



ANDERSON TERUO OKIMOTO

**Bactérias oportunistas e genes associados às β -
lactamases de amplo espectro na boca de pacientes
oncológicos submetidos à radioterapia de cabeça e
pescoço.**

ARAÇATUBA

2017

ANDERSON TERUO OKIMOTO

**Bactérias oportunistas e genes associados às β -
lactamases de amplo espectro na boca de pacientes
oncológicos submetidos à radioterapia de cabeça e
pescoço.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Odontologia.

ORIENTADOR: Prof. Titular Elerson Gaetti Jardim Jr.

COORIENTADOR: Profa. Assistente Doutora Ana Cláudia Okamoto.

ARAÇATUBA

2017

*Dedico este trabalho a Deus por guiar minha vida,
a meus pais Julio e Rosalina Okimoto,
e à minha irmã Andréia Okimoto
pelo exemplo, incentivo, amor e carinho*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a **Deus**, que ao longo desses anos nas madrugadas, deu-me forças e protegeu-me nas estradas, quando muitas vezes o único pensamento era desistir, mas permitiu que eu vencesse essa batalha.

À **Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”**, na pessoa do diretor da Faculdade de Odontologia de Araçatuba Prof. **Wilson Roberto Poi** e do vice-diretor Prof. **João Eduardo Gomes Filho**.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Elerson Gaetti Jardim Jr.**, pela atenção, dedicação, tempo despendido, mas acima de tudo pela amizade, pelos conselhos e excelentes conversas.

À minha coorientadora, **Profa. Dra. Ana Cláudia Okamoto**, por contribuir amplamente para meu aprendizado nas aulas e sua disposição para realização deste.

Aos professores membros da Banca Examinadora, **Dra. Maria Cristina Rosifini Alves Resende**, pelo encorajamento e conselhos muito além das aulas; ao **Dr. João César Bedran de Castro**, por sua dedicação a esta instituição, contribuindo com sua vida e trabalho na formações de gerações.

Ao meu pai, **Julio Okimoto**, trabalhador incansável, nunca poupou esforços para proporcionar o melhor para nossa família.

À minha mãe, **Rosalina Okimoto**, que nos ensinou tudo de caráter e humanidade sem deixar de ser a maior lutadora na vida.

À minha irmã, **Andréia Satiko Okimoto**, que jamais deixou de dar apoio nesta jornada.

Ao grande amigo e incentivador para esta profissão, **Carlos Shioya**, a quem tenho imensa gratidão por apresentar a mim o caminho para o mundo da odontologia.

A **Sérgio Florentino da Silva** e **Suely Yamamoto da Silva** pelo apoio nos momentos que mais necessitei.

Ao professor, companheiro e amigo, **Newton Fernandes Brites**, junto nas viagens e histórias nos últimos 20 anos ou mais.

A todos os Professores desta instituição que foram tão importantes na minha formação acadêmica através de aulas, práticas, teóricas e clínicas, com saber, aconselhamento e amizade.

À dona **Neide de Mello** que foi uma segunda mãe pra mim nesses últimos anos.

À minha parceira e grande amiga, **Jéssica Soares Bugiga**, que esteve sempre ao meu lado nos momentos de maior dificuldade e de alegria nesta faculdade, com quem aprendi muitas coisas que certamente levarei para sempre.

Aos meus atuais e ex-patrões, diretores e coordenadores que apoiaram-me e ajudaram de diversas maneiras no percurso desses árduos anos, **Tarcisio Basso Barbosa, Gizi Tamborlin, Renata Drigo Lodi, Junior Soler e Cristina Soler, Ana Sílvia Cavenagui Doho, Élide Maria Barison, Suely e Emílio Silvestre, Ubaldo e Carolina Martins, Luciana e Euclides do Amaral, Ana Carolina Martins**, e aos amigos mantenedores **Carlos Guimarães, Walter e Márcia Biolcati**.

Aos professores, companheiros e colaboradores nas escolas onde leciono e lecionei, **Cláudio dos Santos, Geisa Grosso, Jaqueline Grosso, Anderson Marques, Cláudia Zampieri, Cláudia Guimarães Lopes, Haig Krikor Hamparian, Jorge Tenani, Míriam Brites**.

Aos servidores técnicos-administrativos **Robson Varley Ranieri, Ilídio Teodoro Filho, José Ari Gualberto Junqueira, Sueli Tetsuko Yamada, Carlos Alberto Gonçalves, Eduardo Rodrigues Cobo**, e ao grande amigo **Jander Carvalho Inácio**.

Aos meus alunos de todas unidades que renovaram e renovam minha energia depois de todas madrugadas cansativas de viagens até as escolas.

*“I shall be telling this with a sigh
Somewhere ages and ages hence:
Two roads diverged in a wood, and I—
I took the one less traveled by,
And that has made all the difference.”*
Robert Frost

OKIMOTO, AT. Bactérias oportunistas e genes associados às β -lactamases de amplo espectro na boca de pacientes oncológicos submetidos à radioterapia de cabeça e pescoço. 2017. 46f

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2017.

Resumo

Resumo: o presente estudo avaliou a ocorrência de membros da família *Enterobacteriaceae* e do gênero *Pseudomonas*, bem como dos principais marcadores de resistência de resistência que codificam para as β -lactamases de amplo espectro, no biofilme supra e subgengival, além da mucosa bucal de 50 pacientes oncológicos submetidos a radioterapia (RT) de cabeça e pescoço. Após exames clínicos intra e extrabuciais, com avaliação das condições dentais e periodontais, espécimes clínicos de biofilme supra e subgengival, bem como raspado de mucosa desses pacientes foram coletados imediatamente antes do tratamento radioterápico, 15-22 dias após o início da radioterapia, imediatamente após o final da RT e 6 meses após a RT. A presença dos microrganismos alvo e marcadores de resistência foi determinada através da amplificação do DNA alvo por meio de PCR utilizando-se de iniciadores e condições de amplificação específicas. Os resultados foram submetidos ao teste Qui-Quadrado, teste de Mann-Whitney e teste exato de Fisher, enquanto a existência de correlação entre a distribuição dos microrganismos, marcadores de resistência e as características clínicas dos pacientes foram avaliadas através do teste de correlações de Spearman. Observou-se uma elevação progressiva da distribuição dos microrganismos alvo ao longo da RT, principalmente nos pacientes que mostraram mucosite severa. A presença do

gene *bla*_{TEM} mostrou correlação com a presença da família *Enterobacteriaceae* nos espécimes coletados e também aumentou com a RT.

Palavras-chave: Radioterapia. Neoplasias de cabeça e pescoço. Infecção. Mucosite. Beta-lactamase.

OKIMOTO, AT. Bactérias oportunistas e genes associados às β -lactamases de amplo espectro na boca de pacientes oncológicos submetidos à radioterapia de cabeça e pescoço. 2017. 46f

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2017.

Abstract

The present study evaluated the occurrence of members of the family Enterobacteriaceae and of the genus *Pseudomonas*, as well as the main resistance markers that codify for the broad-spectrum β -lactamases in the supra and subgingival biofilm, besides the oral mucosa of 50 cancer patients submitted to head and neck radiotherapy (RT). After intraoral and extraoral clinical examinations with evaluation of dental and periodontal conditions, clinical specimens of supra and subgingival biofilm as well as mucosa scraping of these patients were collected immediately prior to radiotherapy treatment, 15-22 days after the start of radiotherapy, immediately after the end of RT and 6 months after RT. The presence of target microorganisms and resistance markers was determined by amplification of the target DNA by PCR using primers and specific amplification conditions. The results were submitted to the Chi-square test, Mann-Whitney test and Fisher's exact test, while interrelationships between selected microorganisms resistance markers and the clinical characteristics of the patients were evaluated using the Spearman correlation test. There was a progressive increase in the distribution of the target microorganisms throughout the RT, especially in the patients who presented severe mucositis. The presence of the bla_{TEM} gene showed a correlation with the presence of the *Enterobacteriaceae* family in the specimens collected and also increased with RT.

Keywords: Radiotherapy. Head and neck neoplasias. Infection. Mucositis. Beta-lactamase.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Ocorrência da família *Enterobacteriaceae*, do gênero *Pseudomonas* e dos marcadores de resistência aos β -lactâmicos no biofilme supragengival, ao longo do estudo (n= 28) 45

Tabela 2. Ocorrência da família *Enterobacteriaceae*, do gênero *Pseudomonas* e dos marcadores de resistência aos β -lactâmicos no biofilme subgengival, ao longo do estudo. (n=28) 46

Tabela 3. Ocorrência da família *Enterobacteriaceae*, do gênero *Pseudomonas* e dos marcadores de resistência aos β -lactâmicos na mucosa bucal, ao longo do estudo. (n=50) 47

LISTA DE ABREVIATURAS

&	e
<	menor
=	igual
>	maior
µg	micrograma
µl	mililitro
Amostra N	Amostra Normal
bla _{CTX-M}	Beta Lactamase enzima CTX-M
bla _{FUS-1}	Beta Lactamase gene FUS-1
bla _{SHV}	Beta Lactamase SHV
bla _{TEM}	Beta Lactamase TEM1
cGy	CentiGrays
CPOD	Índice de Dentes Cariados Perdidos e Obturados
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ESBL	β-lactamases de espectro de ação aumentado
et al	e colaboradores
FOA	Faculdade de Odontologia de Araçatuba
MilliQ	Marca Registrada de água purificada da empresa <i>Millipore</i>
min	minutos
ml	mililitros
mM	milimolar

nM	nanometro
°C	centígrados
OMS	Organização Mundial da Saúde
p	valor p (estatística)
PCR	reação em cadeia da polimerase
QIAamp	<i>Kit</i> para extração de DNA
RT	Radioterapia
s	segundo
U	unidade internacional
UNESP	Universidade Estadual Paulista

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
2.1 População estudada	17
2.2 Exame clínico bucal	18
2.3 Coleta dos espécimes	19
2.4 Detecção clínica de microrganismos da família Enterobacteriaceae e do gênero Pseudomonas	20
2.5 Detecção dos marcadores de resistência associados à produção de β -lactamases de amplo espectro de ação.....	21
3. ANÁLISE ESTATÍSTICA	21
4. RESULTADOS	21
5. DISCUSSÃO	24
6. CONCLUSÃO.....	32
7. REFERÊNCIAS.....	33

1. INTRODUÇÃO

A utilização da radioterapia no tratamento das lesões malignas de cabeça e pescoço, com melhora significativa da sobrevida dos pacientes, acaba por induzir diferentes reações adversas que afetam a qualidade de vida dos pacientes, alterando a evolução e intensificação do tratamento (DUNCAN et al., 2005; MINHAS et al., 2016). A radiação produz profundas alterações na fisiologia das glândulas salivares, no aporte sanguíneo aos tecidos bucais e no reparo, mas a intensidade desse fenômeno depende da dose/frequência da radioterapia, local irradiado, da idade e condições clínicas do paciente e dos tratamentos associados (BENSANDOUN et al., 2001; ROLIM et al., 2011; O'NEILL et al., 2015). Essas alterações ainda podem ser agudas, durante a terapia ou nas semanas subsequentes, ou crônicas, nos meses ou anos após o tratamento (ROLIM et al., 2011), destacando-se entre as infecções graves de cabeça e pescoço, como a osteorradionecrose, a qual pode dar origem a fraturas e pode corroborar para a disseminação da infecção à distância e estão intimamente ligadas à microbiota bucal dos pacientes irradiados (STORE et al., 2005; HANSEN et al., 2006b), a qual sofre profundas modificações em função da hipossalivação que se estabelece (ALMSTÅHL et al., 2015).

A formação de áreas ulceradas em pacientes com mucosite radioinduzida, bem como os traumas locais, podem predispor à ocorrência desses quadros sépticos secundários locais ou sistêmicos (BENSANDOUN et al., 2001), causados geralmente por microrganismos oportunistas, como fungos e bastonetes Gram-negativos entéricos (GAETTI-JARDIM JR et al., 2011). Como agravante, a xerostomia que acompanha muitos desses pacientes pode afetar a resistência bucal às infecções, criando condições favoráveis para a implantação e proliferação de

membros da microbiota residente e de microrganismos exógenos ao ambiente bucal (ALMSTÅHL et al., 2015), os quais podem também colonizar o biofilme bucal, como os gêneros *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Citrobacter*, *Proteus*, *Enterobacter*, *Escherichia*, e *Klebsiella* (SEDGLEY et al., 1997; GAETTI-JARDIM JR et al., 2012), entre outros, capazes de albergar diferentes marcadores de resistência aos principais antimicrobianos utilizados em odontologia e medicina, o que os torna importantes agentes de infecções multirresistentes e nosocomiais (KADHIRAVAN et al., 2008; SINGH et al., 2014; RAMS et al., 2014), não raro envolvendo o sistema respiratório dos pacientes oncológicos (MIRABILE et al., 2016).

Esse contato entre membros da microbiota bucal e microrganismos oportunistas exógenos no biofilme de pacientes irradiados pode facilitar a disseminação de marcadores de resistência a diferentes fármacos, como os β -lactâmicos, onde os microrganismos produtores de β -lactamases de espectro de ação aumentado (ESBL) ganham uma importância ainda maior, em função de sua participação em infecções respiratórias, pós-cirúrgicas, nosocomiais multirresistentes, cujo tratamento apresenta prognóstico mais reservado (ROYO-CEBRECOS et al., 2017). Além desse aspecto, a distribuição de bactérias capazes de produzir essas enzimas apresenta marcada variação espacial, mesmo dentro de um mesmo país (KANAYAMA et al., 2015) e poucas informações estão disponíveis sobre a ocorrência desses patógenos e seus genes de resistência no biofilme bucal, particularmente em pacientes irradiados.

Desde que a seleção e disseminação desses marcadores de resistência têm mostrado relação direta com o consumo de antibióticos e outros antimicrobianos (BELL et al., 2014), principalmente para os β -lactâmicos (KURIYAMA et al., 2000) e em função da relevância dos efeitos da radioterapia sobre a microbiota bucal e

sobre a predisposição dos pacientes irradiados a infecções, bem como a importância do uso de β -lactâmicos no tratamento das infecções de cabeça e pescoço, o presente estudo objetivou avaliar a distribuição dos principais genes associados à resistência a esses agentes antimicrobianos em amostras do biofilme de pacientes oncológicos submetidos à radioterapia de cabeça e pescoço.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 População estudada

Inicialmente, de uma amostra de 50 pacientes oncológicos com lesões malignas na região de cabeça e pescoço, que completaram a radioterapia (RT) prevista e preencheram todos os critérios de inclusão do presente estudo, incluindo o acompanhamento clínico nos primeiros 6 meses após a RT. Apenas os pacientes que concluíram o tratamento e permitiram o acompanhamento até o final do período planejado tiveram seus dados incluídos. Assim, aqueles pacientes que acabaram por desistir do tratamento, ou vieram a óbito ou ainda não puderam ser contatados, foram substituídos por outros pacientes. Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética da Faculdade de Odontologia de Araçatuba (Processo 01559, UNESP, Araçatuba, SP, Brasil).

Todos os pacientes autorizaram a participação na pesquisa e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, estavam para iniciar o tratamento radioterápico, associado ou não à ressecção cirúrgica da lesão e/ou quimioterapia, e apresentavam o diagnóstico definitivo (histopatológico) de lesão maligna (WIJERS et al., 2001). Os pacientes que participaram do presente estudo receberam radioterapia e acompanhamento junto à Unidade Regional de Radioterapia de Megavoltagem em São José do Rio Preto, bem como pacientes atendidos para acompanhamento clínico no Centro de Oncologia Bucal, FOA-UNESP. Esses pacientes receberam de

5040 a 7020 cGy de radiação, fracionados em doses de 180 cGy. A radioterapia era realizada através de acelerador linear. Desses pacientes, 6% ainda receberam associação com quimioterapia e 56% ainda passaram por ressecção cirúrgica da lesão, associada (16%) ou não (40%) à quimioterapia.

Foram excluídos os pacientes que utilizavam bifosfonatos (HANSEN et al., 2006a), receberam medicação tópica ou sistêmica com atividade antimicrobiana nos 3 meses que precederem as coletas para análise da microbiota (WIJERS et al., 2001), que fizeram uso de medicamentos capazes de afetar o fluxo salivar ou que possuíam doenças sistêmicas debilitantes adicionais (GAETTI-JARDIM JR et al., 2011).

2.2 Exame clínico bucal

Inicialmente precedeu-se a anamnese, em formulários padronizados, constando a identificação do paciente, idade, aspectos étnico-raciais, história da doença atual, histórias social, médica e familiar. Realizou-se o exame das mucosas bucais para avaliação da ocorrência de diferentes graus de mucosite, conforme descrito por Veness et al. (2006). A avaliação clínica periodontal, dentária e extra bucal foram realizadas antes da radioterapia, entre 15 e 22 dias do início da radioterapia, imediatamente após a última sessão da radioterapia, e 6 meses após a radioterapia.

Um exame total da boca foi realizado como previamente descrito (GAETTI-JARDIM JR et al., 2011), incluindo avaliações de profundidade de sondagem, recessão gengival, sangramento a sondagem (sim/não), e determinação de índice de placa (ausência/presença). A perda de anexo clínico foi calculada pela adição de profundidade de sondagem e mensurações de recessão. Mensurações periodontais foram realizadas em seis sítios por dente (mesio-bucal, bucal, disto-bucal, mesio-

lingual, lingual e disto-lingual) em todos os dentes. A equipe médica no Centro de Radioterapia forneceu dados sobre a saúde sistêmica e medicação usada por pacientes. As condições dentais foram avaliadas segundo os critérios da OMS para determinar o índice CPOD (MATTILA et al., 1998). Após os exames clínicos, os pacientes eram encaminhados para atendimento odontológico, com instituição de medidas educativas objetivando a melhora da higiene bucal, prevenção dos efeitos da xerostomia advinda da RT a ser iniciada, eliminação de focos de infecção, tratamentos endodôntico e periodontal, bem como restauração de dentes com cárie cavitadas.

2.3. Coleta dos espécimes clínicos.

As amostras oriundas das mucosas bucais foram coletadas com auxílio de zaragatoas alginatadas que foram friccionadas contra o dorso da língua, assoalho de boca, e mucosa jugal e transferidas para criotubos contendo água ultrapura Milli Q. As coletas de biofilme supragengival foram realizadas imediatamente antes do exame clínico das condições dentárias dos pacientes. O biofilme supragengival foi removido com auxílio de curetas esterilizadas e transportadas e mantidas em água ultrapura Milli Q. Os espécimes do biofilme supragengival foram obtidos com o uso de cones de papel absorvente esterilizados, após a remoção do biofilme supragengival, permanecendo por 30 segundos no interior dos sulcos gengivais ou bolsas periodontais com maior profundidade clínica de sondagem e evidências de sangramento gengival. Após esse período de tempo, os cones de papel eram transferidos para água ultrapura Milli Q.

2.4. Detecção de microrganismos da família *Enterobacteriaceae* e do gênero *Pseudomonas*.

O DNA das amostras clínicas nos criotubos com água Milli Q foi extraído através do “kit” QIAamp DNA (QIAGEN, Hilden, Alemanha) e sua concentração foi determinada, para cada amostra, em espectrofotômetro (Beckman, Modelo DU-640), com leitura da absorbância ($A_{260\text{ nm}}$). A presença do gênero *Pseudomonas* (SPILKER et al., 2004) e a família *Enterobacteriaceae* (MOHAMMED et al., 2013) foi realizada por meio de PCR convencional, empregando-se, para tanto, iniciadores e condições de amplificação específicas.

A amplificação do DNA foi realizada em volumes de 25 μl , contendo 2,5 μl de 10 X tampão PCR, 1,25 μl de MgCl_2 (50 mM), 2,0 μl de dNTP (10 mM), 0,25 μl de *Taq* DNA polimerase (0,5 U), 1,0 μl de cada iniciador (0,4 μM), 7 μl de água ultrapura Milli-Q esterilizada e 10 μl de DNA (ng). A amplificação era realizada termociclador (Perkin Elmer, GeneAmp PCR System 2400) programado para: 1 ciclo de 94°C (5 min.); de 30 a 36 ciclos de 94°C (30 s. a 1 min.), temperatura de anelamento de cada iniciador por um tempo que variou de 30s. a 2 min., 72°C (1 min.) e 1 ciclo de 72°C (5 min.), para a extensão final da cadeia de DNA em amplificação.

Em todas as reações foram utilizadas, como controle positivo, DNA de cepas de referência dos microrganismos estudados. Os produtos da amplificação pelo PCR eram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1%, corados com brometo de etídio (0,5 $\mu\text{g/ml}$) e fotografados sobre transiluminador de luz ultravioleta, com câmara Kodak (Eletrophoresis Documentation and Analyses System 120). Como padrão de peso molecular utilizaram-se os marcadores 1Kb DNA ladder e 50bp DNA ladder (Gibco, SP, Brasil).

2.5. Detecção dos marcadores de resistência associados à produção de β -lactamases de amplo espectro de ação.

A presença dos genes *bla*_{TEM} (BELAAOUAJ et al., 1994), *bla*_{CTX-M}, *bla*_{SHV} (HENRIQUES et al., 2006) e *bla*_{FUS-1} (VOHA et al, 2006) foi determinada através de PCR com iniciadores específicos. As reações de amplificação foram realizadas em termociclador (AmpliTherm Thermal Cycler, Madison, WI, USA) programado para 94°C (5 min), seguido de 35 ciclos a 94°C por 1 min; temperatura específica para cada par de iniciadores por 1 min.; 72°C por 1,0 min., seguidos de um ciclo adicional a 72°C por 5 min para permitir a conclusão das reações de amplificação do DNA.

3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Variáveis com três ou mais categorias foram submetidas ao teste Qui-quadrado, variáveis com duas categorias foram submetidas ao teste Mann-Whitney e teste exato de Fisher, e a ocorrência de correlações entre a presença de genes β -lactamase, presença de patógenos oportunistas e condições clínicas de pacientes irradiados foram analisados pela media do teste de correlação de Spearman.

4. RESULTADOS

Dos pacientes, a grande maioria era composta de pessoas iletradas ou com educação básica incompleta (78%), consumidores de tabaco (88%) e/ou álcool (66%). Apenas 36% procuraram o tratamento odontológico recomendado previamente à realização da radioterapia e apenas 16% dos pacientes mostravam-se livres de cáries cavitando no início da RT. Observou-se que 44% dos pacientes eram edêntulos e usuários de próteses totais, enquanto que 20% tinham gengivite, 32% eram portadores de periodontite crônica e dois pacientes eram

periodontalmente saudáveis (4%). Apenas 18% apresentaram uma higiene satisfatória, caracterizada pela ausência da placa visível e cálculo; 36% apresentavam higiene regular, com depósitos moderados de placa visível, mas sem cálculo clinicamente detectável e 46% condições precárias de higiene, com depósitos visíveis de cálculo e biofilme dental nas próteses totais utilizadas e superfícies dentais.

Mucosite, dermatite, xerostomia, disgeusia, disfagia e, em menor grau, candidose foram amplamente distribuídas entre os pacientes irradiados e a ocorrência dessas alterações se manteve elevada nesses pacientes mesmo 6 meses após a conclusão da radioterapia. Logo após o final da RT 58% apresentavam grau III ou IV de mucosite, enquanto que, 6 meses após, nenhum paciente apresentou mucosite severa e, embora 56% ainda apresentassem sinais e sintomas dessa enfermidade, todos eram portadores dessa condição em um grau leve ou moderado. As alterações de índice de placa se mostraram significativas apenas durante a radioterapia, após o qual retornaram a valores próximos aos evidenciados antes da RT. Os indivíduos periodontalmente sadios desenvolveram gengivite nas primeiras duas semanas do início da terapia e não retornaram às condições de saúde periodontal, mesmo 6 meses após a conclusão do tratamento, evidenciando, concomitantemente, mucosite e xerostomia. A ocorrência de mucosite não mostrou correlação com os níveis de higiene bucal da população estudada, mas observou-se que todos os pacientes que desenvolveram mucosite grau III e IV apresentavam condições precárias de higiene dental, independentemente das condições de saúde periodontal, estando, nos pacientes usuários de prótese total, também relacionada às condições insatisfatórias de uso das próteses e tempo de uso desses dispositivos protéticos (teste de Qui-quadrado, $p < 0,001$).

Verificou-se, através do teste exato de Fisher, que nenhum parâmetro microbiano teve correlação direta com o aparecimento de mucosite, xerostomia, disgeusia e disfagia, mas a ocorrência dos pseudomonados ($p=0.023$) e, principalmente, da família *Enterobacteriaceae* ($p<0,01$) se elevou com a RT e seus efeitos bucais, como a xerostomia e a mucosite, sendo que esses últimos microrganismos mostraram relação com higiene precária ($p=0,021$) e mucosite severa ($p<0,01$).

A ocorrência da família *Enterobacteriaceae* em biofilmes supra e subgingivais também foi associada com o uso do tabaco (Teste Qui-quadrado, $p=0,021$ e $p=0,04$, respectivamente) e mucosite graus III ou IV (Teste Qui-quadrado, $p=0,035$). No biofilme supragengival, a ocorrência da família *Enterobacteriaceae* aumentou durante todo o período de estudo ($p<0,01$), enquanto os pseudomonados mostraram mais frequentes após a RT ($p=0,026$) e a colonização se manteve estável após 6 meses da avaliação.

Quanto aos marcadores de resistência aos β -lactâmicos, a presença dos genes bla_{TEM} e bla_{SHV} mostrou-se associada positivamente com a ocorrência da família *Enterobacteriaceae* nos mesmos espécimes clínicos (Teste de correlações de Spearman, $r=0,7045$). A distribuição do gene bla_{TEM} se elevou durante a RT e se manteve estável ao longo do período pós-RT, o mesmo ocorrendo com o conjunto de todos os marcadores estudados. Para os genes bla_{CTX-M} , bla_{SHV} e bla_{FUS-1} não foram observadas modificações de distribuição ao longo do período de acompanhamento, tanto nas amostras de biofilme quanto na mucosa. Esses resultados também mostraram que o biofilme microbiano é o principal reservatório desses patógenos exógenos e dos marcadores de resistência aos β -lactâmicos.

5. DISCUSSÃO

O perfil dos pacientes examinados, com idade por volta de cinquenta e sessenta anos e baixa escolaridade, está de acordo com o perfil descrito por Al-Nawas & Grotz (2006), sendo que o aumento da idade está ligado a um aumento na susceptibilidade aos carcinógenos extrínsecos. No Brasil, mais de 85% dos tumores de cabeça e pescoço são diagnosticados em fases avançadas, o que está fortemente associado à morbidade e mortalidade da doença. A identificação tardia, além de reduzir a expectativa de vida, faz com que o tratamento da neoplasia seja, na maioria das vezes, mais mutilante, comprometendo a qualidade de vida pós-terapia e as condições de saúde (GAETTI-JARDIM JR et al., 2011; SOUZA et al., 2013), afetando também a microbiota residente (SCHUURHUIS et al., 2016), criando condições para microrganismos exógenos se implantarem na boca (GAETTI-JARDIM JR et al., 2011; GAETTI-JARDIM JR et al., 2017).

Nos pacientes irradiados, o tabagismo foi característica frequente, sendo considerado agente iniciador para o câncer de cabeça e pescoço, uma vez que possui diversos agentes carcinogênicos em sua composição (WANG et al., 2010). Como agravante entre esses pacientes, mostrou-se frequentemente ligado ao etilismo, o que potencializa o risco do desenvolvimento dessas neoplasias malignas (WANG et al., 2010).

Nos pacientes estudados, os campos de irradiação atingiram principalmente as regiões cérvico-faciais direita e esquerda, fossa supraclavicular e cervical direita e esquerda, em função do estadiamento e localização das lesões, envolvendo as glândulas salivares e produzindo severa xerostomia e mucosite, facilitando o acúmulo de biofilme e a deterioração das condições periodontais dos pacientes, e da mucosa bucal que suporta dispositivos protéticos móveis, totais ou parciais. Como

agravante, apenas uma minoria dos pacientes seguiu a orientação dos centros de radioterapia e se submeteram a tratamento odontológico previamente à realização da RT, comprometendo as suas condições de saúde e higiene bucais (RUBIRA et al., 2007; OWOSHO et al., 2017), levando ao desenvolvimento de quadros mais ou menos severos de candidose bucal, dermatite, disgeusia e mucosite, cuja severidade pode ser reduzida pelo tratamento odontológico prévio (SENNHENN-KIRCHNER et al., 2009; GAETTI-JARDIM JR et al., 2011). Essa realidade se apresenta em toda a sua extensão quando se verifica que 27,4% dos 113 pacientes inicialmente selecionados não concluíram o tratamento em função da severidade das sequelas bucais do tratamento instituído.

Dentre essas sequelas, destaca-se a mucosite pelos seus efeitos na qualidade de vida dos pacientes (OWOSHO et al., 2017) e seus principais sinais e sintomas puderam ser observados na quase totalidade dos pacientes após aproximadamente 2700 cGy. As lesões da mucosite se desenvolvem rapidamente, associadas a modificações qualitativas e quantitativas na salivação, microbiota bucal e na condição imunológica desses pacientes (LEUNG et al., 2000; SHUURHUIS et al., 2016), de forma que medidas preventivas antes, durante e depois da RT devem ser instituídas e incluir instruções de dieta, higiene oral, controle do biofilme, e higiene com os dispositivos protéticos.

Nesse estudo foi possível identificar vários graus de mucosite, verificando-se que durante e logo após a RT, o grau III foi o mais frequente. Foi observado o grau IV em 8 pacientes, sendo que vários outros pacientes interromperam o tratamento radioterápico em função as extensas áreas ulceradas intra e peribucais que se desenvolveram. Nesses pacientes, os aspectos nutricionais ganham uma relevância ainda maior, uma vez que a alimentação se mostra bastante prejudicada e a perda

de peso é acentuada e as lesões ulceradas evidentes facilitam as infecções oportunistas, agravadas pelas alterações salivares, nas primeiras semanas da terapêutica (MALO, 2004; PATERSON et al, 2015). O agravamento da mucosite e da xerostomia foram as principais reclamações dos pacientes, que diminuíram a frequência de higienização das próteses e a escovação dental, agravando as condições periodontais.

Quanto aos resultados microbiológicos, verificou-se um aumento na ocorrência da família *Enterobacteriaceae* e de pseudomonados, tanto nos biofilmes quanto nas superfícies mucosas, o que pode estar associado à uma progressiva deterioração das condições bucais e de higiene, associadas ao câncer e seu tratamento, uma vez que a presença desses microrganismos na boca pode ter relação com a higiene bucal, bem como com as condições de saúde periodontal (SLOTS et al., 1991; BARBOSA et al., 2001; BOTERO et al., 2007; GAETTI-JARDIM JR et al., 2008; COLOMBO et al., 2013), possivelmente agravadas pela mucosite e xerostomia.

A xerostomia induzida por radiação parece exacerbar a ocorrência de patógenos não-orais em pacientes com condições de higiene oral adequada e tratamento dental prévio (ALMSTÅHL et al., 2008; ALMSTÅHL et al., 2015), mas a maioria dos pacientes sendo submetidos a RT no Brasil apresentam precárias condições socioeconômicas e de higiene bucal inadequada, o que pode criar condições favoráveis para a adesão e proliferação de bactérias exógenas, tais como bastonetes Gram-negativos da família *Enterobacteriaceae* e o gênero *Pseudomonas*.

Com a progressão da xerostomia, observa-se um aumento da adesão de espécies de bastonetes entéricos Gram-negativos (AYARS et al., 1982) às células

epiteliais bucais e superfícies de resina acrílica de dispositivos protéticos, o que poderia predispor a infecções oportunistas por esses microrganismos. Esse fenômeno poderia explicar parcialmente o significativo aumento na prevalência de dessas bactérias entéricas e pseudomonados no biofilme supra e subgengival e, em menor extensão, nas superfícies mucosas dos pacientes irradiados. Embora não tenha sido observada uma relação direta entre dieta e colonização pelos microrganismos alvo, no presente estudo, observou-se uma tendência de ocorrência desses microrganismos entre pacientes que passaram a se utilizar de uma alimentação mais rica em carboidratos e alimentos de consistência pastosa.

Antes da RT, os mesmos microrganismos foram detectados na mucosa bucal e/ou no biofilme subgengival e supragengival de uma minoria dos pacientes, como também descrito na literatura (COLOMBO et al., 2013; LEÃO-VASCONCELOS et al., 2015), mas durante todo o período experimental a distribuição da família *Enterobacteriaceae* se elevou no biofilme supragengival, ao passo que no biofilme subgengival e na mucosa esses bastonetes tiveram sua ocorrência estabilizada, o mesmo ocorrendo com o gênero *Pseudomonas* em todos os espécimes. Contudo, os dados sobre a ocorrência desses microrganismos em pacientes irradiados são escassos (LEUNG et al., 2001; GAETTI-JARDIM JR et al., 2011; SONALIKA et al., 2012).

Os resultados aqui apresentados são semelhantes aos obtidos por Leung et al. (2001), que relataram a presença das famílias *Enterobacteriaceae* e *Pseudomonadaceae* em 64% a 100% dos pacientes irradiados, embora as espécies detectadas variassem com o tempo. No presente estudo, como a detecção desses microrganismos foi realizada focando-se o gênero *Pseudomonas* e na família *Enterobacteriaceae* como um todo, diferenças na distribuição de espécies não

podem ser observadas, embora os resultados de outros pacientes brasileiros irradiados sugere que essa flutuação pode não ocorrer em pacientes com higiene precária e que, no geral não foram submetidos a tratamento odontológico (GAETTI-JARDIM JR et al., 2011). Essa estabilidade de colonização bucal pode ser observada nos dados de 6 meses de acompanhamento. Essa ampla distribuição mostrou-se mesmo mais elevada do que aquela observada em pacientes brasileiros imunocomprometidos (GAETTI-JARDIM JR et al., 2008).

Entretanto, para o gênero *Pseudomonas*, os dados aqui apresentados são inferiores aos descritos por Pan et al. (2014), mas superiores aos observados por Yamashita et al. (2013) em pacientes oncológicos submetidos à radioterapia e/ou quimioterapia. Aspectos geográficos e culturais podem interferir no processo de colonização por esses microrganismos oportunistas, sendo que os dados de Pan et al (2014) mostram colonização bucal elevada na China, exacerbada pelo tratamento oncológico. A ocorrência desses microrganismos e da família *Enterobacteriaceae* se mostrou particularmente elevada para pacientes portadores de mucosite grau III ou IV e desde que são bastonetes Gram-negativos, sua endotoxina pode induzir a liberação de citocinas, interleucinas e enzimas proteolíticas de leucócitos (GONÇALVES et al., 2007; NAPEÑAS et al., 2007), podendo exacerbar a mucosite radioinduzida, o que necessita ser melhor avaliado.

Embora várias fontes externas para esses microrganismos possam ser avaliadas, como a possibilidade de água ou alimentos contaminados, como sugerido por Slots et al. (1991), possivelmente a própria microbiota intestinal do paciente, associada às precárias condições de higiene pode ter criado condições para a colonização da cavidade bucal dos pacientes. Da mesma forma, não se pode excluir

a possibilidade de que o próprio ambiente hospitalar e possa vir a constituir fonte de disseminação desses microrganismos (LEÃO-VASCONCELOS et al., 2015).

Essa colonização bucal por microrganismos das famílias *Enterobacteriaceae* e do gênero *Pseudomonas* pode ser transitória (Leung et al., 2001), mas isso não tem suporte nos dados apresentados, que sugerem que a presença da família *Enterobacteriaceae* e do gênero *Pseudomonas* foi crescente ao longo do tratamento radioterápico, estabilizando-se após RT na maioria dos portadores, como já observado para outros pacientes irradiados (GAETTI-JARDIM JR et al., 2011) e mesmo para a equipe de saúde de hospitais oncológicos (Leão-Vasconcelos et al., 2015).

Esses microrganismos representam reservatórios de genes de resistência a numerosos antimicrobianos e estão profundamente associados com infecções oportunistas (GONÇALVES et al., 2007; RAMOS et al., 2009; LEÃO-VASCONCELOS et al., 2015) e a cavidade oral pode atuar como reservatório desses microrganismos e os seus genes de resistência a antimicrobianos (BARBOSA et al., 2001; GONÇALVES et al., 2007; GAETTI-JARDIM JR et al., 2011; LEÃO-VASCONCELOS et al. 2015), de forma que cuidados com sua transmissão devem constituir aspecto relevante no atendimento do paciente oncológico (LEÃO-VASCONCELOS et al., 2015), principalmente quando se considera as condições de profunda debilidade que muitos desses pacientes apresentam.

Dentre os agentes antimicrobianos mais empregados na clínica médico-odontológica, os β -lactâmicos ganham destaque pela sua baixa toxicidade e amplo emprego no tratamento das infecções de cabeça e pescoço (RAMOS et al., 2009), mas a disseminação de microrganismos resistentes vem comprometendo a aplicabilidade clínica desses fármacos (RAMOS et al., 2009; LOGAN et al., 2014). A

resistência aos β -lactâmicos pode se dar por diminuição da afinidade das proteínas de ligação da penicilina (*penicillin binding proteins*, PBP) (RICE et al., 2004), redução da permeabilidade da membrana externa de bactérias Gram-negativas (TENOVER, 2006), mas principalmente pela produção de enzimas capazes de inativar esses fármacos, as β -lactamases (RAMOS et al., 2009; GAETTI-JARDIM Jr et al., 2013; LOGAN et al., 2014; LEÃO-VASCONCELOS et al., 2015). Em patógenos Gram-negativos, β -lactamases continuam a ser o fator mais importante para resistência a β -lactâmicos, e sua crescente prevalência, bem como sua evolução alarmante, parecem estar diretamente ligadas ao uso clínico abusivo ou não dessas drogas (HANDAL et al 2004; Al-HARONI et al., 2008; GAETTI-JARDIM JR et al., 2013;).

Várias famílias de β -lactamases têm sido identificadas (PÉREZ-PÉREZ & HANSON, 2002) e a maioria delas apresenta maior afinidade por um grupo pequeno de drogas β -lactâmicas, não configurando enzimas de amplo espectro, as ESBL, capazes de atuar sobre a maioria dos fármacos desse grupo, com exceção dos carbapenêmicos e cefamicinas (LOGAN et al., 2014; LEÃO-VASCONCELOS et al., 2015) e geralmente produzidas por microrganismos oportunistas e superinfectantes, como os membros da família *Enterobacteriaceae* (RAMOS et al., 2009; LEÃO-VASCONCELOS et al., 2015; KOUKOS et al., 2015), o que pode explicar a relação entre a presença do gene *bla*_{TEM} e a ocorrência desses bastonetes Gram-negativos nos mesmos espécimes clínicos no pacientes irradiados, resultados semelhantes ao observado para indivíduos não irradiados por Ramos et al., 2009). Entretanto, essa correlação entre a presença de membros da família *Enterobacteriaceae* e a ocorrência do gene *bla*_{TEM}, no biofilme ou mucosa bucal, nem sempre se mostra verdadeira (LEÃO-VASCONCELOS et al., 2015).

Em microrganismos Gram-negativos bucais, a maioria das β -lactamases são ativas sobre penicilinas e cefalosporinas (HANDAL et al., 2004; AL-HARONI et al., 2008; GAETTI-JARDIM JR & SCHWEITZER, 2013), geralmente passíveis de inibição pelo ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam, entre outros inibidores de β -lactamases utilizados em associação às penicilinas e cefalosporinas (RAMOS et al., 2009; GAETTI-JARDIM JR & SCHWEITZER, 2013).

Para as bactérias de maior relevância em infecções nosocomiais, ganha destaque a presença dos genes *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} e *bla*_{CTX-M} (BIBBAL et al., 2007; Ramos et al., 2009), capazes de codificar para β -lactamases de maior espectro de ação e cuja disseminação vem se mostrando alarmante, particularmente entre microrganismos entéricos, o que torna as infecções causadas por microrganismos multirresistentes em pacientes oncológicos um grande desafio, principalmente pelo perfil de resistência apresentado (GUDIOL et al., 2011).

Esse parece ser o primeiro levantamento da distribuição desses genes no biofilme e mucosa e pacientes ao longo do tratamento radioterápico e no período imediato de acompanhamento. Os dados aqui apresentados reforçam a percepção de que os espécimes clínicos bucais se convertem em reservatórios desses marcadores de resistência e que esse fenômeno denota estabilidade da colonização microbiana, particularmente para os portadores do gene *bla*_{TEM}.

As tabelas 1, 2 e 3 mostram que a ocorrência do gene *bla*_{TEM} foi semelhante à descrita por Ramos et al. (2009), utilizando microrganismos resistentes oriundo do biofilme de pacientes com diferentes condições periodontais, mas muito inferiores à ocorrência do gene *bla*_{TEM} em gregos com diferentes condições periodontais (KOUKOS et al., 2016), sugerindo a existência de certas peculiaridades geográficas

na distribuição desses marcadores, entretanto essa sugestão necessita de avaliações complementares.

6. CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo foram analisados e permitiram as seguintes conclusões:

- a) a ocorrência de bastonetes do gênero *Pseudomonas* e da família *Enterobacteriaceae* se eleva significativamente com a RT, tanto no biofilme quanto na mucosa;
- b) os pacientes com mucosite grau III e IV apresentam maior ocorrência desses bastonetes Gram negativos oportunistas;
- c) a presença da família *Enterobacteriaceae* mostra relação com a presença do gene *bla*_{TEM} no biofilme e mucosa dos pacientes irradiados.

REFERÊNCIAS

AL-HARONI, M.; et al. Proteomic analysis of ampicillin-resistant oral *Fusobacterium nucleatum*. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 23, p. 36-42,2008.

ALMSTÅHL, A, WIKSTRÖM, M.; FAGERBERG-MOHLIN, B. Microflora in oral ecosystems and salivary secretion rates. A 3-year follow-up after radiation therapy to the head and neck region. *Arch Oral Biol* 2015;60:1187-5.

ALMSTÅHL, A.; WIKSTRÖM, M.; FAGERBERG-MOHLIN B. Microflora in oral ecosystems in subjects with radiationinduced hyposalivation. *Oral Dis* 2008;14:541-9.

AL-NAWAS, B.; GROTZ, K. A. Prospective study of the long change of the oral flora after radiation therapy. *Support Care Cancer*, v. 14, n. 3, p. 291-6, 2006.

AYARS, G.H. et al. Effect of decreased salivation and pH on the adherence of *Klebsiella* species to human buccal epithelial cells. **Infect. Immun.**, v. 38, p. 179-182, 1982.

BARBOSA, F.C.B.; MAYER, M.P.A.; SABA-CHUJFI, E.; CAI, S. Subgingival occurrence and antimicrobial susceptibility of enteric rods and pseudomonads from Brazilian periodontitis patients. *Oral Microbiol Immunol*. 2001; 16:306-10.

BELAAOUAJ, A. et al. Nucleotide sequences of the genes coding for the TEM-like β -lactamases IRT-1 and IRT-2 (formerly called TRI-1 and TRI-2). FEMS Microbiol. Letters, v. 120, p. 75-80, 1994.

BELL, B.G.; SCHELLEVIS, F.; STOBBERINGH, E.; GOOSSENS, H.; PRINGLE, M. A systematic review and meta-analysis of the effects of antibiotic consumption on antibiotic resistance. BMC Infect. Dis. 2014, 14:13
<http://www.biomedcentral.com/1471-2334/14/13>.

BENSANDOUN, R.J. et al. Chemotherapy- and radiotherapy-induced mucositis in head and neck cancer patients: new trends in pathophysiology, prevention and treatment. Eur. Arch. Otorhinolaryngol., v. 258, p. 481-7, 2001.

BOTERO, J.E.; CONTRERAS, A.; LAFAURIE, G.; JARAMILLO, A.; BETANCOURT, M.; ARCE R.M. Occurrence of periodontopathic and superinfecting bacteria in chronic and aggressive periodontitis subjects in a Colombian population. J Periodontol. 2007; 78:696-704.

COLOMBO, A.V.; BARBOSA, G.M; HIGASHI, D.; DI MICHELI, G.; RODRIGUES, P.H; SIMIONATO, M.R.L. Quantitative detection of *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* and *Pseudomonas aeruginosa* in human oral epithelial cells from subjects with periodontitis and periodontal health. J Med Microbiol. 2013; 62:1592-1600.

DUNCAN, G. G. et al. Quality of life, mucositis, and xerostomia from radiotherapy for head and neck cancers: a report from the NCIC CTG HN2 randomized trial of an antimicrobial lozenge to prevent mucositis. *Head Neck*, v. 27, p. 421-8, 2005.

GAETTI-JARDIM Jr. E., NAKANO, V.; WAHASUGI, T.C.; CABRAL, F.C.; GAMBA, R.; AVILA-CAMPOS, M.J. Occurrence of yeasts, enterococci and other enteric bacteria in subgingival biofilm of HIV-positive patients with chronic gingivitis and necrotizing periodontitis. *Braz J Microbiol.* 2008; 39:257- 61.

GAETTI-JARDIM Jr, E.; CIESIELSKI, F.I.N.; SOUSA, F.R.N.; NWAOKORIE, F.O.; SCHWEITZER, C.S.; AVILA-CAMPOS, M.J. Occurrence of yeasts, pseudomonads and enteric bacteria in the oral cavity of patients undergoing head and neck radiotherapy. *Braz. J. Microbiol.* (2011) 42: 1047-1055.

GAETTI-JARDIM Jr., E.; CUNHA-CORREIA, A.S.; OKAMOTO, A.C.; GAETTI-JARDIM Jr., E. Oral microbiota and mucositis in patients with head and neck cancer undergoing radiotherapy: literature review. *Arch. Health Invest.*, v.6, p.89 - 94, 2017.

GAETTI-JARDIM Jr., E.; LANDUCCI, L.F.; OLIVEIRA, K.L.; COSTA, I.; RANIERI, R.V.; OKAMOTO, A.C.; SCHWEITZER, C.M. Microbiota associated with infections of the jaws. *Int. J. Dent.*, v.2012. doi:10.1155/2012/369751.

GAETTI-JARDIM Jr., E. & SCHWEITZER, C. M. Antimicrobial susceptibility to β -lactams and metronidazole of microorganisms isolated from chronic and aggressive periodontitis. *Int. J. Odontostomat.*, 7(2):193-198, 2013.

GONÇALVES, M.O. et al. Periodontal disease as reservoir for multi-resistant and hydrolytic enterobacterial species. *Lett. Appl. Microbiol.*, v. 44, p. 488-94, 2007.

GUILDIOL, C.; TUBAU, F.; GARCIA-VIDAL, C.; CISNAL, M.; SÁNCHEZ-ORTEGA, I.; DUARTES, R.; CALVOS, M.; CARRATALA, J. Bacteraemia due to multidrug-resistant Gram-negative bacilli in cancer patients: risk factors, antibiotic therapy and outcomes. *J Antimicrob Chemother* 2011; 66: 657–663.

HANDAL T. et al. β -Lactamase production and antimicrobial susceptibility of subgingival bacteria from refractory periodontitis. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 19, p. 303-8, 2004.

HANSEN, T. et al. Actinomyces in infected osteoradionecrosis- underestimated? *Human Pathology*, v. 37, p. 61-7, 2006b.

HANSEN, T. et al. Osteonecrosis of the jaws in patients treated with bisphosphonates- histomorphologic analysis in comparison with infected osteoradionecrosis, *J. Oral Pathol. Med.*, v.35, p. 155-60, 2006a.

HENRIQUES, I. S. et al. Occurrence and diversity of integrons and β -lactamase genes among ampicillin-resistant isolates from estuarine waters. *Res. Microbiol.*, v. 157, p. 938-47, 2006.

KANAYAMA, A.; KOBAYASHI, I.; SHIBUYA, K. Distribution and antimicrobial susceptibility profile of extended-spectrum β -lactamase-producing *Proteus mirabilis* strains recently isolated in Japan. *Int. J. Antimicrob. Agents* 45 (2015) 113–118.

KOUKOS, G.; KONSTANTINIDIS, A.; TSALIKIS, L.; ARSENAKIS, M.; SLINI, T.; SAKELLARI, D. Prevalence of β -lactam (*bla_{tem}*) and metronidazole (*nim*) resistance genes in the oral cavity of Greek subjects. *Open Dent. J.*, 2016, 10, 89-98.

KURIYAMA, T.; NAKAGAWA, K.; KARASAWA, T.; SAIKI, Y.; YAMAMOTO, E.; NAKAMURA, S. Past administration of β -lactam antibiotics and increase in the emergence of β -lactamase–producing bacteria in patients with orofacial odontogenic infections.

LEÃO-VASCONCELOS, L.S.N.O.; LIMA, A.B.M.; COSTA, D.; ROCHA-VILEFORT, L.O.; OLIVEIRA, A.C.A.; GONÇALVES, N.F.; VIEIRA, J.D.G.; PRADO-PALOS, M.A. Enterobacteriaceae isolates from the oral cavity of workers in a Brazilian oncology hospital. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*, 57(2):121-127, March-April, 2015

LEUNG, W.K. et al. Oral colonization, phenotypic, and genotypic profiles of *Candida* species in irradiated, dentate, xerostomic nasopharyngeal carcinoma survivors. *J. Clin. Microbiol.*, v. 38, p. 2219-26, 2000.

LEUNG, W.K., et al., Oral colonization of aerobic and facultative anaerobic Gram-negative rods and cocci in irradiated, dentate, xerostomic individuals, *Oral Microbiol. Immunol.*, v.16, p. 1-9, 2001.

LOGAN, L.K.; MELTZER, L.A.; MCAULEY, J.B.; HAYDEN, M.K.; BECK, T.; BRAYKOV, N.P.; LAXMINARAYAN, R.; WEINSTEIN, R.A. Extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* infections in children: a two-center case–case–control study of risk factors and outcomes in Chicago, Illinois. *J. Pediatr Infect Dis*, Vol. 3, No. 4, pp. 312-19, 2014.

MALO, M. Manifestations and treatment of xerostomia and associated oral effects secondary to head and neck radiation therapy. *J. Am. Dent. Assoc.* v. 128, n. 8, p. 1128-33, 2004.

MATILLA, M.L. et al. Changes in dental health and dental health habits from 3 to 5 years of age. *J. Public. Health Dent.*, v. 58, n. 4, p. 270-4, 1998.

MINHAS, S.; KASHIF, M.; ALTAF, W.; NAG1, A.H. Oral candidiasis: complication of concomitant chemo-radiotherapy in patients with oral squamous cell carcinoma. *Brit Microbiol Res J* 2016;**11**:1-11.

MIRABILE, A.; VISMARA, C.; CRIPPA, F.; BOSSI, P.; LOCATI, L.; BERGAMINI, C.; GRANATA, R.; RESTEGHINI, C.; CONTE, E.; MORELI, D.; SCARPELLINI, P.; LICITRA, L. Health care–associated infections in patients with head and neck cancer treated with chemotherapy and/or radiotherapy. *Head & Neck*, E1009-E1013, 2016. DOI 10.1002/HED.

MOHAMMED, G.J.; HINDI, A.K.; WANG, Y.; AL-TAEI, I.H. Genotyping of the genus *Proteus* by 16SRRNA and *rpob* sequence analysis. IJBPAS, December, 2013, 2(12): a-n.

O'NEILL, C.B.; BAXI, S.S.; ATORIA, C.L.; O'NEILL, J.P.; HANMAN, M.C.; SHERMAN, E.J.; LEE, N.Y.; PFISTER, D.G.; ELKIN, E.B. Treatment-related toxicities in older adults with head and neck cancer: a population-based analysis. Cancer 2015;121:2083-9.

OWOSHOP, A.A.; THOR, M.; HUN, J.; RIAZ, N.; , TSAI, C.J.; ROSENBERG, H.; VERTHIS, S.; YOM, S.H. K.; HURYN, J.M.; LEE, N.W.; DEASY, J.O.; ESTILO, C.L. The role of parotid gland irradiation in the development of severe hyposalivation (xerostomia) after intensity-modulated radiation therapy for head and neck cancer: Temporal patterns, risk factors, and testing the QUANTEC guidelines. J. Cranio-Maxillofac. Surg., v. 45 (4): 595-600, 2017.

PAN, J.; ZHAO, J.; JIANG, N.; Oral cavity infection: an adverse effect after the treatment of oral cancer in aged individuals. J. Appl. Oral Sci, 22(4): 261-267, 2014.

PATERSON, C.; CALDWELL, B.; PORTEOUS, S.; MCLEAN, A.; MESSOW, C. M.; THOMSON, M. Radiotherapy-induced xerostomia, pre-clinical promise of LMS-611. Support Care Cancer 2015. DOI 10.1007/s00520-015-2823-5

PEREZ-PEREZ, F.J.; HANSON, N.D. Detection of plasmid-mediated AmpC β -lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. J. Clin. Microbiol, v. 40, 2153-62, 2002.

RAMOS, M.M.B.; GAETTI-JARDIM Jr., E.C.; GAETTI-JARDIM Jr., E. Resistance to tetracycline and β -lactams and distribution of resistance markers in enteric microorganisms and pseudomonads isolated from the oral cavity. J. Appl. Oral Sci. , v.17, p.13 - 18, 2009.

RAMS, T.E.; DEGENER, J.E.; van WINKELHOFF, A.J. Antibiotic resistance in human peri-implantitis microbiota. Clin. Oral Impl. Res. 25, 2014, 82–90doi: 10.1111/clr.12160

RICE, L.B. et al. Impact of specific *pbp5* mutations on expression of β -lactam resistance in *Enterococcus faecium*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 48, p. 3028-32, 2004.

ROLIM A.E.H.; Costa L.J.; RAMALHO L.M.P. Impact of radiotherapy on the orofacial region and management of related conditions. Radiol Bras. 2011 Nov/Dez;44(6):388–395.

ROYO-CEBRECOS, C.; GUDIOL, C.; GARCÍA, J.; TUBAU, F.; LAPORTE, J.; ARDANUY, C.; ANTONIO, M.; MARIN, M.; GORNALS, J. B.; CARRATAL, J. Characteristics, aetiology, antimicrobial resistance and outcomes of bacteraemic

cholangitis in patients with solid tumours: a prospective cohort study. *J. Infect.* (2017) 74, 172e178.

RUBIRA, C.M.F. et al. Evaluation of some oral postradiotherapy sequelae in patients treated for head and neck tumors. **Braz Oral Res.**, v. 21, p. 272-7, 2007.

SCHIIRHUIS, J.M.; STOKMAN, M.A.; WITJES, M.J.H.; LANGENDIJK, J.A.; Van WINKELHOFF, A.J.; VISSINK, A. et al. Head and neck intensity modulated radiation therapy leads to an increase of opportunistic oral pathogens. *Oral Oncol* 2016;58:32-40.

SEDGLEY, C.M.; SAMARANAYAKE, L.P.; CHAN, J.C.Y.; WEI, S.H.Y. A 4-year longitudinal study of the oral prevalence of enteric gram-negative rods and yeasts in Chinese children. *Oral Microbiol Immunol* 1997; 12: 183-188.

SENNHENN-KIRCHNER, S. et al. Dental therapy before and after radiotherapy - an evaluation on patients with head and neck malignancies. *Clin. Oral. Invest.*, v. 13, p.157-64, 2009.

SILVA, S.S.; RIBEIRO, M.O.; GOMES, F.I.F.; CHAVES, H.V.; SILVA, A.A.R.; ZANIN, I.C.J.; BARBOSA, F.C.B. Occurrence and antimicrobial susceptibility of enteric rods and pseudomonads isolated from the dental prostheses biofilm. *J. Appl Oral Sci.* 2016;24(5):462-71.

SINGH, M.; KAMBALIMATH, D.H.; GUPTA, K.C. Management of odontogenic space infection with microbiology study. *J. Maxillofac. Oral Surg.* (Apr–June 2014) 13(2):133–139.

SLOTS, J. et al. Subgingival microflora of advanced periodontitis in the Dominican Republic. *J. Periodontol.*, v. 62, p. 543-7, 1991

SONALIKA, W.G.; TAYAAR, S.A.; BHAT, K.G.; PATIL, B.R.; MUDDAPUR, M.V. Oral microbial carriage in oral squamous cell carcinoma patients at the time of diagnosis and during radiotherapy. A comparative study. *Oral Oncol* 2012;**48**:881-886.

SOUZA, F.R.N.; BARBOSA, G.S.; PRADO, G.M.; SCHWEITZER, C.M.; GAETTI-JARDIM JR., E. Qualidade de vida de pacientes submetidos à radioterapia para tratamento de lesões malignas de cabeça e pescoço. *Arch Health Invest* (2013) 2(5): 26-33.

SPIPKER, T. et al. PCR-based assay for differentiation of *Pseudomonas aeruginosa* from other *Pseudomonas* species recovered from cystic fibrosis patients. *J. Clin. Microbiol.*, v. 42, p. 2074-9, 2004.

STORE, G.; OLSEN, I. DNA-DNA hybridization demonstrates multiple bacteria in osteoradionecrosis, *J. Int. Oral Maxillofacial Surg.*, v. 34, p. 193-6, 2005a.

KADHIRAVAN, T.; PIRAMANAYAGAM, P.; BANGA, A.; GUPTA, R. and SHARMA, S.K. “Lemierre’s syndrome due to community acquired meticillin-resistant

Staphylococcus aureus infection and presenting with orbital cellulitis: a case report,”
Journal of Medical Case Reports, vol. 2, article no. 374, 2008.

TENOVER, F.C. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. Am. J. Infect.
Control., v. 34, p. S3-10, 2006.

VENESS, M.J. et al. Use of topical misoprostol to reduce radiation-induced mucositis:
Results of a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. Austr. Radiol., v. 50,
p. 468-74, 2006.

VOHA, C. et al. Genetic and biochemical characterization of FUS-1 (OXA-85), a
narrow-spectrum class D β -lactamase from *Fusobacterium nucleatum* subsp.
polymorphum. Antimicrob. Agents Chemother., v. 50, p. 2673–9, 2006.

WANG, L.E. et al. Reduced DNA repair capacity for removing tobacco carcinogen–
induced DNA adducts contributes to risk of head and neck cancer but not tumor
characteristics. Clin. Cancer Res., v. 15, 764-74, 2010.

WIJERS, O.B. et al. Mucositis reduction by selective elimination of oral flora in
irradiated cancers of the head and neck: a placebo controlled double-blind
randomized study. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys., v. 50, n. 2, p. 343-52, 2001.

YAMASHITA, K.; OHARA, M.; KOJIMA, T.; NISHIMURA, R.; OGAWA, T.; HINO, T.;
OKADA, M.; TORATANI, T.; KAMATA, N.; SUGAI, M.; SUGIYAMA, M. Prevalence of

drug-resistant opportunistic microorganisms in oral cavity after treatment for oral cancer. J. Oral Sci., v. 55, No. 2, 145-155, 2013.

Tabela 1. Ocorrência da família *Enterobacteriaceae*, do gênero *Pseudomonas* e dos marcadores de resistência aos β -lactâmicos no biofilme supragengival, ao longo do estudo (n= 28).

Alvo	Amostra N (%)			
	Antes da RT	15-22 dias	Após	6 meses após RT
		após início da RT	conclusão RT	
<i>Enterobacteriaceae</i>	7 (25,0)	9 (32,1)	16 (57,1)	23 (82,1)
<i>Pseudomonas</i> spp.	2 (7,1)	3 (10,7)	9 (32,1)	9 (32,1)
bla _{TEM}	1 (3,6)	1 (3,6)	5 (17,9)	7 (25,0)
bla _{CTX-M}	0 (0,0)	1 (3,6)	0 (0,0)	0 (0,0)
bla _{SHV}	1 (3,6)	0 (0,0)	3 (10,7)	2 (7,1)
bla _{FUS-1}	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (3,6)	0 (0,0)
Total marcadores de resistência	2 (7,1)	2 (7,1)	7 (25,0)	7 (25,0)

Tabela 2. Ocorrência da família *Enterobacteriaceae*, do gênero *Pseudomonas* e dos marcadores de resistência aos β -lactâmicos no biofilme subgengival, ao longo do estudo. (n=28).

Alvo	Amostra N(%)			
	15-22 dias		Após conclusão RT	6 meses após RT
	Antes da RT	após início da RT		
<i>Enterobacteriaceae</i>	7 (25,0)	11 (39,3)	18 (64,3)	20 (71,4)
<i>Pseudomonas</i> spp.	1 (3,7)	2 (7,1)	9 (32,1)	6 (21,4)
bla _{TEM}	1 (3,6)	1 (3,6)	6 (21,4)	7 (25,0)
bla _{CTX-M}	0 (0,0)	1 (3,6)	1 (3,6)	0 (0,0)
bla _{SHV}	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (7,1)	2 (7,1)
bla _{FUS-1}	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (3,6)	0 (0,0)
Total marcadores de resistência	1 (3,6)	2 (7,1)	7 (25,0)	6 (21,4)

Tabela 3. Ocorrência da família *Enterobacteriaceae*, do gênero *Pseudomonas* e dos marcadores de resistência aos β -lactâmicos na mucosa bucal, ao longo do estudo. (n=50).

Alvo	Amostra N(%)			
	Antes da RT	15-22 dias	Após conclusão RT	6 meses após RT
		após início da RT		
<i>Enterobacteriaceae</i>	5 (10,0)	11 (22,0)	27 (54,0)	38 (76,0)
<i>Pseudomonas</i> spp.	0 (0,0)	3 (6,0)	17 (34,0)	8 (16,0)
bla _{TEM}	1 (2,0)	1 (2,0)	4 (8,0)	4 (8,0)
bla _{CTX-M}	1 (2,0)	1 (2,0)	1 (2,0)	0 (0,0)
bla _{SHV}	1 (2,0)	0 (0,0)	2 (4,0)	1 (2,0)
bla _{FUS-1}	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (2,0)	0 (0,0)
Total marcadores de resistência	2 (4,0)	2 (4,0)	6 (12,0)	4 (8,0)