. *Endodontics Dental Traumatology*. v.11, n.1, p.15-19, 1995.
- WHITMAN, M.S.; TUNKEL, A.R. Azithromycin and clarithromycin: overview and comparison with erythromycin. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, v. 13, n. 6, p. 357–368,1992.
- WONG, T.Y. A nationwide survey of deaths from oral and maxillofacial infections: the Taiwanese experience. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. v.57, n.11, p. 1297-9, 1999.
- 10 XIE,Y.; CHEN, J.; HE, J.; MIAO, X.; XU, M.; WU, X.; XU, B.; YU, L.; ZHANG, W. Antimicrobial resistance and prevalence of resistance genes of obligate anaerobes isolated from periodontal abscesses. *Journal of Periodontology*. v. 85, n. 2, p. 327-34, 2014.
- XIONG, H.; WEI, L.; PENG, B. Immunohistochemical localization of IL-17 in induced rat periapical lesions. *Journal of Endodontics*. v. 35, n. 2, p. 216-20, 15 2009.
- YANG, L.C.; HUANG, F.M.; LIN, C.S. Induction of interleukin-8 gene expression by black-pigmented *Bacteroides* in human pulp fibroblasts and osteoblasts. *International Endodontic Journal*. v. 36, p. 774-9, 2003.
- 20 YOSHIE, O.; IMAI, T.; NOMIYAMA, H. Chemokines in immunity. *Advances in Immunology*. v. 78, p. 57–110, 2001.
- YU, J.J.; RUDDY, M.J.; WONG, G.C.; SFINTESCU, C.; BAKER, P.J.; SMITH, J.B.; EVANS, R.T.; GAFFEN, S.L. An essential role for IL-17 in preventing pathogen-initiated bone destruction: recruitment of neutrophils to inflamed bone requires IL-17 receptor-dependent signals. *Blood*. v. 109, n. 9, p. 3794-802, 2007.
- 25 ZALECKAS, L.; RASTENIENE, R.; RIMKUVIENE, J.; SESELGYTE, R. Retrospective analysis of cellulitis of the floor of the mouth. *Stomatologija*. v.12, n.1, p. 23-7, 2010.
- ZEITOUN, I.M.; DHANARAJANI, P.J. Cervical cellulitis and mediastinitis caused by odontogenic infections: report of two cases and review of literature. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. v.53, n.2, p.203-8, 1995.
- 30

ZHANG, C.; TANG, Y.; ZHENG, M.; YANG, J.; ZHU, G.; ZHOU, H.; ZHANG, Z.; LIANG, X. Maxillofacial space infection experience in West China: a retrospective study of 212 cases. *International Journal Infectious Diseases*. v.4, n.5, p. 414-7, 2010.

5 ZHU, J., PAUL, W.E. CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood*. n.112, v. 5, p.1557-69, 2008

ZHU, Q. A review of novel bacterial complex lipids: implications for the pathogenesis of apical periodontitis. *Iranial Endodontic Journal*. v. 5, n. 4, p. 141-6, 2010.

10

## ANEXOS

### **ANEXO A. Aprovação pelos comitês de ética em pesquisa da UFMG e do Hospital Odilon Behrens**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

**Parecer nº. ETIC 374/08**

**Interessado(a): Prof. Evandro Neves Abdo**  
**Depto. de Clínica, Patologia e Cirurgia Odontológicas**  
**Faculdade de Odontologia - UFMG**

#### **DECISÃO**

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 17 de setembro de 2008, após atendidas as solicitações de diligência, o projeto de pesquisa intitulado "**Epidemiologia e perfil microbiológico das infecções odontogênicas de pacientes internados em um hospital público de Belo Horizonte**" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

  
**Profa. Maria Teresa Marques Amaral**  
**Coordenadora do COEP-UFMG**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Projeto: CAAE – 0374.0.203.000-08

**Interessado(a): Prof. Evandro Neves Abdo**  
**Depto. de Clínica, Patologia e Cirurgia Odontológicas**  
**Faculdade de Odontologia - UFMG**

#### DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP analisou e aprovou, no dia 30 de maio de 2012, a inclusão, abaixo relacionada, no projeto de pesquisa intitulado "**Epidemiologia e perfil microbiológico das infecções odontogênicas de pacientes internados em um hospital público de Belo Horizonte**".

- Inclusão da técnica MDA-checkerboard

A aprovação é válida por um ano (30 de maio de 2012 a 29 de maio de 2013).

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.



**Prof. Maria Teresa Marques Amaral**  
**Coordenadora do COEP-UFMG**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Projeto: CAAE – 0374.0.203.000-08

Interessado(a): **Prof. Evandro Neves Abdo**  
Depto. de Clínica, Patologia e Cirurgia Odontológicas  
Faculdade de Odontologia - UFMG

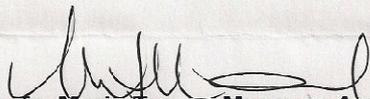
#### DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP analisou e aprovou, no dia 11 de dezembro, o adendo, abaixo relacionado, ao projeto de pesquisa intitulado **"Epidemiologia e perfil microbiológico das infecções odontogênicas de pacientes internados em um hospital público de Belo Horizonte"**.

- o Quantificação de citocinas pró-inflamatórias.

A aprovação é válida por um ano (11 de dezembro de 2013 a 10 de dezembro de 2014).

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

  
**Prof. Maria Teresa Marques Amaral**  
Coordenadora do COEP-UFMG



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

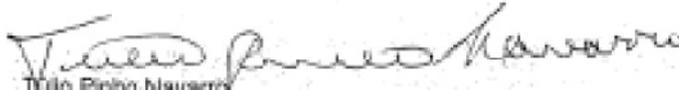
**Avaliação de Projeto de Pesquisa**

Título do Protocolo: Epidemiologia e perfil microbiológico das infecções odontogênicas de pacientes internados em um hospital Público de Belo Horizonte.

Pesquisador responsável: Evandro Neves Abdo

Parecer do CEP/HOB: o projeto em apreço foi avaliado e foi aprovado pelo CEP HOB sendo autorizado a sua realização.

Atenciosamente,

  
Tullio Pinho Navarro  
Presidente do COEP-HOB

DATA: 09/10/2008

## **ANEXO B. Termo de consentimento livre e esclarecido**

Pacientes maiores de idade

Este documento tem como finalidade propor sua participação no projeto de pesquisa  
5 "INFEÇÕES ODONTOGÊNICAS GRAVES: ETIOLOGIA E PERFIL DE SUSCETIBILIDADE A  
DROGAS ANTIMICROBIANAS DAS AMOSTRAS ISOLADAS".

Esta pesquisa tem como objetivo analisar os fatores que interferem nas infecções de origem  
dentária (as bactérias causadoras das infecções bem como a resistência aos antibióticos usados  
para estes tratamentos). Este estudo é de grande importância, pois irá contribuir para melhorar o  
atendimento e o tratamento dos pacientes com este problema. Para isso é necessária a coleta de  
10 secreção, ou seja, pus da infecção.

Não será necessário procedimento adicional porque a coleta do pus será feita durante o  
procedimento de drenagem que é usado como tratamento para qualquer tipo de infecção.

Nesta pesquisa não existe custo adicional para você e, fica ao seu critério a possibilidade de negar  
a participar do estudo sem qualquer prejuízo ao seu tratamento.

15 Os dados obtidos na pesquisa serão confidenciais e seu nome não será em hipótese alguma  
divulgado. Os resultados serão apresentados em congressos e publicações sem que você seja  
identificado.

Este estudo foi aprovado pelos comitês de ética em pesquisa da UFMG e Hospital Municipal  
Odilon Behrens.

20 **Termo de Livre Consentimento**

Li e entendi as informações fornecidas. Tive a oportunidade de fazer perguntas e todas as minhas  
dúvidas foram respondidas a contento. Autorizo a realização de coleta do pus durante o  
procedimento de drenagem. Permito também a utilização dos dados para divulgação e ensino,  
25 respeitando sempre meu direito de não ser identificado.

Este formulário está sendo assinado voluntariamente por mim, tendo sido garantido o meu direito  
de desistir a qualquer momento.

PACIENTE:

Nome: \_\_\_\_\_

30 Assinatura: \_\_\_\_\_

Documento apresentado: \_\_\_\_\_ n°: \_\_\_\_\_

Belo Horizonte, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

PESQUISADORES: \_\_\_\_\_

prazeres magalhães Tel 3409 2743 Augusto César Sette Dias Tel: 3409 2743

35 Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) Av: Antônio Carlos, 6627 Unidade Administrativa II (prédio  
da Fundep), 2º andar, sala 2005. tel 3409 4592 72

## **ANEXO C Artigos**

### ***Carta de aceite do artigo: Cytokine expression in patients hospitalized for severe odontogenic infection in Brazil***

----- Forwarded message -----

From: **The Journal of Endodontics** <[support@elsevier.com](mailto:support@elsevier.com)>  
Date: 2016-01-27 10:35 GMT-02:00  
Subject: Acceptance of JOE Manuscript  
To: [ppmagalhaes@ufmg.br](mailto:ppmagalhaes@ufmg.br)

Ref.: Ms. No. JOE 15-864R2  
Cytokine expression in patients hospitalized for severe odontogenic infection in Brazil

Dear Dr. Magalhaes,

I am pleased to inform you that your manuscript has now been accepted for publication in Journal of Endodontics.

You will soon be contacted by our publisher to review the galley proofs.

When your paper is published on ScienceDirect, you want to make sure it gets the attention it deserves. To help you get your message across, Elsevier has developed a new, free service called AudioSlides: brief, webcast-style presentations that are shown (publicly available) next to your published article. This format gives you the opportunity to explain your research in your own words and attract interest. You will receive an invitation email to create an AudioSlides presentation shortly. For more information and examples, please visit <http://www.elsevier.com/audioslides>

This journal offers a free service called AudioSlides. These are brief, webcast-style presentations that are shown next to published articles on ScienceDirect and can be viewed for free. This format gives you the opportunity to explain your research in your own words and promote your work by embedding it on your own website and sharing in social media. For more information and examples, please visit <http://www.elsevier.com/audioslides> or watch our webinar: <https://www.publishingcampus.elsevier.com/pages/206/Tell-your-research-story-with-AudioSlides.html>

Thank you for submitting this manuscript. I look forward to seeing it published soon.

With kind regards,

Ken Hargreaves  
Editor  
Journal of Endodontics

## **Artigo I**

*Cytokine expression in patients hospitalized for severe odontogenic infection in Brazil*

Augusto C. Sette-Dias<sup>1</sup>, Kamilla F. Maciel<sup>2</sup>, Evandro N. Abdo<sup>2</sup>, Luciana C. N. Brito<sup>3</sup>, Maria Auxiliadora R. Carvalho<sup>1</sup>, Leda Q. Vieira<sup>4</sup>, Luiz M. Farias<sup>1</sup>, Antônio P. Ribeiro-Sobrinho<sup>2</sup>, Paula P. Magalhães<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Oral Microbiology and Anaerobes, Department of Microbiology, Institute of Biological Sciences, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil.

<sup>2</sup>School of Dentistry, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil.

<sup>3</sup>School of Dentistry, Fundação Universidade de Itaúna, Itaúna, MG, Brazil.

<sup>4</sup>Laboratory of Gnotobiology and Immunology, Department of Biochemistry and Immunology, Institute of Biological Sciences, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil.

\*Corresponding author: Laboratory of Oral Microbiology and Anaerobes, Department of Microbiology, Institute of Biological Sciences, Universidade Federal de Minas Gerais. Av. Antônio Carlos 6627, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, CEP 31270-901, Phone 55 31 34092759, E-mail: ppmagalhaes@ufmg.br.

Luiz M. Farias, Antônio P. Ribeiro-Sobrinho, and Paula P. Magalhães contributed equally to the study.

Acknowledgement: The authors deny any conflicts of interest.

## Abstract

**Introduction:** Severe odontogenic infections remain an important public health concern and significant economic burden to public health care facilities. Despite this several aspects of the disease, for example immune response profile remain poorly understood. The aim of this study was to search for an association between mRNA levels of the cytokines IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-17A, IL-10, and TGF- $\beta$  and the chemokines IL-8, CCL2/MCP-1, and CCL5 and odontogenic infection.

**Methods:** Our case group was comprised by of 12 patients hospitalized in consequence of severe odontogenic infection and our control group included 12 individuals with healthy periapical tissues. Clinical samples were taken from the case (drainage site) and control (periapical interstitial fluid) groups with the aid of paper points. Total RNA was extracted, complementary DNA was synthesized, and mRNA levels were determined by quantitative polymerase chain reaction. Data analysis was performed by using SPSS and the Wilcoxon test was employed to determine statistical significance ( $p < 0.05$ ).

**Results:** Our results showed a significantly increased expression of pro-inflammatory cytokines (IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , and IL-17A), IL-8 and CCL2/MCP-1 in odontogenic infection patients. mRNA levels of IL-10, TGF- $\beta$ , and CCL5 were similar in both study groups.

**Conclusions:** In general individuals presenting with odontogenic infections exhibited extraordinary pro-inflammatory cytokine profiles paralleled with unaltered expression of regulatory mediators.

**Key words:** odontogenic infections, cytokines, chemokines, immune response.

## Introduction

Severe odontogenic infections are always a risk to patients. They remain an important public health concern and have become a significant economic burden to public health care facilities. Incorrect or delayed treatment generally leads to serious complications such as compromised airway (1).

Propagation of the infection depends on local and systemic host factors and on the virulence of the pathogen (2, 3). During maturation of the immune response, antigen-presenting cells are responsible for the polarization of T-helper (Th) immune responses. Naive CD4<sup>+</sup>Th may undergo polarization into different effector Th cell subtypes. Four T-cells subsets have already been described, Th1, Th2, Th17, and T-regulatory (Treg) cells. Each of them drives a characteristic protective immune response (4, 5).

A type 1 immune response, characterized by the production of interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), and interleukin-1 (IL-1), is involved in the disease progression, bone destruction, and remodeling of periapical lesions (4). In contrast, immunosuppressive mechanisms mediated by Treg- or Th2-derived cytokines are responsible for healing and restricting the inflammatory immune mechanisms (6). IL-10, initially described as a Th2 cytokine, and TGF- $\beta$  exhibits strong anti-inflammatory properties. Researchers now recognized that Th1 and Th17 (represented by IL-17) cells also produce IL-10 in addition to Th2 and Treg cells (7).

Chemokines are a specialized group of cytokines that coordinate movement of leukocytes into and through tissues. They are involved in a multitude of biological processes, including organ development and homeostasis, angiogenesis, and immune activation and regulation. The role of chemokines and their cognate receptors in the immune response is carried out by leukocyte homing and trafficking (8).

Although the immune response in periapical lesions and periodontal disease is well known, the cytokine response profile in severe odontogenic infections has not been clearly defined. The aim of this study was to assay the mRNA levels of the cytokines IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-17A, IL-10, and TGF- $\beta$  and the chemokines IL-8, CCL2/MCP-1 and CCL5 in tissue samples obtained from patients

presenting with severe odontogenic infection and to compare the results with those obtained for individuals with healthy periapical tissues.

## Materials and Methods

### Study group

This study was approved by the Ethics Committee of the Hospital Odilon Behrens and Universidade Federal de Minas Gerais (ETIC 374-08). All patients recruited to the study signed an informed consent form. The study group was comprised of 24 individuals, 12 cases and 12 controls, non-consecutive patients, collected in one year. The case group was recruited from patients hospitalized for severe odontogenic infection in the Hospital Odilon Behrens, Belo Horizonte, MG, Brazil. Patients presenting with other infectious diseases were excluded. Control subjects were selected from patients with vital pulp prosthetic and indications, for endodontic treatment that were referred to the School of Dentistry at the Universidade Federal de Minas Gerais.

The case group included 8 women and 4 men, ranging in age from 17 to 62 years. Seven cases involved the lower third and second molars, while in the five remaining cases other teeth were responsible for the abscess. Pulpal necrosis was correlated to seven cases and post-extraction surgery was associated with worsening of the disease in three subjects; two were caused by periodontitis, and one pericoronaritis. Two patients showed associated systemic diseases (diabetes mellitus and hypertension).

In these patients multiple spaces were stricken, the space most frequently affected was submandibular, often associated with the involvement of buccal and cervical spaces. Three patients have undergone tracheotomy. The main clinical manifestations included submandibular swelling and dysphagia that were associated with trismus in all patients.

### Sample collection

Clinical samples were taken from extra or intraoral drainage sites of patients with odontogenic infection. After antisepsis with 70% alcohol (extra-oral) or chlorhexidine 0.12% (intra-oral), two paper points were introduced into the

drainage site for 1 minute. Subsequently they were transferred to microcentrifuge tubes, transported to the laboratory, and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ .

In regard to the control group, ProTaper nickel-titanium files (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Switzerland) in conjunction with 5.2% sodium hypochlorite were used for cleaning and shaping of the root canals. Following cleaning and drying, three paper points #20 were introduced into each root canal passing through the root apex (2 mm) in order to collect the periapical interstitial fluid. After 1 minute the paper points were cut 4 mm from the tip, placed into a microcentrifuge tube, and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  (3).

#### Sample preparation

TRIzol reagent (Gibco/BRL Laboratories, Grand Island, NY, USA) was employed for RNA isolation as previously described (3). Briefly, chloroform was added, and the mixture was centrifuged at 12,000g at  $4^{\circ}\text{C}$  for 15 minutes; the aqueous phase was collected, and RNA was precipitated by isopropanol. Samples were centrifuged at 12,000g at  $4^{\circ}\text{C}$  for 10 minutes. The RNA precipitate was washed once with 75% cold ethanol, dried, dissolved in RNase-free water, and then incubated at  $55^{\circ}\text{C}$  for 10 minutes. The RNA was then stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ .

#### Real-time reverse transcription polymerase chain reaction

Expression of the cytokines IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-17A, IL-10, TGF- $\beta$ , and the chemokines IL-8, CCL2/MCP-1 and CCL5 was quantified by real-time reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR). A total of 1  $\mu\text{g}$  of RNA was employed for obtaining complementary DNA (cDNA) by reverse transcription (9). qPCR was performed in a volume of 25  $\mu\text{L}$  and contained 1 mg of cDNA. Primer sequences, melting temperatures, and amplicon sizes are shown in Table 1 (3, 10). Primers were designed using Primer Express Software (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) based on nucleotide sequences available in the GenBank database. Amplification reactions were conducted according to the following protocol: a holding stage at  $95^{\circ}\text{C}$  for 10 minutes; a cycling stage of 40 cycles at  $95^{\circ}\text{C}$  for 15 seconds followed by  $60^{\circ}\text{C}$  for 1 minute; and a melting curve stage at  $95^{\circ}\text{C}$  for 15 seconds,  $60^{\circ}\text{C}$  for 1 minute, and  $95^{\circ}\text{C}$  for 15 seconds (3, 10).

The assays were performed in a Step One Real-time PCR System (Applied Biosystems) and SYBR Green (Applied Biosystems) was used to detect amplification. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was employed as a housekeeping gene for normalization. All samples were run in duplicate. Sequence Detection Software version 2.0 (Applied Biosystems) was used for data analysis. Results were obtained as threshold cycle (CT) values. Expression levels were then calculated using the comparative CT method. The values were calculated as the mean value of the duplicates for each patient, and the levels of mRNA in all samples were defined as the ratio of each specific primer to GAPDH expression.

### Statistical Analysis

Data analysis was performed by using SPSS for Windows (version 15.0; SPSS, Chicago, IL, USA). Data were subjected to the Shapiro-Wilk test to characterize their normality. The Wilcoxon T-test was used to determine statistical significance ( $p < 0.05$ ) because data did not present a normal distribution.

### Results

Expression of all evaluated cytokines (IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-17A, IL-10, and TGF- $\beta$ ) and chemokines (IL-8, CCL2/MCP-1, and CCL5) was detected in both clinical conditions. A significantly increased expression of pro-inflammatory cytokines (IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , and IL-17A) and chemokines IL-8 and CCL2/MCP-1 was observed in samples recovered from acute abscesses in comparison with the control group ( $p < 0.05$ ). There was no statistical difference when the expression of the regulatory cytokines (IL-10 and TGF- $\beta$ ) and CCL5 was compared between the two groups (Figures 1 and 2).

### Discussion

Odontogenic infections lead to an accumulation of immune competent cells that, together with other local cells, such as fibroblasts, endothelial, and epithelial cells, promote a protective response against microbial spreading to the surrounding tissues (11). In this study, we observed a significantly increased expression of several pro-inflammatory cytokines and chemokines.

TNF- $\alpha$  mRNA level was higher in patients hospitalized for severe odontogenic infection when compared with the control group. The cytokine is a potent immunologic mediator of acute and chronic inflammatory responses in consequence to the ability to increase bone resorption. It stimulates the production of collagenase, chemokines, and cytokines, cellular adhesion molecules, and bone resorption-related factors (12). TNF- $\alpha$  contributes to periodontal damage by its direct effect on osteoclastogenesis and by amplification of inflammatory immune reactions (2). Our findings are in accordance with previous reports that showed higher levels of TNF- $\alpha$  in root canal exudates, in human periapical lesions, and in periapical lesions refractory to treatment (3, 13, 14).

IL-1 $\beta$  plays a central role in several chronic diseases and is one of the most active stimulators of bone resorption (15). Among the local effects of IL-1 we should highlight lymphocytes stimulation, neutrophils potentiation, production of proteases and prostaglandins activation, leukocyte adhesion enhancement, and bone formation inhibition (16). The cytokine is also associated with the induction of fever as an event of the acute-phase response (17). It has already been demonstrated that IL-1 $\beta$  expression is increased in periapical lesions (18) and decreases following endodontic treatment (3). Similarly to TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  expression was also increased in our case group.

IFN- $\gamma$  is the main activator of macrophages, which subsequently produce cytokines and other mediators that play a significant role in the development of periradicular diseases (19). The cytokine IL-17 is able to reactivate the inflammatory process, including the induction of neutrophil attraction (20). There is strong evidence that IL-17 may induce the production of receptor activator for nuclear factor kappa B ligand (RANKL), activating osteoclast-induced bone resorption (21). We observed a significantly higher expression of IFN- $\gamma$  and IL-17A in diseased patients when compared to control subjects. Similar results have already been reported for periapical interstitial fluid (2, 13). Additionally a positive correlation between IL-17 and IFN- $\gamma$  expression was previously observed in endodontic infections (22, 23).

Chemokines play a role in directing cell movements necessary for the initiation of T-cell immune responses to different pathogens or types of stimuli, leading to the differential recruitment of Th1 and Th2 cells (7). IL-8 attracts and

activates primarily polymorphonuclear neutrophils making them more available and more competent to engage and kill bacteria. It also stimulates osteoclast recruitment and activity. The results obtained in this study are in accordance with data generated from previous investigations that showed a higher IL-8 gene expression in dental pulp cells after stimulation and active periapical lesions (24). Previously, a positive correlation between expression levels of IL-8 and pain in patients with periodontal lesion has been shown (25). Moreover, oral pathogens such as *Porphyromonas endodontalis*, *Porphyromonas gingivalis*, and *Prevotella intermedia* are able to stimulate the production of IL-8 by pulp fibroblasts and osteoblasts (26). Systemic levels of IL-8 are also correlated with increased multiorgan failure, sepsis, and mortality (27).

The chemokine CCL2/MCP-1 is involved in the recruitment of monocytes to the site of inflammation (7) and is also associated with osteoclast chemotaxis and differentiation, probably through the interaction with CCR2 receptor (28). Macrophages promote microbial elimination in the infected sites and, subsequently, present antigens to operate B and T cells. The high gene expression of CCL2/MCP-1 observed in this study in odontogenic infection patients is in agreement with previously published results (21).

CCL5 modulates the innate immune response during sepsis (29). An association between CCL5 and Th1-type cellular response has been suggested following the observation that neutralization of CCL5 reduced formation of type 1 granuloma (30). de Brito *et al.* (3) found that CCL5 expression, together with some Th1 cytokines, was reduced after endodontic procedures. Conversely, Ferreira and coworkers (14) found similar levels of CCL5 mRNA in periapical interstitial fluid from individuals presenting or not with sickle cell anemia, a condition associated with a permanently activated immunoinflammatory status. In agreement, in the present investigation the levels of CCL5 expression were not significantly different between the case and control groups. This chemokine functions as a chemoattractant for blood monocytes, memory T helper cells and eosinophils, and the results of this study suggest that its expression may depend on the previous Th1 cytokine expression, as demonstrated in chronic endodontic infections by others (3).

IL-10 a cytokine that displays anti-inflammatory properties plays a central role in reducing infection by limiting the immune response to pathogens and thereby preventing damage to the host (10). Several studies have demonstrated the role of IL-10 in periapical lesions and periodontal diseases (31, 32). Accordingly, in the present study low level of IL-10 expression in the case group was detected. The finding may be due to a cross-immune regulation promoted by the high expression of pro-inflammatory over anti-inflammatory cytokines (3, 23).

TGF- $\beta$  regulates cell growth, differentiation, and matrix production. It is also a potent immunosuppressive factor that down-regulates the transcription of pro-inflammatory factors, such as IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ , as well as matrix metalloproteases (33). It has been shown that both TGF- $\beta$  and IL-10 down-regulate the pro-inflammatory cytokine response in periapical and periodontal immune responses (33, 34). As observed for IL-10, our results indicate basal levels of TGF- $\beta$  gene expression.

In conclusion, this study demonstrated that in hospitalized individuals presenting with an acute oral infection, pro-inflammatory mediators are expressed at their peak, while the regulatory responses are probably inhibited due to the cross-regulatory mechanism, a well-established concept (35).

## References

1. de Vicente-Rodríguez JC. Celulitis maxilofaciales. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2004;9 (Suppl):S1 26-38.
2. Huang H, Zhao N, Xu X et al. Dose-specific effects of tumor necrosis factor alpha on osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Cell Prolif* 2011;445:420-7.
3. de Brito LC, Teles FR, Teles RP et al. T-lymphocyte and cytokine expression in human inflammatory periapical lesions. *J Endod* 2012;38:481-5.
4. de Jong EC, Smits HH, Kapsenberg ML. Dendritic cell-mediated T cell polarization. *Springer Semin Immunopathol* 2005;26:289-307.
5. Graves DT, Oates T, Garlet GP. Review of osteoimmunology and the host response in endodontic and periodontal lesions. *J Oral Microbiol* 2011;17:3.
6. Romagnani S. T-cell subsets (Th1 versus Th2). *Ann Allergy Asth Immunol* 2000;85:9-21.

7. Silva TA, Garlet GP, Lara VS et al. Differential expression of chemokines and chemokine receptors in inflammatory periapical diseases. *Oral Microbiol Immunol* 2005;20:310-6.
8. Bryant VL, Slade CA. Chemokines, their receptors and human disease: the good, the bad and the itchy. *Immunol Cell Biol* 2015;93:364-371.
9. Barbosa Silva MJ, Vieira LQ, Sobrinho AP. The effects of mineral trioxide aggregates on cytokine production by mouse pulp tissue. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2008;105:e70-6.
10. Bambirra Jr W, Maciel KF, Thebit MM et al. Assessment of apical expression of alpha-2 integrin, heat shock protein, and proinflammatory and immunoregulatory cytokines in response to endodontic infection. *J Endod* 2015;41: 1085-1090.
11. Márton IJ, Kiss C. Overlapping protective and destructive regulatory pathways in apical periodontitis. *J Endod* 2014;40:155-63.
12. Boyce BF, Li P, Yao Z et al. TNF-alpha and pathologic bone resorption. *Keio J Med* 2005;54:127-31.
13. Henriques LC, de Brito LC, Tavares WL et al. Cytokine analysis in lesions refractory to endodontic treatment. *J Endod* 2011;37:1659-62.
14. Ferreira SB, de Brito LC, Oliveira MP et al. Periapical cytokine expression in sickle cell disease. *J Endod* 2015;41:358-62.
15. de Sá AR, Moreira PR, Xavier GM et al. Association of CD14, IL1B, IL6, IL10 and TNFA functional gene polymorphisms with symptomatic dental abscesses. *Int Endod J* 2007;40:563-72.
16. Nair PN. Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. *Crit Rev Oral Biol Med* 2004;15:348-81.
17. Radics T, Kiss C, Tar I et al. Interleukin-6 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in apical periodontitis: correlation with clinical and histologic findings of the involved teeth. *Oral Microbiol Immunol* 2003;18:9-13.
18. Morsani JM, Aminoshariae A, Han YW et al. Genetic predisposition to persistent apical periodontitis. *J Endod* 2011;37:455-9.
19. Colić M, Lukić A, Vučević D et al. Correlation between phenotypic characteristics of mononuclear cells isolated from human periapical lesions

- and their in vitro production of Th1 and Th2 cytokines. Arch Oral Biol 2006;51:1120-30.
20. Gu C, Wu L, Li X. IL-17 family: cytokines, receptors and signaling. Cytokine 2013;64:477-85.
  21. Marçal JR, Samuel RO, Fernandes D et al. T-helper cell type 17/regulatory T-cell immunoregulatory balance in human radicular cysts and periapical granulomas. J Endod 2010;36:995-9.
  22. Tavares WL, de Brito LC, Henriques LC et al. Effects of calcium hydroxide on cytokine expression in endodontic infections. J Endod 2012;38:1368-71.
  23. Colić M, Gazivoda D, Vučević D et al. Regulatory T-cells in periapical lesions. J Dent Res 2009;88:997-1002.
  24. Patel T, Park SH, Lin L et al. Substance P induces interleukin-8 secretion from human dental pulp cells. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2003;96:478-85.
  25. Graunaite I, Lodiene G, Maciulskiene V. Pathogenesis of apical periodontitis: a literature review. J Oral Maxillofac Res 2012;2:e1.
  26. Yang LC, Huang FM, Lin CS et al. Induction of interleukin-8 gene expression by black-pigmented *Bacteroides* in human pulp fibroblasts and osteoblasts. Int Endod J 2003;36:774-9.
  27. Kraft R, Herndon DN, Finnerty CC et al. Predictive value of IL-8 for sepsis and severe infections after burn injury - a clinical study. Shock 2015;43:222-7.
  28. Silva TA, Garlet GP, Fukada SY et al. Chemokines in oral inflammatory diseases: apical periodontitis and periodontal disease. J Dent Res 2007;86:306-19.
  29. Ness TL, Carpenter KJ, Ewing JL et al. CCR1 and CXCR3 chemokine ligand 5 interactions exacerbate innate immune responses during sepsis. J Immunol 2004;173:6938-48.
  30. Chensue SW, Warmington KS, Allenspach EJ et al. Differential expression and crossregulatory function of RANTES during mycobacterial (type 1) and schistosomal (type 2) antigen-elicited granulomatous inflammation. J Immunol 1999;163:165-73.

31. Eastcott JW, Yamashita K, Taubman MA et al. Adoptive transfer of cloned T helper cells ameliorates periodontal disease in nude rats. *Oral Microbiol Immunol* 1994;9:284-9.
32. Sasaki H, Balto K, Kawashima N et al. Gamma interferon (IFN-gamma) and IFN-gamma-inducing cytokines interleukin-12 (IL-12) and IL-18 do not augment infection-stimulated bone resorption in vivo. *Clin Diagn Lab Immunol* 2004;11:106-10.
33. Khalaf H, Lönn J, Bengtsson T. Cytokines and chemokines are differentially expressed in patients with periodontitis: possible role for TGF- $\beta$ 1 as a marker for disease progression. *Cytokine* 2014;67:29-35.
34. Maciel KF, Neves de Brito LC, Tavares WL et al. Cytokine expression in response to root canal infection in gnotobiotic mice. *Int Endod J* 2012;45:354-62.
35. Coffman RL, Mosmann TR. CD4<sup>+</sup> T-cell subsets: regulation of differentiation and function. *Res Immunol* 1991;142:7-9.

#### Acknowledgements

This study was supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES-PROEX), and Pró-reitoria de Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (PRPq/UFMG). The authors deny any conflicts of interest related to this study.

Table 1. Primer sequences, melting temperatures (Mt), and amplicon sizes for each target cytokine or chemokine.

Target	Primer sequence (5'-3')	Mt (°C)	Amplicon (pb)
GAPDH	F: GCA CCA CCA ACT GCT TAG CA	80	96
	R: TGG CAG TGA TGG CAT GGA GGA		
IFN- $\gamma$	F: GAA CTG TCG CCA GCA GCT AAA	80	95
	R: TGC AGG CAG GAC AAC CAT TA		
IL-1 $\beta$	F: TGG CAG AAA GGG AAC AGA A	73	59
	R: ACA ACA GGA AAG TCC AGG CTA		
TNF- $\alpha$	F: TTC TGG CTC AAA AAG AGA ATT G	76	73
	R: TGG TGG TCT TGT TGC TTA AGG		
IL-17A	F: CAA TGACCT GGA ATT ACC CAA	70	52
	R: TGA AGG CAT GTG AAA TCG AGA		
IL- 8	F: GAA TGG GTT TGC TAG AAT GTG ATA	60	129
	R: CAG ACT AGG GTT GCC AG ATT TAA C		
IL-10	F: GGT TGC CAA GCC TTG TCT GA	81	107
	R: TCC CCC AGG GAG TTC ACA T		
TGF- $\beta$	F: TCT GCT GAG GCT CAA GTT AAA	54	74
	R: ATC GCC AGG AAT TGT TGC		
CCL2/MCP-1	F: AAG ACC ATT GTG GCC AAG GA	80	93
	R: CGG AGT TTG GGT TTG CTT GT		
CCL5	F: CGT GCC CAC ATC AAG GAG TA	80	91
	R: CAC ACA CTT GGC GGT TCT TTC		

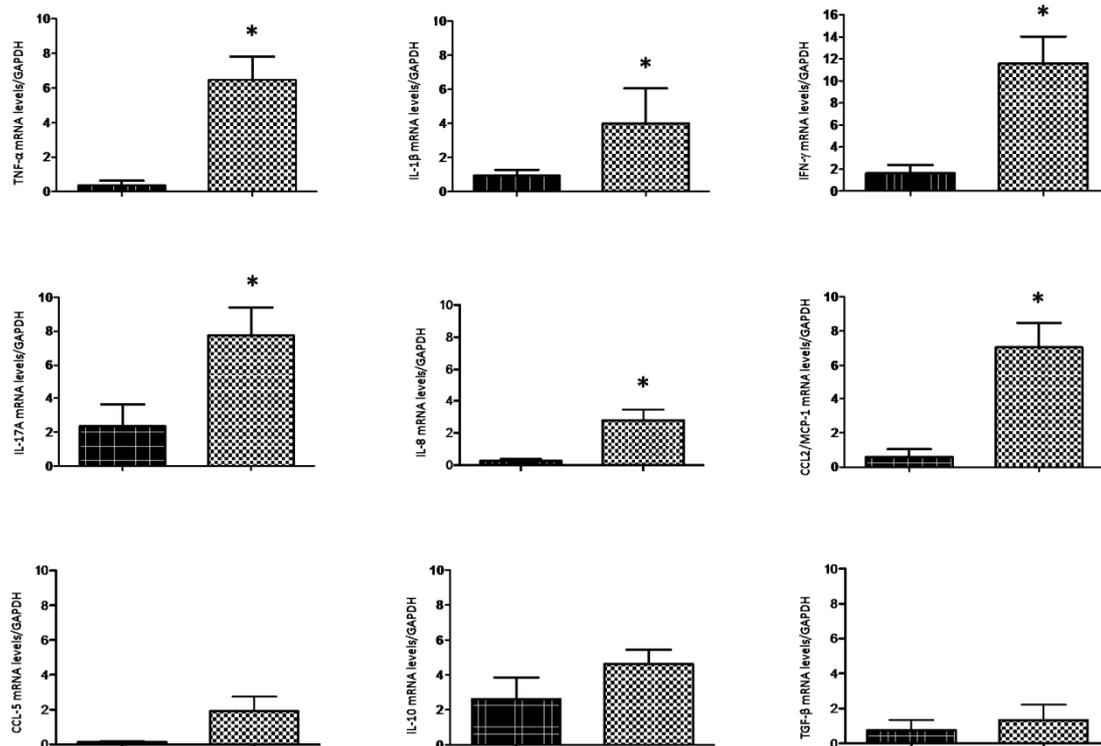


Figure 1. mRNA levels of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , IL-17A, IL-8, CCL2/MCP-1, CCL-5, IL-10, and TGF- $\beta$  in patients presenting with severe odontogenic infection (case group: ) and in individuals with healthy periapical tissues (control group: ) as determined by real-time reverse transcription polymerase chain reaction and quantified by comparison with the internal control glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) gene. Bars represent the mean values of samples recovered from 12 controls and 12 diseased patients. Error bars represent the standard error of the mean. \* indicates statistical significance ( $p < 0.05$ ) as determined by the Wilcoxon test.

## Susceptibility profiling of isolates from severe odontogenic infections

Augusto César Sette Dias<sup>1</sup>

Maria Auxiliadora Roque de Carvalho<sup>1</sup>

Paula Magalhães Prazeres<sup>1</sup>

Evandro Neves Abdo<sup>2</sup>

Luiz Macedo de Farias<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Microbiology ICB, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

<sup>2</sup> Dental School, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

Luiz de Macedo Farias

Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais,  
Caixa Postal 486, 31270-901 Belo Horizonte, MG, Brazil

Tel.: +55-31-3499-2761; fax: +55-31-3499-2730.

E-mail address: macedo@icb.ufmg.br (L.M. Farias)

## **Abstract**

*Objectives:* Odontogenic infection occurs when caries leads to pulpar necrosis and eventually a periapical abscess, apical periodontitis or pericoronaritis. On occasions, the infection spreads into the deep cervicofacial space. The aim of this study was to evaluate susceptibility patterns to antibacterial agents (i.e., facultative cocci and obligatory anaerobes) recupered in patients with severe odontogenic infection.

*Materials and methods:* Antimicrobial susceptibility for facultative Gram positive cocci was performed by means of the agar disk diffusion method. A minimum inhibitory concentration (MIC) by agar dilution method established a measurement for the anaerobes, following the guidelines from the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).

*Results:* In general, the result showed the bacteria were highly susceptible to the antibiotics tested. However, high resistance rates were found against erythromycin (43.5 %) and clindamycin (29.7 %). In catalase negative Gram-positive facultative cocci showed a resistance rate of 44.1% against erythromycin, and 38.2% against cefotaxime, ceftriaxone, and clindamycin.

*Conclusions:* In general high susceptibility was also observed among anaerobic species. In recupered bacteria we showed high resistance to test levels of erythromycin and clindamycin. It was also observed high standards of resistance among anaerobes to metronidazole and clindamycin.

*Clinical relevance:* Significant differences in susceptibility profiles of relevant antibiotics have been documented in different geographical areas. There is evidence of increased resistance to these drugs over the years. Because of changing patterns of genetic modifications it is frequently necessary to adjust the presumed resistance rate.

**Keywords:** odontogenic infection, microbiology, antimicrobial resistance, susceptibility

## Introduction

Odontogenic infection occurs when caries leads to pulpar necrosis and eventually a periapical abscess or acute apical periodontitis [1]. Head and neck infections of odontogenic origins are routinely treated in an office procedure. Untreated or rapidly spreading odontogenic infections can be potentially life-threatening, secondary to a compromised airway or septicemia [2].

Medical management is based primarily on the administration of high doses of antibiotics aimed at the organisms that are probably causing the infection. ampicillin/sulbactam, penicillin/metronidazole, clindamycin, or cephalosporin is the antibiotic generally indicated [3]. Antimicrobial susceptibility of bacteria isolated from odontogenic abscesses may differ from country to country [4].

The laboratory data regarding bacteriology and microbial susceptibility are crucial information for the clinician who is considering the administration of antimicrobial therapy. However, it may take several days or even longer to obtain such data. Hence, a pragmatic and rational approach to empirical antibiotic selection is acceptable if the choice is based on scientific data and contemporary experience, as microbiota of orofacial infections constantly evolve [5]. This choice is also based upon the type or types of streptococci and anaerobic bacteria affecting the patient [4].

Although the study of molecular genetics in bacterial resistant genes has advanced, it is crucial to study changes in the antimicrobial susceptibilities of odontogenic pathogens to target therapy and facilitate the choice of an appropriate antibiotic when indicated for the treatment of infections [6]. The aim of this study was to evaluate the susceptibility patterns to antibacterial agents, such as facultative cocci and obligatory anaerobes in patients with severe odontogenic infections requiring emergent surgical incision and drainage due to the severity of the abscess.

## Materials and methods

A total of 74 isolates were tested, 28 obligatory anaerobic bacteria and 46 strains of facultative anaerobic bacteria *Staphylococcus* (10) and Viridans group *Streptococci* (36). These samples were obtained from 30 pus specimens from 30 non-consecutive patients with odontogenic infection, who were admitted to the Hospital Municipal Odilon Behrens, a public hospital in Belo Horizonte, Brazil. This study was approved by the Ethics in Human Research Committee of Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) and Hospital Municipal Odilon Behrens (HMOB).

All bacteria were identified using enzymatic and biochemical tests. Antimicrobial susceptibility for facultative Gram positive cocci was performed by means of the agar disk diffusion method according Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) [7]. In coagulase-negative *Staphylococci* were used Miller Hinton agar and antimicrobial drugs: cefalotine, gentamicin, clindamycin, ciprofloxacin, oxacillin, amoxicillin, dicloxacillin, teicoplanine, erythromycin, tetracycline, rifampicin, sulfamethoxazole/trimethoprim, ampicillin, ceftriaxone, chloramphenicol and penicillin. The of catalase negative Gram-positive facultative cocci group we used Miller Hinton agar with 5% sheep's blood under microaerophilic conditions. In this case, the antimicrobial drugs tested were vancomycin, cefepime, erythromycin, cefotaxime, ceftriaxone, clindamycin, chloramphenicol, penicillin, levofloxacin, daptomycin, ampicillin and linezolid.

The anaerobes were incubated in a chamber under anaerobic conditions (N<sub>2</sub> 85%, H<sub>2</sub> 10%, CO<sub>2</sub> 5%), and we established measurements for the minimum inhibitory concentration (MIC) using the agar dilution method and following the guidelines from the CLSI [7]. The isolates obtained were tested against the following antibiotics: ampicillin, cefoxitin, ceftriaxone, clindamycin, chloramphenicol, metronidazole and tetracycline. The MIC values, indicating resistance or susceptibility of each of the antibiotics, were based on the reference criteria provided by the ethics committee above.

## Results

A total of 74 isolates from 30 patients were tested. In absolute terms, the isolated strains seemed to be highly sensitive to the routinely used antibiotics.

Results showed bacteria were highly susceptible to antimicrobial agents. However, high values of resistance were found against erythromycin and clindamycin, 43.5% and 29.7%, respectively.

In 10 coagulase-negative *Staphylococcus*, we observed high resistance to penicillin (70.0%), ampicillin (60.0%), erythromycin (40.0%) and oxacillin (30.0%) (Fig. 1).

In catalase negative Gram-positive facultative cocci showed a resistance rate of 44.1% against Erythromycin and 38.2% against cefotaxime, ceftriaxone and clindamycin (Fig. 2). Among the Viridans Group, we observed that *S. mitis* presented high resistance to clindamycin (75.0%) and erythromycin (87.5%), whereas *S. anginosus* showed low rates of resistance to clindamycin (18.0%) and erythromycin (25.0%).

Anaerobic susceptibility to different antibiotics is summarized in figure 3. Among anaerobic species, high sensitivity was observed. The samples presented resistance values of 43.8% and 25.0%, respectively, against metronidazole and clindamycin. When Gram positive and Gram negative bacterial strains were analysed, the resistance rates of the anaerobes were, respectively, 17.8% and 25.0% for metronidazole and 10.0% and 14.0% for clindamycin.

## Discussion

This work was carried out with samples collected from patients with severe odontogenic infections. It is important to note that patients commonly require admission to an ICU for airway management and other supportive care [8]. Because of the severity of infection all patients were treated mainly with clindamycin and gentamycin before sampling and following hospital protocol. Certainly, the treatment of patients with drugs resulted in the isolation of more bacteria strains resistant to these antimicrobials than in patients who would not have had prior antibiotic therapy [9].

A recommended therapy for patients afflicted with odontogenic infection is based on facultative Gram positive facultative cocci and Gram positive and Gram negative obligatory anaerobes, according to Limeres *et al.* [4]. All positive cultures in these cases were tested for susceptibility to antibiotics with the intention of determining the most effective drug for all isolated microorganisms.

Bacterial sensitivity was evaluated according to the Clinical and Laboratory Standards Institute's guidelines (CLSI) [7]. Despite advances in molecular genetics that suggest possible alternative approaches to the study of bacterial resistance, susceptibility tests are still considered fundamental to classical phenotypic evaluation of the susceptibility profile of particular drugs.

Significant differences in susceptibility profiles of relevant antibiotics have been documented in different geographical areas. These differences are explained by uncontrolled drug use and poor compliance. Regular surveillance of antimicrobial susceptibility in different geographical locations seems important to treat patients with the most optimal antibiotic regimen [4,10,11]. Thus, obtaining local data based on necessary laboratory analysis is critical for establishing empirical therapy, whereas regular surveillance of antimicrobial susceptibility in different geographical locations seems important for treating patients with the most optimal antibiotic regimens [9].

In general, the results showed high susceptibility in the antimicrobial drugs tested; high resistance rates were found against erythromycin (43.5%) and clindamycin (29.7%). Despite these high resistance rates, these drugs are still indicated in dentistry [12,13].

The samples of *Staphylococcus* showed high rates of resistance to penicillin (70.0%), ampicillin (60.0%), erythromycin (40.0%) and oxacillin (30.0%) (fig. 1). Rega *et al.* [2] reported similar results from observing resistance indexes of 72.7% for penicillin, 58.5% for ampicillin, 5.0% for ciprofloxacin and 10.5% for clindamycin.

In our study, *S. anginosus* showed a resistance rate to erythromycin (14.3%) similar to research from Korea (14.2%) [14], which is significantly higher than the resistance rate found in Germany (5.7%)[15], the Netherlands (2.6%)[16] and Spain (17.1%) [17]. Comparing results among Viridans group isolates, our results (44.1%) are similar to Skucaite *et al.*[6], although lower than in Italy (56.3%) [18].

Contrasting data analyses from various research studies, we realized that resistance rates of bacteria can vary around the world and according to the year of study [2,5,13]. For Sands [19] and Uh *et al.*[20], there is evidence of increased resistance to these drugs over the years. Because of changing patterns of genetic modifications it is frequently necessary to adjust the presumed resistance rate [21].

In catalase negative Gram-positive facultative cocci did exhibit a high resistance rate for clindamycin, 38.2%, which was similar to work [22,23,24]. Lemires *et al.*[4] offers an explanation: This correlation can be explained by gene *erm*, which are responsible for conferring resistance to macrolides and may also confer cross-resistance to lincosamides.

Our rates of resistance to cephalosporins, erythromycin and clindamycin differ from those reported by several authors [2,5,13]. The results of this study were similar to those described by Skucaite *et al.*[17], who reported that 2.3% of the sample was penicillin-resistant to *Streptococcus*. Rega *et al.*[2] reported rates of antimicrobial resistance of 12.9%. High levels of susceptibility of streptococcus Viridans group were also observed for ampicillin (98.4%), cefazolin (100%), ciprofloxacin (100%), clindamycin (86.3%), erythromycin (83.4%), levofloxacin (98.6%) and vancomycin (100%). Chunduri *et al.*[25] reported *Streptococcus* sensitivity of 85% and 59% to clindamycin and erythromycin between samples.

The results of this investigation are different regarding cephalosporin than those described in studies from the United State and Spain. Investigations conducted at these locations point to the absence of resistance to penicillin and third generation cephalosporins [15, 26, 27].

In anaerobes, combinations of carbapenems and  $\beta$ -lactamase inhibitor can be used as single agents to combat mixed infections involving anaerobes, whereas metronidazole must be combined with one of several antibiotics that are active against aerobic bacteria. chloramphenicol is rarely used in the clinical setting because of its potential toxicity. However, with recent and rapidly changing patterns of antimicrobial

resistance among most clinically important anaerobic bacteria and associated clinical failures, susceptibility testing is now indicated for surveillance and some specific clinical situations [28].

Despite that clindamycin is capable of obtaining very low MIC against anaerobic bacteria from the *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* and *Fusobacterium nucleatum* species it has been proposed as the drug of choice, in view of its good absorption, low incidence of bacterial resistances, and the high antibiotic concentrations reached in bone [29]. When the results for anaerobic bacteria were evaluated separately, according to microscopic morphology and reaction to Gram stain, we observed that the rates of resistance to clindamycin were 10.5% and 14.5% for Gram positive and Gram negative, respectively. For metronidazole, the values were 17.8% and 26.0%. The results contradict some authors who consider metronidazole resistance is common among Gram positive anaerobes [30,31]. Actually, metronidazole has excellent activity against anaerobes but no activity against aerobes and, therefore, must be used in conjunction with other agents [18,32].

In conclusion, the results indicated that recuperated bacteria in this study had high levels of susceptibility to antimicrobial agents. However, it showed high resistance to test levels of erythromycin and clindamycin. We observed high standards of resistance among anaerobes to metronidazole and clindamycin. These data contribute to the knowledge of the bacteria's antimicrobial susceptibility profiles, showing they are possibly involved in the pathogenesis of severe dental infections; these results may also support for the establishment of more appropriate antibiotic therapies.

#### **Acknowledgments**

The authors are grateful to Cassia Lopes Silva and Amanda Maria Pereira Borges for their assistance with the experiments. This work was supported by CNPq, CAPES and FAPEMIG.

#### **Conflict of interest**

The authors declare that they have no conflict of interest.

#### **Ethical approval**

All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional research committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards.

#### **References**

1. Gutiérrez-Pérez JL, Perea-Pérez EJ, Romero-Ruiz MM, Girón-González JA (2004). Infecciones orofaciales de origen odontogénico. *Med Oral* 2004;9:280-7.
2. Rega AJ, Aziz SR, Ziccardi VB (2006). Microbiology and antibiotic sensitivities of head and neck space infections of odontogenic origin. *J Oral Maxillofac Surg* 64: 1377-80.
3. Peterson LJ (1993). Contemporary management of deep infections of the neck. *J Oral Maxillofac Surg* 51: 226-31.

4. Limeres J, Tomás I, Alvarez M, Diz P (2005). Empirical antimicrobial therapy for odontogenic infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 100:263-4.
5. Kuriyama T, Karasawa T, Nakagawa K, Saiki Y, Yamamoto E, Nakamura S (2000). Bacteriologic features and antimicrobial susceptibility in isolates from orofacial odontogenic infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 90: 600-8.
6. Skucaite N, Peciuliene V, Vitkauskiene A, Machiulskiene V (2010). Susceptibility of endodontic pathogens to antibiotics in patients with symptomatic apical periodontitis. *J Endod* 36:1611-6.
7. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2015). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Twenty-Fifth Informational Supplement, M100-S23, 2013.
8. Dodson R, Thomas B (1996). Risk Factors Affecting Hospital Length of Stay in Patients with Odontogenic Maxillofacial Infections. *J Oral Maxillofac Surg* 54:1391-1392.
9. Veloo AC, Seme K, Raangs E, Rurenga P, Singadji Z, Wekema-Mulder G, Van-Winkelhoff AJ.(2012). Antibiotic susceptibility profiles of oral pathogens *International Journal of Antimicrobial Agents* 40: 450–454.
10. Van-Winkelhoff, AJ, Herrera D, Oteo A, Sanz M (2005). Antimicrobial profiles of periodontal pathogens isolated from periodontitis patients in The Netherlands and Spain. *J Clin Periodontol* 32: 893-8.
11. Chardin H, Yasukawa K, Nouacer N, Plainvert C, Aucouturier P, Ergani A, *et al* (2009). Reduced susceptibility to amoxicillin of oral streptococci following amoxicillin exposure. *J Med Microbiol* 58: 1092-7,
12. Khemaleelakul S, Baumgartner JC, Pruksakorn S (2002). Identification of bacteria in acute endodontic infections and their antimicrobial susceptibility. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 94: 746-55.
13. Kuriyama T, Karasawa T, Nakagawa K, Yamamoto E, Nakamura S (2002). Bacteriology and antimicrobial susceptibility of Gram-positive cocci isolated from pus specimens of orofacial odontogenic infections. *Oral Microbiol Immunol* 17: 132-5.
14. Chun S, Huh HJ, Lee NY (2015). Species-specific difference in antimicrobial susceptibility among Viridans group *Streptococci*. *Ann Lab Med* 35: 205-11.
15. Asmah N, Eberspächer B, Regnath T, Arvand, M (2009). prevalence of erythromycin and clindamycin resistance among clinical isolates of the *Streptococcus anginosus* group in Germany. *Journal of Medical Microbiology* 58: 222-7.
16. Jacobs JA, Stobberingh EE (1996). In vitro antimicrobial susceptibility of the “*Streptococcus milleri*” group (*Streptococcus anginosus*, *Streptococcus constellatus* and *Streptococcus intermedius*). *J Antimicrob Chemother* 37: 371–375.
17. Limia A, Jiménez ML, Alarcó NT, López-Brea, M (1999). Five year analysis of antimicrobial susceptibility of the *Streptococcus milleri* group. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 18: 440–44.
18. Brencianin A, Tiberi E, Tili E, Mingoia M, Palmieri C, Varaldo PE, Giovanetti E (2014). Genetic determinants and elements associated with antibiotic resistance in viridans group *Streptococci*. *J Antimicrob Chemother* 69 :1197-204.

19. Sands T, Pynn BR, Katsikeris N (1995). Odontogenic infections: microbiology, 10 antibiotics, and management. *Oral Health* 85:11-28.
20. Uh, Y.; Shin, D.H.; Jang, I.H.; Hwang, G.Y.; Lee, M.K.; Yoon, K.J.; *et al* (2004).. Antimicrobial susceptibility patterns and macrolide resistance genes of viridians streptococci from blood cultures in Korea. *J. Antimicrob. Chemother* 53:1095-1097.
21. Hecht DW, Vedantam G, Osmolski JR (1999). Antibiotic resistance among anaerobes: What does it mean? *Anaerobe* 5: 421-9.
22. Lewis MA, Parkhurst CL, Douglas CW, Martin MV, Absi EG, Bishop, PA, Jones, .A( 1995) Prevalence of penicillin resistant bacteria in acute suppurative oral infection. *J Antimicrob Chemother* 35: 785-91.
23. Poeschl PW, Spusta L, Russmueller G, Seemann R, Hirschl A, Poeschl E, *et al.*(2010). Antibiotic susceptibility and resistance of the odontogenic microbiological spectrum and its clinical impact on severe deep space head and neck infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 110:151-6.
24. Poeschl PW, Crepez V, Russmueller, G, Seemann, R, Hirschl AM, Ewers R (2011). Endodontic Pathogens Causing Deep Neck Space Infections: Clinical Impact of Different Sampling Techniques and Antibiotic Susceptibility. *J Endod* 37:1201-05.
25. Chunduri NS, Madasu K, Goteki VR, Karpe, T. Reddy H (2012). Evaluation of bacterial spectrum of orofacial infections and their antibiotic susceptibility. *Ann Maxillofac Surg* 2: 46-50.
26. Aracil B, Gomez-Garces JL, Alos JI (1999). A study of susceptibility of 100 clinical isolates belonging to the *Streptococcus milleri* group to 16 cephalosporins. *J Antimicrob Chemother* 43: 339-402.
27. Tracy M, Wanahita A, Shuhatovich Y, Goldsmith EA, Clarridge JE, Musher DM (2001). Antibiotic susceptibilities of genetically characterized *Streptococcus milleri* group strains. *Antimicrob Agents Chemother* 45: 1511-4.
28. Hecht DW, Vedantam G, Osmolski JR (1999). Antibiotic resistance among anaerobes: What does it mean? *Anaerobe* 5 421-9, 1999.
29. Kirkwood KL (2003). Update on antibiotics used to treat orofacial infections. *Alpha Omegan* 3:28-34.
30. Koeth LM, Good CE, Appelbaum PC, Goldstein EJ, Rodloff AC, Claros M, Dubreuil LJ (2004). Surveillance of susceptibility patterns in 1297 European and US anaerobic and capnophilic isolates to co-amoxiclav and five other antimicrobial agents. *J Antimicrob Chemother* 53:1039-44.
31. Pankuch GA, Jacobs MR, Appelbaum PC (1993). Susceptibilities of 428 Gram-positive and negative anaerobic bacteria to Bay y3118 compared with their susceptibilities to ciprofloxacin, clindamycin, metronidazole, piperacillin, piperacillin-tazobactam, and ceftioxin. *Antimicrob. Agents Chemother* 37: 1649-54.
32. Roche Y, Yoshimori RN (1997). In-vitro activity of spiramycin and metronidazole alone or in combination against clinical isolates from odontogenic abscesses. *J Antimicrob Chemother* 40: 353-7.

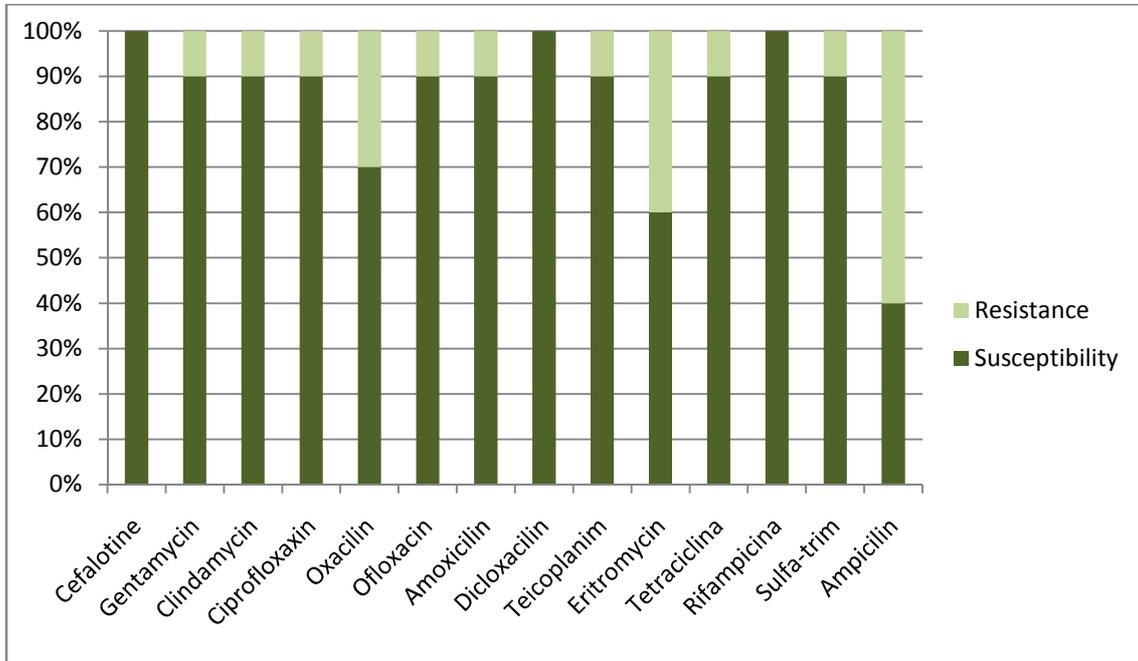


Figure 1: Profile of antimicrobial susceptibility of 10 strains of *Staphylococcus* isolated from patients with severe dental infections.

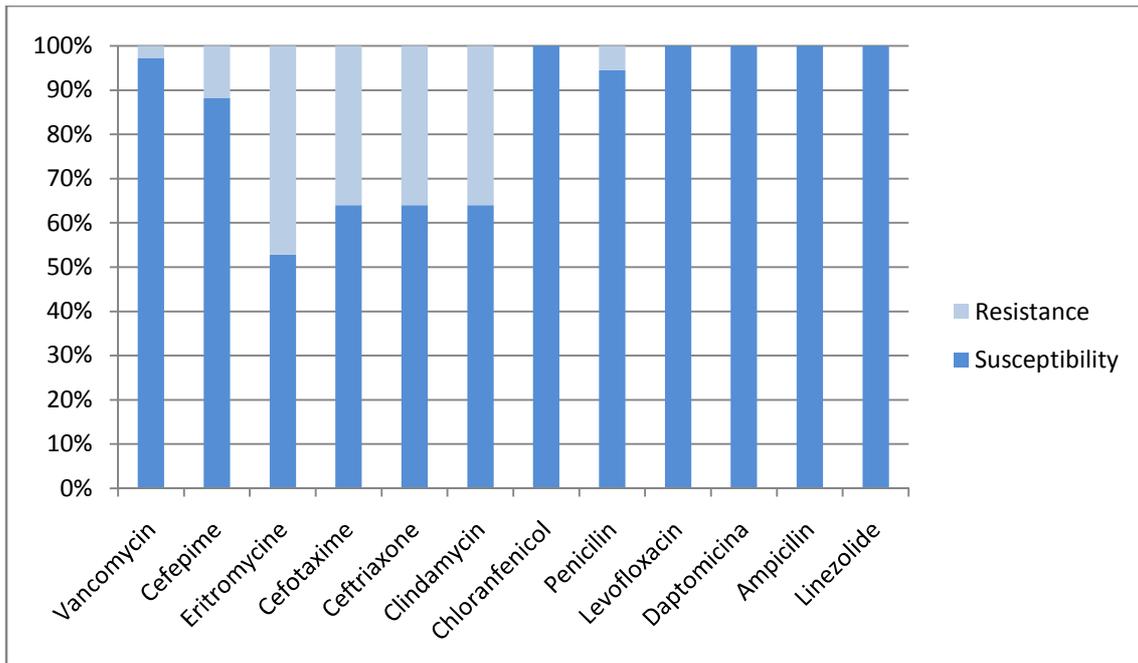


Figure 2: Profile of antimicrobial susceptibility of 36 samples of catalase negative Gram-positive facultative cocci isolated from patients with severe dental infections.

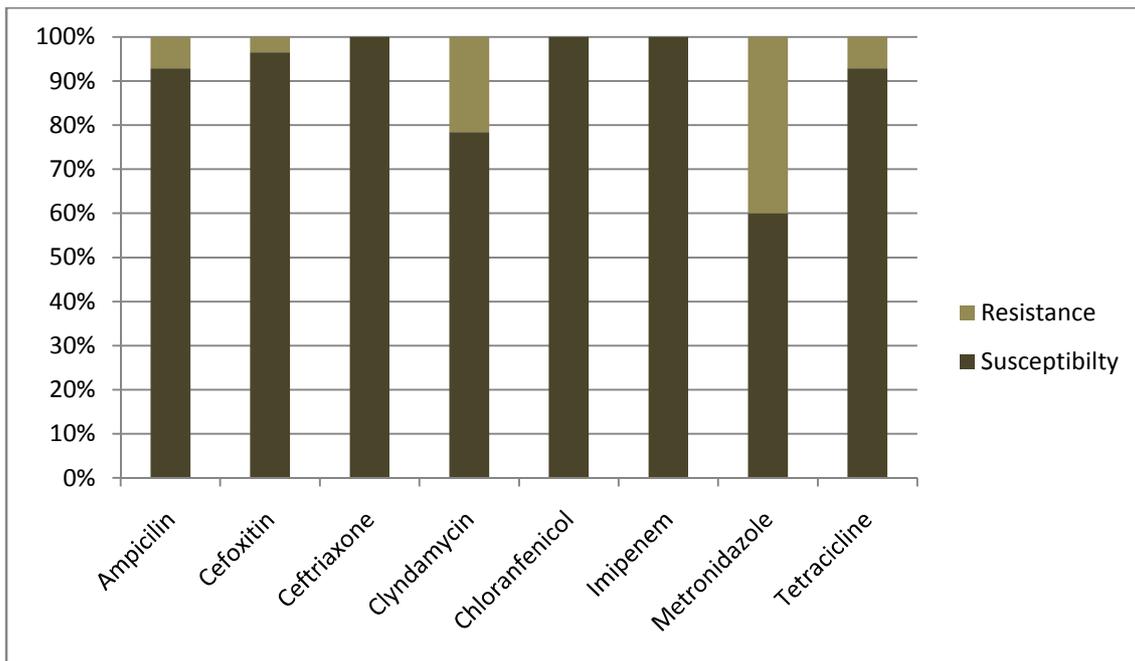


Figure 3: Profile of antimicrobial susceptibility of 28 samples of obligate anaerobic bacteria isolated from patients with severe dental infections.