

## Emprego de saliva na determinação do risco às doenças periodontais: aspectos microbiológicos e clínicos

*Maurício Hidemi SHIMADA, Leciana de ANGELIS,*

*Francisco Isaak Nicolas CIESIELSKY, Ellen Cristina GAETTI-JARDIM,*

*Elerson GAETTI-JARDIM Jr.*

*Departamento de Patologia e Propedêutica Clínica, Faculdade de Odontologia,  
UNESP, 16015-050 Araçatuba - SP, Brasil*

Shimada MH, Angelis L, Ciesielsky FIN, Gaetti-Jardim EC, Gaetti-Jardim Jr E. Use of saliva in the evaluation of risk for periodontal diseases: clinical and microbiological aspects. Rev Odontol UNESP. 2008; 37(2): 183-189.

**Resumo:** O diagnóstico microbiológico das condições periodontais constitui método para o acompanhamento da eficácia do tratamento, bem como para a caracterização da microbiota do paciente. O presente estudo avaliou a possibilidade de se empregar a saliva para análise da microbiota de indivíduos com diferentes condições periodontais. A amostra foi constituída de 53 pacientes com gengivite, 52 com periodontite e 70 eram saudáveis. Os espécimes clínicos de saliva e do biofilme subgengival foram obtidos, sendo que a ocorrência de 14 patógenos foi avaliada através de PCR. A prevalência dos microrganismos testados e a confiabilidade dos resultados foram avaliadas pelas estatísticas de Cochran e Mantel-Haenszel. Verificou-se uma concordância de 79% a 86% entre as amostras de saliva e de biofilme subgengival para a ocorrência de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Campylobacter rectus*, *Eikenella corrodens* e *Fusobacterium nucleatum*. Valores ainda significativos foram observados para *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia* e *Enterococcus faecalis*. Os resultados sugerem que a saliva pode ser utilizada para a caracterização da microbiota subgengival.

**Palavras-chave:** Doença periodontal; prevenção; anaeróbios; saliva; biofilme.

**Abstract:** The microbiological diagnostic of periodontal pathologies represents relevant method of treatment follow up and characterization of patients' microbiota. This study evaluated the usefulness of saliva in the analysis of microbiota of subjects presenting different periodontal conditions. The sample was constituted by 53 gingivitis patients, 52 periodontitis patients, and 70 healthy subjects. Clinical samples of subgingival biofilm and saliva were obtained and the occurrence of 14 periodontal pathogens was determined by PCR. The prevalence of the target microorganisms and the reliability of the results were submitted to Cochran e Mantel-Haenszel statistical analyses. It was verified a concordance from 79% to 86% between saliva and biofilm samples for *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Campylobacter rectus*, *Eikenella corrodens* and *Fusobacterium nucleatum*. Significant values were also observed for *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia* and *Enterococcus faecalis*. These results suggested that saliva may be useful in the evaluation of subgingival microbiota, which may reduce the necessity of complex and sophisticated methods to collect and transport clinical samples for microbiological analysis.

**Keywords:** Periodontal diseases; prevention; saliva; anaerobic bacteria; saliva; biofilm.

### Introdução

Entre as doenças que acometem o aparelho estomatognático, merecem destaque as periodontopatias, que possuem um caráter endógeno e estão associadas à formação de um biofilme microbiano complexo, no qual espécies bacte-

rianas desempenham um papel específico na patogênese dessas condições, quer através de danos diretos aos tecidos do hospedeiro, quer através de fenômenos inflamatórios e imunologicamente mediados<sup>1,2</sup>.

A patogênese das periodontopatias está ligada a diferentes espécies microbianas, em particular os bastonetes Gram-negativos, como *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, relacionados a outros microrganismos Gram-positivos e negativos<sup>1-3</sup>. A distribuição de alguns desses periodontopatógenos ainda possui marcada influência étnico-racial, como *A. actinomycetemcomitans*, freqüentemente associado com as modalidades mais agressivas de doenças periodontais<sup>4-6</sup>.

Sabe-se que as bactérias anaeróbias e microaerófilas bucais estão envolvidas em diversos outros processos infecciosos. Entretanto, poucos são os laboratórios clínicos ou de pesquisa, no Brasil, que realizam o isolamento, identificação e detecção desses microrganismos, seja por métodos convencionais ou moleculares<sup>7-8</sup>, sendo que esses últimos constituem importantes e precisas ferramentas de diagnóstico clínico e identificação das espécies microbianas bucais<sup>9</sup>, colaborando na compreensão das inter-relações entre essa microbiota e seu hospedeiro. Dentre essas metodologias, destaca-se o PCR<sup>5</sup>.

Em função de uma relação íntima entre a microbiota do sulco gengival e o desenvolvimento dessas doenças, o biofilme subgengival é escolhido como fonte de espécimes clínicos para determinação do risco de progressão das periodontopatias<sup>10-11</sup>. Contudo, em levantamentos epidemiológicos, para a obtenção do biofilme subgengival, sem contaminá-lo com saliva ou biofilme supragengival, necessita-se de condições ambientais e de trabalho adequadas.

Porém, caso a composição da microbiota salivar se assemelhe ou se origine da presente no interior do sulco gengival, poder-se-ia empregar a própria saliva, em substituição ao biofilme, para esses fins<sup>12</sup>. Assim, considerando-se a importância de estudos microbiológicos sobre distribuição de microrganismos bucais associados às periodontopatias no monitoramento dos efeitos do tratamento periodontal, bem como na avaliação de fatores de risco para essas doenças, o presente estudo avaliou o uso da saliva como substituto do biofilme subgengival para a caracterização da microbiota periodontal, bem como possíveis correlações entre as condições de saúde periodontal e a contaminação microbiana observada na saliva.

## Material e método

### População estudada

A população estudada foi constituída de 70 indivíduos periodontalmente saudáveis, 53 pacientes com gengivite associada ao biofilme microbiano e 52 pacientes com periodontite crônica, com idade variando de 18 a 60 anos (média de  $43,27 \pm 16,83$  anos), de ambos os gêneros (112 do gênero feminino e 63 do gênero masculino). Os pacien-

tes procuraram as clínicas da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP ou faziam parte de programas de atendimento proporcionados por essa instituição de ensino. Os pacientes receberam instruções sobre a importância e objetivos do estudo e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Todos os pacientes foram submetidos à avaliação estomatológica e de dieta, bem como a um questionário sobre hábitos de higiene e consumo de bebidas alcoólicas e tabaco. Os indivíduos selecionados apresentavam, no mínimo, 20 elementos dentais<sup>13</sup> e não fizeram uso de antimicrobianos nos três meses que precederam a coleta dos espécimes clínicos. Pacientes grávidas, indivíduos que receberam tratamento periodontal nos seis meses anteriores ou que possuíssem patologias sistêmicas não participaram do estudo<sup>4</sup>.

### Exame clínico periodontal

Inicialmente procedeu-se à anamnese, em formulários padronizados, constando a identificação do paciente, idade, aspectos étnico-raciais, história da doença atual, histórias social, médica e familiar. A seguir, realizaram-se os exames clínicos intra e extrabucais. Os exames clínicos periodontais foram realizados utilizando-se os critérios do Periodontal Screening and Recording (PSR).

O exame foi realizado com o uso de espelho bucal plano, pinça para algodão (Duflex®), sondas periodontais milimetradas tipo Williams (Trinity®) e sondas periodontais (Trinity®), semelhantes às sondas número 621 da Organização Mundial de Saúde. A sonda era introduzida no sulco gengival, de maneira delicada, posicionada paralelamente ao longo eixo dental e percorria todas as faces dos dentes presentes. A cavidade bucal do indivíduo era dividida em sextantes.

O maior escore do PSR era avaliado para cada um dos sextantes e, se ausente, era registrado com um X. Os escores variaram de 0 a 4. Código 0: ausência de bolsa periodontal, sem sangramento à sondagem, ausência de cálculo e de excessos de margens de restauração. Código 1: ausência de bolsa periodontal, embora com presença de sangramento à sondagem; sem cálculo e excessos nas margens das restaurações. Código 2: ausência da bolsa periodontal, sangramento à sondagem, presença de cálculo supra e/ou subgengival e/ou excessos nas margens de restaurações. Código 3: presença de bolsa de 3,5 a 5,5 mm, necessitando de um exame periodontal complementar apenas do sextante com periodontograma, radiografias, medidas de bolsa e nível de inserção e de tratamento periodontal especializado. Código 4: presença de bolsa periodontal acima de 5,5 mm, a qual, por ser considerada sinal de periodontite instalada, necessitava de minuciosos exames periodontais e radiográficos completos.

A inserção do código (\*) no sextante significava a presença de problemas como envolvimento de furca, mobilidade,

patologias muco-gengivais e retração gengival acima de 3,5 mm. Os dados coletados eram registrados em ficha apropriada, segundo recomendação da American Dental Association e American Academy of Periodontology. Os indivíduos diagnosticados com os códigos 3 e 4 eram submetidos a exame periodontal complementar mais detalhado. Todos os pacientes e sadios receberam palestras individuais sobre instruções de higiene oral, utilização de escova, de fio/fita dentais e uso de escovas interdentais.

No exame periodontal complementar, considerava-se o índice sangramento gengival<sup>14</sup>, presença de cálculo, mobilidade dental, determinação da profundidade clínica de sondagem e nível clínico de inserção<sup>15</sup>, índice de higiene oral<sup>16</sup>, com utilização de verde de malaquita (2%), o qual não apresenta atividade antimicrobiana significativa. O exame radiográfico era realizado por um único examinador previamente treinado, com filmes periapicais Kodak Ekta Plus e uso de posicionadores tipo Hanshin, para avaliar a quantidade de osso remanescente e padrão de distribuição óssea.

#### *Obtenção dos espécimes clínicos*

As coletas de saliva não estimulada foram realizadas imediatamente antes do exame clínico das condições periodontais. A saliva era coletada e transferida para criotubos contendo água ultrapura Milli Q (Milli-Q Water Purification System, Millipore, Milford, MA, USA), que foram armazenados a -196 °C, até a extração do DNA bacteriano.

A coleta dos espécimes do biofilme subgengival foi realizada, após a remoção do biofilme supragengival e profilaxia dental, nos três sítios periodontais com maior profundidade clínica de sondagem e apresentando características clínicas de inflamação gengival. A coleta era realizada por meio de cones de papel absorvente esterilizados, que eram introduzidos no interior dos sulcos gengivais (ou bolsas periodontais), onde permaneciam por 60 segundos<sup>7</sup>. Todos os espécimes coletados eram transferidos imediatamente para água ultrapura Milli-Q e submetidos ao processamento laboratorial para extração do DNA microbiano.

#### *Extração do DNA bacteriano e determinação de sua concentração*

O DNA das amostras clínicas nos criotubos com água Milli Q era extraído através do “kit” QIAamp DNA MiniKit (QIAGEN, Hilden, Alemanha), seguindo as recomendações do fabricante. O produto era mantido a -196 °C e as concentrações do DNA bacteriano, para cada uma das amostras de saliva e biofilme (700 amostras ao todo), foram determinadas em espectrofotômetro (Beckman, Modelo DU-640), com leitura da absorbância ( $A_{260\text{ nm}}$ ).

#### *Deteção de microrganismos periodontais por PCR*

A presença *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Campylobacter rectus*, *Dialister pneumosintes*, *Eikenella corrodens*, *Enterococcus sp.*, *E. faecalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Peptostreptococcus micros*, *Porphyromonas endodontalis*, *P. gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *P. nigrescens*, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola* foi avaliada utilizando-se iniciadores e condições de amplificação, por PCR, específicos para cada microrganismo<sup>17-21</sup>.

#### *Reação de amplificação do DNA por PCR*

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<sub>2</sub> (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. A amplificação foi realizada em aparelho de PCR (Perkin Elmer, GeneAmp PCR System 9700) programado para: 1 ciclo de 94 °C (5 minutos); 30-36 ciclos de 94 °C (30 segundos - 1 minuto), temperatura de anelamento de cada iniciador (30 segundos - 1 minuto), 72 °C (30 segundos - 1 minuto); e um ciclo final de 72 °C (5 minutos), para a elongação final das cadeias de DNA.

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 µg.mL<sup>-1</sup>) e fotografados sobre transiluminador com luz UV. Como padrão de peso molecular utilizou-se o marcador 1 kb DNA ladder (Gibco, São Paulo, Brasil).

#### *Análise estatística*

As amostras permitiram, através de estatísticas pontuais e intervalos de confiança, caracterizar os pacientes quanto aos parâmetros clínicos, bem como microbiológicos. Prevalência e análise de risco foram feitas utilizando-se as estatísticas de Cochran e Mantel-Haenszel (cálculo de odds-ratio) para variáveis dicotômicas, ou teste de Qui-quadrado de Pearson para análise de proporções quando as variáveis possuírem 3 ou mais categorias. As inter-relações entre os parâmetros clínicos, os diferentes microrganismos presentes na saliva e no biofilme, foram avaliadas por regressão logística multivariada. Os níveis de significância adotados nos testes foram sempre iguais a 5%.

#### **Resultado**

A população estudada mostrou heterogeneidade em termos de gênero, sendo que uma minoria é consumidora de bebidas alcoólicas (teste de Qui-quadrado,  $P < 0,001$ ) ou tabagista (teste de Mann-Whitney,  $P = 0,273$ ), e o gênero masculino mostrou-se mais propenso a esses dois hábitos.

Os dados coletados evidenciaram que 64% dos participantes do estudo declararam ter freqüentado o cirurgião-dentista no ano anterior.

A má higiene bucal não se mostrou ligada ao fator gênero, estando distribuída homogeneamente entre homens e mulheres. Verificou-se que os indivíduos mais velhos apresentavam significativa deterioração das condições de saúde periodontal, com maior sangramento gengival (teste de Mann-Whitney,  $P = 0,035$ ) e perda de inserção conjuntiva (teste de Mann-Whitney,  $P < 0,001$ ). Não foram observadas relações entre sangramento gengival e gênero dos pacientes, bem como consumo de tabaco ou bebidas alcoólicas e inflamação gengival. Entretanto, o consumo de bebidas alcoólicas mostrou relação com o grau de mobilidade dental (teste de Qui-quadrado,  $P < 0,001$ ).

A freqüência de escovação e uso de fio dental não se mostraram influenciadas pelos fatores gênero, idade ou consumo de tabaco, mas foram significativamente menores nas pessoas que consumiam bebidas alcoólicas (teste de Qui-quadrado,  $P = 0,001$ ). A presença de retenção de alimentos na cavidade bucal evidenciou relação com a perda de inserção conjuntiva (teste de Mann-Whitney,  $P < 0,001$ ) e presença de sangramento gengival (teste de Qui-quadrado,  $P = 0,011$ ).

Quanto aos dados microbiológicos, verificou-se que cada espécie microbiana interagiu de diferentes formas com os fatores ambientais e com os demais membros da microbiota. A Tabela 1 apresenta a freqüência de detecção dos microrganismos estudados nas amostras de saliva da população

alvo, enquanto a Tabela 2 apresenta os resultados referentes às amostras de biofilme subgengival.

A análise da freqüência de detecção dos diferentes microrganismos estudados pode permitir que as complexas relações ecológicas entre os membros da microbiota bucal sejam avaliadas. Assim, parece existir uma associação sinérgica entre *A. actinomycetemcomitans*, *E. corrodens*, *P. intermedia* e *P. gingivalis*; entre *C. rectus*, *P. micros*, *P. intermedia*, *P. gingivalis* e *T. forsythia*; *F. nucleatum* e *T. forsythia*; *P. endodontalis* e *P. intermedia*; entre *C. rectus*, *D. pneumosintes* e *P. intermedia* no biofilme subgengival e saliva.

Nesse sentido, *Porphyromonas endodontalis* no biofilme foi detectada em maior freqüência entre os pacientes que apresentavam sangramento gengival, independentemente da presença ou não de perda de inserção conjuntiva (teste de Mann-Whitney,  $P = 0,031$ ), enquanto a presença de *Eikenella corrodens* nesse mesmo biofilme se mostrou associada à falta de higiene (teste de Mann-Whitney,  $P = 0,018$ ), consumo de tabaco (teste de Qui-quadrado,  $P = 0,021$ ; teste exato de Fisher,  $P = 0,036$ ), e baixa freqüência de escovação (teste de Qui-quadrado,  $P = 0,023$ ).

A freqüência de detecção de *P. endodontalis*, *A. actinomycetemcomitans*, *F. nucleatum*, *T. forsythia*, *P. intermedia*, *P. gingivalis* e *P. nigrescens* era mais elevada em pacientes que apresentavam sangramento gengival, enquanto *E. corrodens*, *A. actinomycetemcomitans*, *F. nucleatum* e *P. gingivalis* foram observados com maior freqüência entre indivíduos com elevados níveis de placa.

**Tabela 1.** Ocorrência de microrganismos na saliva de pacientes portadores de diferentes condições de saúde periodontal

Microrganismo	Condição de saúde periodontal N(%)			
	IPS <sup>a</sup> N = 70	PG <sup>b</sup> N = 53	PP <sup>c</sup> N = 52	Total <sup>d</sup> N = 175
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	10 (14,29)	11 (20,76)	12 (23,08)	33 (18,86)
<i>C. rectus</i>	21 (30,0)	18 (33,96)	29 (55,77)	68 (38,86)
<i>D. pneumosintes</i>	2 (2,86)	8 (15,09)	16 (30,77)	26 (14,86)
<i>E. corrodens</i>	21 (30,0)	28 (52,83)	34 (65,38)	83 (47,43)
<i>Enterococcus spp.</i>	11 (15,71)	13 (24,53)	13 (25,0)	37 (21,14)
<i>E. faecalis</i>	10 (14,29)	11 (20,75)	9 (17,31)	31 (17,71)
<i>F. nucleatum</i>	29 (41,43)	30 (56,6)	39 (75,0)	98 (56,0)
<i>P. micros</i>	9 (12,86)	12 (22,64)	21 (40,38)	42 (24,0)
<i>P. endodontalis</i>	14 (8,0)	8 (15,09)	9 (17,31)	28 (16,0)
<i>P. gingivalis</i>	21 (30,0)	19 (35,85)	22 (42,31)	62 (35,43)
<i>P. intermedia</i>	22 (31,43)	33 (62,26)	36 (69,23)	91 (52,0)
<i>P. nigrescens</i>	11 (15,71)	19 (35,95)	21 (40,38)	51 (28,14)
<i>T. denticola</i>	9 (12,86)	0 (0,0)	4 (7,69)	13 (7,43)
<i>T. forsythia</i>	10 (14,29)	13 (24,53)	21 (40,38)	44 (25,14)

<sup>a</sup>Indivíduos periodontalmente saudáveis; <sup>b</sup>Pacientes com gengivite; <sup>c</sup>Pacientes com periodontite; <sup>d</sup>Total de indivíduos estudados

**Tabela 2.** Ocorrência de microrganismos no biofilme subgengival de pacientes portadores de diferentes condições de saúde periodontal

Microrganismo	Condição de saúde periodontal N(%)			
	IPS <sup>a</sup> N = 70	PG <sup>b</sup> N = 53	PP <sup>c</sup> N = 52	Total <sup>d</sup> N = 175
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	9 (12,86)	12 (22,64)	16 (30,77)	37 (21,14)
<i>C. rectus</i>	19 (27,14)	25 (47,17)	37 (71,38)	81 (46,29)
<i>D. pneumosintes</i>	4 (5,71)	13 (24,53)	21 (40,38)	38 (21,71)
<i>E. corrodens</i>	33 (47,14)	34 (64,15)	40 (76,92)	107 (61,14)
<i>Enterococcus spp.</i>	16 (22,86)	11 (20,65)	19 (36,54)	46 (26,29)
<i>E. faecalis</i>	7 (10,0)	7 (13,21)	13 (25,0)	27 (15,43)
<i>F. nucleatum</i>	36 (51,43)	33 (62,26)	47 (90,38)	116 (66,29)
<i>P. micros</i>	13 (18,71)	17 (32,08)	28 (53,85)	68 (38,86)
<i>P. endodontalis</i>	15 (21,42)	10 (18,88)	16 (30,76)	41 (23,43)
<i>P. gingivalis</i>	21 (30,0)	23 (43,4)	30 (57,69)	64 (36,58)
<i>P. intermedia</i>	27 (38,57)	39 (73,58)	45 (86,54)	111 (63,43)
<i>P. nigrescens</i>	14 (20,0)	27 (50,94)	25 (48,08)	66 (37,71)
<i>T. denticola</i>	8 (11,43)	9 (16,98)	13 (25,0)	30 (17,14)
<i>T. forsythia</i>	11 (15,71)	19 (35,85)	29 (55,77)	59 (33,71)

<sup>a</sup>Indivíduos periodontalmente saudáveis; <sup>b</sup>Pacientes com gengivite; <sup>c</sup>Pacientes com periodontite; <sup>d</sup>Total de indivíduos estudados

A perda de inserção conjuntiva, observada nos pacientes com graus 3 e 4 do PSR, se mostrou estatisticamente ligada à colonização do biofilme por *A. actinomycetemcomitans*, *P. intermedia*, *C. rectus*, *E. corrodens*, *P. micros*, *P. nigrescens* e, especialmente, *T. forsythia* e *P. gingivalis*, bem como a presença desses microrganismos na saliva. Outro aspecto que afetou a ocorrência de alguns microrganismos foi a retenção de alimentos na cavidade bucal, que parece facilitar a colonização por *E. corrodens*, *T. forsythia*, *P. intermedia*, *P. gingivalis* e *P. nigrescens*. O consumo de bebidas alcoólicas parece estar associado a uma maior detecção de *P. nigrescens* na saliva dos pacientes.

Verificou-se uma concordância de 79% a 86% entre as amostras de saliva e do biofilme subgengival para a ocorrência de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Campylobacter rectus* e *Fusobacterium nucleatum*. Valores menores, mas significativos ainda foram observados para *Eikenella corrodens*, *Enterococcus faecalis*, *Prevotella intermedia* e *Tannerella forsythia*, enquanto a saliva foi inadequada para a detecção de *D. pneumosintes* e *T. denticola*.

## Discussão

A saliva é frequentemente indicada para avaliação do risco à cárie em levantamentos epidemiológicos e clínicas odontológicas, mas nesse caso os principais microrganismos detectados, os estreptococos cariogênicos, fazem parte da microbiota supragengival e acabam por ter fácil acesso ao

fluxo salivar, de forma que a composição da saliva representa a composição da microbiota presente no biofilme supragengival. Assim, poucos são os estudos que objetivam caracterizar a contaminação microbiana da saliva quanto à ocorrência de periodontopatógenos<sup>22</sup>, o que contrasta com o fato de ser ela o veículo de transmissão desses microrganismos<sup>23-24</sup>.

O acesso dos microrganismos periodontopatogênicos ao fluxo salivar seria mais indireto, uma vez que seu habitat é o sulco gengival ou a bolsa periodontal<sup>2</sup>, sendo que quanto maior a profundidade clínica de sondagem do sítio periodontal, menor seria o contato de sua microbiota com o ambiente bucal externo. Porém, com a progressão das doenças periodontais, as principais populações dos patógenos associados à etiologia dessas condições também sofrem uma significativa elevação<sup>1</sup>, o que poderia compensar o menor contato delas com a saliva. Além desse aspecto, a grande sensibilidade de métodos moleculares, como os baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR), pode compensar essas limitações<sup>12</sup>.

Mesmo em pacientes submetidos ao tratamento periodontal, o monitoramento da recolonização dos sítios periodontais e a formação da microbiota subgengival são importantes<sup>22</sup>, embora, em função dos custos e dificuldades metodológicas, poucos laboratórios clínicos ou de pesquisa se destinem a esse objetivo<sup>8</sup>.

Sirinian et al.<sup>22</sup> verificaram a frequência de detecção de quatro espécies de periodontopatógenos na saliva, obtendo valores de ocorrência menores do que os apresentados na Tabela 1, sendo que os valores referentes à colonização do

periodonto por esses microrganismos não é apresentada, o que dificulta a comparação entre o biofilme subgingival e saliva como espécime para análise. Contudo, como também observado no presente estudo, a composição da microbiota presente na saliva é capaz de trazer informações adicionais não suspeitadas, como as condições de higiene e outros aspectos clínicos, que constituem fatores de risco que devem ser avaliados.

Os resultados apresentados na Tabela 1 são mais próximos dos obtidos por Umeda et al.<sup>24</sup>, os quais encontraram elevada proporção de pacientes adultos e crianças colonizadas por esses microrganismos. Contudo, algumas diferenças marcantes também podem ser observadas, como a pequena frequência de detecção de alguns microrganismos, como *T. denticola*, no presente estudo, o que pode refletir aspectos culturais e sócio-econômicos da população estudada, uma vez que os métodos empregados foram semelhantes.

A grande heterogeneidade da população brasileira pode dificultar comparações entre os resultados obtidos em nosso país com aqueles oriundos de outras áreas geográficas e essa dificuldade também se observa comparando-se diferentes populações brasileiras. Assim, embora os resultados do presente estudo concordem que a microbiota subgingival deixa sua marca na composição microbiana da saliva, como também observado por Cortelli et al.<sup>25</sup>, ao contrário desses últimos, que detectaram *A. actinomycetemcomitans* em mais de 80% dos pacientes com periodontite, a Tabela 2 evidencia a presença desse microaerófilo em 30,77% dos pacientes.

Enquanto a ocorrência de mais do que uma espécie periodontopatogênica na saliva parece ser rara entre americanos de ascendência européia, entre os latino-americanos e asiáticos vivendo nos Estados Unidos essa característica está presente em 20% das crianças e seus familiares<sup>22</sup> e também foi observada no presente estudo, no qual, não raro, *A. actinomycetemcomitans*, *C. rectus*, *E. corrodens*, *F. nucleatum* e *T. forsythia* colonizaram o mesmo sítio periodontal e também puderam ser detectados na saliva do paciente.

Os resultados apresentados estão de acordo com a literatura que evidenciou que a microbiota presente na saliva refletia a microbiota subgingival dos pacientes<sup>26-27</sup>, sendo que a obtenção de saliva conta com uma colaboração muito maior desses últimos, uma vez que é considerada não invasiva<sup>28</sup>, facilitando estudos epidemiológicos em grandes populações ou envolvendo crianças.

Contudo, a utilidade da saliva para detecção desses microrganismos em indivíduos sadios ou com gengivite era considerada questionável pela pequena quantidade de DNA normalmente obtida<sup>12,24</sup>. Nesse sentido, a sensibilidade da técnica utilizada se mostrou satisfatória e permitiu a detecção dos periodontopatógenos em todas as categorias de pacientes envolvidos, sendo que a sensibilidade do método foi estimada em 2000 cópias do genoma do microrganismo

alvo, como determinado no processo de padronização da metodologia, a partir de diluições seriadas do DNA de amostras de referência.

## Conclusão

Assim, os resultados do presente estudo reforçam a possibilidade do emprego de saliva para avaliação da microbiota associada às doenças periodontais, independentemente do grau de comprometimento periodontal do paciente e que a análise do conteúdo microbiano da saliva reflete as condições periodontais e vários aspectos sócio-econômicos, culturais e comportamentais dos pacientes.

## Agradecimento

O presente estudo foi realizado com suporte financeiro e material obtido com auxílios junto à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP 07/54851-0 e 07/07/51016-3).

## Referências

1. Feng Z, Weinberg A. Role of bacteria in health and disease of periodontal tissues. *Periodontology* 2000; 2006;40:50-76.
2. Faveri M, Mayer MPA, Feres M, de Figueiredo LC, Dewhirst FE, Paster BJ. Microbiological diversity of generalized aggressive periodontitis by 16S rRNA clonal analysis. *Oral Microbiol Immunol*. 2008;23:112-8.
3. Haffajee AD, Patel M, Socransky SS. Microbiological changes associated with four different periodontal therapies for the treatment of chronic periodontitis. *Oral Microbiol Immunol*. 2008;23:148-57.
4. 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;31:996-1002.
5. Leung WK, Ngai VKS, Yau JYY, Cheung BPK, Tsang PWK, Corbet EF. Characterization of Actinobacillus actinomycetemcomitans isolated from young Chinese aggressive periodontitis patients. *J Periodontal Res*. 2005;40:258-68.
6. Gaetti-Jardim Jr. E, Bosco JMD, Lopes AM, Landucci LF, Gaetti-Jardim EC, Carneiro SRS. Occurrence of Actinobacillus actinomycetemcomitans in patients with chronic periodontitis, aggressive periodontitis, healthy subjects, and children with gingivitis in two cities of the State of São Paulo, Brazil. *J Appl Oral Sci*. 2006;14:153-6.
7. Gaetti-Jardim Jr E, Zelante F, Avila-Campos MJ. Oral species of Fusobacterium from human and environmental samples. *J Dent*. 1996;24:345-8.
8. Paula MO, Gaetti-Jardim Jr E, Avila-Campos MJ. Plasmid profile in oral Fusobacterium nucleatum from

- humans and *Cebus apella* monkeys. *Rev Inst Med Trop de São Paulo*. 2003;45:5-9.
9. Yamaura M, Sato T, Echigo S, Takahashi N. Quantification and detection of bacteria from postoperative maxillary cyst by polymerase chain reaction. *Oral Microbiol Immunol*. 2005;20:333-8.
  10. Boutaga K, Savelkoul PHM, Winkel EG, Van Winkelhoff AJ. Comparison of subgingival bacterial sampling with oral lavage for detection and qualification of periodontal pathogens by real-time polymerase chain reaction. *J Periodontol*. 2007;78:79-86.
  11. Ebersole JL, Holt SC, Hansard R, Novak MJ. Microbiologic and immunologic characteristics of periodontal disease in Hispanic Americans with type 2 diabetes. *J Periodontol*. 2008;79:637-46.
  12. Price RR, Viscount HB, Stanley MC, Leung K-P. Targeted profiling of oral bacteria in human saliva and in vitro biofilms with quantitative real-time PCR. *Biofouling*. 2007;23:203-13.
  13. Cortelli SC, Feres M, Rodrigues AAB, Aquino DR, Shibli JA, Cortelli JR. Detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in unstimulated saliva of patients with chronic periodontitis. *J Periodontol*. 2005;76:204-9.
  14. Ainamo J, Bay I. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. *Int Dent J*. 1975;25:229-35.
  15. Ramfjord SP. Indices for prevalence and incidence of periodontal disease. *J Periodontol*. 1959;30:51-9.
  16. O'leary TJ, Drake RB, Naylor JE. The plaque control record. *J Periodontol*. 1972; 43:38-56.
  17. Ashimoto A, Chen C, Bakker I, Slots J. Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. *Oral Microbiol Immunol*. 1996;11:266-73.
  18. Ke D, Picard FJ, Martineau F, Ménard C, Roy PH, Ouellette M, et al. Development of a PCR assay for rapid detection of enterococci. *J Clin Microbiol*. 1999;37:3497-503.
  19. Doan N, Contreras A, Flynn J, Slots J, Chen C. Molecular identification of *Dialister pneumosintes* in subgingival plaque of humans. *J Clin Microbiol*. 2000;38:3043-7.
  20. Avila-Campos MJ, Velasquez-Melendez G. Prevalence of putative periodontopathogens from periodontal patients and healthy subjects in São Paulo, SP, Brazil. *Rev Inst Med Trop S Paulo*. 2002;44:1-5.
  21. Foschi F, Cavrini F, Montebugnoli L, Stashenko P, Sambri V, Prati C. Detection of bacteria in endodontic samples by polymerase chain reaction assays and association with defined signs in Italian patients. *Oral Microbiol Immunol*. 2005;20:289-95.
  22. Sirinian G, Shimizu T, Sugar C, Slots J, Chen C. Periodontopathic bacteria in young healthy subjects of different ethnic backgrounds in Los Angeles. *J Periodontol*. 2002;73:283-8.
  23. Asikainen S, Chen C, Alaluusua S, Slots J. Can one acquire periodontal bacteria and periodontitis from a family member? *J Am Dent Assoc*. 1997;128:1263-71.
  24. Umeda M, Miwa Z, Takeuchi Y, Ishizuka M, Huang Y, Noguchi K, et al. The distribution of periodontopathic bacteria among Japanese children and their parents. *J Periodontal Res*. 2004;39:398-404.
  25. Cortelli JR, Cortelli SC, Jordan S, Haraszthy VI, Zambon JJ. Prevalence of periodontal pathogens in Brazilians with aggressive or chronic periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2005;32:860-6.
  26. Mattö J, Saarela M, von Troil-Linden B, Alaluusua S, Jousimies-Somer H, Asikainen S. Similarity of salivary and subgingival *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* isolates by arbitrarily primed polymerase chain reaction. *Oral Microbiol Immunol*. 1996;11:395-401.
  27. Umeda M, Contreras A, Chen C, Bakker I, Slots J. The utility of whole saliva to detect the oral presence of periodontopathic bacteria. *J Periodontol*. 1998;69:828-33.
  28. Asikainen S, Alaluusua S, Saxen L. Recovery of *A. actinomycetemcomitans* from teeth, tongue, and saliva. *J Periodontol*. 1991;62:203-6.

Recebido: 14/05/2008

Aceito: 17/06/2008

