



Influência do perfil clínico inflamatório na determinação da microbiota subgengival em crianças

Sousa J*, Casati MZ, Ruiz KGS, Sallum EA, Nociti-Júnior FH, Casarin RCV, Monteiro MF

INTRODUÇÃO

A periodontite é uma doença inflamatória caracterizada pela destruição dos tecidos de suporte dentais, que em casos mais severos pode acarretar mobilidade e perdas dentais. A visão mais atual da patogênese da doença periodontal descreve a presença de um biofilme disbiótico, caracterizado por alteradas proporções de determinados grupos microbianos em uma comunidade¹, associado à um desequilíbrio entre a resposta inflamatória do hospedeiro e às agressões promovidas pelo biofilme como a causa da destruição periodontal e óssea². Neste sentido, a microbiota e a inflamação local no sítio periodontal estariam diretamente relacionadas e se influenciariam mutuamente, funcionando em uma relação de feedback positivo na qual tanto a disbiose poderia promover maiores níveis de inflamação periodontal, como uma intensa inflamação local poderia oferecer as condições ambientais favoráveis para o estabelecimento de uma microbiota disbiótica².

Estudos recentes do nosso grupo que focavam em avaliar a agregação familiar dos casos mais severos e de rápida progressão da doença periodontal, atualmente classificada como periodontite estágio III/IV e grau C³, demonstraram uma estreita relação entre o histórico periodontal familiar e a colonização oral em crianças⁴⁻⁷. Tais estudos identificaram uma microbiota disbiótica, mesmo antes de sinais clínicos de destruição periodontal. Adicionalmente, ao mesmo tempo que foram identificadas modificações microbiológicas, maiores níveis de inflamação clínica e alterações em marcadores inflamatórios também puderam ser detectadas⁸. Assim, a presença destas alterações poderia estar associada a um maior risco e ao aparecimento precoce de perdas periodontais⁶.

Desta forma, é evidente a importância da inflamação gengival no desenvolvimento da doença e torna-se necessário compreender como os níveis de inflamação se correlacionam com uma microbiota alterada e com um maior risco à periodontite. Esta influência poderia ser ainda mais impactante em crianças, uma vez que o histórico familiar de periodontite pode influenciar o padrão de colonização e que a microbiota ainda se estabelecendo e em maturação apresentada por elas poderia sofrer um maior impacto das condições ambientais alteradas causadas pela inflamação exacerbada.

OBJETIVO

Assim, o objetivo deste estudo será avaliar como os padrões clínicos de inflamação se correlacionam com a presença de alterações do microbioma subgengival, além de identificar fatores que influenciariam na presença de elevados índices clínicos inflamatórios.

MATERIAIS E MÉTODOS

O projeto foi realizado na clínica de extensão e pós-graduação, e no laboratório de histologia e biologia molecular da Área de Periodontia da FOP-UNICAMP. Foi delineado um estudo clínico-laboratorial que visa correlacionar os índices clínicos inflamatórios com o perfil microbiano subgengival em crianças filhas de indivíduos com periodontite agressiva e com saúde periodontal.

Seleção dos pacientes

Foram selecionadas 36 crianças (entre 6 e 12 anos), oriundas de dois grupos familiares distintos, considerando o diagnóstico periodontal parental, de acordo com os critérios abaixo:

- Periodontite: indivíduos afetados por periodontite generalizada, estágio III-IV e grau C (anteriormente enquadrados como periodontite agressiva generalizada, pela antiga classificação da AAP⁹):

- 1) idade inferior a 35 anos no momento do diagnóstico;
- 2) taxas de progressão de perda óssea elevada (medida pela porcentagem de perda óssea radiográfica ao redor do dente dividida pela idade do indivíduo) > 1
- 3) perda de inserção > 5 mm, associada a profundidade de sondagem > 6 mm

- 4) perda de inserção afetando mais que 30% dos sítios e dentes além de incisivos e molares
- 5) pelo menos 20 dentes restantes na cavidade oral;

- Saúde periodontal: indivíduos classificados como periodontalmente saudáveis de acordo com os critérios definidos pela nova classificação das doenças periodontais^{3,10,11}:

- 1) ausência de bolsas periodontais: sulcos gengivais com profundidade de sondagem ≤ 3 mm
- 2) apresentar sangramento a sondagem menos 10% dos sítios;
- 3) não apresentar perdas ósseas proximais radiograficamente visíveis;
- 4) pelo menos 20 dentes na cavidade oral;

Como critérios de exclusão foram considerados: alteração na saúde sistêmica dos indivíduos, uso de anti-inflamatórios ou antibióticos nos 6 meses anteriores ao estudo, hábito tabagista dos pais.

Parâmetros clínicos

Foram avaliados os seguintes parâmetros clínicos: Índice de Placa – **IP**¹²; Índice gengival – **IG**¹²; Sangramento à sondagem – **SS**¹³; Recessão Gengival – **RG** distância da margem gengival à junção cimento esmalte. Nível Clínico de Inserção – **NIC**: distância da junção cimento esmalte até a base, clinicamente detectável, da bolsa periodontal. Profundidade de Sondagem – **PS** (NICR - PMG): distância da margem gengival à base, clinicamente detectável, da bolsa periodontal. Todos os parâmetros clínicos foram obtidos utilizando uma sonda periodontal do tipo Carolina do Norte, por um examinador calibrado (MFM).

Coleta das amostras e Sequenciamento do DNA

As amostras de biofilme subgengival foram coletadas logo após a coleta dos dados clínicos. A coleta foi realizada em 2 primeiros molares e em 2 incisivos centrais de cada indivíduos, e armazenadas na forma de pool. Caso o mesmo não apresentasse nenhum desses elementos, a coleta era feita na região adjacente mais próxima. A coleta do biofilme subgengival foi realizada utilizando-se cones de papel absorvente estéreis. A área para coleta do material era devidamente isolada e seca com rolos de algodão esterilizados e a porção supragengival do biofilme bacteriano removida. Os cones de papel eram colocados no interior do sulco/bolsa periodontal e após 30 segundos os cones de papel eram então removidos e colocados em tubos para microcentrifugação (eppendorf) com solução Tris-EDTA, codificados para cada um dos pacientes. Os eppendorfs foram mantidos em temperatura de -20° C até a realização do ensaio. A extração de DNA foi realizada com o uso do kit Qiagen MiniAmp (Valencia, CA), seguindo as recomendações do fabricante.

Após a extração do DNA, a plataforma Illumina MiSeq foi utilizada para o sequenciamento. Duas regiões do gene 16S rRNA foram amplificadas e foram utilizadas as regiões V1-V3 e V4-V5. A preparação das bibliotecas e pré-processamento das sequências foi realizada como descrito em trabalhos anteriores⁶.

Análise dos dados

Para a análise dos dados as 36 crianças foram divididas em 3 grupos em função do padrão clínico de inflamação apresentado. O SS no sítio de coleta foi considerado como fator de divisão e as crianças separadas em função da distribuição nos quartis. Assim, 9 crianças localizadas no primeiro quartil (que apresentavam os menores níveis de SS local) foram enquadradas no grupo de baixa inflamação, 18 crianças pertencentes ao 2º e 3º quartis foram incluídas no grupo Intermediário, e 9 crianças pertencentes ao 4º quartil (maiores níveis de SS local) foram enquadradas no grupo Alta Inflamação.

Posteriormente, as crianças foram comparadas em fundo do grupo pertencente. A diferença na distribuição de gênero entre os grupos foi testada utilizando o teste de Qui-quadrado, enquanto diferenças na idade e parâmetros clínicos entre os grupos foram avaliadas com o teste de Análise de Variância (ANOVA).

Análises do microbioma

A análise do microbioma foi realizada utilizando ferramentas de bioinformática. A diversidade das amostras foi computada através da diversidade alfa (dentro de uma comunidade) e beta (entre comunidades diferentes). O método de Shannon foi utilizado para computar a diversidade alfa e as diferenças entre grupos foram avaliadas usando o teste Kruskal-Wallis. A diversidade beta foi estimada pelos métodos filogenéticos de Weighted e Unweighted Unifrac e analisada pela Análise de Coordenadas Principais (PCoA). A significância entre os grupos foi avaliada pelo método de Adonis com 999 permutações e o gráfico gerado pelo pacote ggplot do R. O programa DESeq2 do pacote Bioconductor para R foi utilizado para identificar as bactérias diferencialmente abundantes entre os grupos¹⁴.

Correlação entre dados clínicos e microbiológicos

Adicionalmente, foi realizada uma regressão multivariada para determinar o valor preditivo de outras características na determinação da condição inflamatória do indivíduo. Para tal análise, o SS no sítio de coleta foi utilizado como variável dependente, enquanto fatores individuais como idade, gênero, grupo familiar, fatores clínicos e gêneros e

espécies bacterianas foram considerados como variáveis independentes. O modelo de regressão foi ajustado de forma a conseguir o modelo mais explicativo da condição clínica observada. Em todas as análises foi considerado um nível de significância de 5%.

RESULTADOS DISCUTIDOS

A etiologia da doença periodontal é multifatorial, mas a presença de uma resposta inflamatória alterada em resposta a um biofilme disbiótico é fundamental em sua patogênese². Assim, compreender esta interação no processo de doença é fundamental para o correto manejo dos pacientes. Recentemente, Van Dyke e colaboradores sugeriram um novo modelo da patogênese da periodontite, na qual a inflamação apresenta um papel central em modular o ambiente subgingival e produzir a disbiose. Desta forma, o presente estudo tentou correlacionar a inflamação clínica dos indivíduos com a comunidade microbiana presente subgingivalmente.

Neste sentido, as crianças foram separadas em grupos de acordo com o perfil de inflamação gengival (baixa inflamação, inflamação intermediária ou alta inflamação). Na tabela 1 estão demonstrados os dados clínicos e demográficos das crianças participantes do estudo. O índice de SS foi utilizado como critério na separação dos grupos, sendo a única diferença estatística entre os três grupos. Em relação aos demais dados apresentados, como idade, gênero e outros parâmetros clínicos como índice de placa e índice gengival, não há diferença entre as crianças, o que reduz o impacto destas variáveis na comparação entre os grupos.

Tabela 1. Dados clínicos e demográficos dos grupos.

	Alta inflamação	Intermediário	Baixa inflamação
Idade (anos)	10.8±1.7 A	9.9±2.0 A	8.9±2.4 A
Gênero (%F)	55.5% A	44.4% A	44.4% A
PS (mm)	3.4±0.5 A	3.4±0.4 A	3.1±0.3 A
SS (%)	80.0±10.0 A	50.0±20.0 B	10.0±10.0 C
IP (%)	60.0±30.0 A	50.0±30.0 A	40.0±40.0 A
IG (%)	30.0±20.0 A	20.0±30.0 A	20.0±40.0 A

As figuras 1 e 2 demonstram o efeito da inflamação clínica sobre a diversidade microbiana. O padrão clínico de inflamação não causou impacto sobre a diversidade alfa dos indivíduos (Figura 1, teste de Kruskal-Wallis, $p=0.438$).

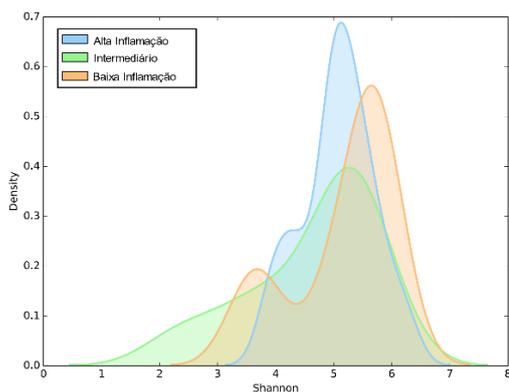


Figura 1. Gráfico de diversidade alfa com a métrica Shannon.

Com relação a diversidade beta, não foi possível observar a separação dos grupos em clusters em função do SS para os índices de dissimilaridades de Weighted Unifrac (Figura 2A, teste de Adonis, $p=0.381$) e Unweighted Unifrac (Figura 2B, teste de Adonis, $p=0.0377$), podendo-se confirmar que o perfil de inflamação não se mostrou determinante na diversidade microbiana das crianças avaliadas. A inflamação sempre precede a doença periodontal, porém, apenas em estágio mais tardios e com inflamação persistente e acentuada é possível observar uma mudança mais drástica nas condições do microambiente subgingival, quando ocorre uma mudança na composição e proporção das espécies bacterianas e emergência de bactérias associadas a periodontite¹⁵. Assim, é possível que a não identificação de diferenças entre a diversidade microbiana dos grupos possa estar relacionada ao tempo que esta inflamação local está presente, situação não avaliada no estudo. Desta forma, torna-se necessário a avaliação do efeito da inflamação sobre a microbiota a longo prazo.

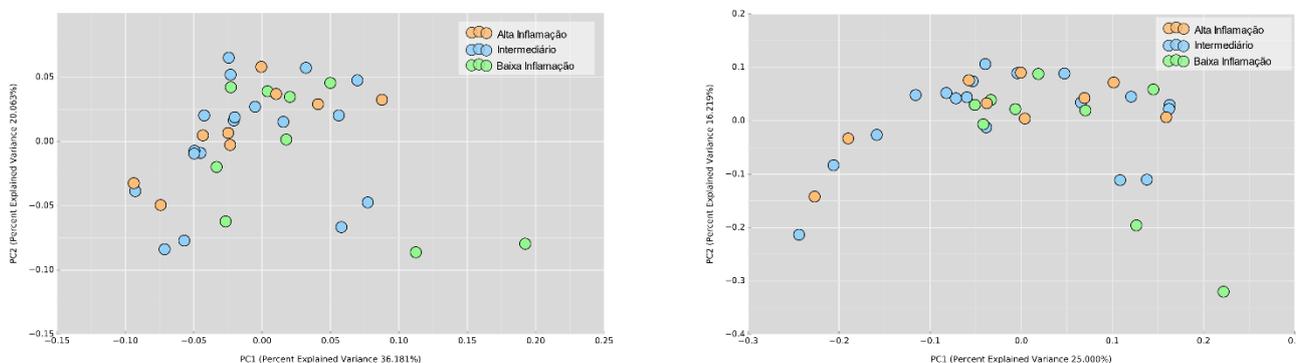


Figura 2. Gráfico de diversidade beta. A) PCoA da métrica Weighted Unifrac. B) PCoA da métrica Unweighted Unifrac.

Apesar de não identificar diferenças na diversidade microbiana, foi observado que existem bactérias diferencialmente abundantes entre os grupos de baixa e alta inflamação (Figura 3). Algumas espécies bacterianas representantes dos gêneros *Leptotrichia*, *Prevotella* e *Porphyromonas*, e *Tannerella*, usualmente associadas a um biofilme mais maduro e mais associados a doença, foram identificadas com maior abundância no grupo de alta inflamação. Adicionalmente, *Prevotella intermedia* (espécie reconhecidamente importante na doença periodontal) se mostrou mais de 4 vezes mais abundantes no grupo de alta inflamação do que no grupo de indivíduos com baixa inflamação.

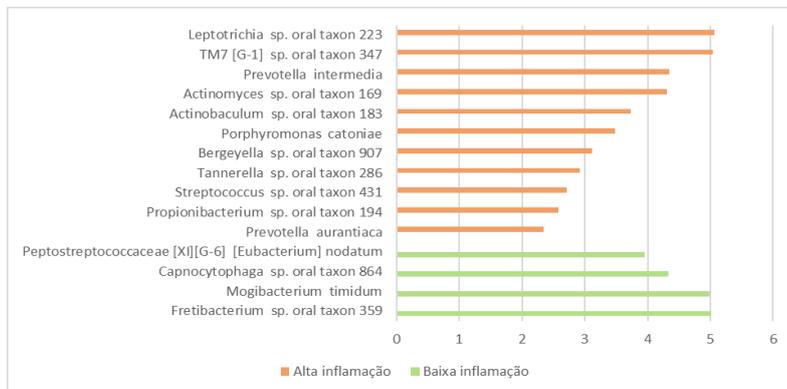


Figura 3. Bactérias diferencialmente abundante entre os grupos (DESeq2, FDR<0,05). Diferenças na abundância das espécies entre os grupos demonstrada pelo tamanho da barra que descreve o fold-change.

Adicionalmente às análises microbiológicas, o estudo tentou identificar características que pudessem estar relacionadas com o nível de SS. A análise de regressão múltipla ajustada (Tabela 2) demonstrou que alguns gêneros de bactérias, como *Streptococcus* e *Prevotella*, apresentaram-se negativamente correlacionados ao SS, enquanto o histórico periodontal familiar e abundância relativa de *Fusobacterium*, *Parvimonas*, *Selenomonas*, *Streptococcus parasanguinis* e *Prevotella intermedia* foram positivamente correlacionados ao SS. Interessantemente, além de alguns gêneros bacterianos, o grupo familiar no qual as crianças pertencem também foi preditor de SS, sendo que apresentar pais com histórico de saúde periodontal está associado a menores taxas de inflamação clínica. Em contrapartida, características clínicas como IP, PS, idade e gênero não foram considerados importantes preditores de SS.

Tabela 2. Regressão múltipla Stepwise considerando SS como variável dependente e outras variáveis clínicas e abundância relativa de espécies e gêneros como variáveis independentes.

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)	R ² Ajustado
(Intercept)	0.67	0.15	4.24	0.0003	0.4716
Grupo (saúde)	-0.36	0.10	-3.28	0.0035	
Aggregatibacter_actinomycetemcomitans	32.70	22.88	1.42	0.1676	
Porphyromonas_gingivalis	-5.52	2.83	-1.94	0.0649	
Tannerella_forsythia	19.38	12.83	1.51	0.1458	
Prevotella_intermedia	36.97	18.08	2.04	0.0535	
Streptococcus_parasanguinis_I	75.39	34.34	2.19	0.0395	
g__Fusobacterium	47.33	9.94	4.76	0.0001	
g__Prevotella	-4.53	1.50	-3.01	0.0065	
g__Lactobacillus	308.31	237.67	1.29	0.2086	
g__Streptococcus	-2.74	0.77	-3.53	0.0019	
g__Parvimonas	12.36	3.61	3.42	0.0025	
g__Selenomonas	20.37	9.10	2.20	0.0362	
g__Fusobacterium_2	-1.75	0.64	-2.74	0.0122	

Tais resultados corroboram com a literatura ao demonstrar a interrelação entre microbiota subgingival e inflamação^{2,15,16}, ao mesmo tempo que reforçam a importância do histórico familiar de doença periodontal na determinação da característica clínica e colonização oral das crianças^{5,6,8}. É importante ressaltar, que estes dados foram observados em uma população entre 6 e 12 anos, e que clinicamente apresentam ausências de perda periodontal, o que mostra que estas mudanças a nível de gêneros bacterianos já podem ser observadas de maneira precoce na presença de maiores níveis de inflamação.

Na doença periodontal, comunidades polimicrobianas são capazes de induzir uma resposta inflamatória local no periodonto, que na maioria das vezes é autolimitante e não é capaz de promover perda de inserção clínica. Entretanto, na presença de alteração na proporção relativa de certos microrganismos no biofilme, conhecida como disbiose, pode ocorrer uma resposta inflamatória desregulada e destrutiva por parte do hospedeiro. Neste sentido, é sugerido que a presença e proporção de certos microrganismos na comunidade microbiana pode determinar a patogenicidade do biofilme subgingival¹⁷. Lamont e colaboradores sugere que *Tannerella forsythia*, *Porphyromonas gingivalis*, assim como bactérias dos gêneros *Prevotella* e *Selenomonas* podem ser considerados patógenos e estar associados à doença. Já presença de *A. actinomycetemcomitans* é frequentemente associada à formas agressivas de doença periodontal^{16,18}. Apesar de não avaliar pacientes com destruição periodontal e atividade de doença, o presente estudo foi capaz de associar certas espécies e gêneros usualmente relacionados a destruição periodontal e maior patogenicidade do biofilme com a

inflamação gengival. Tais dados reforçam a importância de compreender a relação entre inflamação e microbiota para compreender o início e desenvolvimento da periodontite.

Estudos demonstraram que a gengivite persistente a longo prazo se caracteriza como fator de risco para a perda de tecidos periodontais¹⁹, os quais reforçam a importância da inflamação no desenvolvimento da doença e a necessidade do controle de gengivite nas crianças avaliadas no estudo, as quais, em sua maioria, apresentam altos níveis de inflamação. A gengivite, inflamação gengival induzida pelas bactérias presentes no biofilme, sempre precede a periodontite. Portanto, como forma de controle da gengivite e, conseqüentemente, de prevenção da doença periodontal, faz-se necessário o controle do biofilme presente nas superfícies dentais, sendo a escovação a forma mais eficiente de se obter redução do biofilme e do sangramento gengival.

CONCLUSÃO

Pode-se concluir que, apesar do sangramento a sondagem não estar relacionado a alterações na diversidade microbiana, ele está diretamente relacionado com alteração na proporção relativa de algumas espécies e gêneros bacterianos.

BIBLIOGRAFIA

1. Sommer F, Anderson JM, Bharti R, Raes J, Rosenstiel P. The resilience of the intestinal microbiota influences health and disease. *Nat Rev Microbiol*. 2017;15(10):630–8.
2. Lamont RJ, Koo H, Hajishengallis G. The oral microbiota: dynamic communities and host interactions. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2018;16(December):1.
3. Caton JG, Armitage G, Berglundh T, Chapple ILC, Jepsen S, Kornman K, et al. A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions – Introduction and key changes from the 1999 classification. *J Clin Periodontol*. 2018;45(March):S1–8.
4. Monteiro MF, Casati MZ, Taiete T, Sallum EA, Nociti-Jr FH, Ruiz KG, et al. Salivary carriage of periodontal pathogens in generalized aggressive periodontitis families. *Int J Paediatr Dent* [Internet]. 2014;24(2):113–21.
5. Monteiro M, Casati MZ, Taiete T, Do Vale HF, Nociti FH, Sallum EA, et al. Periodontal clinical and microbiological characteristics in healthy versus generalized aggressive periodontitis families. *J Clin Periodontol*. 2015;42(10):914–21.
6. Monteiro M. Heritability in generalized aggressive periodontitis: microbiological, immunological and preventive aspects. University of Campinas; 2019.
7. Reis AA. Dinâmica de colonização em familiares de pacientes portadores de periodontite agressiva: um estudo de caso-controle. Universidade Estadual de Campinas; 2019.
8. Monteiro MF, Tonelli H, Reis AA, Casati MZ, Silvério KG, Nociti Junior FH, et al. Triclosan toothpaste as an adjunct therapy to plaque control in children from periodontitis families: a crossover clinical trial. *Clin Oral Investig* [Internet]. 2020 Apr 6;24(4):1421–30.
9. Armitage GC. Development of a Classification System for Periodontal Diseases and Conditions. *Ann Periodontol* [Internet]. 1999;4(1):1–6.
10. Chapple ILC, Mealey BL, Van Dyke TE, Bartold PM, Dommisch H, Eickholz P, et al. Periodontal health and gingival diseases and conditions on an intact and a reduced periodontium: Consensus report of workgroup 1 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Clin Periodontol*. 2018;45(December 2017):S68–77.
11. Lang NP, Bartold PM. Periodontal health. *J Clin Periodontol*. 2018;45(August 2016):S9–16.
12. Ainamo J, Bay I. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. *Int Dent J*. 1975;25(4):229–35.
13. Mühlemann H, Son S. Gingival sulcus bleeding--a leading symptom in initial gingivitis. *Helv Odontol Acta*. 1971;15(2):107–13.
14. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol*. 2014;15(12):1–21.
15. Van Dyke TE, Bartold PM, Reynolds EC. The Nexus Between Periodontal Inflammation and Dysbiosis. *Front Immunol* [Internet]. 2020 Mar 31;11.
16. Kinane DF, Stathopoulou PG, Papapanou PN. Periodontal diseases. *Nat Rev Dis Prim*. 2017;3.
17. Darveau RP, Hajishengallis G, Curtis MA. *Porphyromonas gingivalis* as a potential community activist for disease. *J Dent Res*. 2012;91(9):816–20.
18. Fine DH, Patil AG, Velusamy SK. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa) Under the Radar: Myths and Misunderstandings of Aa and Its Role in Aggressive Periodontitis. *Front Immunol* [Internet]. 2019 Apr 16;10.
19. Lang NP, Schätzle MA, Loe H. Gingivitis as a risk factor in periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 2009;36(SUPPL. 10):3–8.