

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA  
MESTRADO EM CLÍNICA ODONTOLÓGICA - ODONTOPEDIATRIA

**DETECÇÃO MICROBIANA E DE GENES DE RESISTÊNCIA  
EM ECOSSISTEMAS DA CAVIDADE ORAL DE PACIENTES  
INFANTIS COM NECROSE PULPAR**

BRUNA ROESE DE LIMA

PORTO ALEGRE

2015

BRUNA ROESE DE LIMA

**DETECÇÃO MICROBIANA E DE GENES DE RESISTÊNCIA  
EM ECOSSISTEMAS DA CAVIDADE ORAL DE PACIENTES  
INFANTIS COM NECROSE PULPAR**

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

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Clínica Odontológica – Odontopediatria.

**Orientador:** Prof. Dr. Luciano Casagrande

PORTO ALEGRE

2015

CIP - Catalogação na Publicação

Roesse de Lima, Bruna  
DETECÇÃO MICROBIANA E DE GENES DE RESISTÊNCIA EM  
ECOSSISTEMAS DA CAVIDADE ORAL DE PACIENTES INFANTIS  
COM NECROSE PULPAR / Bruna Roesse de Lima. -- 2015.  
41 f.

Orientador: Luciano Casagrande.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Faculdade de Odontologia,  
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Porto  
Alegre, BR-RS, 2015.

1. Resistência anti-microbiana. 2. Biologia  
molecular. 3. Dentes decíduos. I. Casagrande,  
Luciano, orient. II. Título.

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

*Aos meus pais, por sempre me incentivarem e  
acreditarem nos meus sonhos.*

## AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por sempre guiar meus passos e colocar pessoas especiais ao meu redor.

À **Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul** e ao **Programa de Pós-Graduação em Odontologia**, pela excelência de ensino.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** pelo apoio financeiro concedido durante o período do mestrado.

Aos professores da área de Odontopediatria da UFRGS: **Adriela Mariath, Jonas de Almeida Rodrigues e Fernando Borba de Araújo** pelos ensinamentos e parceria ao longo destes dois anos.

Ao **Professor Dr. Francisco Montagner** e à **Professora Dra. Clarissa Fatturi-Parollo**, pela disponibilidade e apoio na realização deste trabalho.

À **professora Dra. Maria Beatriz Cardoso Ferreira**, por ser, além de professora, uma amiga. Obrigada por estar sempre disponível, pela ajuda e pelos conselhos.

Ao meu orientador, **Professor Dr. Luciano Casagrande**, pela oportunidade e pelos ensinamentos ao longo deste período de 2 anos.

À minha mãe, **Silvana**, meu maior exemplo de força e coragem. Se um dia eu for metade do que tu és, já me sentirei realizada. Obrigada pelo apoio incondicional, pelos “puxões de orelha”, que me fizeram mais forte e por estar sempre presente em todos os momentos da minha vida.

Ao meu pai, **Cláudio**, por todo o suporte até agora, pela preocupação, pelos conselhos e por sempre acreditar e apoiar as minhas escolhas.

Aos outros membros da família (**Leo, Vó Nerys, Tia/Dinda Clarice**) por estarem sempre presentes e por torcerem por mim.

Às minhas amigas **Isadora Klein, Liana Webber, Mariana Klein, Regina Cunha, Luciana Luz, Gabriela Hochscheidt e Clarissa Giacomelli** por estarem sempre comigo, por me apoiarem e torcerem por mim.

À minha grande amiga, **Alejandra Seminario**; um verdadeiro presente que o mestrado me deu. Um ser humano incrível, que se mostrou disponível em todos os momentos possíveis, seja de trabalho, descontração, alegrias e tristezas. Muito obrigada pela grande ajuda na parte laboratorial deste trabalho, no LABIM, nossa segunda casa por alguns meses. Mesmo

tentando, acredito que nunca conseguirei retribuir o que tu fizeste por mim. Tenho certeza de que essa amizade vai permanecer, mesmo com os Km de distância que irão nos separar.

À colega **Caroline Sarti**, que apesar de ter sido minha colega por 5 anos no curso de graduação, foi no mestrado que construímos uma grande amizade. Obrigada pelos conselhos, pela paciência, desabafo, risadas.

Às colegas de mestrado **Claudia Azevedo**, **Ximena Melgar** e, também, às novas mestrandas (**Fernanda**, **Daiana**, **Nicole**) pelo companheirismo diário; e um agradecimento mais do que especial à colega **Juliane Brustolin**, pela ajuda nas triagens, coletas e execução do tratamento dos pacientes deste trabalho. Muito obrigada pela tua dedicação!

Às colegas de doutorado **Joanna Pereira** e **Stefanie Werle**, seja por dividir angústias, boas risadas, triagens de pacientes, conselhos. Obrigada por toda a ajuda! Também agradeço às colegas **Márcia Gomes**, **Lizandra Guimarães**, **Fabiane Piva** pela parceria nestes 2 anos.

À **Julcelaine**, por ser essa pessoa atenciosa, sempre pronta para ajudar.

Ao aluno de graduação, **Ariel Rup**, pela grande ajuda na execução dos procedimentos laboratoriais. Tenho absoluta certeza de que tu vais ter muito sucesso na vida acadêmica!

À colega de doutorado **Ludmila Moraes** pelo auxílio nos procedimentos desta pesquisa.

À **Luisa Mercado**, por todas as dicas, apoio e companhia quase que diária, por alguns meses. Tu tornaste o ambiente de trabalho mais leve. Sentiremos falta da rotina diária do LABIM!

## LISTA DE TABELAS

### Artigo

<b>Table 1.</b> Sequences, annealing temperature and fragment length for nucleotides used in the PCR reactions.....	31
<b>Table 2.</b> Sequences and fragment length for nucleotides used in the PCR reactions.....	32
<b>Table 3.</b> Clinical and radiographic characteristics of the sampled teeth.....	33
<b>Table 4.</b> Frequency of microorganisms in different niches of the oral cavity.....	34

## RESUMO

Alguns estudos caracterizaram a microbiota de canais radiculares de dentes decíduos com necrose pulpar como polimicrobiana, com predomínio de microrganismos anaeróbios. No entanto, nenhum estudo até o presente momento investigou a presença de genes de resistência a antimicrobianos em diferentes ecossistemas da cavidade oral de crianças. Este estudo tem por objetivo determinar a presença de espécies de *Prevotella* e do gene *cfxA/cfxA2* associados à resistência à beta-lactâmicos, em diferentes ecossistemas orais de crianças com necrose pulpar. Vinte e sete crianças, que estavam sob cuidados odontológicos no Ambulatório de Clínica Infanto-Juvenil da Faculdade de Odontologia da UFRGS, e que apresentavam, pelo menos, um dente decíduo com necrose pulpar foram selecionados para este estudo. Foram coletadas amostras de saliva, biofilme supragengival, biofilme da câmara pulpar e do canal radicular de 32 dentes (27 posteriores e 5 anteriores). Após isolamento do DNA microbiano, a presença das bactérias *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Prevotella tanneriae* e do gene *cfxA/cfxA2* foi avaliada através do método de PCR. A amostra foi composta de pacientes com idade média de 5,5 anos ( $\pm 1,76$ ). A taxa total de espécies de *Prevotella* foi de 29,1%, 25%, 21,8% e 32,29% em amostras de saliva, biofilme, câmara pulpar e canal radicular, respectivamente. As três espécies juntas não foram detectadas em todos os micro-ambientes do mesmo paciente, mas estavam presentes em 3,1% (n=1) de amostras do canal radicular. *Prevotella nigrescens* foi a bactéria mais frequentemente encontrada em todos os ecossistemas estudados. Foram observadas diferenças estatisticamente significativas em relação à presença de *P. nigrescens* em pelo menos um local e idade do paciente (teste t,  $p = 0,04$ ). Também foi encontrada associação entre a presença desta bactéria, em pelo menos um local e uso de antimicrobianos (teste exato de Fisher,  $p = 0,014$ ). A presença do gene de resistência à beta-lactâmicos, *cfxA/cfxA2*, foi testada em 12 pacientes da amostra, nos quatro micro-ambientes orais. Entre esses pacientes, 55,6% eram meninas, com idade média de 6 anos ( $\pm 2,5$ ). Não foi detectada a presença deste gene em nenhuma amostra investigada. Os dados sugerem que a cavidade bucal de crianças com necrose pulpar apresenta presença diversificada de espécies de *Prevotella* em diferentes micro-ambientes orais. A ausência do gene *cfxA/cfxA2* foi observada em todas as amostras investigadas. Estudos futuros, testando a presença de outros genes de resistência à beta-lactâmicos, são importantes para uma investigação abrangente.

Palavras-chave: Resistência anti-microbiana, Saliva, Biofilme, Canal Radicular, Biologia Molecular, Dentes decíduos.



## ABSTRACT

Some studies characterized the microbiota of root canals of primary teeth with pulp necrosis as polymicrobial, with a predominance of anaerobic microorganisms. However, no study to date has investigated the presence of antimicrobial resistance genes in different ecosystems of the oral cavity of children. This study aims to determine the presence of *Prevotella* species and genes associated with resistance to beta-lactams in different oral environments of children with pulp necrosis. Twenty-seven children who were under dental care at the Children and Youth Clinic (Dental School, UFRGS, Porto Alegre, Brazil), and who had at least one primary tooth with pulp necrosis were selected for this study. Saliva, supragingival biofilm, pulp chamber biofilm and root canal biofilm were collected of 32 teeth (27 posterior and 5 anterior). After isolation of microbial DNA, the presence of *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Prevotella tanneriae* and *cfxA/cfxA2* gene were evaluated using the PCR. The sample consisted of patients with a mean age of 5.5 years ( $\pm 1.76$ ). The total rate of *Prevotella* species was 29.1%, 25%, 21.8% and 32.29% in saliva samples, biofilm, pulp chamber and root canal, respectively. The three strains were not detected in all environments of the same patient, but were present at 3.1% ( $n = 1$ ) of the root canal samples. *Prevotella nigrescens* was the most common bacteria in all oral environments. Statistical significant differences were observed for the presence of *P. nigrescens* at least one oral environment and age of the patient (t-test,  $p = 0.04$ ). Also an association was observed, among the presence of these bacteria in at least one environment and use of antimicrobials (Fisher's exact test,  $p = 0.014$ ). The presence of the resistance gene to beta-lactams, *cfxA/cfxA2*, was tested on 12 patients of the sample at all four oral environments. Among these patients, 55.6% were girls with a mean age of 6 years ( $\pm 2.5$ ). Absence of this gene in the sample investigated was detected. The absence of *cfxA/cfxA2* gene was observed in all the investigated samples. Future studies testing the presence of other resistance genes to beta-lactams, are important for a comprehensive investigation.

Keywords: Drug Resistance, Saliva, Biofilm, Root Canal, Molecular Biology, Primary teeth.

## SUMÁRIO

<b>1 ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>09</b>
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>13</b>
<b>3 ARTIGO .....</b>	<b>14</b>
<b>4 CONCLUSÃO .....</b>	<b>35</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>36</b>
<b>APÊNDICE .....</b>	<b>39</b>
<b>ANEXO .....</b>	<b>40</b>

## 1 ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVA

Apesar da redução da incidência da cárie, proporcionada pela incorporação de medidas preventivas, esta ainda é considerada um problema de saúde pública no Brasil, em virtude de seus altos índices encontrados entre a população (BRASIL, 2011).

Nos casos mais severos de cárie dentária, quando a agressão microbiana atinge a polpa, ocorre a necrose e decomposição do tecido pulpar (BROOK, 1981). Após a colonização do sistema de canais radiculares, a infecção estende-se para os tecidos apicais, podendo causar alterações no tecido ósseo e potencialmente afetar o germe do dente permanente sucessor, no caso de dentes decíduos.

Dessa forma, nestes casos, a terapia pulpar visa à erradicação do processo infeccioso, com a eliminação dos microrganismos, restos necróticos pulpares e drenagem dos produtos da infecção, seguido da prevenção de subsequente re-infecção (ESPÍNDOLA *et al.*, 2002; GABARDO *et al.*, 2009). Para a realização da sanificação dos canais radiculares, é utilizado um preparo químico-mecânico, com auxílio de instrumentos endodônticos e soluções químicas de irrigação, a fim de promover a limpeza e modelagem dos canais (LOPEZ & SIQUEIRA JR., 2004). A Academia Americana de Odontopediatria (AAPD 2004) sugere a utilização de Digluconato de Clorexidina e/ou Hipoclorito de Sódio na concentração de 1%, como soluções irrigadoras em dentes decíduos acometidos com necrose pulpar. Após a sanificação, é realizado um selamento dos canais radiculares, por meio de pastas com ação antimicrobiana. Os materiais mais comumente utilizados, em odontopediatria, para este fim, são o Óxido de Zinco e Eugenol, pasta contendo Cloranfenicol, Tetraciclina e Óxido de Zinco e Eugenol (CTZ), Hidróxido de Cálcio e Pasta Iodoformada (DUNSTON B. & COLL J.A, 2008).

Embora seja uma terapia complexa, uma vez que possui vários passos e exige técnica do operador e comportamento colaborativo do paciente, o tratamento endodôntico em dentes decíduos é muito importante. Isso porque a perda precoce de dentes decíduos pode vir a comprometer o desenvolvimento do sistema estomatognático e o estabelecimento da dentição permanente, promovendo alterações ortodônticas e estéticas, e, por consequência, podendo ocasionar problemas emocionais, psicológicos e comportamentais (CORDEIRO MMR & ROCHA MJC, 2005; KRAMER *et al.*, 2000).

As infecções endodônticas podem ser caracterizadas como agudas ou crônicas, dependendo da presença ou ausência de sintomatologia dolorosa, respectivamente. A presença

ou ausência de sintomatologia dolorosa espontânea está associada às características específicas da composição microbiana, tanto qualitativamente quanto quantitativamente (JACINTO *et al.*, 2003). Já a intensidade dos sinais e sintomas parece estar relacionada às características da composição das comunidades microbianas (SANTOS *et al.*, 2011).

Dessa forma, observa-se o importante papel dos microrganismos na patogênese das alterações pulpares e periapicais e a importância de sua eliminação para a obtenção do sucesso do tratamento endodôntico. Em dentes decíduos infectados, as lesões se desenvolvem na bi ou trifurcação, diferentemente dos dentes permanentes, onde a lesão se estabelece na região apical. Este fato relaciona-se não somente pela anatomia diferenciada que esses dentes possuem, com elevada quantidade ramificações e de canais acessórios, mas também à presença de determinados tipos bacterianos nesses sítios (GOMES *et al.*, 2013).

Em alguns casos, os agentes antimicrobianos são utilizados como medidas adicionais à terapia endodôntica para controlar processos agudos, principalmente em pacientes nos quais se observam sinais e sintomas que denotam disseminação sistêmica do processo infeccioso (WYNN & BERGMAN, 1994; ANDRADE & SOUZA-FILHO, 2006; MORAES *et al.*, 2015). Os antibióticos mais prescritos, para infecções endodônticas, são os beta-lactâmicos, como, por exemplo, as penicilinas (SALAKO *et al.*, 2004; DAR-ODEH NS *et al.*, 2013). Atualmente, o uso generalizado de antibióticos, muitas vezes, desnecessário e impreciso, tem proporcionado um desenvolvimento crescente de resistência, tornando este um problema global (OWENS-JR RC, 2008; HAWKEY PM, 2008). Assim, torna-se imprescindível a realização periódica de testes laboratoriais para detectar e monitorar continuamente a suscetibilidade desses microrganismos (WEXLER HM, MOLITORIS E, FINEGOLD SM 1993; VAN STEENBERGEN *et al.*, 1993).

Os mecanismos da resistência a antibióticos têm sido atribuídos a genes, e estudos têm demonstrado que a microbiota humana, inclusive a da cavidade oral, pode atuar como um reservatório para os genes de resistência a esses medicamentos (SOARES *et al.*, 2012). O mecanismo mais eficiente de resistência antimicrobiana é a produção de enzimas (CHAMBERS HF & SANDER MA, 1996). Moraes *et al.* (2015) mostraram recentemente a presença do gene *cfxa/cfxa2*, que é associado à degradação de beta-lactâmicos, em diferentes micro-ambientes da cavidade oral de adultos com e sem infecção (MADINIER I *et al.*, 2001).

Devido ao importante papel dos microrganismos na patogênese das alterações pulpares e periapicais, torna-se essencial estudá-los e também seus mecanismos de resistência a fim de permitir o controle/eliminação e, conseqüentemente, obter sucesso no tratamento.

Tradicionalmente, a identificação de bactérias é realizada em meio de cultura sólido ou líquido à base de métodos de crescimento bioquímicos. Esses procedimentos são trabalhosos, caros e demorados (LUIZ FERNANDO TOMAZINHO, MARIO J. & AVILA-CAMPOS, 2007). Avanços nas técnicas de diagnóstico que utilizam métodos de biologia molecular têm permitido a identificação de microrganismos e comunidades microbianas, bem como fatores de virulência e sua patogenicidade (GOMES & MONTAGNER, 2010).

Os métodos moleculares são considerados rápidos, sensíveis e precisos, permitindo, assim, a detecção de diversas espécies microbianas, porém possuem um custo bastante elevado (LUIZ FERNANDO TOMAZINHO, MARIO J. & AVILA-CAMPOS, 2007). Estes métodos são baseados em sequências de ácidos nucleicos e têm sido utilizados para identificar microrganismos em infecções endodônticas, especialmente aqueles de difícil cultivo, ainda não cultivados ou também detectar as células que já não são viáveis (SIQUEIRA & RÔÇAS, 2005). Dessa forma, podem auxiliar na caracterização da microbiota dos canais radiculares a fim de que se consiga determinar sua associação com sintomas clínicos, além de fatores relacionados ao prognóstico clínico e ao tratamento a ser realizado (FOUAD *et al.*, 2002).

A técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é a que apresenta alta sensibilidade e especificidade na detecção de microrganismos. O PCR é um método *in vitro* para replicação de sequências específicas de DNA. Tendo início com uma pequena quantidade de DNA (cerca de uma célula bacteriana), o PCR amplia a um bilhão de vezes uma sequência específica conhecida do DNA microbiano, permitindo, dessa forma, a sua posterior detecção. Por sua alta sensibilidade e habilidade de detectar microrganismos incultiváveis, Dixet *al.* (1990) relatam que vários autores têm preferido este método à cultura na identificação microbiana. Ocorreu, por conta destes avanços tecnológicos, uma redefinição da composição da microbiota dos canais radiculares em dentes permanentes (SIQUEIRA & RÔÇAS, 2005). Entretanto, poucos são os estudos que caracterizam a infecção endodôntica presente em dentes decíduos, considerando a presença e ausência de sintomatologia dolorosa e a influência de fatores locais sobre ela.

Estudos realizados para caracterizar a microbiota de canais radiculares em dentes decíduos com necrose pulpar sugerem que, nesses casos, há uma infecção polimicrobiana constituída predominantemente por microrganismos anaeróbios (PAZELLI *et al.*, 2003; SILVA LAB *et al.*, 2006; GOMES *et al.*, 2013; TAVARES *et al.*, 2011). Os microrganismos *Treponema denticola*, *Enterococcus faecalis*, *Prevotella gingivalis* foram frequentemente detectados por Cogulu *et al.* (2008) em dentes decíduos humanos com infecção endodôntica e

sintomatologia dolorosa. Yang *et al* (2010) detectaram gêneros *Prevotella* (24%), *Fusobacterium* (17,7%), *Porphyromonas* (13,9%) em abscessos apicais agudos em crianças. *Prevotella gingivalis* (100%), *Prevotella nigrescens* (93,3%), *Prevotella tanneriae* (40%), *Treponema denticola*, (40%) foram detectados por Gomes *et al* (2013) em amostras de canais radiculares de dentes decíduos humanos com necrose pulpar.

Como visto, alguns estudos têm caracterizado a microbiota de canais de dentes decíduos com necrose pulpar. Porém, nenhum estudo, até o presente momento, investigou a presença de genes de resistência em diferentes ecossistemas da cavidade bucal de crianças.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Este trabalho teve como objetivo verificar a presença de espécies de *Prevotella* e gene de resistência antimicrobiana em diferentes ecossistemas orais de crianças com necrose pulpar em dentes decíduos.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Detectar a presença dos microrganismos *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Prevotella tanneriae* em amostras de saliva, biofilme microbiano supragengival, câmara pulpar e canal radicular de dentes decíduos humanos em pacientes acometidos por necrose pulpar.
- Detectar a presença do gene *cfxA/cfxA2* em amostras de crianças acometidas por necrose pulpar.
- Associar a presença das espécies de *Prevotella* a parâmetros clínicos e radiográficos, como: presença de sintomatologia dolorosa, fístula, edema, espessamento do espaço do ligamento periodontal.

### 3 ARTIGO

#### ***Prevotella* strains and lactamic resistance gene distribution in different oral environments of children with pulp necrosis**

Bruna Roese de Lima<sup>1</sup>, Clarissa Cavalcanti Fatturi-Parolo<sup>2</sup>, Maria Beatriz Cardoso Ferreira<sup>3</sup>, Francisco Montagner<sup>4</sup>, Luciano Casagrande<sup>1</sup>

**Short title:** *Prevotella* strains and *cfxA/cfxA2* gene in oral niches of children with pulp necrosis

<sup>1</sup>Post-Graduate Program in Pediatric Dentistry, Federal University of Rio Grande do Sul - UFRGS, Porto Alegre, Brazil

<sup>2</sup>Department of Preventive and Social Dentistry, Cariology Division, Federal University of Rio Grande do Sul - UFRGS, Porto Alegre, Brazil

<sup>3</sup>Department of Pharmacology, Sciences Institute of Basic Health, Federal University of Rio Grande do Sul - UFRGS, Porto Alegre, Brazil

<sup>4</sup>Post-Graduate Program in Endodontics, Federal University of Rio Grande do Sul - UFRGS, Porto Alegre, Brazil

Keywords: Drug Resistance, Saliva, Biofilm, Root Canal, Molecular Biology, Primary teeth.

#### **Corresponding author:**

Luciano Casagrande

Post-Graduate Program in Pediatric Dentistry, Federal University of Rio Grande do Sul

Ramiro Barcelos 2492, BomFim, Porto Alegre, RS 90.035-003, Brazil

Telephone: 0XX(51) 3308 5493

E-mail: [luciano.casagrande@ufrgs.br](mailto:luciano.casagrande@ufrgs.br); [luciano.casagrande@gmail.com](mailto:luciano.casagrande@gmail.com)



## Summary

**Background:** Studies have characterized the microbiota of root canals in primary teeth with pulp necrosis as polymicrobial with predominance of anaerobic microorganisms. However, no study has already investigated the presence of antimicrobial resistance genes in different ecosystems of the oral cavity of children. **Aim:** To determine the presence of *Prevotella* species and *cfxA/cfxA2* gene associated with resistance to lactamics in different oral niches from children with pulp necrosis. **Design:** Saliva (S), supragingival biofilm (SB), pulp chamber biofilm (PC) and root canal biofilm (RC) were collected. The presence of *P. intermedia*, *P. nigrescens*, *P. tanneriae* and *cfxA/cfxA2* gene was assessed by PCR. **Results:** The sample comprised 27 patients (mean age of 5.5 years  $\pm$  1,76). Thirty-two teeth were sampled. The total rate detection of *Prevotella* strains was 29.1% (S), 25% (B), 21.8% (PC) and 32.29% (RC). *P. nigrescens* was the most commonly detected specie in all oral niches and differences were observed concerning patient's age ( $p=0.04$ ). The *cfxA/cfxA2* gene was not detected in any oral niche. **Conclusion:** The data suggest that the oral cavity of children with pulp necrosis has a variable distribution of *Prevotella* strains in different niches. The *cfxA/cfxA2* gene was not detected in the selected samples.

## Introduction

The endodontic infection in primary teeth occurs after necrosis and decomposition of pulp tissue by microbial aggression<sup>1</sup>. The process occurs through the incursion and microbial growth inside in the pulp chamber and root canals<sup>2</sup>. After the bacterial colonization of the root canal system, the infection can reach to the apical tissues, causing alterations in bone structure by the phagocyte activity of macrophages in response to bacterial toxins.

The treatment of endodontic infections, in primary teeth, involves the disinfection of root canals by chemical-mechanical preparation using bactericidal/bacteriostatic solutions and posterior filling with a paste with bactericidal properties, followed by the final restoration of the tooth. However, in some cases, antimicrobial agents are used as additional measures to control acute processes<sup>3</sup>. The most frequently prescribed antibiotics, in dentistry, are the beta-lactams such as penicillin<sup>4,5</sup>.

Currently, the widespread use of antimicrobial therapy, often unnecessary and inaccurate, affects the development of microbial resistance. Mechanisms of bacterial resistance to antibiotics has been attributed to resistance genes and demonstrated that the human microbiota, including the oral cavity, can act as a reservoir for antibiotic resistance genes<sup>6</sup>.

Advances in diagnostic techniques using molecular biology methods have enabled the identification of microorganisms and microbial communities, as well as virulence factors and its pathogenicity<sup>7</sup>. In the last years, researches have investigated the presence of bacterial genes conferring resistance to antibiotics in clinical samples infections<sup>8,9</sup>. Recently, Moraes et al (2015)<sup>3</sup> showed the presence of *cfxA/cfxA2* gene in different niches of the oral cavity of adults with and without endodontic infections. This resistance gene was cloned from a strain of *Prevotella intermedia* and is associated with degradation of beta-lactams<sup>10</sup>.

Some studies characterized the microbiota of root canals of primary teeth with pulp necrosis as polymicrobial with predominance of anaerobic microorganisms<sup>11,12</sup>. However, no study yet has investigated the presence of antimicrobial resistance genes in different ecosystems of the oral cavity of children. Therefore, this study aims to identify the presence of *Prevotella* species and lactam resistant genes in different oral niches of pediatric patients and correlate with clinical and radiographic parameters.

## **Material and methods**

### *Subjects and Ethical aspects*

This research was approved by the Ethics Committee in Research (CAAE:09190712.1.0000.5347) from the Federal University of Rio Grande do Sul (Porto Alegre, RS, Brazil). Sample size and the methodology used in this study was based on the research conducted by Moraes *et al* (2015)<sup>3</sup>.

Twenty-seven children who were under care at the Children and Youth Clinic (Dental School, UFRGS, Porto Alegre, Brazil) presenting, at least, one primary tooth with pulp necrosis were selected for this study. Children with systemic disease or using chronic medications were not included. Teeth with more than 1/3 of root resorption and with impossibility of performing rubber dam isolation were excluded. Clinical and radiographic data were recorded, as presence of pain, fistula, edema, thickening of the space of periodontal ligament, and periapical/furcation lesion. All guardians for the patients signed an informed consent form prior to the sample collections.

### *Clinical procedures and microbiological sample collection*

The non-stimulated saliva (S) was collected in a sterile eppendorf tube. Supragingival biofilm of related tooth with pulp necrosis was collected using sterile microbrushes (Dentisply

Caulk, Milford, USA) and placed immediately in sterile eppendorf tubes. The involved tooth was isolated with a rubber dam and, then, the operative field disinfection was performed with 30% hydrogen peroxide and 2.5% sodium hypochlorite, followed by neutralization with 5% sodium thiosulfate.

After caries removal, the pulp chamber was exposed under manual irrigation (sterile saline solution) using sterile burs. After coronal access, microbiological sample of the pulp chamber was collected with sterile cotton balls, which were in contact with the pulp chamber floor for 60s and stored in sterile plastic tubes<sup>3</sup>. Subsequently, paper points were introduced near the total length of the root canal according to the preoperative radiographs, remaining in this position for 1 minute. In cases of multi-rooted teeth, samples were collected from the widest root canal. Then, the paper cones were introduced sequentially into plastics tube. The samples were coded and stored in a freezer at -20 °C.

The teeth received specific endodontic treatment (1% sodium hypochlorite was the irrigation solution and the obturation was completed using calcium hydroxide paste thickened by zinc oxide, 3:1 weight proportion) and were restored with resin modified glass ionomer cement (Vitremer, 3M ESPE, St. Paul, MN, USA) or composite resin (Adper Single Bond and Filtek Z-350, 3M ESPE, St. Paul, MN, USA).

#### *Bacterial DNA extraction*

The microbial DNA was isolated with a Purelink Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen, São Paulo, Brazil) according to the manufacturer's recommendations. The DNA from all saliva, supragingival biofilm, pulp chamber and root canal samples was first amplified with universal prokaryotic ribosomal 16S primer (**Table1**)<sup>13</sup>.

#### *Detection of the Prevotella species and cfxA/cfxA2 gene by PCR*

The PCR amplification was used to detect the species *Prevotella intermedia*, *P. nigrescens* and *P. tanneriae*. Species-specific primers were used to target the region of the 16S

rRNA gene in bacterial DNA. The sequences of the oligonucleotides (5'-3') were obtained from the literature (**Table 1**)<sup>14,15,16</sup>.

PCR reactions were processed in the total amount of 25 µL for each sample and contained 2.5 µL of PCR buffer (10x Reaction Buffer, Invitrogen, São Paulo, São Paulo, Brazil); 0.5 µL of a mixture of phosphate deoxyribonucleotides (dNTPs (Invitrogen, São Paulo, São Paulo, Brazil), 1.25 µL of magnesium chloride (MgCl<sub>2</sub>, Invitrogen, São Paulo, São Paulo, Brazil); 0.75 µL of a 100 mM of Primer Forward (Invitrogen, São Paulo, São Paulo, Brazil), 0.75 µL of a 100 mM of Primer Reverse (Invitrogen, São Paulo, São Paulo, Brazil); 17,625 µL of DNAase-free ultrapure water and RNAase; 0,125 µL of the enzyme Taq DNA Polymerase (Taq Platinum, Invitrogen, São Paulo, São Paulo, Brazil) and 1µL of DNA extracted from clinical samples.

The steps of the PCR cycle comprised an initial denaturation (95 °C, 2 min); 36 cycles of denaturation (94 °C, 30 sec), annealing (temperature specific for each primer set for 1 min) and extension (72 °C, 2 min). Finally, there was a final extension (72 °C, 10 minutes). Aliquots of bacterial DNA extracted from strains were used as positive controls. The sequences of nucleotides, the specific temperatures of the annealing step, the length of the amplified fragment and bibliographic citation corresponding to each primer are showed in **Table 1**.

PCR technique was also used to detect the presence of *cfxA/cfxA2* gene in the microbial strain according to the protocol described by Giraud-Morin et al. (2003)<sup>17</sup>. According to the authors, the primers were designed from sequences deposited in Gen-Bank U38243 with the codes (*cfxA*) and AF118110 (*cfxA2*). The PCR reaction steps were as follows: initial denaturation (94°C; 5 min); 25 cycles of denaturation (94°C, 1 min); annealing (58°C, 1 min); extension (72°C, 30 s); and a final extension (72°C, 10 min). The sequences of nucleotides and the length of the each primer are showed in **Table 2**.

The presence of specific amplicons for each sample to the sequences studied was verified by agarose gel electrophoresis 1% (Invitrogen, São Paulo, SP, Brazil) in buffer Trisborato 10x diluted HCl (pH 8.0) and stained with bromide ethidium (5 mg/ml, Invitrogen, São Paulo, SP, Brazil). For each gel, was added a molecular weight marker 100 bp (DNA Ladder, Invitrogen, São Paulo, SP, Brazil). The electrophoresis conditions were 120 V for 30 minutes. Positive reactions were determined by the presence of bands with the proper length visualized under ultraviolet transillumination.

#### *Data Analysis*

The data (clinical features and bacteria/gene detected) were entered into a spreadsheet and analyzed (SPSS for Windows, SPSS Inc., Chicago, USA). *T*-test was used to analyze associations among the presence of bacteria and patient's age. Chi-square test was used to analyze associations among the presence of bacteria, use of antimicrobials and clinical/radiographic parameters. Significance was defined as 5%.

### **Results**

The sample comprised 27 patients (55% boys) with a mean age of 5.5 years ( $\pm 1.76$ ). All patients had at least one tooth with pulp necrosis, totaling thirty-two teeth sampled (7 anterior and 25 posterior). Fifty-five percent of the patients had gingivitis (GBi>20%) and the mean DMF-T was 7 ( $\pm 3.87$ ). Overall, 62.5% of the patients used antimicrobials and 34.4% of those used these medications up to 3 months prior to collection be performed. Clinical and radiographic characteristics of the teeth affected by pulp necrosis are showed in **Table 3**. No association was found among the presence of *Prevotella* strains and clinical/radiographic parameters.

All samples collected were positive for the presence of bacterial DNA as determined

by universal 16S rRNA gene-based PCR. The total rate of *Prevotella* strains was 29.1%, 25%, 21.8% and 32.29% in saliva, biofilm, pulp chamber and root canal samples, respectively. The three *Prevotella* strains were not detected in all environments within the same patient, but they were present in 3.1% of root canal samples. **Table 4** shows the frequency of the species in each oral niche collected.

*P. intermedia* was not found in any sample of saliva, and it was the less frequent bacteria in the other niches collected. In four cases, *P. intermedia* was detected in at least one niche collected, and only in one case this bacteria was present in three different oral niches (B, PC and RC). There was no association between the presence of *P. intermedia* in at least one of the oral environment and the use of antimicrobials (Fisher's exact test,  $p=0.620$ ).

Considering the three studied microorganisms, *P. tanneriae* was the one with intermediate frequency, ranging from 21.9% (biofilm samples) to 37.5% (root canal samples). No association was found between the presence of *P. tanneriae* in at least one of oral niches with the use of antimicrobials (Fisher's exact test,  $p=0.288$ ).

*P. nigrescens* was the most common bacteria in all oral niches, ranging from 40.6% to 59.4%, and its frequency in at least one oral niche was 87.5%. Statistical significant differences were observed concerning the presence of *P. nigrescens* in at least one oral niche and patient's age ( $t$  test,  $p=0.04$ ). There was association between the presence of *Prevotella nigrescens* at least in one niche and the use of antimicrobials (Fisher's exact test,  $p=0.014$ ).

The presence of *cfxA/cfxA2* lactamic resistance gene was tested in 12 patients in the four oral niches (S, B, PC and RC). Among these patients, 55.6% were girls with a mean age of 6 years ( $\pm 2.5$ ). All of these patients used antimicrobials and 50% of these used this medication up to 3 months prior to the collections. Only one patient reported spontaneous pain. It was not detected the presence of the *cfxA/cfxA2* gene in any oral niche collected from this sample.

## Discussion

The present research assessed the frequency of *Prevotella* strains (*P. intermedia*, *P. nigrescens* and *P. tanneriae*) in saliva, supragingival biofilm, pulp chamber and root canal samples from primary teeth with pulp necrosis of children. The overall rate of detection for *Prevotella* strains was 29.1%, 25%, 21.8% and 32.29% in saliva, biofilm, pulp chamber and root canal samples, respectively. Considering all oral niches, *P. nigrescens* was the most prevalent bacteria and *P. intermedia* was observed with less frequency.

The mean age of the patients was 5.5 ( $\pm 1.76$ ) and they had at least one tooth with pulp necrosis, mostly in chronic stage. Over half of the patients had gingivitis (GBi > 20%), and the mean of DMF-T was high ( $7 \pm 3.87$ ), considering that the mean DMF-T observed in the Brazilian population at 5 years old was 2.43<sup>18</sup>.

Most of the teeth in the sample were asymptomatic primary molars that at clinical examination presented carious lesion associated with fistula. In the radiographic examination, these teeth showed thickening in space and the periodontal ligament and bone lesion in furcation/periapical region. A previous study compared the characteristics of endodontic infections in samples obtained from primary and permanent teeth. The most prevalent species in primary teeth were *P. gingivalis* (16%) and *T. denticola* (16%). In permanent teeth, the most prevalent were *E. faecalis* (20%), *P. gingivalis* (32%) and *T. denticola* (32%). It was observed that the presence of *T. denticola* and *E. faecalis* is highly associated with periapical radiolucency prior and pain, while the incidence of *P. gingivalis* has been associated with sensitivity to the percussion in primary and permanent<sup>19</sup>. In our study no association was found between the presence of *Prevotella* strains and clinical/radiographic parameters. This observation is probably explained due to the homogeneity in the characteristics observed in the sample studied.



*Prevotella intermedia* was not found in any saliva sample, unlike than was observed in a similar study with adults, in which these strain appeared with high frequency<sup>3</sup>. The literature showed that *T. forsythia*, *P. intermedia*, *P. nigrescens* and *T. denticola* were detected more frequently in children with poor oral hygiene<sup>20</sup>. In the present study, *P. nigrescens* was also frequently found in children with unsatisfactory oral hygiene.

*P. nigrescens* seems to be a common member of microflora of healthy children and unhealthy. A study performed with Japanese children,found a high frequency of *P. nigrescens* in the saliva samples. It was observed that its frequency increased with the age of the patients<sup>21</sup>. This association corroborates with the results from our study.In addition, results from a study conducted with 56 children and adolescents and their parents suggested that *P. intermedia*, *P. nigrescens* were transmitted in an intrafamilial manner<sup>20</sup>.

There was a low frequency of *P. intermedia* in all the niches collected. The highest frequency of *P. intermedia* was found in root canal samples (12.5%). Although in adults with pulp necrosis literature shows more frequently of this bacterium<sup>3</sup>, our results are similar to findings from Gomes *et al* (2013), which detected a low frequency of these bacteria in root canal samples of primary teeth (6.7%)<sup>2</sup>. The low frequency of *P. intermedia* in the present study samples can be explained due to the almost total sample be composed of teeth with chronic infection. According to the literature, black-pigmented anaerobic bacteria are commonly associated with acute endodontic infections<sup>22</sup>. Sakamoto *et al* (2006), identified species of *Prevotella* as prevalent in endodontic infections, but *P. intermedia* were exclusively detected in symptomatic samples<sup>23</sup>.

*Prevotella nigrescens* has been identified as the pigment-black bacteria most prevalent in endodontic infections. *P. nigrescens* was the most prevalent bacteria found in the different niches of our study, presenting its highest frequency (59.4%) in saliva and root canal. The

similar frequency of these bacterium in root canal of primary teeth (56.2%) was already found<sup>11</sup>.

In general, the root canal infections are mixed and semi-specific infections, with great predominance of strict and facultative anaerobic bacteria. However, there is a great variability in relation to the bacterial species and their prevalence, found in different niches oral of children and adult patients. This diversity can be explained by clinical differences of the sample, such as previous use of antimicrobials, quality oral hygiene, characteristics of endodontic infection, among others. An important issue, which may also explain these differences in the frequency of microorganisms among literature studies, is the geographic location where the study is performed. Roças *et al.*, (2006), found significant differences in bacterial samples of acute periapical abscesses obtained in Portland (Oregon, USA) and Rio de Janeiro (Rio de Janeiro, Brazil)<sup>24</sup>. A study of healthy patients and subgingival periodontal lesions also found differences according to the locality observed<sup>25</sup>. The wide variability can be explained due to the environmental and dietary factors as well as the difference patterns of using antibiotics. Recently, Montagner *et al.* (2010)<sup>26</sup> showed that even paired samples from the same patient, collected from root canals and apical abscesses harbored distinct microbial communities. Therefore, microbial selection may be influenced by the environmental conditions that are observed in different niches, such as saliva, supragingival biofilm, pulp chamber and root canals from primary teeth.

This present research, the presence of *Prevotella* strains in samples collected from the oral cavity of children was determined because bacteria belonging to this genus are beta-lactamase production species in dental infections<sup>27</sup>. Furthermore, lactamic agents are the most prescribed medicaments for endodontic infections<sup>4,5</sup>. A high rate of antibiotics use by patients in the sample was observed, which may have influenced the frequency of microorganisms investigated. In this way, it would be expected to find more antimicrobial resistance, which

did not occur in any sample (S, B, PC, RC). This could have occurred because the patients may have used others antibiotics, or they have used beta-lactams with an administration scheme (dosage, time of use) that doesn't favored the development of antimicrobial resistance. Recently, a survey conducted in a Pediatric Dental Service (UFRGS) to analyze the pattern of self-medication in cases of dental infection of children and pre-teens revealed a non-rational use of medications (data not published). It is estimated that more than 75% of the antimicrobial prescriptions are made inappropriately, and only about 50% of the patients take their medicines properly<sup>28</sup>.

Nevertheless, if these patients have used penicillin (taking into account 50% of the sample used antimicrobials up to 3 months prior to collection), not have occurred the development of antimicrobial resistance is a relevant clinical data. A research with chronic periodontal patients treated with antibiotics showed that antimicrobial resistance was observed in plaque samples before and after therapy be performed. However, the percentage of antibiotic-resistant isolates returned to baseline levels after 90 days of the administration of the medicine<sup>29</sup>.

The absence of *cfxA/cfxA2* gene in the samples may also have been associated to low frequency of *Prevotella intermedia* in our findings. As described in the literature, *cfxA/cfxA2* gene was cloned from a strain of *Prevotella intermedia* that had been isolated from oral cavity exhibiting 98% similarity to the sequence originally described for the *cfxA/cfxA2* gene in *Bacteroides vulgatus*<sup>30</sup>. Moraes et al. (2015)<sup>3</sup> also observed absence of the gene *cfxA/cfxA2* in root canal samples of teeth with chronic infections.

Beta-lactamase production is encoded by chromosomal genes, such as *cfxA/cfxA2*, *cblA*, *cepA*, *cfiA* and *blaTEM*<sup>3,31</sup>. A recent systematic review showed that the frequencies of *blaTEM* gene in root canal samples ranged from 17-43%, while the detection of *cfxA/cfxA2*

gene ranged from 0-40%<sup>31</sup>. Thus, the absence of *cfxA/cfxA2* gene in the studied sample does not mean that there are no bacteria resistant to beta-lactamic in the niches of the oral cavity.

The homogeneity of the sample could be considered a limitation of the study, since the patients were composed predominantly of patients with chronic infection, fistula and periapical lesion. Possibly, in a sample comprising a comparable group of children with acute endodontic infection, the results could yield some associations. The high prevalence of using antibiotics is also another potential bias factor, which may have influenced the findings. However, the high use of antibiotics is a common condition in children living in southern Brazil that are affected, especially in the winter, by respiratory tract infections<sup>32</sup>.

In conclusion, our data suggest that the oral cavity of children with pulp necrosis had diverse detection rates for *Prevotella* strains in the different niches. *Prevotella nigrescens* was the most commonly detected bacteria. No association was found among the presence of *Prevotella* strains and clinical/radiographic parameters. The absence of *cfxA/cfxA2* gene was observed in all samples investigated. Future studies with other resistant genes to beta-lactams are necessary for a comprehensive understanding of the mechanisms associated with the development of resistance to lactamic agents in bacteria from the oral cavity of children.

### **What this paper adds?**

- This paper adds information not yet reported in the literature about the presence of *Prevotella* strains and resistant genes to antimicrobials in different oral niches of children. This is the first study investigating the presence of *cfxA/cfxA2* gene in children with pulp necrosis. Although the occurrence of *cfxA/cfxA2* gene was not observed in patients with chronic endodontic infection, further studies with acute cases and with other resistant genes to beta-lactams are necessary for a comprehensive understanding of the mechanisms associated with the development of resistance to lactamic agents, which ultimately compromise the success of endodontic treatments performed.

### **What this paper is important to paediatric dentists?**

- This study provides information on the presence of certain bacterial species in teeth with pulp necrosis in different environments of the oral cavity of children. Furthermore, it addresses the investigation of resistance genes to antimicrobial agents, which can compromise the success of endodontic treatment.

### **Conflict of interest**

- The authors deny any conflicts of interest. We affirm that we have no financial affiliation (e.g., employment, direct payment, stock holdings, retainers, consultantships, patent licensing arrangements, or honoraria), or involvement with any commercial organization with direct financial interest in the subject or materials used in the manuscript, nor have any such arrangements existed in the past 3 years.

## **Acknowledgements**

Juliane Brustolin for helping in screening, collections and carrying out treatment of patients.

Alejandra Tejada Seminario for helping in the laboratory part of this study.

## References

1. Brook I, Grimm S, Kielich RB. Bacteriology of acute periapical abscess in children. *J Endod.* 1981; 7(8): 378-80.
2. Gomes GB, Sarkis-Onofre R, Bonow MLM, Etges A, Jacinto RC. An investigation of the presence of specific anaerobic species in necrotic primary teeth. *Braz Oral Res.* 2013; 27(2):149-55.
3. Moraes LC, Fatturi-Parolo, CC, Ferreira MBC, Só MVR, Montagner F. Saliva, supragingival biofilm and root canals can harbor gene associated with resistance to lactamic agents. *Braz Oral Res.* 2015; 29(1):1-6.
4. Salako NO, Rotimi VO, Adib SM, Al-Mutawa S. Pattern of antibiotic prescription in the management of oral diseases among dentists in Kuwait. *J Dent.* 2004; 32:503-90.
5. Dar-Odeh NS, Al-Abdalla M, Al-Shayyab MH, Obeidat H, Obeidat L, Kar MA, Abu-Hammad OA. Prescribing Antibiotics for pediatric dental patients in Jordan; knowledge and attitudes of dentists. *The International Arabic Journal of Antimicrobial Agents.* 2013. 3(3:4).
6. Soares GMS, Figueiredo LC, Faveri M, Cortelli SC, Duarte PM, Feres M. Mechanisms of action of systemic antibiotics used in periodontal treatment and mechanisms of bacterial resistance to these drugs. *J Appl Oral Sci.* 2012 May-Jun; 20(3): 295–304.
7. Gomes BP, Montagner F. O papel do diagnóstico molecular no estudo das infecções de origem endodôntica: conceitos, técnicas e aplicações. In: Bombana AC, Ferrari PHP. *A Infecção endodôntica e sua resolução*, São Paulo: Liv. Santos, 2010.
8. Rôças IN, Siqueira Junior JF. Antibiotic resistance genes in anaerobic bacteria isolated from primary dental root canal infections. *Anaerobe.* 2012 Dec;18(6):576-80.
9. Rôças IN, Siqueira Junior JF. Detection of antibiotic resistance genes in samples from acute and chronic endodontic infections and after treatment. *Arch Oral Biol.* 2013 Sep;58(9):1123-8.
10. Madinier I, Fosse T, Giudicelli J, Labia R. Cloning and biochemical characterization of a class A beta-lactamase from *Prevotella intermedia*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45(8):2386-9.
11. Tavares WLF, Neves de Brito LC, Teles RP, MLA Massara MLA, Ribeiro-sobrinho AP, Haffajee AD, Socransky SS, Teles FR. Microbiota of primary endodontic infections analyzed by MDA and Checkerboard DNA-DNA hybridization. *IntEndod J.* 2011; 44(3): 225–235.
12. Silva LAB, Nelson-Filho P, Faria G, Souza-Gugelmin MCM, Ito IY. Bacterial Profile in Primary Teeth with Necrotic Pulp and Periapical Lesions. *Braz Dent J.* 2006; 17(2): 144-148.
13. Nadkarni MA, Martin FE, Jacques NA, Hunter N. Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set. *Microbiol* 2002;148:257–266.
14. Slots J, Ashimoto A, Flynn MJ, Li G, Chen C. Detection of putative periodontal pathogens in subgingival specimens by 16S ribosomal DNA amplification with the polymerase chain reaction. *Clin Infect Dis* 1995; 20 Suppl 2:S304-7.
15. Bogen G, Slots J. Black-pigmented anaerobic rods in closed periapical lesions. *IntEndod J* 1999; 32: 204-10.
16. Xia T, Baumgartner JC, David LL. Isolation and identification of *Prevotella tanneriae* from endodontic infections. *Oral Microbiol Immunol* 2000; 15:273-5.
17. Giraud-Morin, Madinier I, Fosse T. Sequence analysis of cfxA2-like  $\beta$ -lactamases in *Prevotella* species. *J Antimicrob Chemother.* 2003; 51:1293-1296.

18. Brasil. Ministério da Saúde (MS). SB Brasil 2010. Brasília: MS; 2012.
19. Cogulu D, Uzel A, Oncag O, Eronat C. PCR-based identification of selected pathogens associated with endodontic infections in primary and permanent teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2008 Sep;106(3):443-9.
20. Umeda M, Miwa Z, Takeuchi Y, Ishizuka M, Huang Y, Noguchi K, Tanaka M, Takagi Y, Ishikawa I. The distribution of periodontopathic bacteria among Japanese children and their parents. *J Periodontal Res.* 2004 Dec; 39 (6):398-404.
21. Ooshima T, Nishiyama N, Hou B, Tamura K, Amano A, Kimura S. Occurrence of periodontal bacteria in healthy children: a 2-year longitudinal study. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2003; 31:417–425.
22. Rôças IN, Siqueira JF, Andrade AFB, Uzeda M. Identification of selected putative oral pathogens in primary root canal infections associated with symptoms. *Anaerobe.* 2002. 8: 200-208.
23. Sakamoto M, Rôças IN, Siqueira JF Jr, Benno Y. Molecular analysis of bacteria in asymptomatic and symptomatic endodontic infections. *Oral Microbiol Immunol* 2006; 21:112–122.
24. Rôças IN, Baumgartner JC, Xia T, Siqueira JF Jr. Prevalence of selected bacterial named species and uncultivated phylotypes in endodontic abscesses from two geographic locations. *J Endod.* 2006a; 32(12): 1135-1138.
25. Haffajee AD, Bogren A, Hasturk H, Feres M, Lopez NJ, Socransky SS. Subgingival microbiota of chronic periodontitis subjects from different geographic locations. *J Clin Periodontol.* 2004; 31(11): 996–1002.
26. Montagner F, Gomes BP, Kumar PS. Molecular fingerprinting reveals the presence of unique communities associated with paired samples of root canals and acute apical abscesses. *J Endod.* 2010 Sep; 36(9):1475-9.
27. Fosse T, Madinier I, Hitzig C, Charbit Y. Prevalence of beta-lactamase-producing strains among 149 anaerobic gram-negative rods isolated from periodontal pockets. *Oral Microbiol Immunol.* 1999 Dec; 14(6):352-7.
28. World Health organization. The selection and use of essential medicines. World Health Organization technical report series. 2003; 914:i-vi, 1-126.
29. Feres M, Haffajee AD, Allard K, Som S, Goodson JM, Socransky SS. Antibiotic resistance of subgingival species during and after antibiotic therapy. *J Clin Periodontol.* 2002 Aug; 29(8):724-35.
30. Geddes AM, Klugman KP, Rolinson GN. Introduction: historical perspective and development of amoxicillin/clavulanate. *Int J Antimicrob Agents.* 2007 Dec; 30(2):109-12.
31. Moraes LC, S6 MV, Dal Pizzol Tda S, Ferreira MB, Montagner F. Distribution of genes related to antimicrobial resistance in different oral environments: a systematic review. *J Endod.* 2015 Apr;41(4):434-41.
32. Tavares NU, Bertoldi AD, Muccillo-Baisch AL. Antimicrobial prescription in family health units in Southern Brazil. *Cad Saude Publica.* 2008 Aug;24(8):1791-800.



**Table 1.** Sequences, annealing temperature and fragment length for nucleotides used in the PCR reactions.

<b>Specie</b>	<b>Sequence</b>	<b>Annealing (°C)</b>	<b>Fragment</b>
<i>Universal 16SrRNA</i> <sup>13</sup>	5' TCC TAC GGG AGG CAG CAG T 3' 5' GGA CTA CCA GGG TAT CTA ATC CTG TT 3'	60	466 bp
<i>P. intermedia</i> <sup>14</sup>	5' TTT GTT GGG GAG TAA AGC GGG 3' 5' TCA ACA TCT CTG TAT CCT GCG T 3'	58	575 bp
<i>P. nigrescens</i> <sup>15</sup>	5' ATG AAA CAA AGG TTT TCC GGT AAG 3' 5' CCC ACG TCT CTG TGG GCT GCG A 3'	58	804 bp
<i>P. tanneræ</i> <sup>16</sup>	5' CTT AGC TTG CTA AGT ATG CCG 3' 5' CAG CTG ACT TAT ACT CCC G 3'	55	550 bp

**Table 2.** Sequences and fragment length for nucleotides used in the PCR reactions.

<b>Primer</b>	<b>Sequence</b>	<b>Fragment</b>
<i>cfxA</i>	5'-CGTAGTTTTGAGTATAGCTTT-3' 5'- GATGTTGCCTATATATGTC-3'	802 bp
<i>cfxA2</i>	5'-GAAAAAACAGAAAAACAAATC-3' 5'-TTAAGATTTACTGAAGTTTG-3'	966 bp

**Table 3.** Clinical and radiographic characteristics of the sampled teeth.

<b>Variables</b>	<b>n [%]</b>
<b>Type of tooth</b>	
anterior	07 [21.9]
posterior	25 [78.1]
<b>Tooth status</b>	
restored	08 [75.0]
Carious	24 [25.0]
<b>Dental pain</b>	
absent	27 [84.4]
present	05 [15.6]
<b>Periapical/furcation lesion</b>	
absent	03 [9.4]
present	29 [90.6]
<b>Fistula</b>	
absent	15 [46.9]
present	17 [53.1]
<b>Dental mobility</b>	
absent	30 [93.7]
present	02 [6.3]
<b>Edema</b>	
absent	26 [81.3]
present	06 [18.7]
<b>Thickening of periodontal ligament space</b>	
absent	07 [21.9]
present	25 [78.1]

**Table 4.** Frequency of microorganisms in different niches of the oral cavity.

<i>Prevotella</i> species	Saliva	Supra-gingival biofilm	Pulp chamber	Root Canal
<i>P. intermedia</i>	0 (0%)	1 (3.1%)	1 (3.1%)	4 (12.5%)
<i>P. nigrescens</i>	19 (59.4%)	17 (53.1%)	13 (40.6%)	19 (59.4%)
<i>P. tanneriae</i>	9 (28.1%)	7 (21.9%)	8 (25.0%)	12 (37.5%)

#### 4 CONCLUSÃO

- Nossos dados mostraram que a cavidade bucal de crianças com necrose pulpar apresentou diversas taxas de detecção de espécies de *Prevotella* nos diferentes nichos estudados. *Prevotella nigrescens* foi a espécie mais frequentemente encontrada em todos os nichos.
- Não foi observada a presença do gene *cfxa/cfxa2* nas amostras investigadas. Estudos futuros com outros genes de resistência são necessários para uma compreensão mais abrangente dos mecanismos associados ao desenvolvimento de resistência aos agentes beta-lactâmicos em bactérias da cavidade oral de crianças.
- Nenhuma associação foi encontrada entre a presença de espécies de *Prevotella* e parâmetros clínicos/radiográficos.

## REFERÊNCIAS

- AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRIC DENTISTRY. Guideline on pulp therapy for primary and young permanent teeth. In: **Reference Manual** 2005-2006. Chicago (IL); 2004: p.130-34.
- ANDRADE ED, SOUZA-FILHO FJ. Protocolos Farmacológicos em Endodontia. In: Andrade ED, organizador. **Terapêutica Medicamentosa em Odontologia**. 2. ed. São Paulo: Artes Médicas; p. 169-178, 2006.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE - SB Brasil 2011: Pesquisa Nacional de Saúde Bucal: resultados principais / Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde – Brasília: Ministério da Saúde, 2011.;116p.
- BROOK I, GRIMM S, KIELICH RB. Bacteriology of acute periapical abscess in children. **J Endod**, v. 7, n. 8, p. 378-380, 1981.
- CHAMBERS HF, SANDER MA. Antimicrobial agents – The aminoglycosides. In: Goodman LS, Limbird LE, Milinoff PB, Gilman AG, Hardman JG, editors. **Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 9th ed. New York: McGraw-Hill; 1996. p. 1103–1121.
- COGULU D, UZEL A, ONCAG O, ERONAT C. PCR-based identification of selected pathogens associated with endodontic infections in primary and permanent teeth. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 106, n. 3, p. 443-449, 2008.
- CORDEIRO MM, ROCHA MJ. The effects of periradicular inflammation and infection on a primary tooth and permanent successor. **J Clin Pediatric Dent**, v. 29, n. 3, p. 193-200, 2005.
- DAR-ODEH NS, AL-ABDALLA M, AL-SHAYYAB MH, OBEIDAT H, OBEIDAT L, KAR MA, ABU-HAMMAD OA. Prescribing Antibiotics for pediatric dental patients in Jordan; knowledge and attitudes of dentists. **The International Arabic Journal of Antimicrobial Agents**, v. 3, n. 3, 2013.
- DIX, K; WATANABE, SM; MCARDLE, S; LEE, DI; RANDOLPH, C; MONCLA, B; SCHWARTZ, DE. Specific-specific oligodeoxynucleotide probes for the identification of periodontal bacteria. **J Clin Microbiol**, v. 28, n. 2, p. 319-323, 1990.
- DUNSTON B. AND COLL J.A. A survey of primary tooth pulp therapy as taught in US dental school and practiced by diplomats of the American Board Of Pediatric Dentistry. **Pediatr Dent**, v. 30, n. 1, p. 42–48, 2008.

ESPÍNDOLA, A.C.S.; PASSOS, C.O.; SOUZA, E.D.A.; SANTOS, R.A. Avaliação do grau de sucesso e insucesso no tratamento endodôntico em dentes uni-radiculares. **RGO**, v. 50, no. 3, p. 164-166. 2002.

FOUAD AF, BARRY J, CAIMANO M, CLAWSON M, ZHU Q, CARVER R, HAZLETT K, JUSTIN D, RADOLF JD. PCR-Based Identification of Bacteria Associated with Endodontic Infections. **J Clin Microbiol**, v. 40, n. 9, p. 3223-3231, 2002.

GABARDO, M.C.L.; DUFLOTH, F.; SARTORETTO, J.; HIRAI, V.; OLIVEIRA, D.C.; ROSA, E.A.R. Microbiologia do insucesso do tratamento endodôntico. **Revista gestão & saúde**. v. 1, no. 1, p. 11-17. 2009.

GOMES BP, MONTAGNER F. O papel do diagnóstico molecular no estudo das infecções de origem endodôntica: conceitos, técnicas e aplicações. In: Bombana AC, Ferrari PHP. **A Infecção endodôntica e sua resolução**, São Paulo: Liv. Santos, p. 23-45, 2010.

GOMES GB, SARKIS-ONOFRE R, BONOW MLM, ETGES A, JACINTO RC. An investigation of the presence of specific anaerobic species in necrotic primary teeth. **Braz Oral Res**, v. 27, n. 2, p. 149-155, 2013.

HAWKEY PM. The growing burden of antimicrobial resistance. **J Antimicrob Chemother**, v. 62, p. i1-i9, 2008.

JACINTO RC, GOMES BP, FERRAZ CCR, ZAIA AA, SOUZA-FILHO FJ. Microbiological analysis of infected root canals from symptomatic and asymptomatic teeth with periapical periodontitis and the antimicrobial susceptibility of some isolated anaerobic bacteria. **Oral Microbiol Immunol**, v. 18, n. 5, p. 285-292, 2003.

KRAMER PF, FARACO JÚNIOR IF, FELDENS C.A. Estado atual da terapia pulpar nas Universidades brasileiras: Pulpotomia e Pulpectomia em dentes decíduos. **Jornal Brasileiro de Odontopediatria e Odontologia para Bebê**, v. 3, no. 3, p. 220-230, 2000.

LOPEZ EP, SIQUEIRA JUNIOR JF. **Endodontia – Biologia e Técnica**. 2º ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

LUIZ FERNANDO TOMAZINHO, MARIO J. AVILA-CAMPOS. Detection of *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella intermedia*, and *Prevotella nigrescens* in chronic endodontic infection. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 103, n. 2, p. 285-288, 2007.

MADINIER I, FOSSE T, GIUDICELLI J, LABIA R. Cloning and biochemical characterization of a class A beta-lactamase from *Prevotella intermedia*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 45, n. 8, p. 2386-239, 2001.

MORAES LC, FATTURI-PAROLO, CC, FERREIRA MBC, SÓ MVR, MONTAGNER F. Saliva, supragingival biofilm and root canals can harbor gene associated with resistance to lactamic agents. **Braz Oral Res**, v. 29, n. 1, p.1-6, 2015.

OWENS JR RC. An overview of harms associated with  $\beta$ -lactam antimicrobials: where do the carbapenems fit in? **Crit Care**, v. 12, n.4, p. 1-11, 2008.

SALAKO NO, ROTIMI VO, ADIB SM, AL-MUTAWA S. Pattern of antibiotic prescription in the management of oral diseases among dentists in Kuwait. **J Dent**, v. 32, p. 503-90, 2004.

SANTOS AL, SIQUEIRA JF JR, RÔÇAS IN, JESUS EC, ROSADO AS, TIEDJE JM. Comparing the bacterial diversity of acute and chronic dental root canal infections. **PLoSOne**, v.6, n. 11, e28088, 2011.

SILVA LAB, NELSON-FILHO P, FARIA G, SOUZA-GUGELMIN MCM, ITO IY. Bacterial Profile in Primary Teeth with Necrotic Pulp and Periapical Lesions. **Braz Dent J**, v. 17, n. 2, p. 144-148, 2006.

SIQUEIRA JF JR, RÔÇAS IN. Exploiting molecular methods to explore endodontic infections: Part 1 – Current Molecular Technologies for microbiological diagnosis. **J Endod**, v.31, n. 6, p. 411-423, 2005.

SOARES GMS, FIGUEIREDO LC, FAVERI M, CORTELLI SC, DUARTE PM, FERES M. Mechanisms of action of systemic antibiotics used in periodontal treatment and mechanisms of bacterial resistance to these drugs. **J Appl Oral Sci**, v. 20, n. 3, p. 295–304, 2012.

TAVARES WLF, NEVES DE BRITO LC, TELES RP, MLA MASSARA MLA, RIBEIRO-SOBRINHO AP, HAFFAJEE1 AD, SOCRANSKY SS, TELES FR. Microbiota of primary endodontic infections analyzed by MDA and Checkerboard DNA-DNA hybridization. **Int Endod J**, v. 44, n. 3, p. 225–235, 2011.

VAN STEENBERGEN TJ, VAN WINKELHOFF AJ, GRAAFF J, DUERDEN BI. Antibiotic susceptibility of black pigmented gram-negative anaerobes. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 6, n. 2-3, p. 229-234, 1993.

WEXLER HM, MOLITORIS E, FINEGOLD SM. Effect of  $\beta$ -lactamase inhibitors on the activities of various  $\beta$ -lactam agents against anaerobic bacteria. **Antimicrob Agents Chemoth**, v. 35, n. 6, p. 1219-1224, 1991.

WYNN RL, BERGMAN SA. Antibiotics and their use in the treatment of orofacial infections, part I. **Gen Dent**, v. 42, n. 5, p. 398-402, 1994.



## APÊNDICE

### UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL FACULDADE DE ODONTOLOGIA TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

I – **Justificativa e objetivos da pesquisa:** A cárie dental é uma das doenças mais prevalentes na população infantil. As cavidades já são um sinal avançado da evolução da doença, que se não for tratada poderá levar à necessidade de tratamento de canal ou, até mesmo, a perda precoce dos dentes leite (decíduos). **Objetivo básico do tratamento de canal é manter o dente de leite, mesmo sem “nervo” (polpa), com suas funções estéticas e mastigatórias preservadas.**

Poucas são as informações sobre a suas características das bactérias encontradas no interior das raízes dos dentes decíduos associada à presença de dor dental em crianças. Com isso, o presente estudo pretende identificar as bactérias presentes nas raízes dos dentes de leite associando-as com a presença de dor, e compará-las com as bactérias presentes na saliva e na placa bacteriana encontrada na superfície desses dentes.

II – **Procedimentos que serão utilizados e seus propósitos:** Será realizado tratamento de canal em dentes decíduos que apresentam a polpa irreversivelmente comprometida (morte do nervo). Para o tratamento de canal, a região onde se localiza o dente a ser tratado será anestesiada e após a colocação do isolamento absoluto (lençol de borracha para evitar contaminação de saliva e melhorar a união do material restaurador com o dente) será feita a obturação do canal e restauração do dente.

III – **Benefícios e Riscos Esperados:** O indivíduo não terá nenhum benefício adicional direto resultante de sua participação na pesquisa. Os procedimentos clínicos executados visam ao tratamento da condição clínica de dor e infecção e não diferem daqueles normalmente empregados. Os benefícios esperados afetam positivamente os voluntários, pois estarão relacionados com o tratamento da doença cárie e resgate de sua saúde bucal.

Os riscos ou desconfortos causados aos pacientes com a coleta de bactérias com cone de papel absorvente não são significativos, já que **a manobra da coleta bacteriológica faz parte do tratamento de canal, pois a ponta de papel absorvente serve normalmente para secagem do canal antes da colocação de uma medicação ou da obturação.** No caso desta pesquisa, ao invés de ser descartada, esta ponta será colocada num meio adequado para o transporte das bactérias. Durante todo o tratamento de canal e coleta bacteriológica, serão utilizados os equipamentos de proteção individual pelo operador (luvas, gorro, máscara e jaleco descartáveis e óculos desinfetados) e será fornecido gorro descartável e óculos de segurança desinfetado para proteção do paciente.

Caso a criança relate dor pós-operatória, esta não será devido à coleta de amostra e sim, à persistência da infecção nos canais radiculares e/ou nos tecidos periapicais. Se a manifestação dolorosa ocorrer fora dos dias marcados para a execução do tratamento, o paciente poderá ser atendido no Serviço de Urgência da Clínica Infanto-Juvenil da FO-UFRGS ou poderá entrar em contato com o pesquisador responsável, via telefone, para receber uma assistência imediata através dos telefones (51) 8137-2933 (Prof. Francisco Montagner) ou (51) 9508-7447 (Prof. Luciano Casagrande).

**Pelo presente Consentimento Informado, declaro que fui esclarecido, de forma clara detalhada, livre de qualquer forma de constrangimento e imposição, dos objetivos, da justificativa, dos procedimentos que serei submetido pelo presente Projeto de Pesquisa.**

Fui igualmente informado:

- da garantia de receber resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida em relação aos procedimentos, riscos e benefícios e outros assuntos relacionados com a pesquisa;
- da atenção odontológica, inserida dentro de um programa de promoção de saúde, onde o objetivo principal é o restabelecimento e manutenção da saúde bucal, seja através de procedimentos não invasivos (orientação de higiene bucal, hábitos alimentares e fluoroterapia profissional) em conjunto aos procedimentos invasivos (restaurações, endodontias, extrações) quando necessários;
- da liberdade abandonar o estudo a qualquer momento, conforme minha conveniência, sem que isto traga prejuízo à continuação do meu cuidado e tratamento;
- do compromisso de proporcionar informação atualizada obtida durante o estudo.

Porto Alegre, \_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_.

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Francisco Montagner/Prof. Dr. Luciano Casagrande

Concordo com o solicitado: \_\_\_\_\_

( )pai ( )mãe ( )responsável

Nome do paciente: \_\_\_\_\_ Grupo: I ( ) II ( )

Nome do pai/mãe ou responsável: \_\_\_\_\_

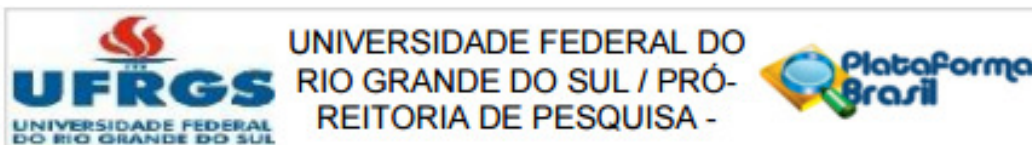
Endereço: \_\_\_\_\_ Tel. contato: \_\_\_\_\_ (Falar com: \_\_\_\_\_)

Observação: O presente documento, baseado no item IV das Diretrizes e Normas Regulamentadas para Pesquisa em Saúde, do Conselho Nacional de Saúde (resolução 196/96), será assinado em duas vias, de igual teor, ficando uma em poder do paciente e outra do pesquisador Responsável.

**Comitê de Ética em Pesquisa – UFRGS, Fone: (51) 3308-3738**

**Faculdade de Odontologia – UFRGS, Ramiro Barcelos 2492, 90035-003, Fone – (51) 3308-5027 (Clínica Infanto-Juvenil), Porto Alegre - RS**

## ANEXO



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** CARACTERIZAÇÃO MICROBIANA EM ECOSISTEMAS DA CAVIDADE ORAL DE PACIENTES INFANTIS COM INFECÇÕES ENDODÔNTICAS

**Pesquisador:** Luciano Casagrande

**Área Temática:**

**Versão:** 4

**CAAE:** 09190712.1.0000.5347

**Instituição Proponente:** UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL/COMITÊ DE ÉTICA EM

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 787.355

**Data da Relatoria:** 04/09/2014

#### Apresentação do Projeto:

Trata-se de uma emenda a um projeto que já havia sido aprovado pelo CEP em 06/06/2013.

#### Objetivo da Pesquisa:

O objetivo deste estudo será identificar a presença grupos de microrganismos específicos dos gêneros *Prevotella* e *Porphyromonas* e de genes relacionados à produção de enzimas lactamases em amostras de saliva, biofilme microbiano supragengival, câmara pulpar e canal radicular de dentes deciduos em pacientes acometidos por infecções endodônticas.

#### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Com relação aos riscos e benefícios, foi feita a alteração no TCLE conforme solicitação.

#### Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Os pesquisadores estão propondo esta emenda a fim de informar mudança no cronograma devido a dificuldade de obtenção da amostra total, havendo necessidade de um período de tempo maior para a conclusão da pesquisa. Devido às dificuldades de obtenção da amostra via triagem da Faculdade de Odontologia da UFRGS, resolveu-se expandir esta seleção a pacientes oriundos de Unidades Básicas de Saúde do município de Porto Alegre, que atualmente são encaminhados para atendimento no Centro de Especialidades Odontológicas de Clínica Infanto-Juvenil da Faculdade de

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

Continuação do Parecer: 787.355

Odontologia da UFRGS, o qual realiza tratamentos endodônticos em dentes decíduos. Por conta da grande demanda de pacientes encaminhados a este serviço, acredita-se que, desta forma, será viável a obtenção da amostra para a realização do estudo.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

O TCLE poderia ter adotado uma linguagem mais simples.

**Recomendações:**

Sugere-se aprovação.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

De acordo com avaliação do CEP UFRGS, como os pacientes serão abordados unicamente na Faculdade de Odontologia da UFRGS, o único CEP responsável pela avaliação do presente projeto é o desta instituição.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Aprovado.

PORTO ALEGRE, 11 de Setembro de 2014

---

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

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