

Detecção de periodontopatógenos por técnicas de biologia molecular: revisão de literatura

DETECTION OF PERIODONTOPATHOGENS BY MOLECULAR BIOLOGY ASSAYS: A REVIEW

Luís Fernando Landucci
Luciane Dias de Oliveira
Antonio Olavo Cardoso Jorge
Cristiane Yumi Koga-Ito

Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos- UNESP

RESUMO

Bastonetes anaeróbios Gram-negativos específicos possuem um papel fundamental nas diferentes entidades clínicas da doença periodontal. Apesar da existência de métodos de cultura, imunológicos e enzimáticos para a detecção de microrganismos específicos na doença periodontal, nenhum deles tem sido completamente preciso para detecção de bactérias periodontopatogênicas. O progresso e a disponibilidade de técnicas de biologia molecular para a detecção de microrganismos periodontais mostram-se necessários para a descrição rápida e mais precisa de espécies periodontopatogênicas, assim como a determinação do papel das mesmas nas diferentes formas de doenças periodontais, uma vez que o controle de algumas infecções periodontais seria mais eficaz com a utilização de terapias específicas e monitoramento de fatores de risco para uma reinfecção. Portanto, o objetivo deste trabalho foi realizar por meio de revisão de literatura, uma análise das técnicas de biologia molecular na detecção, descrição e monitoramento de periodontopatógenos.

PALAVRAS-CHAVES

Periodontia. Microbiologia. Biologia molecular.

INTRODUÇÃO

Bastonetes anaeróbios Gram-negativos específicos possuem um papel fundamental nas diferentes entidades clínicas da doença periodontal (LISTGARTEN, 1994; LISTGARTEN; WONG; LAI, 1995; MOORE; MOORE, 2000). *Porphyromonas gingivalis* freqüentemente tem sido identificado como um dos principais agentes etiológicos da periodontite (SLOTS; RAMS, 1992). *Actinobacillus actinomycetemcomitans* é isolado, com

freqüência, em quadros de doenças periodontais agressivas, com grande capacidade de invadir os tecidos gengivais (CHRISTERSSON et al., 1987). *A. actinomycetemcomitans* tem sido identificado como patógeno primário na periodontite agressiva, uma doença na qual o tecido periodontal é rapidamente destruído na ausência de depósitos significantes de bactérias (GONCHAROFF et al., 1993). Esse microrganismo é encontrado em sítios que falharam na resposta à terapêutica periodontal (SLOTS; LISTGARTEN, 1988), assim como *Fusobacterium nucleatum* que, segundo MOORE e MOORE (1994), pode estar envolvido na patogênese das diferentes modalidades de periodontopatias, desde gengivites até periodontites avançadas (HAFFAIEE; SOCRANSKY, 1994).

P. gingivalis e *Prevotella intermedia* são freqüentemente isolados de amostras de biofilme subgengival de pacientes com diversas formas de doença periodontal, incluindo a periodontite crônica (MOORE; MOORE, 1994), e podem ser encontrados, em menor proporção, em tecidos periodontais saudáveis. *Prevotella intermedia* associada com espiroquetas também é encontrada na gengivite ulcerativa necrosante.

Fusobacterium nucleatum constitui o isolado mais comum em amostras de biofilme subgengival de diferentes condições clínicas, sendo importante na iniciação da gengivite e *Tannerella forsythia* é encontrado freqüentemente na placa subgengival em associação com sítios de perda de inserção periodontal (TRAN et al., 2001).

Apesar da existência de métodos de cultura, imunológicos e enzimáticos para a detecção de microrganismos específicos na doença periodontal (LISTGARTEN, 1992), nenhum deles tem sido

completamente preciso para detecção de bactérias periodontopatogênicas (NOZAKI et al., 2001). O progresso e a disponibilidade de técnicas de biologia molecular para a detecção de microrganismos periodontais são necessários para a descrição rápida e mais precisa de espécies periodontopatogênicas (LAI et al., 1987). A quantificação precisa do número de células de uma espécie bacteriana em uma amostra de biofilme dentário é necessária para compreensão da etiologia bacteriana da periodontite. A técnica do *real-time* PCR oferece uma alternativa eficiente, sensível e confiável para esta quantificação (LYONS; GRIFFEN; LEYS, 2000). Também é de grande importância na determinação do papel dessas espécies microbianas nas diferentes formas de doenças periodontais, uma vez que o controle de algumas infecções periodontais seria mais eficaz com a utilização de terapias específicas e monitoramento de fatores de risco para uma reinfecção (NEWMAN, 1990; LISTGARTEN, 1994). Portanto, o objetivo deste trabalho foi realizar, pela revisão de literatura, uma análise das técnicas de biologia molecular na detecção e descrição de periodontopatógenos.

REVISÃO DE LITERATURA

Uma das maiores dificuldades para a detecção de microrganismos periodontopatogênicos está relacionada ao custo elevado dos meios de cultura e testes bioquímicos, dificuldade na manipulação dos microrganismos após sua coleta, e dificuldades técnicas para incubação e leitura dos resultados (SOCRANSKY et al., 1987).

Tecnologias no diagnóstico microbiológico aplicado às doenças periodontais, como utilização de sondas de DNA e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (ASAI et al., 2005; PEREA, 2004), têm expandido as possibilidades do estudo de uma grande quantidade de espécies com custos relativamente baixos. As sondas de DNA consistem em segmentos específicos de DNA, de fita simples, que reconhecem e hibridizam com seqüências complementares presentes no genoma bacteriano, via pareamento de bases complementares, formando moléculas híbridas de fita dupla. As sondas são marcadas com radioisótopos, enzimas ou moléculas quimioluminescentes, para que as moléculas híbridas possam ser identificadas após o teste.

A técnica da PCR permite a detecção de patógenos isolados ou diretamente em material clínico, mesmo se presentes em pequenas quantidades, pela

amplificação de seqüências nucleotídicas específicas contidas no patógeno. Asai et al. (2005) verificaram pela técnica da PCR, de acordo com a seqüência nucleotídica, que *P. gingivalis* Pg-II tipo 2 é freqüentemente detectado em pacientes com doenças periodontais, sugerindo seu importante papel na etiologia dessas doenças.

A análise por meio de sondas de DNA oferece sensibilidade apropriada e metodologia específica e equivalem aos métodos de cultura para detecção de *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* e *P. intermedia* nas amostras de biofilme subgingival humanos (ALI et al., 1994; LOESCHE et al., 1991; SLOTS; RAMS., 1992; VAN STEENBERG et al., 1996). Com relação à PCR, Riggio et al. (1996), pelo estudo comparativo de detecção de *A. actinomycetemcomitans* e *P. gingivalis*, observaram claramente a superioridade do PCR sobre o método de cultura.

Nozaki et al. (2001), estudando a presença de *P. gingivalis* pela detecção de DNA e posterior amplificação por PCR, observaram que a amplificação genômica foi eficiente para a detecção da espécie, com alta sensibilidade e especificidade. Esses autores, comparando a sensibilidade de técnicas de PCR e de ensaios de imunofluorescência indireta (IFI) para a detecção de *P. gingivalis*, observaram que PCR foi cem vezes mais sensível do que a IFI em termos de detecção do microrganismo. Doudgudomdacha et al. (2001) observaram por meio de PCR que metade dos sítios inicialmente positivos para *P. gingivalis*, *P. intermedia* e *A. actinomycetemcomitans* antes do tratamento periodontal mostraram-se positivos após o tratamento. Além disso, alguns sítios considerados saudáveis também foram positivos. Os autores demonstraram que, pelas técnicas altamente sensíveis, é possível determinar o número relativo de microrganismos necessários para o início de uma infecção e, assim como Teanpaisan; Douglas e Walsh (1995), enfatizaram que a mera presença dos patógenos não implica doença, mas, sim, o alto número desses microrganismos.

A detecção de microrganismos, utilizando-se métodos de alta especificidade e sensibilidade, é de particular importância nas periodontites que afetam pré-adolescentes. É possível que patógenos periodontais permaneçam na região de esfoliação do dente decíduo e continuem a sobreviver no sulco gengival do dente permanente durante a dentição mista. Nesse caso, o número de patógenos na área

específica pode ser pequeno, e a detecção desses microrganismos pode contribuir para a identificação de pacientes com potencial risco de desenvolver a doença na adolescência (OKADA; HAYASHI; NAGASANA, 2000).

A literatura relata similaridade na microbiota periodontal de indivíduos de diferentes partes do mundo, entretanto, a maioria desses estudos utilizou métodos de cultura convencionais, limitando o isolamento de espécies de biofilme subgingival, subestimando por vezes o número real de patógenos que podem estar presentes na doença periodontal. Colombo et al. (2002), utilizando a técnica de hibridização de DNA, observaram que a microbiota subgingival de pacientes com periodontite crônica no Brasil apresenta similaridades à microbiota de adultos nas mesmas condições em populações de outros países. Cortelli et al. (2005) relataram prevalência similar de *P. gingivalis* em pacientes brasileiros com periodontite crônica ou agressiva com relação a outros países da América do Sul.

Moncla et al. (1990) utilizaram sondas para as regiões hipervariáveis de RNA ribossômico e comprovaram que a utilização de seqüências de nucleotídeos altamente específicas para cada espécie bacteriana mostra-se como uma alternativa importante para o diagnóstico mais preciso e sensível baseado em PCR. Entre os muitos potenciais sítios de amplificação, o gene 16S rRNA aparece como o mais utilizado para reações de PCR e está presente na maioria das bactérias, sendo altamente específico para cada espécie.

Além da detecção e monitoramento das espécies microbianas presentes no periodonto, as técnicas de biologia molecular também podem ser utilizadas para identificação de organismos que exibem alta semelhança genética e fenótipo similar. Por exemplo, *A. actinomycetemcomitans* é geneticamente semelhante ao *Haemophilus aphrophilus*, ambas as espécies são encontradas na biofilme subgingival e exibem morfologia colonial semelhante. *P. intermedia* e *P. nigrescens* mostram 94% de similaridade e apenas 6,6% de diferenças; ambos os organismos são habitantes freqüentes das bolsas periodontais e difíceis de serem distinguidos pelos meios de cultura. O 16S rRNA foi capaz de identificar cada um desses microrganismos sem nenhuma evidência de reatividade cruzada (ASHIMOTO et al., 1996).

DISCUSSÃO

Tecnologias para a identificação da microbiota periodontal incluem: cultura, testes imunológicos e enzimáticos e métodos de biologia molecular (PCR e sondas de DNA). Os métodos de cultura consomem muito tempo, são caros e podem falhar no crescimento de alguns microrganismos importantes. Os métodos de diagnósticos imunológicos requerem anticorpos reagentes específicos, os quais não avaliam sua leitura e podem resultar em conclusões falso-positivas devido à reação cruzada com organismos não-alvo (ASHIMOTO; FLYN; SLOTS, 1995). Já a utilização do PCR e sondas de DNA têm sido capazes de detectar e identificar microrganismos que se apresentam em pequeno número, com a vantagem de serem técnicas simples, rápidas e mais sensíveis do que a utilização de culturas bacterianas, possibilitando ainda a caracterização genética dos microrganismos (DOGAN; SAARELA; ASIKAINEN, 1999; RIGGIO et al., 1996; SAKAMOTO; UMEDA; BENNO, 2005; SANZ, 2004).

O progresso e a disponibilidade dessas técnicas têm sido extremamente úteis na descrição mais precisa de espécies subgingivais e, conseqüentemente, determinando o papel dessas espécies nas doenças periodontais (LOESCHE et al., 1991; SAKAMOTO; UMEDA; BENNO, 2005). Socransky e Haffaiee (1992) descreveram uma técnica para identificação de espécies subgingivais diretamente de amostras de biofilme dentário, eliminando a necessidade de cultura de microrganismos e permitindo a caracterização de um grande número de amostras em curto espaço de tempo.

Além disso, espécies em pequeno número podem ser facilmente detectadas, como demonstraram Riggio et al. (1996) por meio do estudo comparativo de detecção de *A. actinomycetemcomitans* e *P. gingivalis* utilizando técnicas de PCR e meios de cultura. Doungudomdacha et al. (2001) e Teanpaisan; Douglas e Walsh (1995) observaram que PCR pode ser utilizada para determinar o número relativo de microrganismos necessários para o início de uma infecção, devido a sua alta sensibilidade e especificidade.

Enquanto *A. actinomycetemcomitans* pode ser rotineiramente recuperado em meios de cultura seletivos, a utilização do DNA pode detectar níveis mais baixos do que os requeridos para a cultura (LISTGARTEN; WONG; LAI, 1995). A detecção desse periodontopatógeno é de particular importância no caso

de periodontites que afetam pré-adolescentes e a sua caracterização pode ser importante na determinação do potencial de risco desses pacientes (OKADA; HAYASHI; NAGASAKA, 2000).

Segundo Nozaki et al. (2001), as técnicas de biologia molecular promovem uma eficiente detecção de *P. gingivalis*, com alta sensibilidade e especificidade, sendo considerado pelos autores como o melhor procedimento, na atualidade, para identificação dessa espécie. Além disso, *P. gingivalis* não se desenvolve com confiança em cultura, particularmente se ficar em meio de transporte por tempo prolongado.

Dificuldades podem ser encontradas com a utilização de sondas de DNA, pois, por vezes, elas não discriminam entre células viáveis e não viáveis, produzindo resultados falso-positivos (CHEN; SLOTS, 1999). Por outro lado, as limitações na utilização das sondas de DNA e PCR são muito menores do que as apresentadas pelos métodos de cultura (COLOMBO et al., 2002; RIGGIO et al., 1996).

As vantagens das técnicas moleculares consistem na sua sensibilidade, especificidade e segurança. Em termos de segurança, essas técnicas não exigem o isolamento do agente infeccioso e podem ser efetuadas em amostras retiradas diretamente da infecção (FRENCH et al., 1986). Em virtude de sua sensibilidade, é possível detectar amostras muito diluídas e microrganismos em pequeno número e, por fim, sua especificidade permite a distinção das diferentes espécies envolvidas nas periodontopatias (ASHIMOTO et al., 1996). Essas técnicas podem representar, em um futuro muito próximo, uma arma viável para o clínico na melhor compreensão e controle das periodontopatias, uma vez que identifica com precisão diferentes espécies microbianas envolvidas nesta patologia, permitindo possíveis mudanças nas estratégias terapêuticas na Periodontia.

CONCLUSÕES

As técnicas de biologia molecular (PCR e sondas de DNA) apresentam maior sensibilidade, especificidade e segurança para a detecção de periodontopatógenos em relação aos métodos fenotípicos e permitem a detecção e descrição mais precisas desses microrganismos.

ABSTRACT

Anaerobic Gram-negative rods have an essential role in different clinical manifestations of periodontal diseases. Despite the existence of microbiological, immunological

and enzymatic methods for the detection of periodontal diseases related to specific microorganisms, none of them have been considered completely accurate to detect periodontopathogens. The progress and the availability of molecular biology techniques for the detection of periodontopathogens are necessary for a faster and more precise description of periodontopathogenic species, also for the determination of their role in different forms of periodontal diseases, considering that the control of some periodontal infections would be more effective with the use of specific therapies and re-infection risk factors monitoring. Therefore, the aim of this work was to analyze, through literature review, the modern techniques of molecular biology in the detection, description and monitoring of periodontopathogens.

KEY-WORDS

Periodontology. Microbiology. Molecular biology.

REFERÊNCIAS

- ALI, R.W. et al. Microbial association of 4 putative periodontal pathogens in Sudanese adult periodontitis patients determined by DNA probe analysis. *J Periodontol*, v. 65, n. 11, p.1053-1057, 1994.
- ASAI, Y. et al. Genetic variation of a fimbrial protein from *Porphyromonas gingivalis* and its distribution in patients with periodontal diseases. *Microbiol Res*, v. 160, n. 3, p. 257-263, 2005.
- ASHIMOTO, A. et al. Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. *Oral Microbiol Immunol*, v. 11, n. 4, p.266-273, 1996.
- ASHIMOTO, A.; FLYN, M.J.; SLOTS, J. Molecular genetic detection of *Bacteroides heparinolyticus* in adult periodontitis. *Oral Microbiol Immunol*, v. 10, n. 5, p. 284-7, 1995.
- CHEN, C.; SLOTS, J. Microbiological tests for *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*. *Periodontol 2000*, v.20, n. 1, p.53-64, 1999.
- CHRISTERSSON L. A. et al. Tissue localization of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontitis. *J Periodontol*, v. 58, n. 8, p.528-39, 1987.

- COLOMBO, A. P. V. et al. Subgingival microbiota of brazilian subjects with untreated chronic periodontitis. *J Periodontol*, v. 73, n. 4, p. 360-369, 2002.
- CORTELLI, J. R. et al. Prevalence of periodontal pathogens in Brazilians with aggressive and chronic periodontitis. *J Clin Periodontol*, v. 32, n. 8, p. 860-6, 2005.
- DOGAN, B.; SAARELA, M.; ASIKAINEN, S. Genotyping of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotype isolates based on polymerase chain reaction. *Oral Microbiol Immunol*, v. 14, n. 6, p. 387-390, 1999.
- DOUNGUDOMDACHA, S. et al. Effect of non-surgical periodontal treatment on clinical parameters and the numbers of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* at adult periodontitis sites. *J Clin Periodontol*, v. 28, n. 5, p. 437-445, 2001.
- FRENCH, C. K. et al. DNA probe detection of periodontal pathogens. *Oral Microbiol Immunol*, v. 1, n. 1, p. 58-62, 1986.
- GONCHAROFF, P. et al. Identification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: polymerase chain reaction amplification of IktA-specific sequences. *Oral Microbiol Immunol*, v. 8, n. 2, p. 105-110, 1993.
- HAFFAIEE, A. D.; SOCRANSKY, S. S. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol 2000*, v. 5, p. 78-11, 1994.
- LAI, C. H. et al. *Bacteroides forsythus* in adult gingivitis and periodontitis. *Oral Microbiol Immunol*, v. 2, n. 4, p. 152-157, 1987.
- LISTGARTEN, M. A. Microbiological testing in the diagnosis of periodontal disease. *J Periodontol*, v. 63, n. 4, p. 332-337, 1992.
- LISTGARTEN, M. A. The structure of dental plaque. *Periodontol 2000*, v.5, n.1, p.52-65, 1994.
- LISTGARTEN, M. A.; WONG, M. Y.; LAI, C. H. Detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, and *Bacteroides forsythus* in an *A. actinomycetemcomitans*- positive patient population. *J Periodontol*, v. 66, n. 2, p. 158-164, 1995.
- LOESCHE, W. J. et al. Comparison of various detection methods for periodontopathic bacteria: can culture be considered the primary reference standard? *J Clin Microbiol*, v.30, n.2, p. 418-426, 1991.
- LYONS, S. R.; GRIFFEN, A. L., LEYS E. J. Quantitative real-time PCR for *Porphyromonas gingivalis* and total bacteria. *J Clin Microbiol*, v.38, n.6, p.2362-5, 2000.
- MONCLA, B. J. et al. Use of synthetic oligonucleotide DNA probes for the identification of *Bacteroides gingivalis*. *J Clin Microbiol*, v. 28, n. 2, p. 324-327, 1990.
- MOORE, W. E. C.; MOORE, L. V. H. The bacteria of periodontal diseases. *Periodontol 2000*, v.5, n.1, p.66-77, 1994.
- NEWMAN, H.N. Plaque and chronic inflammatory periodontal disease. A question of ecology. *J Clin Periodontol*, v.17, n.8, p.533-541, 1990.
- NOZAKI, T. et al. A sensitive method for detecting *Porphyromonas gingivalis* by polymerase chain reaction and its possible clinical application. *J Periodontol*, v. 72, n. 9, p. 1228-1235, 2001.
- OKADA, M.; HAYASHI, F.; NAGASAKA, N. Detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in dental plaque samples from children 2 to 12 years of age. *J Clin Periodontol*, v. 27, n. 10, p.763-768, 2000.
- PEREA, E. J. Oral flora in the age of molecular biology. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, v. 9, n. 6, p.1-5, 2004.
- RIGGIO, M. P. et al. Comparison of polymerase chain reaction and culture methods for detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in subgingival plaque samples. *J Periodont Res*, v. 31, n. 7, p. 496-501, 1996.
- SAKAMOTO, M.; UMEDA, M.; BENNO, Y. Molecular analysis of human oral microbiota. *J Periodontal Res*, v. 40, n. 3, p. 277-85, 2005.
- SANZ, M. Methods of detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythensis* in periodontal microbiology, with special emphasis on advanced molecular techniques: a

review. *J Clin Periodontol*, v. 31, n. 12, p. 1034-47, 2004.

SLOTS, J.; LISTGARTEN, M. A. *Bacteroides gingivalis*, *Bacteroides intermedius* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal diseases. *J Clin Periodontol*, v. 15, n. 2, p.85-93, 1988.

SLOTS, J.; RAMS, T.E. Microbiology of periodontal disease. In: SLOTS, J.; TAUBMAN, M. A. (Eds.). *Contemporary Oral Microbiology and Immunology*. St Louis: Mosby Year Book, 1992, p. 425-30.

SOCRANSKY, S.S.; HAFFAIEE, A.D. The bacterial etiology of destructive periodontal disease: current concepts. *J Periodontol*, Chicago, v. 63, n. 4, p. 322-331, 1992.

SOCRANSKY, S.S. et al. Difficulties encountered in the search for the etiologic agents of destructive periodontal diseases. *J Clin Periodontol*, v. 14, n. 10, p. 588-593, 1987.

TEANPAISAN, R.; DOUGLAS, C.W.I; WALSH, T.F. Characterization of black-pigmented anaerobes isolated from disease and healthy periodontal sites. *J Periodont Res*, v.3 0, n. 4, p. 245-251, 1995.

TRAN, S. D. et al. Persistent presence of *Bacteroides forsythus* as a risk factor for attachment loss in a population with low prevalence and severity of adult periodontitis. *J Periodontol*, v. 72, n. 1, p.1-10, 2001.

VAN STEENBERGEN, T.J.M. et al. Discrepancy between culture and DNA probe analysis for the detection of periodontal bacteria. *J Clin Periodontol*, v. 23, n.10, p.955-959, 1996.

Cristiane Yumi Koga-Ito

Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos- UNESP
Av. Eng. Francisco José Longo, 777
São José dos Campos - SP
CEP: 12245-000
e-mail: cristiane@fosjc.unesp.br

TRAMITAÇÃO

Artigo recebido em: 25/01/2006
Aceito para publicação em: 21/06/2006