

Identificação das espécies bacterianas orais que albergam genes de resistência e/ou que desenvolveram estratégias de tolerância à antibióticos e fármacos antimicrobianos

Palavras-Chave: Resistoma, Microbiota Oral, Biofilme Dental

Autores(as):

THIAGO PEREIRA HIRATA, FOP – UNICAMP

Prof^a. Dr^a. MARLISE I. KLEIN FURLAN (orientadora), FOP - UNICAMP

INTRODUÇÃO:

Os microrganismos encontrados na cavidade oral são denominados coletivamente como microbiota oral, enquanto os genomas sequenciados perfazem o microbioma. Esses microrganismos incluem procariotos (bactérias e arqueias), eucariotos (fungos e protozoários) e vírus (Dewhirst et al., 2010; Ghannoum et al., 2010; Human Microbiome Project Consortium, 2012; Belmok et al., 2020).

A maioria dos microrganismos são bactérias e são encontrados nos biofilmes dentários (nas superfícies duras dos dentes) e de mucosa (nas superfícies de tecidos moles), e contribuem para alta diversidade da microbiota oral, principalmente, nos biofilmes dentários supra e subgengivais (Li et al., 2012). Biofilmes também crescem nas superfícies de materiais utilizados na reabilitação oral (p. ex., próteses removíveis, restaurações, implantes). A saliva alberga os microrganismos liberados ou desalojados dos biofilmes e os microrganismos transientes, que se incapazes de se aderirem às superfícies são removidos da boca. Entre os microrganismos transientes estão patógenos verdadeiros que podem causar doenças em sítios extraorais

Ainda, os microrganismos podem apresentar resistência à antibióticos e fármacos antimicrobianos, usualmente codificados por genes de resistência. A coleção de genes de resistência à antimicrobianos em um microbioma é definida como resistoma (Carr et al., 2020). A cavidade oral alberga centenas de espécies bacterianas, as quais podem migrar para sítios extraorais (bacteremia, deglutição, aspiração) e causar danos. Assim, é necessário conhecer o resistoma oral e suas implicações para o hospedeiro.

Portanto, os objetivos do projeto são (i) identificar as espécies bacterianas orais (detectadas na boca) que albergam genes de resistência e/ou que desenvolveram estratégias de tolerância à antibióticos e fármacos antimicrobianos e (ii) determinar a quantidade de genes por espécie (ou gênero).

METODOLOGIA:

Estratégia para identificar as espécies bacterianas orais que albergam genes de resistência:

- A abordagem para atingir os objetivos foi uma análise in silico via ferramentas de bioinformática do expandend Oral Microbiome Database ou eHOMD (<https://www.homd.org/>).
- Acesso ao website e busca por genes listados na Tabela 1 utilizando o ícone “SEARCH SITE”, conforme ilustrado na Figura 1.
- Os resultados da busca nos repositórios NCBI e PROKKA foram verificados e tabulados (planilha Excel).
- As cepas positivas para os genes foram agrupadas para os 2 repositórios NCBI e PROKKA ou 1 ou outro, para que o desfecho fosse o mais abrangente.
- Foi verificado o número de cepas da mesma espécie que albergam o(s) gene(s).
- Os dados organizados em Excel foram utilizados para construção de gráficos e tabelas, com o resumo dos principais achados do estudo.
- A pesquisa por gene foi datada porque a inclusão e exclusão de cepas (genomas) é dinâmica na base de dados pesquisada. Isso dificultou a análise em dias distintos. Isso significa que o houve flutuação nos dados quantitativos e os dados apresentados são os de datas específicas.

Figura 1 – Estratégia de busca de genes de resistência no eHOMD. A primeira seta vermelha indica o ícone “site search” para clicar. Após, abre um formulário para digitar o nome do gene (no exemplo “ampC”). Ao clicar em “submit”, o resultado da busca aparece como “Annotations Search Result”. Aparece um resumo com o número de *hits* (quantas vezes o gene foi detectado, no exemplo: 221) e o número genomas em que o gene foi detectado (no exemplo, 197). Ao clicar em “view hit”, aparece um resumo sobre o gene no genoma da cepa em que ele foi detectado.

Mecanismo de ação	Alvo do antibiótico	Classe do antibiótico (exemplos)	Modo de resistência	Exemplos de genes de resistência (e produtos gênicos)
Interferência na síntese da parede celular	Transpeptidases	β -lactâmicos (penicilinas, cefalosporinas, carbapenemos, monobactams)	Hidrólise, efluxo, alteração do alvo	<i>ampC</i> , <i>blaZ</i> (β -lactamases) <i>oprM</i> <i>mecA</i> (PBP2a de baixa afinidade)
	D-Ala-D-Ala	Glicopeptídeos (vancomicina, teicoplanina)	Alteração do alvo	<i>vanRS</i> (sistema de dois componentes) <i>vanHAX</i> (desidrogenase, dipeptidases, ligase) <i>vanY</i> (peptidase)

Inibição da síntese proteica	Subunidade ribossomal 50S	Macrolídeos (eritromicina) Cloranfenicol Oxazolidinonas (Linezolida)	Hidrólise, glicosilação, acetilação, fosforilação, efluxo, alteração do alvo	<i>ereA</i> , <i>ereB</i> (esterase de macrolídeo) <i>mtg</i> , <i>oleI</i> e <i>oleD</i> (glicosiltransferase) <i>cat</i> (acetiltransferase) <i>cpt</i> , <i>mph</i> <i>mtd(A)</i> <i>ermE</i> (23S rRNA metiltransferase)
		Lincosamidas (lincomicina, clindamicina)	<u>Nucleotidilação</u> , efluxo	<i>linA</i> , <i>linB</i> <i>mtd(A)</i>
	Subunidade ribossomal 30S	Aminoglicosídeos (apramicina, estreptomicina, espectinomicina, gentamicina)	Fosforilação, acetilação, <u>Nucleotidilação</u> , efluxo, alteração do alvo	<i>aphI</i> , <i>neo</i> e <i>km</i> (fosfotransferase) <i>aac(3)IV</i> (acetiltransferase apramicina) <i>aadA</i> (adeniltransferase estreptomicina) <i>norM</i> (transportador) <i>grmM</i> , <i>kamC</i> e <i>kan</i> (16S rRNA metiltransferases)
		Tetraciclínas	Monoxigenação, efluxo, acetilação, alteração do alvo	<i>texT</i> (<u>monohidroxilase</u>) <i>tetA</i> , <i>mtd(A)</i> <i>cat</i> <i>tetO</i> , <i>tetM</i> e <i>outra</i> (proteínas de proteção de ribossomo)
Inibição da síntese de ácido nucleico	Enzimas de síntese de DNA	Quinolonas e fluorquinolonas (ciprofloxacina)	Acetilação, efluxo, alteração do alvo	<i>aac6'-ib</i> <i>norA</i> , <i>norM</i> , <i>acrAB</i> <i>gyrA</i> , <i>parC</i>
	Enzimas de síntese de RNA	Rifamicinas (rifamicina, rifampicina)	ADP-ribosilação, monoxigenação, efluxo, alteração do alvo	<i>arr</i> (ADP-ribosiltransferase) <i>acrAB</i> <i>rpoB</i>
Inibição de via metabólica	Síntese de ácido fólico	Sulfonamidas (sulfametoxazol)	Efluxo, alteração do alvo	<i>acrAB</i> <i>sul1</i> , <i>sul2</i> (dihidropteroato sintase)
Rompimento de membrana bacteriana	Membrana celular	Polimixinas (colistina)	Efluxo, alteração do alvo	<i>acrAB</i> <i>pmrAB</i> (sistema de dosi componentes), <i>pmrEF</i> (UDP-glicose desidrogenase, glicosiltransferase)
		Lipopeptídeos (daptomicina)	Alteração do alvo	<i>cIs</i> (cardiolipina sintase)

Tabela 1 – Genes de resistência à antibióticos e fármacos antimicrobianos, considerando o mecanismo de ação e o alvo dos compostos e o modo de resistência.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

A estratégia utilizada demonstrou que o banco de dados eHOMD contém genomas de cepas orais e não orais. Por exemplo, a análise do gene *ampC* mostrou que todas as cepas orais que albergam esse gene possuem apenas 1 cópia dele, mas algumas cepas não orais possuem duas cópias dele, como ilustrado na Tabela 2. Os desfechos dos demais genes pesquisados estão nas Figuras 2 e 3.

Espécie	Número de cepas (genomas)	Oral?	Número de cópias do gene	GRAM
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	9	não	1	negativa
<i>Acinetobacter baumannii</i>	10	não	1	negativa
<i>Acinetobacter johnsonii</i>	12	não	1	negativa
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	10	não	1	negativa
<i>Alloprevotella rava</i>	1	sim	1	negativa
<i>Alloprevotella tannerae</i>	1	sim	1	negativa
<i>Bacteroides heparinolyticus</i> (Prevotella)	2	sim	1	negativa
<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	10	não	2 (9 cepas) e 1 (1 cepa)	negativa

<i>Brevibacterium paucivorans</i>	1	não	1	negativa
<i>Brucella anthropi</i>	9	não	1	negativa
<i>Burkholderia cepacia</i>	9	não	1	negativa
<i>Cronobacter sakazakii</i>	9	não	1	negativa
<i>Cupriavidus gilardii</i>	10	não	1	negativa
<i>Enterobacter cancerogenus</i>	10	não	1	negativa
<i>Enterobacter hormaechei</i>	9	não	2 (2 cepas) e 1 (7 cepas)	negativa
<i>Escherichia coli</i>	10	não	1	negativa
<i>Hallella dentalis</i>	2	sim	2 (1 cepa) e 1 (1 cepa)	negativa
<i>Hoylella koreensis</i>	1	sim	1	negativa
<i>Klebsiella aerogenes</i>	10	não	2 (9 cepas) e 1 (1 cepa)	negativa
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	não	1	negativa
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	17	sim	1	negativa
<i>Prevotella intermedia</i>	6	sim	1	negativa
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9	não	1	negativa
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	10	não	1	negativa
<i>Pseudomonas oleovorans</i>	1	não	1	negativa
<i>Segatella baroniae</i>	3	sim	1	negativa
<i>Segatella buccae</i>	2	sim	1	negativa
<i>Serratia marcescens</i>	10	sim	1	negativa
<i>Stutzerimonas stutzeri</i>	3	não	1	negativa
29 espécies	197	10 orais/19 não orais	21 cepas com 2 genes de total de 197 cepas (genomas)	Todas Gram negativas

Tabela 2 – Dados para o gene *ampC*.

Foram analisados 4 genes, os quais foram detectados em genomas disponíveis, correspondendo a cepas específicas de determinadas espécies, conforme ilustrado nas Figuras 2 (genomas com a presença dos genes), 3 (espécies) e 4 (espécies classificadas por Gram). O gene mais frequente foi *mecA* em espécies orais e não orais, seguido de *blaZ* e *ampC*. O gene *eraA* não foi detectado.

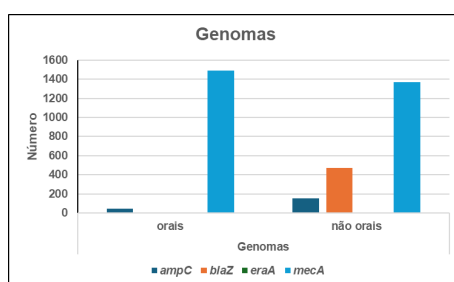


Figura 2 – Número de genomas que correspondem às cepas diferentes que albergam os genes de resistência analisados.

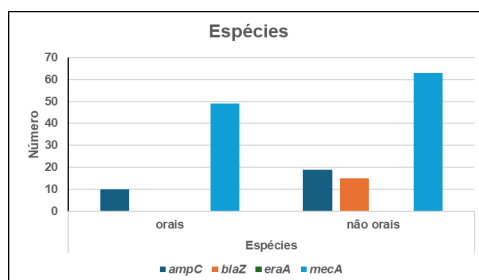


Figura 3 – Número de espécies que correspondem às cepas diferentes que albergam os genes de resistência analisados.

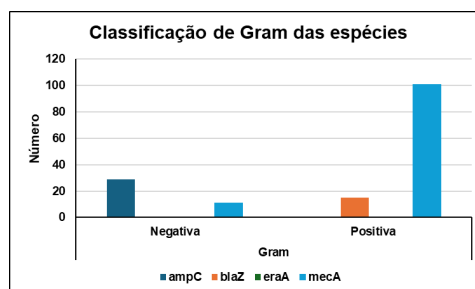


Figura 4 – Número de espécies que albergam os genes de resistência analisados classificadas por Gram.

Os dados para os 4 genes analisados mostram cepas orais e não orais que possuem esses genes. Ainda, serão avaliados os outros genes.

As cepas não orais podem ser espécies transitórias na cavidade bucal. Além disso, as espécies orais que albergam os genes podem servir de reservatório para genes que podem ser passados para outras espécies, mesmo as não orais porque as espécies orais podem ser disseminadas para sítios extraorais, onde poderiam fornecer os genes de resistência para demais espécies.

CONCLUSÕES: Considerando os genes pesquisados, muitas espécies bacterianas possuem genes de resistência conhecidos, a maioria dessas espécies não são orais.

BIBLIOGRAFIA: Belmok A, de Cena JA, Kyaw CM, Damé-Teixeira N. The Oral Archaeome: A Scoping

Review. J Dent Res. 2020 Jun;99(6):630-643.

Carr VR, Witherden EA, Lee S, Shoaie S, Mullany P, Proctor GB, Gomez-Cabrero D, Moyes DL. Abundance and diversity of resistomes differ between healthy human oral cavities and gut. Nat Commun. 2020 Feb 4;11(1):693.

Dewhirst FE, Chen T, Izard J, Paster BJ, Tanner AC, Yu WH, Lakshmanan A, Wade WG. The human oral microbiome. J Bacteriol. 2010 Oct;192(19):5002-

Ghannoum MA, Jurevic RJ, Mukherjee PK, Cui F, Sikaroodi M, Naqvi A, Gillevet PM. Characterization of the oral fungal microbiome (mycobiome) in healthy individuals. PLoS Pathog. 2010 Jan 8;6(1):e1000713.

Human Microbiome Project Consortium. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. Nature. 2012 Jun 13;486(7402):207-14.

Li K, Bihan M, Yooseph S, Methé BA. Analyses of the microbial diversity across the human microbiome. PLoS One. 2012;7(6):e32118.