

## **Análise do pH da saliva total em pacientes com doença periodontal por RMN**

Liana Bastos Freitas-Fernandes, Fabiana Albernaz, Ana Paula Valente e Fabio Almeida. Instituto da Bioquímica médica da UFRJ e ao Centro Nacional de Ressonância Magnética Nuclear da UFRJ

### **INTRODUÇÃO**

A saliva é um biofluido complexo que contém vários de componentes dentre inúmeras funções regula a composição da microbiota oral mantendo a saúde bucal. A adsorção dos componentes salivares nas superfícies orais inicialmente formam o biofilme oral que seguidamente inicia-se o processo de adesão de microrganismos nestas interfaces orais. Os biofilmes, que se forma na superfície oral, são o principal fator etiológico no desenvolvimento da cárie dentária e doença periodontal (Krasse 1968, Bratthall 1970, Løe et al, 1965). O estabelecimento de placa dentária e adesão de microrganismos são dependentes da composição da saliva, a anatomia do dente, e características da superfície do dente, bem como a capacidade de ligação de microorganismos e à dieta (Meckel 1965, Glantz 1969, Sonju & Glantz 1975, Baier e Glantz 1978, Hay et al 1971, Carlen 1996, Amerongen & Veerman 2002; (Lundqvist 1952, Mandel, 1984; Scheie et al 1984). A complexidade do sistema implica que a formação do biofilme oral é resultado de um processo dinâmico que envolve diferentes tipos de moléculas, que influenciam a adsorção na superfície oral (Meckel 1965, Baier e Glantz 1978, Bennick et al 1983, para revisão ver Lindh 2002).

Várias tentativas foram feitas para compreender e classificar bioquímica da saliva e propriedades físico-químicas (Amerongen & Veerman 2002, Schipper et al 2007). Estes estudos mostraram que a composição da saliva não é homogênea e varia muito, tanto intra e inter-individual e depende de vários fatores como idade, sexo, dieta e estado fisiológico. Por exemplo, na periodontite, aril-sulfatase, aspartato aminotransferase,  $\beta$  - glucoronidase e lactato desidrogenase são elevadas no fluido gengival (revisado por Page, 1992). Na verdade, a composição das proteínas da saliva todo difere mesmo entre indivíduos de saúde ( Freitas-Fernandes LB, 2003).

Recentemente, a saliva tem recebido toda a atenção devido ao seu potencial para diagnóstico de doenças virais, bacterianas e sistêmica, e foi incluído na "era genômica" (metabonômica, proteômica, genômica e bioinformática). Vários esforços estão sendo feitos para identificar biomarcadores na saliva para fins de diagnóstico adicional e, além disso, a concepção de novos medicamentos (Hu S et al 2007).

Tentativas com sucesso usando estratégias proteômica identificados marcadores associados com condições diferentes como por exemplo na saliva de pacientes com câncer de mama ( Streckfus et al. 2006 ). Além disso, identificadas componentes na síndrome de Sjogren em saliva dos pacientes (Ryu et al., 2006).

Saliva pode indicar alterações nos hormônios como a progesterona (Prince et al 1979), (Vinning et al 1983 a, Heine et al 1999) estriol, e cortisol (Vinicius et al, 1983a). Em princípio, as informações relativas biomoléculas presentes na saliva poderia caracterizar o estado metabólico e ser correlacionado com alguma condição especial sistêmica ou oral. Geralmente, os métodos descritos para investigar bio-componentes envolvem etapas de purificação (Vassilakos et al 1992), mas as novas tecnologias estão sendo aplicadas no estudo da saliva como um potencial no diagnóstico de doenças (Schipper et al 2007).

Espectroscopia de RMN é uma técnica que permite estudos de sistemas múltiplos componentes, como biofluido, sem purificação (Silwood et al 2002, Lynch et al, 1999). Ainda mais, permite a detecção de metabólitos de dietéticos, produtos para saúde bucal e as fontes de detecção de produtos farmacêuticos (Lynch et al, 1999).

O objetivo deste trabalho foi usar o RMN para avaliar possíveis mudanças no pH saliva de pacientes com saúde bucal e com doença periodontal.

## **MATERIAL E MÉTODO**

### **A seleção dos pacientes**

Seis indivíduos de 21 + 60 anos com 28 dentes na boca e sem doença sistêmica, foram selecionados e aceitaram participar do estudo. Três pacientes apresentaram

doença periodontal de acordo com os critérios que mais de 50% de todos os sites da gengiva com sangramento à sondagem (Löe 1967), bem como mais de 20% de todos os sites tinha uma profundidade de bolsa gengival (Ainamo et al 1982) de 5 mm ou mais. Três indivíduos não tinham sinais de doença periodontal.

## Saliva

Não-estimulada de saliva foram coletadas e mantidas em gelo. Amostras de saliva foram clarificadas por centrifugação em 10.000 xg a 4 °C durante uma hora em uma centrífuga Eppendorf (Centrífuga 5417C/5417R, Eppendorf, Hamburgo-Alemanha). Os sobrenadantes foram divididos em tubos eppendorf e colocado em um congelador a -80 °C a fim de ser utilizado para os experimentos a seguir. A concentração de proteínas foi determinado pelo método de Lowry. (Lowry et al 1951).

## A preparação das amostras para RMN

400 µl do sobrenadante da amostra de saliva total de cada sujeito foi utilizado nos experimentos de RMN. Óxido de deutério (0,03 mL) foi incluído na amostra obtendo volume final de 500 µl de cada tubo para a análise no RMN.

## Aparelho de RMN

Os espectros de RMN foram adquiridos através de um espectrômetro Bruker Avance 400 MHz (Bruker Biospin, Rheinstetten, Alemanha) equipado com um 5 Bruker sonda de alta resolução mm. Os experimentos foram realizados a 25

oC. Uma investigação do controle mostraram que as amostras de saliva total foram estáveis durante todo o período experimental de RMN (~ 6 horas). As condições experimentais para a aquisição do espectro de fósforo –  $^{31}\text{P}$ -RMN.

## A análise estatística

A intensidade do pico de fósforo foi anotado para cada paciente e realizada médias e desvios padrão para ambos os grupos. Para cada região do espectro de acordo com ressonância magnética nuclear foi utilizada para calcular o pH da saliva (Nosaka et al 1998) feito diferença estatística entre os grupos pelo teste T ( $p < 0,05$ ).

## RESULTADO

Três pacientes apresentaram doença periodontal similares mais de 50% de todos os sítios da gengiva com sangramento à sondagem, bem como mais de 20% de todos os sítios tinham uma profundidade de bolsa gengival de 5 mm. Três indivíduos não tinham sinais de doença periodontal.

$^{31}\text{P}$ - NMR permitiu a detecção de fósforo na saliva. É evidente que há diferenças na intensidade das ressonâncias que são relacionados a diferentes concentrações na amostra.

O deslocamento químico  $^{31}\text{P}$  é dependente do pH e, portanto, foi utilizado como uma sonda para a variação do pH (Nosaka et al 1998). Utilizou-se o presente  $^{31}\text{P}$  nativas na saliva. Fig. 1A mostra o espectro  $^{31}\text{P}$  de saliva total de pacientes

saudáveis (linhas 1, 2 e 3) e Fig. 2B mostra os espectros de saliva de pacientes com doença periodontal (linhas 4, 5 e 6). Houve uma pequena variação de pH entre cada amostra em torno de pH 7,2. Em pacientes saudáveis a variação foi de 0,35 ppm, que corresponde a uma variação de pH de 6,9 a 7,8. Pacientes com doença periodontal apresentaram também uma variação, o intervalo de ressonância  $^{31}\text{P}$  de 0,6 ppm, o que corresponde a uma variação de pH de 7,06-7,65. Além disso, houve uma variação na intensidade do pico entre os dois grupos, conforme demonstrado na análise estatística (Fig. 2) como ilustra a Boxplot e mostra que diferem o pH do grupo com e sem doença periodontal.

## **DISCUSSÃO**

Metaboloma tem sido incluídos nas investigações genômicas e proteômicas por causa da descrição quantitativa dos metabolitos de baixa massa molecular presentes em amostras biológicas como urina, plasma (Lenz et al 2003) ou saliva (Lynch et al, 1999). Na análise de tais estudos realizados utilizando  $^1\text{H}$  alto campo de ressonância magnética nuclear (RMN), espectroscopia de plasma mostraram que apresentou variabilidade inter e intra baixa individual. Por outro lado, a amostra de urina mostrou uma grande variabilidade inter-individual, mas a variabilidade intra-individual foi menos pronunciada (Lenz et al 2003). Saliva analisados por espectroscopia de RMN (Silwood et al 2002, Lynch et al, 1999) metabolitos detectados a partir alimentares, produtos de cuidados de saúde oral e fontes farmacêutica (Lynch et al, 1999), que também tem variabilidade inter-

individual no entanto a variabilidade intra-individual foi menos observada.

O presente estudo analisou os espectros de  $^{31}\text{P}$  de toda saliva de indivíduos com e sem doença periodontal. Os níveis dos componentes salivares podem servir como marcadores da suscetibilidade dos pacientes a doença oral. Também é possível observar semelhança entre os dados de ressonância encontrada em cada indivíduo e foi permanecer ao longo da reprodutibilidade das análises experimentais. Fósforo-31 estudo de ressonância magnética nuclear foi utilizada para calcular o pH da saliva de acordo com Nosaka et al 1998. Nossos dados mostram que, foi possível identificar as diferenças no pH nas alterações na presença de doença periodontal quando comparada com pacientes saudáveis.

Também é importante ter em mente que o fluido crevicular gengival é parte da saliva total. É sabido que a atividade da colagenase no fluido gengival de pacientes com periodontite se correlaciona com parâmetros clínicos da doença (Villela et al 1987) e que estas diminuem os níveis de enzimas em resposta a procedimentos de tratamento periodontal (Hakkarainen et al 1988). A origem das proteases parecia que poderia ser secretadas pelas células como fibroblastos e secretadas incluem chymotrypsin tripsina e elastase (Suomalainen 1993). Enzimas no fluido gengival e da sua atividade a atividade associada à quebra de componentes da matriz extracelular da gengiva. Além disso arilsulfatase fluido gengival, aspartato aminotransferase, B-glucuronidase e lactato desidrogenase são elevados na periodontite exibindo a destruição tecidual ativa a

julgar pela perda de inserção (revisado por Page, 1992). A correlação entre positiva do índice gengival (Loe e Silness 1963) e escores de atividade peroxidase no fluido gengival tem sido relatada (Tenovuo e Anttonen 1978). Este estudo também mostrou diferença a quantidade de lactato no fluido crevicular entre saudáveis, bem os sujeitos com doença periodontal.

É possível que os componentes encontrados alterado pode estar relacionada à exposição a agentes gerado por bactérias que, de acordo com a etiologia da doença periodontal. Neste trabalho foi usado RMN para avaliar possíveis mudanças no pH saliva de pacientes com saúde bucal comparada com doença periodontal provavelmente devido a grande quantidade de bactérias presentes na boca dos indivíduos com doença periodontal.

Esta constatação está em consonância com anteriormente inquirido que foi encontrado que o etanol foi detectada em uma grande proporção das amostras de saliva humana por análise de RMN 1H (Lynch et al, 1999). Parece que toda a saliva de paciente com doença periodontal têm mais produtos de bactérias gram-negativas (Page) e é esperado que os indivíduos sem doença periodontal têm mais bactérias do grupo Streptococcus disponíveis na saliva total. Sabe-se que catabólica bacteriana derivada como um exemplo, é decorrente do metabolismo de carboidratos por Streptococcus mutans.

A saliva contém uma séria de componentes que podem interferir com a aderência bacteriana (Scannapienco 1994; Douglas, 1994). *S. mutans* na cavidade bucal humana mostraram uma variação na resistência individual à colonização bacteriana (Krasse et al 1967; Svanberg e Krasse 1981). *S. mutans* revestido com a saliva de indivíduos com elevado número de *S* indígenas. *mutans* foi mais facilmente aderem em superfícies oral que os indivíduos que abrigam baixo número de *S. mutans* (Svanberg & Krasse 1981). Observou-se anteriormente que a saliva de indivíduos com elevado número de bactérias ou contém componentes que promovem a adesão ou a falta de componentes que inibem a aderência. Esses relatórios mostram que variações individuais na composição salivar pode afetar as chances de bactérias de aderir e tornar-se aderir a superfícies orais. O número aumentado de microorganismos na cavidade oral de pacientes com doença periodontal pode ser um fator para aumento do pH neste grupo em relação aos pacientes saudáveis. Neste estudo foi possível quantificar a intensidade de Fósforo através da ressonância magnética nuclear da saliva assim como foi realizado em outro estudo o qual pode calcular o pH da saliva humana da parótida, submandibular e sublingual (Nosaka et al 1998).

Espectroscopia de RMN é uma técnica que oferece muitas vantagens sobre os trabalhoso métodos analíticos, pois permite o exame rápido, não invasivo e simultânea de uma ampla gama de componentes presentes em fluidos biológicos, apesar de que não é necessário saber a composição total do fluido. A falta de critérios precisos para a avaliação clínica da doença periodontal tem levado à busca de meios alternativos de determinar os locais de doença ativa, o

prognóstico de futuros locais de ruptura, o que eventualmente poderia ser usado para avaliação da resposta à terapia.

O presente estudo mostrou que os espectros da amostra de saliva de dois grupos de indivíduos com e sem doença periodontal, demonstraram uma grande variação inter-individual, mas também diferenças entre os grupos. Foi mostrado que o pH aumentado das amostras de saliva de pacientes com doença periodontal em relação ao grupo sem doença periodontal. O estudo conclui que foi possível identificar os pico do fósforo, mostrando pico aumentado no grupo da saliva dos pacientes com doença periodontal comparado com pacientes saudáveis.

## **REFERÊNCIAS**

Ainamo J, Barnes D, Beagle G: Development of the World Health Organization Community Periodontal Index of Treatment Needs CPITN. In Dent J 1982 32 (3) 281-291.

Amerongen AV, Veerman ECi. Saliva-The defender of the oral cavity. Oral Disease, 8 (2002)12-22.

Attström R. Does supragingival plaque removal prevent further breakdown ? In Guggenheim B. Ed. Periodontology Today, Karger AG, Basel 1988. pp 251-259.

Baier RE, Glantz P-O. Characterization of oral in vivo films formed on different types of solid surfaces. Acta Odontol Scand. 36 (1978) 289-301.

Bennick A, Chau G, Goodlin R, Abrams S, Tustian D, Madapallimattam G. The role of the human cid praline rich proteins in the formation of acquired dental pellicle in vivo and their fate after adsorption to the human enamel surface. *Archs Oral Biol* 28(1983) 19-27.

Bratthall D. Demonstration of five serological groups of streptococcal strains resembling *Streptococcus mutans*. *Odontol Revy.* 21(1970)143-152.

Carlén A. Saliva and bacterial Adherence. PhD thesis University of Gotheborg Sweden. (1996) 1- 44.

Freitas- Fernandes LB. On salivary interactions with the antiplaque agents delmopinol and chlorhexidina An experimental in vitro study. PhD thesis University of Malmo, Sweden (2003) 1-95.

Gibbons RJ, Etherden I. Comparative hydrophobicities of oral bacteria and their adherence to salivary pellicles. *Infect Immun* 41 (1983) 1190-1196.

Glantz P-O. On wettability and adhesiveness. *Odontologisk Revy* . 20 (1969) 1-132.

Glantz P-O, Attstrom R, Meyer A, Baier R. interfacial phenomena with reference to the oral cavity. In:bender M, ed *Interfacial phenomena in biological systems*. New York: Marcel Dekker. (1991) 77-103.

Krasse B. Caries etiology: summary. *Ala J Med Sci* 1968, 5(3):267-268.

Hakaraunen K, Uitto V-J, Aimano J. Collagenase activity and protein content of sulcular fluid after scaling and occlusal adjustment of teeth with deep periodontal pockets. *J Periodontal Res* 23 (1988) 204-210.

Hay DI, Gibbons RJ, Spinell DM. Characteristics of some high molecular weight constituents with bacterial aggregations activity from whole saliva and dental plaque. *Caries Res.* 5 (1971) 111-123.

Hu Shen, Yen Yun, Ann David, Wong David. Implications of salivary proteomics in drug discovery and development: a focus on cancer drug discovery. *Drug Discovery Today* 12 (2007) 911-916.

Johnson CS Jr. Diffusion ordered nuclear magnetic resonance spectroscopy principles and applications *Progress Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* 34 (1999) 203-256.

Krasse B, Edwardsson S, Svensson I and Trelle L Implantation of caries-inducing *streptococci* in the human oral cavity. *Archs Oral Biol* 12 (1967) 231-236.

Lindh L. The adsorption behavior of saliva and purified salivary proteins at solid/liquid interfaces PhD thesis University of Malmo, Sweden (2002) 1-57.

Lindon JC, Holmes E, Nicholson JK. Pattern recognition methods and applications in biomedical magnetic resonance. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy.* 39 (2001) 1-40.

Löe H, Theilade E, Jensen SB. Experimental gingivitis in man. *J of Periodol.* 36(1965) 177-187.

Löe H. The gingival index, the plaque index, and the retention index systems. *J Periodontal* (1967) 38 special issue 610-616.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ, Protein measurement with the Folin phenol reagent . *J Biol Chem* 193(1951) 265-275.

Lundqvist C. Oral sugar clearance- Its influence on dental caries activity. *Ondontol Revy* 3 (1952) supp I.

Lynch E, Sheerin A, Silwood C, Grootveld M. Multicomponent evaluations of the oxidising actions and status of a peroxoborate-containing tooth-whitening system in whole human saliva using high resolution proton MNR spectroscopy. *J of Inorg Bioch* 72 (1999) 65-84.

Löe H, Silness J. Periodontal disease in pregnancy. I. Prevalence and severity. *Acta Odontol Scand* 21 (1963) 533-551.

Mandel ID. Relation of saliva and plaque caries. *J Dent Res* 53(1974) 246-266.

Meckel AH. The formation and properties of organic films on teeth. *Arch Oral Biol.* 10(1965) 585-597.

Murray N, Williamson M. Conformational study of salivary proline-rich protein repeat sequence. *Eur J Biochem.* 219 (1994)915-921.

Naganagowda GA, Gururaja TL, Satyanarayana J, Levine MJ. NMR analysis of human salivary mucin (MUC7) derived O-linked model glycopeptides: comparison of structural features and carbohydrate-peptide interactions. *J Peptide Res.* 54(1999) 290-310.

Nascimento CJ, Jr Bloch C. Ressonância Magnética Nuclear: *GradusPrimus. Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento.* 21(2001) 52-61.

Nosaka A Y, Fukutomi S, Vemura S , Kobayasky, Kyogok Y Phosphorous-31 nuclear magnetic resonance study of healthy human saliva. *Arch Oral Biol* 43(4) (1998) 341-346.

Page RC. Host response tests for diagnosing periodontal diseases. *J Periodontol* 63 (1992) 356-366.

Ross JS, Fletcher J. The HER-2 /neu oncogene in breast cancer: prognostic factor, predictive factor and target for therapy. *Stem cells* 16 (1998) 413-428.

Rudiger SG, Carlén A, Meuman JH, Kari K, Olsson J. Dental biofilms at healthy and inflamed gingival margins. *J Clin Periodontol.* 29( 2002) 524-530.

Scannapieco F A. Saliva-bacterium interactions in oral microbial ecology. *Crit Rev Oral Bio Med* 5 (1994) 203-248.

Silwood L, Lynch EJ, Seddon S, Sheerin A, Claxson A, Grootveld MC. <sup>1</sup>H- NMR analysis of microbial-derived organic acids in primary root carious lesions and saliva. *NMR Biomed* 12 (1999) 345-356.

Silwood CJL, Lynch E, Claxson AWD, Grootveld MC. <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectroscopic analysis of human saliva. *J Dent Res* 81(6) ( 2002 ) 422-427.

Scheie A, Arneberg P, Orstavik D, Afseth J. Microbial Composition, pH depressing capacity and acidogenicity of 3-week smooth surface plaque developed on sucrose-regulated diets in man. *Caries Res* 18 (1984) 74-86.

Schipper RG, Silletti E, Vingerhoeds MH. Saliva as research material: Biochemical, physicochemical and practice aspects. *Arch Oral Biology* 52 (2007) 114-11356.

Sonju T, Glantz P-O. Chemical composition of salivary integuments formed in vivo on solids with some established surface characteristics. *Arch of Oral Biol.* 20 (1975) 687-691.

Sreebny L. Saliva in health and disease: an appraisal and update. Intern Dental J. 50 (2000) 140-161.

Svanberg M and Krasse B. Oral implantation of saliva-treated *Streptococcus mutans* in man. Arch oral Biol 26(1981) 197-201.

Tenovou J Anttonen T. Application of a dehydrated test strip, Hemastrix, for the assessment test gingivitis. J Clin Periodontol 5 (1978) 206-212.

Van Steijn GJ, Nieuw Amerongen AV, Veerman ECI, Kabanmoentalib S, Overdijk B. Effect of periodontal treatment on the activity of chitinase in whole saliva of periodontitis patients. J Periodont Res. 37 (2002) 245-249.

Vassilakos N, Rundegren J, Arnebrant T, Glantz P-O. Adsorption from salivary fractions at solid liquid and air interfaces. Arch oral Biol 37: (1992) 549-557.

Villalain J. Location of cholesterol in model membranes by magic-angle-sample spinning NMR. Eur J Biochem 241 (1996) 586-593.

Villela B, Cogen RB, Bartolucci AA, Birkedal-Hansen H. Crevicular fluid collagenase activity in healthy, gingivitis chronic adult periodontitis and localized juvenile periodontitis patients. J Periodont Res 22 (1987) 209-211.

Watts A, Addy M. Tooth discolouration and staining: a review of the literature. Br Dent J 190 (2001) 309-316.

Wüthrich K. NMR of proteins and nucleic acids. John Wiley & Sons, chapter 1 (1986) 1-17.

## FIGURAS

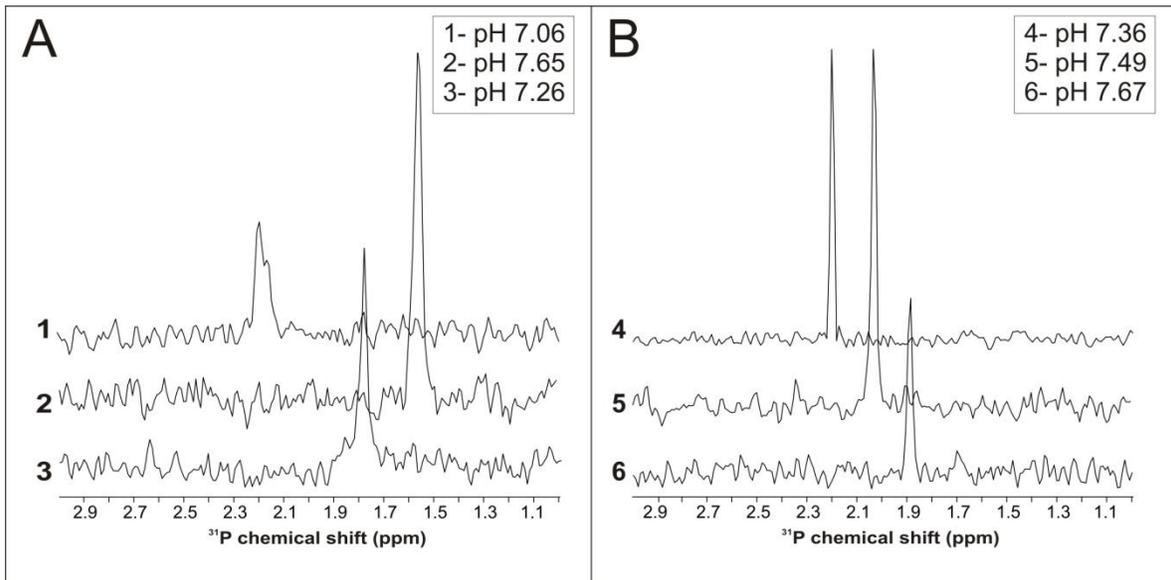


Figura 1- Espectro de  $^{31}\text{P}$  da saliva total de três pacientes com saúde oral como mostra na figura 1A e figura B mostra saliva dos três pacientes com doença periodontal.

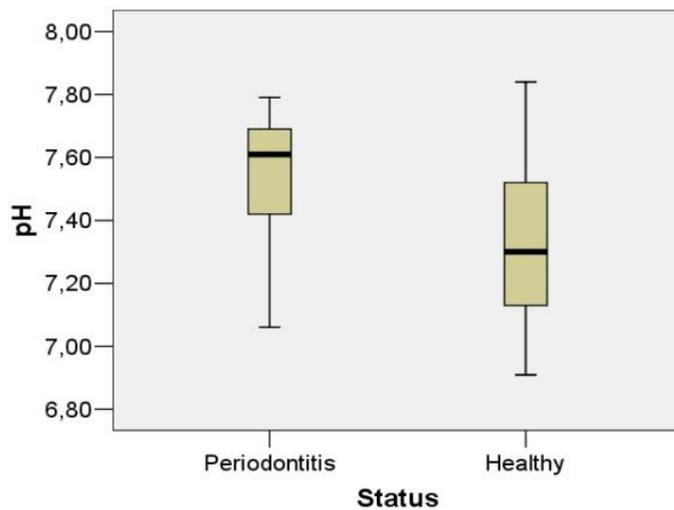


Figura 2- Boxplot mostra a media e variação das intensidades do pico de fósforo de pacientes com e sem doença periodontal.