

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
MESTRADO EM PATOLOGIA BUCAL**

Linha de Pesquisa
Epidemiologia, Etiopatogenia e Repercussão das Doenças da
Cavidade Bucal e Estruturas Anexas

**AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE E DA VARIABILIDADE DA MICROBIOTA
SALIVAR ARMAZENADA EM DIFERENTES TEMPERATURAS**

ELISABETE ULSENHEIMER ROJAS

Orientadora
Prof^a. Dr^a. Anna Cecília Moraes Chaves
Co-orientadora
Prof^a. Dr^a. Sueli Teresinha Van der Sand

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Nível Mestrado, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como pré-requisito final para obtenção do título de Mestre em Odontologia, área de concentração: Patologia Bucal.

Porto Alegre, setembro de 2007.

**"A vida sem ciência é uma espécie de morte."
Sócrates**

DEDICATÓRIA

Dedico essa dissertação ao meu marido **Denis Bittencourt Rojas**. A luta foi nossa e a vitória a consequência. Você iluminou a minha vida. Te amo muito.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais **Ceno** e **Dalia** pelo amor, apoio e compreensão durante toda minha vida. Amo vocês.

Ao meu irmão **Diego** que compartilhou comigo essa fase importante. Tua companhia me deu segurança e juntos superamos a dor da distância.

Ao meu irmão **Marcelo** e sua esposa **Mônica** pelo incentivo ao aperfeiçoamento profissional e ao meu amado sobrinho **Artur Leonel** que trouxe muita alegria em nossas vidas.

À família Rojas. Meus sogros **Alba** e **Abel** e meu cunhado **Lucas**, pelo carinho e em especial, minha cunhada **Ana Paula** pela dedicação durante minha ausência.

À minha tia Irmã **Sueli Brisch**, minha querida “mãezinha”. Obrigada pela atenção especial que sempre teve comigo. A todas as Irmãs e funcionárias da Residência Universitária Santa Teresa de Jesus pela acolhida.

Aos meus amigos **Julio Manfredini Junior** e **Andréa Willeman** pela confiança profissional e apoio na decisão de realizar esse mestrado e às todos os amigos da minha jornada.

À minha orientadora professora **Anna Cecília Moraes Chaves**. A sua organização e exigência aperfeiçoaram e moldaram esse trabalho. Obrigada pela orientação e pelos ensinamentos em Estomatologia.

À minha co-orientadora professora **Sueli Teresinha Van der Sand**. Os conhecimentos em microbiologia e as suas orientações conduziram essa pesquisa. Obrigada pela confiança.

Ao professor **Pantelis Varvaki Rados**. Um mestre a ser seguido em conhecimento e didática de ensino. “Quando mestre serei, em ti me espelharei.”

Ao professor **Manoel Sant’Ana Filho**. Um incentivador à pesquisa científica e um pesquisador que “atinge o alvo que os outros não vêem e não apenas o que os outros não conseguem”. Obrigada pelos ensinamentos em Patologia. Ao professor **Onofre Francisco de Quadros**, pelo carinho e atenção, mesmo que num convívio breve.

Às minhas colegas de mestrado e amigas **Fernanda Visioli** e **Sabrina Pozatti Moure**. Ferzinha, um doce de amiga e colega. Bina, uma confidente,

parceira, vencedora e uma amiga para sempre. Vocês me ampararam nos momentos difíceis e a nossa união fortaleceu a ânsia pela nossa vitória.

Ao doutorando e amigo **Vinícius Coelho Carrard** pelo conhecimento e exemplo de dedicação à Patologia. “A vida é a arte de reconhecer as dificuldades, superar os desafios, contornar os sofrimentos e buscar incessantemente a felicidade.”

Às professoras **Márcia Gaiger de Oliveira** e **Ana Cristina Fossati** e também à **Isabel da Silva Lauxen** “Isa” e **Luciana Adolfo** “Lu”, pela convivência e ajuda sempre que necessário.

Ao **Leandro Nunes** e à “Dona” **Rosinha Savall** pela amizade, carinho e companhia. Vocês fazem parte da minha vida.

À **Adriana Aguiar** pela atenção nos assuntos burocráticos e conversas alegres. Ao **Lucas Mendes Nunes**, sempre disposto a resolver nossas “falhas” na informática.

Aos alunos da graduação, **Gustavo Giacomelli Nascimento** e **Luisa Schertel Cassiano**. Vocês foram indispensáveis à realização dessa pesquisa. Obrigada pela convivência alegre e de muita dedicação ao nosso trabalho. Valeu a pena. E também, à aluna **Priscila Zanco Kerber** pela contribuição nessa pesquisa.

Aos **pesquisadores, professores e funcionários** dos laboratórios do Departamento de Microbiologia dessa Universidade, especialmente do Laboratório 164, **Sabrina, Margaroni, Katiane, Mica, Diego, Márcia, Alessandra, Evelise**, e professora **Ana Paula** pela ajuda, ensinamentos e alegria no convívio.

Aos professores do **PPG em Odontologia**, pelos ensinamentos.

A todos os meus **colegas de mestrado**, às mestres em Patologia Bucal **Ana Luísa, Laura, Luhana** e **Márcia**, aos novos mestrandos em Patologia Bucal, **Adriana Jou Inchausti** e **Fábio Vieira de Miranda** e à **Fabiana Ramos**. Não importa o quanto convivemos. Foi muito bom tê-los conhecido.

Aos alunos da graduação, **turma ATO 10/01**, pela compreensão em nosso aprendizado de ensino.

Aos **funcionários da UFRGS**, em especial da biblioteca dessa faculdade.

Aos **voluntários** dessa pesquisa, pela colaboração e contribuição à ciência.

A **CAPES** pela concessão da bolsa de estudos.

RESUMO

O armazenamento de saliva para avaliação da microbiota bucal muitas vezes é necessário, principalmente em estudos epidemiológicos. O objetivo desse estudo foi avaliar a viabilidade e a variabilidade da microbiota bucal, de amostras de saliva armazenadas em temperaturas de -20°C e em nitrogênio líquido (N_2L), após 3 e 10 meses. Uma alíquota de cada amostra de saliva estimulada, usando goma de mascar sem açúcar, foi processada em até 45 minutos após a sua coleta. As amostras foram armazenadas seguindo três métodos diferentes: no primeiro método, as amostras de saliva foram preparadas com glicerol 10% (G) e mantidas a -20°C durante 8 horas e então armazenadas em botijão com N_2L ; no segundo foi utilizado o mesmo protocolo, porém, sem glicerol; no terceiro método as alíquotas foram preparadas com glicerol 10% e mantidas a -20°C . Após semeadura das amostras e incubação o número de unidades formadoras de colônias (UFC) foi determinado e uma média de 30 colônias de cada amostra foi identificada por meio de provas bioquímicas. Não houve diferença significativa na contagem de UFC/mL das amostras processadas imediatamente após a coleta ($2,1 \times 10^7$ UFC/mL) e após 3 meses de armazenamento em N_2L (G) ($4,5 \times 10^6$ UFC/mL), N_2L ($1,6 \times 10^6$ UFC/mL), e -20°C ($2,2 \times 10^6$ UFC/mL). Porém, após 10 meses de preservação em N_2L (G) ($4,5 \times 10^5$ UFC/mL), e N_2L ($2,3 \times 10^5$ UFC/mL), observou-se uma redução ($p=0.0183$) do número de UFC/mL em comparação com a avaliação inicial. Não houve diferença significativa no número de UFC nas amostras armazenadas com e sem crioprotetor. A determinação da variabilidade da microbiota bucal mostrou que as bactérias presentes nas amostras frescas dos gêneros *Streptococcus*, *Staphylococcus* e *Bacillus* mantiveram-se nos diferentes tempos de avaliação, mesmo que em diferentes concentrações. Baseado nos resultados obtidos pode-se sugerir que preservação de saliva a -20°C e a -196°C , são métodos de armazenamento eficazes, para avaliação da microbiota bucal, por um período de 3 e 10 meses.

Palavras-chave: armazenamento de saliva, saliva, microbiota, nitrogênio líquido e congelamento.

ABSTRACT

Saliva storage for oral microbiota evaluation often is required, especially in epidemiologic studies. The aim of the present study was to assess the effects of different storage methods upon viability and the variability of the oral microbiota in saliva samples. One aliquot of each saliva sample was processed until 45 minutes after collection. Saliva was stimulated using chewing gum sugar free. The samples were storage following three different methods: in the first method, aliquots of saliva were mixed with glycerol 10% (G) and maintained at -20°C for 8 hours and then stored in N₂L; the second followed the same protocol without glycerol; and in the third method aliquots were prepared with glycerol 10% and maintained at -20°C. From each sample the number as the colony-forming units (CFU/mL) was determined and 30 colonies were chosen and cells were identified by biochemical assays. There was not statistically significant difference on the number of CFU/mL of samples processed immediately after de collection and after 3 months as storage. However, after 10 months of storage in N₂L, there was a decrease in the number of CFU/mL ($p=0.0183$) in comparison with the initial evaluation, and the number of CFU/mL in the samples stored with and without glycerol did not showed statistically significant difference. Although in different percentages of cell number, the oral microbiota variability evaluation showed that *Streptococcus*, *Staphylococcus* and *Bacillus* were maintained in the different times of evaluation. Based on our results, it is possible to suggest that the preservation of saliva in -20°C and -196°C are efficient storage methods for oral microbiota evaluation for a period of 3 and 10 months.

Key words: storage saliva, saliva, microbiota, liquid nitrogen and freezing.

SUMÁRIO

1. ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVA	9
2. OBJETIVOS	22
3. METODOLOGIA.....	23
REFERÊNCIAS	25
4. ARTIGO CIENTÍFICO*	32
Introdução	33
Metodologia	34
Resultados	38
Discussão	43
Referências	50
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	56
ANEXOS	58

* Artigo científico a ser enviado à revista Oral Microbiology and Immunology.

1. ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVA

A boca é mantida úmida e lubrificada pela saliva que apresenta microrganismos oriundos da superfície dos dentes, da mucosa bucal, do sulco gengival e do dorso da língua, sendo esta a maior local de colonização primária dos microrganismos presentes na mesma (MAGER *et al.*, 2003; MARSH e MARTIN, 2005).

Muitas funções são descritas como características do fluido salivar, entre elas: limpeza da cavidade bucal; solubilização das substâncias alimentares; formação do bolo alimentar; facilitação da mastigação e deglutição; diluição dos detritos e lubrificação da mucosa, bem como facilitar a fala. Outras funções como a proteção dos dentes, a participação na formação da película adquirida, a ação antimicrobiana e de defesa são relatadas como características específicas de componentes da saliva (PEDERSEN *et al.*, 2002). Portanto, a saliva pode ser utilizada em pesquisa para avaliação da microbiota salivar (MAGER *et al.*, 2005; HINTAO *et al.*, 2007), especificamente da composição bacteriana (BENTLEY, CRAWFORD e BRODERIUS, 1988; SCHLAGENHAUF, POMMERENCKE e WEIGER, 1995; BRAMBILLA *et al.*, 1999; HOMANN *et al.*, 2000; MUTO *et al.*, 2000; DAWES, TSANG e SUELZLE, 2001), composição de leveduras (BRAMBILLA, STROHMENGER e VOGEL, 1992; TILLONEN *et al.*, 1999; JOHANSSON *et al.*, 2000); da concentração de tiocianato (CALLAS, HAUGH e FLYNN, 1989) de nitrato e nitrito salivar (LI *et al.*, 2007); avaliação de proteínas como Imunoglobulina A (IgA) (NURKKA *et al.*, 2003), estabilidade dos esteróides presentes na saliva (GRÖSCHL *et al.*, 2001), como fonte de células descamadas da mucosa bucal para avaliação molecular (JOHANSSON *et al.*, 2000) e fonte de DNA genômico (NG *et al.*, 2004). A saliva também pode ser utilizada para estudos relacionando o papel do álcool na carcinogênese, por meio da análise do nível de acetaldeído presente na mesma (JOKELAINEN *et al.*, 1996; HOMANN *et al.*, 1997; HOMANN *et al.*, 2000; HOMANN *et al.*, 2001).

Já foram identificadas mais de 700 espécies bacterianas na boca humana (PASTER *et al.*, 2006), sendo que a saliva pode conter até 10^8 microrganismos/mL (MARSH e MARTIN, 2005). Em adultos, a microbiota bucal residente permanece estável e coexiste em razoável harmonia com o hospedeiro, por meio da dieta e das interações microbianas (WILLIAMS, 1963; MARSH, 1994; AMERONGEN e

VEERMAN, 2002; MAGER *et al.*, 2003). WILLIAMS (1963) sugeriu que os nutrientes utilizados pela população bacteriana provêm principalmente dos alimentos residuais e das relações de sinergismo e simbiose entre os microrganismos, sendo que a saliva contribui apenas em pequeno percentual como fonte nutritiva.

O mecanismo de antagonismo bacteriano favorece a manutenção da homeostase microbiana. As bactérias colonizadoras do biofilme bacteriano podem produzir substâncias (bacteriocinas) inibidoras do crescimento de microrganismos patogênicos (MARSH, 1994). A película adquirida, que consiste de proteínas e glicoproteínas presentes na saliva e no fluido do sulco gengival, depositadas sobre a superfície dentária, apresenta receptores específicos para adesão bacteriana (MARSH e BRADSHAW, 1995). Sobre essa película há colonização de bactérias, os chamados colonizadores iniciais, que interagem com esses receptores através de proteínas de adesão (adesinas). Os principais colonizadores da película adquirida são bactérias Gram-positivas como *Streptococcus* sp. e *Actinomyces* sp. e Gram-negativas como *Haemophilus* sp. e *Fusobacterium* sp. Os colonizadores tardios unem-se às espécies já aderidas por meio de co-agregação ocorrendo uma interação específica de adesinas de determinadas bactérias com os receptores de carboidratos ou proteínas de superfície de outras bactérias (GIBBONS, 1989; MARSH e MARTIN, 2005). Essa interação determina a formação do biofilme bacteriano (LILJEMARK, FENNER e BLOOMQUIST, 1986; WHITTAKER, KLIER e KOLENBRANDER, 1996), ou seja, os microrganismos presentes na superfície dentária, envolvidos pela matriz salivar (COSTERTON *et al.*, 1994).

A microbiota bucal residente pode sofrer interferências da saliva e seus componentes, como IgA, lactoferrina, lisozima e peroxidases que desempenham atividades antimicrobianas, limitando o crescimento bacteriano (SCHENKELS, VEERMAN e AMERONGEN, 1995). O uso de antibiótico tópico ou sistêmico também afeta a população microbiana, porém ela é restabelecida após a suspensão do medicamento e sua eliminação (WILLIAMS, 1963).

Na boca existem dois tipos diferentes de superfícies, a dentária e a epitelial (membrana mucosa e língua), proporcionando condições ecológicas distintas, as quais afetam a dispersão, agregação e crescimento microbianos (WILLIAMS, 1963; MAGER *et al.*, 2003). As bactérias apresentam tropismo para estas diferentes superfícies biológicas (GIBBONS, 1989).

Alguns estudos mostraram que os microrganismos que predominam na microbiota salivar colonizam, principalmente, a língua. Gibbons, Kapsimalis e Socransky (1964) observaram a presença do *Streptococcus salivarius* tanto em amostras de saliva como nas de língua dos pacientes avaliados. Mager *et al.* (2003) avaliaram 40 espécies bacterianas da microbiota salivar e observaram um predomínio dos microrganismos Gram-positivos (*Actinomyces odontolyticus*) e Gram-negativos (*Veillonella parvula*, *Prevotella melaninogenica*, *Eikenella corrodens*, *Neisseria mucosa*, *Fusobacterium periodonticum*, *F. nucleatum* ss *vincentii* e *Porphyromonas gingivalis*). Essas bactérias também predominaram nas amostras da superfície dorsal e lateral da língua dos mesmos pacientes. Também foram observados diferentes padrões de colonização do gênero *Streptococcus*, entre eles, *S. oralis*, *S. mitis*, *S. constellatus* que colonizaram em maior proporção os tecidos moles (superfícies dorsal, lateral e ventral da língua, palato duro, mucosa labial, gengiva inserida, soalho e mucosa bucal). Outras espécies como *S. sanguis*, *S. anginosus*, *S. intermedius* e *S. gordonii*, foram encontradas em quantidades semelhantes nas superfícies dentária e mucosa avaliadas.

Alterações no ambiente bucal, como o acúmulo do biofilme bacteriano sobre a superfície dentária, principalmente pela falta de remoção por meio de higiene bucal, predispõe ao desequilíbrio da homeostasia microbiana e à instalação de cárie dental e de doenças periodontais (MARSH, 1994). A microbiota, ou sua alteração, é também investigada nos pacientes expostos a fatores de risco para câncer de boca, cigarro e álcool, os quais modificam o habitat local, em relação à microbiota de pacientes não expostos a esses fatores (COLMAN *et al.*, 1976; JOKELAINEN *et al.*, 1996; HOMANN *et al.*, 1997; HOMANN *et al.*, 2000; HOMANN *et al.*, 2001; KURKIVUORI *et al.*, 2007).

Na doença cárie, os estreptococos do grupo mutans (*S. mutans* e *S. sobrinus*) são os principais microrganismos relacionados com a sua etiologia. O consumo excessivo de carboidratos promove alteração na homeostasia da população microbiana residente e favorece o predomínio das bactérias capazes de fermentar os carboidratos da dieta (MARSH, 1989; van HOUTE, 1994).

Na doença periodontal inflamatória, o acúmulo de biofilme bacteriano supra e subgengival favorece o crescimento de espécies anaeróbias estritas e proteolíticas (*Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Prevotella melaninogenica*, *Prevotella intermedia*, *Campylobacter rectus* e *Eikenella corrodens*), resultando no desequilíbrio

da microbiota subgengival, predispondo a região à doença (DARVEAU *et al.*, 1997; DAROUT *et al.*, 2002). Segundo Piccinin (2005), o efetivo controle do biofilme supragengival determina melhora significativa na situação periodontal.

Os fatores de risco para o câncer de boca, fumo e álcool, promovem alterações no habitat local. Estudos realizados a partir da avaliação da variabilidade da microbiota bucal demonstraram que o fumo tem propriedades antibacterianas (fenóis que danificam a membrana de células bacterianas), além de gerar condições anaeróbias na mucosa bucal, favorecendo o crescimento de anaeróbios estritos, entre eles, microrganismos Gram-negativos, bacilos do gênero *Porphyromonas*, *Prevotella* e *Fusobacterium* e cocos do gênero *Veillonella* (COLMAN, BEIGHTON e CHALK, 1976). Colman, Beighton e Chalk (1976) avaliaram a microbiota bucal de pacientes fumantes e não-fumantes. Pacientes não fumantes apresentaram maior quantidade de *Neisseria* sp. (cocos Gram-negativo) nas amostras obtidas da mucosa da língua e do palato, sendo que em pacientes fumantes, ocorreu maior presença de anaeróbios estritos, *Veillonella* sp. (cocos Gram-negativo) e *Porphyromonas* sp. e *Prevotella* sp. (bacilos Gram-negativos).

A ingestão de álcool favorece o crescimento de microrganismos capazes de metabolizá-lo. Kurkivuori *et al.* (2007), avaliando a produção de acetaldeído por bactérias bucais demonstraram que os estreptococos do grupo viridans (anaeróbios facultativos), contribuem significativamente na produção de acetaldeído salivar após ingestão de álcool. O acetaldeído, primeiro metabólito do álcool, é considerado carcinogênico (HOMANN *et al.*, 1997).

A boca e a saliva apresentam condições de estudo das interações entre as diferentes localizações, superfícies dentária e epitelial e a população microbiana presente (GIBBONS, 1989).

A variabilidade da microbiota bucal pode ser avaliada de diferentes formas, sendo uma delas utilizando-se amostras de saliva (CHIAPPIN *et al.*, 2007). As análises da saliva podem ser realizadas através da coleta de saliva total ou de saliva das glândulas salivares específicas (MARSH e MARTIN, 2005).

A coleta de saliva total pode ser realizada por meio de "drenagem" pelo lábio inferior, ou por meio de expectoração (DAWES, TSANG e SUELZLE, 2001). A saliva coletada por expectoração pode ser expelida diretamente no frasco coletor (MAGER *et al.*, 2003; LI *et al.*, 2007) ou estimulada mecanicamente por meio do uso de uma goma de mascar durante a coleta (MARSH e MARTIN, 2005). As amostras de saliva

coletadas por meio de estímulo mecânico contêm 14 vezes mais bactérias do que as amostras coletadas por drenagem durante 1 minuto (DAWES, TSANG e SUELZLE, 2001), portanto, comparando estudos nos quais diferentes procedimentos de amostragem são utilizados, os resultados irão depender, em certa extensão, do método de coleta adotado (DAWES, TSANG e SUELZLE, 2001; MARSH e MARTIN, 2005; CHIAPPIN *et al.*, 2007). Tanto a coleta quanto o processamento das amostras são as maiores fontes potenciais de erro na análise quantitativa assim como na análise da variabilidade da microbiota salivar (BENTLEY, CRAWFORD e BRODERIUS, 1988). Para definição da população microbiana após uma única coleta, há necessidade de se instruir o paciente quanto aos cuidados necessários para este procedimento e de padronizar a técnica de coleta (BENTLEY, CRAWFORD e BRODERIUS, 1988; THYLSTRUP e FEJERSKOV, 1998; DAWES, TSANG e SUELZLE, 2001), além de motivar os indivíduos para que uma quantidade adequada de saliva possa ser coletada no tempo preconizado (CALLAS, HAUGH e FLYNN, 1989).

A técnica da coleta de saliva estimulada usando goma de mascar durante diferentes tempos tem sido utilizada em diversos estudos experimentais (BENTLEY, CRAWFORD e BRODERIUS, 1988; BRAMBILLA, STROHMENGER e VOGEL, 1992; SCHLAGENHAUF, POMMERENCKE e WEIGER, 1995; HOMANN *et al.*, 1997; BRAMBILLA *et al.*, 1999; TILLONEN *et al.*, 1999; HOMANN *et al.*, 2000; JOHANSSON *et al.*, 2000; DAWES, TSANG e SUELZLE, 2001; HOMANN *et al.*, 2001). Esse método de coleta tende a deslocar células epiteliais e bactérias da mucosa bucal pela ação mecânica da mastigação e o aumento do fluxo salivar tende a desalojar aquelas que estão fracamente ligadas às superfícies dos dentes (DAWES, TSANG e SUELZLE, 2001). Assim, quando se utiliza saliva estimulada, o volume do primeiro minuto deve ser desprezado e a composição da saliva é estimada a partir do volume coletado a seguir (THYLSTRUP e FEJERSKOV, 1998), evitando assim uma contagem elevada das bactérias acumuladas na boca. Dawes, Tsang e Suelzle (2001) demonstraram um maior número de unidades formadoras de colônias (UFC) presentes na saliva após o primeiro minuto da coleta ($\pm 15 \times 10^7$ UFC/minuto). Este número diminuiu seqüencialmente durante a mastigação da goma e atingiu valores platô após 10 minutos ($\pm 50 \times 10^6$ UFC/minuto).

Após a coleta, a saliva deve ser armazenada quando sua análise for realizada num período posterior a 90 minutos, pois seus constituintes, assim como a

microbiota presente na mesma sofrem degradação (CHIAPPIN *et al.*, 2007). As técnicas de refrigeração usualmente utilizadas incluem o armazenamento a 4°C, -20°C e -80°C. O armazenamento por meio de criopreservação consiste em estabilizar células em temperaturas criogênicas, ou seja, temperaturas inferiores a -130°C, nas quais não existe água na forma líquida e todos os processos metabólicos, como respiração e atividade enzimática, são inativados (COMMITTEE ON GERM PLASM RESOURCES, 1978; MAZUR, 1984; SIMIONE, 1998). Essas temperaturas criogênicas podem ser conseguidas e mantidas em nitrogênio líquido (-196°C) (N₂L) e em freezer de ultra-baixa temperatura (-150°C) (MORRIS, 1995). Segundo Chiappin *et al.* (2007), os espécimes salivares podem ser mantidos a 4°C quando analisados num período de 3 a 6 horas e a -20°C, -80°C e -196°C quando processados em dias ou meses após a sua coleta.

O armazenamento em nitrogênio líquido é considerado um método viável para a preservação de microrganismos isolados (GILMOUR *et al.*, 1978; MIYAMOTO-SHINOHARA *et al.*, 2000), pequenos organismos multicelulares (SIMIONE, 1998), sêmen (ESTEVES *et al.*, 2003), amostras de suco gástrico (VÄKEVÄINEN *et al.*, 2001), células isoladas e fragmentos de tecidos (BONNAS *et al.*, 1999; LOKEN e DEMETRICK, 2005) e ainda organismos complexos como embriões (SIMIONE, 1998). Este método tem sido utilizado para o armazenamento de amostras de saliva por diversos autores, principalmente em estudos epidemiológicos (CALLAS, HAUGH e FLYNN, 1989; BRAMBILLA, STROHMENGER e VOGEL, 1992; BRAMBILLA *et al.*, 1999; NURKKA *et al.*, 2003).

As diferentes condições de armazenamento afetam a sobrevivência celular diminuindo a viabilidade bacteriana, que é definida como a capacidade do microrganismo crescer e se multiplicar após o descongelamento, quando inoculado em meio de cultura apropriado (WELLS e RUSSELL, 1996). A água é o principal componente para manutenção das funções celulares e deve estar viável na célula para que os processos químicos de vida ocorram, e o metabolismo celular é interrompido quando a água é convertida em gelo (SIMIONE, 1998). O gelo é formado quando a temperatura cai abaixo de 0°C. A água extracelular congela no momento em que a célula se aproxima do ponto de congelamento, removendo o líquido extracelular, aumentando a osmolaridade. Com o desequilíbrio osmótico, a água é retirada do meio intracelular para o compartimento extracelular, ocasionando

uma diminuição do volume celular, dependente da velocidade de congelamento (RUSSEL, 1994).

O ponto de congelamento da maioria das células não halofílicas (bactérias que não necessitam de uma concentração mínima de cloreto de sódio para crescerem) é acima de -2°C (MAZUR, 1965). Wood e Rosenberg (1957) avaliaram leveduras para determinar a fração de água celular congelada em função da temperatura, sendo que as células continham 69% de água do total do seu volume. Ocorreu o congelamento de aproximadamente 87% do total da água celular, no congelamento progressivo de 0°C a -22°C . De acordo com esses autores, as leveduras podem se manter viáveis sempre que aproximadamente 90% da água celular for congelada.

No processo de criopreservação o desafio é determinar como as células podem sobreviver a baixas temperaturas e retornar subsequente às condições fisiológicas. Segundo Hilliard (1918), a maioria das bactérias consegue exercer seu metabolismo normal a temperaturas inferiores a 6°C . Vários fatores afetam a sobrevivência celular na criopreservação: taxa de congelamento; tamanho e desidratação da célula; taxa de descongelamento e regeneração celular (MAZUR, 1984). Quando a taxa de congelamento é baixa, ou seja, quando a razão temperatura/tempo de congelamento ($^{\circ}\text{C}/\text{min.}$) ocorre de forma lenta e gradual, a desidratação celular, causada pela alta concentração de eletrólitos no meio extracelular provoca o acúmulo de gelo extracelular. Quando a taxa de congelamento é alta, ou seja, a razão $^{\circ}\text{C}/\text{min.}$ de congelamento é rápida, ocorre um menor desequilíbrio osmótico, porém as injúrias celulares são causadas pela formação de gelo intracelular. Em ambos os casos, o mecanismo de dano ocorre pela presença de cristais de gelo, os quais afetam a estrutura celular, porém, quanto mais lenta a taxa de congelamento, mais tempo as células ficam expostas ao efeito soluto (MAZUR, 1970; BANK e MAZUR, 1973; SANDSKÄR e MAGALHÃES, 1994; SIMIONE, 1998; FONSECA, BÉAL e CORRIEU, 2001). Quando a taxa de congelamento é ultra-rápida, pode ocorrer a vitrificação (RUSSEL, 1994).

Diferentes tipos de células podem necessitar diferentes taxas de congelamento (SANDERS, VENEMA e KOK, 1999), no entanto um congelamento uniforme na taxa de $1^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$ a partir da temperatura ambiente, é efetiva para uma ampla variedade de células (SIMIONE, 1998). Mazur (1970) obteve maior número de

células viáveis, de leveduras e eritrócitos, quando utilizou uma taxa de congelamento de 7°C e 3000°C por minuto, respectivamente. O valor numérico para a taxa de congelamento crítica (acima da ótima), na qual ocorre a formação de cristais de gelo na porção interna da célula, depende de fatores como a proporção do volume celular, da área de superfície e ainda da permeabilidade da membrana à água (MAZUR, 1965).

A temperatura de descongelamento também pode afetar a viabilidade celular através da diferença de concentração dos eletrólitos ou da recristalização do gelo (SIMIONE, 1998). Um descongelamento rápido é conseguido com a imersão do criotubo em banho - de - água de 30°C durante 2 minutos (FONSECA *et al.*, 2006) ou de 35°C a 40°C, durante 1 a 2 minutos (SANDSKÄR e MAGALHÃES, 1994; MORRIS, 1995; WITHERS e WILLIAMS, 1998). Durante o descongelamento, os cristais de gelo menores (intracelulares) que se formaram durante o congelamento, apresentam maior energia de superfície que os cristais mais largos (extracelulares) e tendem a se fundir com outros cristais menores, fenômeno chamado de recristalização (MAZUR, 1970). A interação entre a taxa de congelamento e a temperatura de descongelamento deve ser considerada quando se pensa na utilização de um método de armazenamento que preserve a viabilidade celular.

Quando as células são congeladas de forma mais lenta que a ótima, a sobrevida é considerada maior se o descongelamento também for lento (KARLSSON e TONER, 1996). Porém, quando o congelamento é rápido e o descongelamento é lento, as células ficam mais tempo expostas ao meio externo, permitindo que ocorra a recristalização (MAZUR, 1970, 1984) e que a barreira de permeabilidade das células seja definitivamente danificada (MAZUR, 1965). A forma de se evitar a recristalização seria utilizar um descongelamento rápido (KARLSSON e TONER, 1996). Bank e Mazur (1973) utilizaram uma taxa de congelamento de aproximadamente 7°C/minuto e obtiveram 55% e 2% de recuperação das células leveduras viáveis, após um descongelamento rápido e lento, respectivamente.

Durante a criopreservação, desde o momento em que se inicia a formação do primeiro cristal de gelo até a regeneração da célula (retomada do crescimento), os fenômenos físico-químicos como saída de água da célula para o meio extracelular durante o congelamento, desidratação celular pelo aumento da concentração de solutos no meio extracelular, formação de cristais de gelo intracelular e extracelular devem ser anulados ou reduzidos (MAZUR, 1984).

Várias substâncias têm sido testadas como agentes crioprotetores, sozinhos ou combinados, entre elas, açúcares, soro, ou solventes. No entanto, álcoois, como o glicerol (propano-1,2,3-triol) e amidas, como o sulfóxido de di-metila (DMSO) são os crioprotetores mais utilizados e efetivos, pois possuem baixo peso molecular e são solúveis em água (MAZUR, 1970), sendo que o glicerol é o agente de escolha por ser menos tóxico e mais viscoso que o DMSO (SIMIONE, 1998). O mecanismo de ação desses crioprotetores baseia-se nas ligações de hidrogênio que eles promovem com as moléculas de água. Essas ligações mudam a orientação da molécula da água nos cristais de gelo, criando um ambiente menos nocivo às células (NASH, 1966; DALIMATA e GRAHOM, 1997; ZHAO e ZHANG, 2005). Fonseca *et al.* (2006) utilizaram glicerol 10% (v/v) em amostras de *Lactobacillus delbrueckii* subespécie *bulgaricus* armazenadas por diferentes protocolos de taxa de congelamento (5°C/minuto, 300°C/minuto e imersão direta em nitrogênio líquido). Os autores demonstraram que a viscosidade da solução na qual as células encontram-se expostas na presença de glicerol, aumenta rapidamente durante o congelamento. Segundo Morris *et al.* (2006), na presença de glicerol a formação de gelo é menor com uma taxa de congelamento mais rápida.

Fonseca, Béal e Corrieu (2001) avaliando a preservação da atividade celular de bactérias como *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subespécie *bulgaricus*, confirmaram o efeito benéfico do agente crioprotetor glicerol durante o congelamento e o armazenamento desses microrganismos à -70°C. Gilmour *et al.* (1978) testaram 3 tipos de agentes crioprotetores para congelamento de bactérias anaeróbias Gram-negativas em nitrogênio líquido por 1 ano, e constataram que o polivinil pirrolidona foi superior ao glicerol e ao DMSO, mas este superior ao glicerol. Gorman e Adley (2004) utilizaram diferentes técnicas para o armazenamento da bactéria *Campylobacter jejuni*. A bactéria se manteve viável durante 7 meses, quando armazenada a -20°C com 10% de glicerol e durante 12 meses quando armazenada a -85°C com 15% de glicerol.

Diferentes métodos de recuperação das células às condições de atividade metabólica também interferem na sua viabilidade, sendo que meios de cultura apropriados devem ser utilizados no processo de regeneração celular, permitindo a retomada dos processos metabólicos interrompidos pelo congelamento, com o mínimo de distúrbio osmótico e físico (ZHAO e ZHANG, 2005). Meios de cultura

apropriados são utilizados para avaliação das células que mantiveram a capacidade de se dividir e formaram colônias bacterianas as quais são contadas (UFC) (PANOFF *et al.*, 1998; WOLFE e BRYANT, 1999). Hoover e Newbrun (1977) utilizaram a contagem das UFC para avaliar a viabilidade bacteriana, de amostras de biofilme bacteriano armazenadas em diferentes temperaturas (5°C, 20°C, -40°C e -196°C). Na comparação do percentual da contagem total de UFC das amostras avaliadas na coleta e após 72 horas de armazenamento, observou-se um maior número de bactérias viáveis quando as amostras foram armazenadas a 5°C e a 20°C (>30%). Nas temperaturas a -40°C e a -196°C, a viabilidade foi de aproximadamente 10% e 20%, respectivamente. No entanto, as amostras foram armazenadas diretamente nas respectivas temperaturas, sem o controle da taxa de congelamento.

Independente do protocolo de congelamento utilizado, algumas células apresentam resistência às mudanças bruscas de temperatura. Bactérias do gênero *Bacillus* contêm endósporos, estruturas de resistência que se formam dentro das células, com parede celular espessa, são altamente resistentes às mudanças do ambiente e podem sobreviver em condições desfavoráveis. Estas formas de repouso são metabolicamente inativas, o que significa que não estão crescendo. Sob condições apropriadas, exposição ao calor, eles podem germinar e tornarem-se células vegetativas metabolicamente ativas, que crescem e se multiplicam (CHAN *et al.*, 1973). Hilliard e Davis (1918) observaram que endósporos de *Bacillus subtilis* em misturas congeladas mostraram maior viabilidade que espécies não esporuladas. Endósporos contêm 5 vezes mais enxofre do que as células vegetativas. Provavelmente as macromoléculas responsáveis pela manutenção do estado dormente é uma camada de proteína rica em cistina estabilizada em uma configuração específica por pontes dissulfeto. As mudanças dessa estrutura poderiam ser responsáveis por expor os sítios enzimáticos ativos necessários para germinação ou aumento de acessibilidade ao substrato por elas (KEYNAN *et al.*, 1964).

A conversão de um endósporo de um estado dormente para um estado ativado, é um processo reversível. A quebra da dormência envolve dois mecanismos superpostos: ativação reversível do endósporo por calor ou outros agentes e processo de germinação irreversível que pode ser induzido somente pela ativação

do endósporo. A temperatura e a duração do calor variam amplamente em diferentes espécies e em diferentes preparações de uma mesma cepa. A taxa de germinação máxima é atingida com tempo de incubação de 45 minutos na temperatura de 60°C ou com 48 horas de incubação a 34°C (KEYNAN *et al.*, 1964). Knaysi e Curran (1961) mostraram que o congelamento e o descongelamento sucessivos retardam a germinação.

Levinson (1971) propôs que o calor causa a liberação de um estimulante da germinação para o endósporo, mas não suporta a germinação sozinho e reage com componentes exógenos adicionados para aumentar a taxa de germinação. A liberação de ácido dipicolínico e L-alanina durante a ativação por calor permitem a sustentação desta hipótese (GOULD e HITCHINS, 1963).

Apesar de algumas bactérias apresentarem maior resistência ao congelamento (HILLIARD e DAVIS, 1918), os estudos da viabilidade microbiana de amostras de saliva são escassos.

A literatura relata diferentes temperaturas de armazenamento de saliva, desde refrigeração à 4°C (GRÖSCHL *et al.*, 2001; NURKKA *et al.*, 2003; NG *et al.*, 2004; LI *et al.*, 2007), à -20°C (CALLAS, HAUGH e FLYNN, 1989; JOHANSSON *et al.*, 2000; DAROUT *et al.*, 2002), à -30°C (HOMANN *et al.*, 1997) e -80°C (TILLONEN *et al.*, 1999; HOMANN *et al.*, 2000; NURKKA *et al.*, 2003; NG *et al.*, 2004) até criopreservação em nitrogênio líquido (BRAMBILLA, STROHMENGER e VOGEL, 1992; BRAMBILLA *et al.*, 1999; NURKKA *et al.*, 2003).

Nurkka *et al.* (2003) armazenaram saliva e avaliaram a presença de anticorpos IgA anti-*Streptococcus pneumoniae* utilizando diferentes métodos de congelamento. Imediatamente após a coleta as amostras de saliva foram mantidas a -196°C e a 4°C, de 4 a 8 horas, e posteriormente armazenadas a -70°C durante 1 semana. O congelamento imediato em nitrogênio líquido para posterior armazenamento no -70°C, mostrou uma concentração de anticorpos 41% a 47% maior que o armazenamento temporário a 4°C e foi considerado o método mais apropriado para avaliação de anticorpos IgA anticapsular em amostras salivares armazenadas posteriormente a -70°C.

Brambilla *et al.* (1992) avaliaram a presença de leveduras em amostras de saliva de 127 crianças após armazenamento a -196°C. Observaram que após o período de congelamento de 2 meses, houve pequeno ou nenhum efeito do

armazenamento sobre a viabilidade das leveduras. Estes resultados foram confirmados em outro estudo de Brambilla *et al.* (1999), onde congelaram amostras de saliva em nitrogênio líquido durante 20 dias e avaliaram os níveis de *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus* na saliva de 473 crianças. Para comparar o crescimento bacteriano, 20 amostras foram processadas antes do armazenamento, e o coeficiente de correlação entre as amostras avaliadas imediatamente após a coleta e as congeladas foi positivo ($r= 0.989$).

Apesar de trabalhos terem demonstrado a eficácia da criopreservação de células à -196°C , cuidados devem ser tomados neste tipo de armazenamento quanto a manutenção do botijão de nitrogênio líquido. A retirada da tampa para checagem das amostras, a inserção de novas amostras, assim como a recarga de nitrogênio líquido no botijão, podem facilitar a contaminação microbiana junto aos cristais de gelo que se formam nas superfícies internas do botijão, os quais podem se acumular na parte externa dos criotubos (MORRIS, 2005). Burden (1999) também demonstrou o risco de contaminação microbiana e alertou quanto às diferentes temperaturas que podem ocorrer dentro do botijão de armazenamento. A parte líquida do nitrogênio atinge a temperatura de -196°C e na parte superior, em sua fase de vapor, a temperatura varia. Esta variação vai de -157°C a -82°C , conforme a posição dos canisters nos quais os criotubos permanecem inseridos. Desta forma, tanto o risco de contaminação quanto a posição de armazenamento dos criotubos devem ser considerados, para evitar que esses fatores interfiram na integridade das amostras armazenadas.

Existem várias técnicas para preservação das células e cada tipo celular requer diferente método de armazenamento. Segundo Pegg (1976), um percentual satisfatório de sobrevivência pode ser obtido quando métodos utilizados para o armazenamento em nitrogênio líquido reduzirem o efeito soluto, a uma taxa de congelamento lenta o suficiente, para prevenir o congelamento intracelular. Já Fonseca *et al.* (2006) avaliando bactérias observaram que, independente da taxa de congelamento utilizada, não houve formação de gelo intracelular com as células suspensas em glicerol.

Observa-se que a maioria dos trabalhos que avalia os efeitos do armazenamento de bactérias em baixas temperaturas, utiliza amostras de bactérias isoladas. Poucos trabalhos utilizaram o armazenamento de saliva para análise da viabilidade microbiana, e os que utilizaram sua preservação em nitrogênio líquido,

mantiveram as amostras congeladas por um período de até 2 meses. Poucos estudos avaliam a viabilidade da microbiota da saliva armazenada em diferentes temperaturas por períodos mais longos. Este tipo de trabalho se faz necessário para que se possa confirmar a eficácia dos processos de armazenamento de saliva, possibilitando a manutenção da viabilidade microbiana necessária para a realização de estudos epidemiológicos longitudinais.

2. OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL:

Determinar se a viabilidade e a variabilidade da microbiota bucal em amostras de saliva humana armazenada em diferentes temperaturas e condições sofrem alteração.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Determinar a viabilidade da microbiota bucal em amostras de saliva armazenadas em nitrogênio líquido (-196°C) e a -20°C, após a coleta e aos 03 e 10 meses;
- Determinar a variabilidade da microbiota bucal em amostras de saliva armazenadas em nitrogênio líquido (-196°C) e a -20°C, após a coleta e aos 03 e 10 meses;
- Determinar a viabilidade do *Streptococcus mitis* e *S. salivarius* em amostras de saliva armazenadas em nitrogênio líquido (-196°C) e a -20°C aos 03 e 10 meses após a coleta;
- Determinar a necessidade de utilização de agente crioprotetor para armazenamento de saliva em nitrogênio líquido.

3. METODOLOGIA

3.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Estudo observacional, transversal e analítico.

O presente trabalho caracterizou-se por um estudo em que o objetivo foi determinar se a microbiota bucal presente na saliva sofre alteração devido ao armazenamento da saliva.

Esse trabalho teve aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa da Faculdade de Odontologia da UFRGS (anexo 1).

Para a coleta da saliva, pacientes foram selecionados conforme descrito no item 3.3. Para cada paciente, no momento da coleta da amostra, foi preenchida uma ficha clínica (anexo 2) e também foi obtido o termo de consentimento informado (anexo 3).

O projeto foi desenvolvido no Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, local onde foram processadas as amostras.

3.2 TREINAMENTO E CALIBRAGEM DO EXAMINADOR

A examinadora foi treinada quanto aos procedimentos de coleta, armazenamento e processamento das amostras de saliva.

A calibragem para o número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) foi estabelecida através de contagem repetida, em 10% da amostra, durante o estudo. O valor do teste t foi de 0,948, mostrando não haver diferença nas contagens repetidas do número de UFC.

Para avaliar se o armazenamento da saliva altera a microbiota presente na mesma, foi determinada a variabilidade e a viabilidade da microbiota bucal nas amostras de saliva. A determinação da variabilidade da microbiota foi realizada imediatamente após a coleta, 3 meses de armazenamento a -20°C , 3 e 10 meses de armazenamento em Nitrogênio Líquido (N_2L).

A viabilidade da microbiota bucal foi avaliada nas amostras de saliva armazenadas em N_2L após 3 e 10 meses, e a -20°C , após 3 meses de armazenamento. Também foi realizada a avaliação da viabilidade do *Streptococcus*

mitis e *S. salivarius* em amostras de saliva armazenadas em N₂L e a –20°C aos 03 e 10 meses de armazenamento. Finalmente, foi avaliada a necessidade de utilização de agente crioprotetor para armazenamento de saliva em N₂L.

O pH e a capacidade tampão salivar também foram avaliados imediatamente após a coleta da saliva.

3.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

A amostra constituiu-se de 4 homens acima de 40 anos de idade que não fumavam e nem bebiam.

3.4 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Deste experimento foram excluídos os pacientes com história de uso rotineiro de antisséptico bucal, antibioticoterapia ou uso de corticóides nos últimos 03 meses, portadores de doenças auto-imunes, assim como pacientes que comeram ou realizaram higiene bucal 03 horas antecedentes à coleta de saliva.

3.5 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

Os procedimentos experimentais estão descritos na metodologia do artigo científico.

REFERÊNCIAS

- AMERONGEN, A. V. N.; VEERMAN, E. C. I. Saliva – The Defender of the Oral Cavity. **Oral Diseases.**, v. 8, n. 1, p. 12-22, 2002.
- BANK, H.; MAZUR, P. Visualization of Freezing Damage. **The Journal of Cell Biology.**, v. 57, p. 729-742, 1973.
- BENTLEY, C.; CRAWFORD, J.J.; BRODERIUS, C.A. Analytical and Physiological Variability of Salivary Microbial Counts. **Journal Dental Research.**, v. 67, n. 11, p. 1409-1413, 1988.
- BONNAS, W. A. *et al.* Expression of β -defensin Genes by Human Salivary Glands. **Oral Microbiology and Immunology.**, v. 14, p. 371-374, 1999.
- BRAMBILLA, E.; STROHMENGER, L.; VOGEL, G. The Effect of Storage in Liquid Nitrogen on the Isolation of Oral Yeasts in Human Saliva. **Archs Oral Biology.**, v. 37, n. 3, p. 237-239, 1992.
- BRAMBILLA, E. *et al.* Salivary mutans Streptococci and Lactobacilli in 9- and 13-year-old Italian Schoolchildren and the Relation to Oral Health. **Clinical Oral Investigation.**, v. 3, p. 7-10, 1999.
- BURDEN, D. W. Issues in Contamination and Temperature Variation in the Cryopreservation of Animal Cells and Tissues. **Revco Technologies: Application Note.**, 99-08, 1999.
- CALLAS, P. W.; HAUGH, L. D.; FLYNN, B. S. Effects of Long-Term Storage on Salivary Thiocyanate Concentration. **Addictive Behaviors.**, v. 14, p. 643-648, 1989.
- CHAN, E. C.; RUTTER, P. J.; WILLS, A. Abundant Growth and Sporulation of *Bacillus sphaericus* NCA Hoop 1-A-2 in a Chemically Defined Medium. **Canadian Journal of Microbiology.**, v. 19, n. 1, p. 151-154, 1973.
- CHIAPINN, S. *et al.* Saliva Specimen: A New Laboratory Tool for Diagnostic and Basic Investigation. **Clinica Chimica Acta.**, apr. 2007.
- COLMAN, G.; BEIGHTON, D.; CHALK, A. J. Cigarette Smoking and the Microbial Flora of the Mouth. **Australian Dental Journal.**, v. 21, n. 2, p. 111-118, 1976.
- COMMITTEE ON GERM PLASM RESOURDES. Conservation of Germplasma Resources: An Imperative., v. 7, p. 79-84, 1978.
- CORRIELL, L.L. Preservation, storage, and shipment. In: **Methods in Enzymology.** Academic Press, 1979. Cap. 3, p. 29-36.
- COSTERTON, *et al.* Biofilms, the Customized Microniche. **Journal of Bacteriology.**, v. 178, n. 8, p. 2137-2142, 1994.

DAILY, W. A.; HIGGENS C. E. Preservation and Storage of Microorganisms in the Gas Phase of Liquid Nitrogen. **Cryobiology.**, v. 10, p. 364-367, 1973.

DALIMATA, A. M.; GRAHAM J. K. Criopreservation of Rabbit Spermatozoa Using Acetamide in Combination with Trehalose and Methyl Cellulose. **Theriogenology.**, v. 48, p. 831-841, 1997.

DAROUT, I. A. *et al.* Salivary Microbiota Levels in Relation to Periodontal Status, Experience of Caries and Miswak Use in Sudanese Adults. **Journal of Clinical Periodontology.**, v. 29, p. 411-420, 2002.

DARVEAU, R. P.; TANNER, A.; PAGE, R. C. The Microbial Challenge in Periodontitis. **Periodontology 2000.**, v. 14, p. 12-32, 1997.

DAWES, C.; TSANG, R. W. L.; SUELZLE, T. The Effects of Gum Chewing, four Oral Hygiene Procedures, and two Saliva Collection Techniques, on the Output of Bacteria into Human Whole Saliva. **Archives of Oral Biology.**, v. 46, p. 625-632, 2001.

ESTEVEZ, S. C. *et al.* Effects of the Technique of Cryopreservation and Dilution/Centrifugation after Thawing on the Motility and Vitality of Spermatozoa of Oligoasthenozoospermic men. **International Braz J Urol: Official Journal of the Brazilian Society of Urology.**, p. 133-140, 2003.

FONSECA, F.; BÉAL, C.; GEORGES, C. Operating Conditions that Affect the Resistance of Lactic Acid Bacteria to Freezing and Frozen Storage. **Cryobiology.**, v. 43, p. 189-198, 2001.

FONSECA, F.; MARIN, M.; MORRIS, G. J. Stabilization of Frozen *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* in Glycerol Suspensions: Freezing Kinetics and Storage Temperature Effects. **Applied and Environmental Microbiology.**, v. 72, n. 10, p. 6474-6482, 2006.

GIBBONS, R. J.; KAPSIMALIS, B.; SOCRANSKY, S. S. The Source of Salivary Bacteria. **Archives of Oral Biology.**, v. 9, p. 101-103, 1964.

GIBBONS, R. J. Bacterial Adhesion to Oral Tissues: a Model for Infectious Diseases. **Journal Dental Research.**, v. 68, n. 5, p. 750-760, 1989.

GILMOUR, M. N. *et al.* Compact Liquid Nitrogen Storage System Yielding High Recoveries of Gram-Negative Anaerobes. **Applied and Environmental Microbiology.**, p. 84-88, 1978.

GORMAN, J.; ADLEY, C. C. An Evaluation of five Preservation Techniques and Conventional Freezing Temperatures of -20° C and -85° C for Long-Term Preservation of *Campylobacter jejuni*. **Letters in Applied Microbiology.**, v. 38, p. 306-310, 2004.

GOULD, G. W.; HITCHINS, A. D. Sensitization of Bacterial Spores to Lysozyme and Hydrogen Peroxide with Reagents Which Rupture Disulphide Bonds. **Journal of General Microbiology.**, v. 33, p. 413-423, 1963.

GRÖSCHL, M. *et al.* Stability of Salivary Steroids: The Influences of Storage, Food and Dental Care. **Steroids.**, v. 66, p. 737-741, 2001.

HARLOW, E.; LANE, D. **Antibodies A Laboratory Manual.** New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. 258-260 p.

HILLIARD, C. M.; DAVIS, M. A. The Germicidal Action of Freezing Temperatures upon Bacteria. **Journal of Bacteriology.**, v. 3, n.4, p. 423-431, 1918.

HINTAO, J. *et al.* The Microbiological Profiles of Saliva, Supragingival and Subgingival Plaque and Dental Caries in Adults with and without Type 2 Diabetes Mellitus. **Oral Microbiology and Immunology.**, v. 22, p. 175-181, 2007.

HOLT, J. G. *et al.* Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria. In: MacFADDIN, J. F. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.** 3. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1994. Cap. 43, p. 483-623.

HOMANN, N. *et al.* High Acetaldehyde Levels in Saliva after Ethanol Consumption: Methodological Aspects and Pathogenetic Implications. **Carcinogenesis.**, v.18, n. 9, p. 1739-1743, 1997.

HOMANN, N. *et al.* Increased Salivary Acetaldehyde Levels in Heavy Drinkers and Smokers: A Microbiological Approach to Oral Cavity Cancer. **Carcinogenesis.**, v. 21, n. 4, p. 663-668, 2000.

HOMANN, N. *et al.* Poor Dental Status Increases Acetaldehyde Production from Ethanol in Saliva: A Possible Link to Increased Oral Cancer Risk Among Heavy Drinkers. **Oral Oncology.**, v. 37, p. 153-158, 2001.

HOOVER, C. I.; NEWBRUN, E. Survival of Bacteria from Human Dental Plaque Under Various Transport Conditions. **Journal of Clinical Microbiology.**, v. 6, n. 3, p. 212-218, 1977.

van HOUTE, J. Role of Micro-organisms in Caries Etiology. **Journal Dental Research.**, v. 73, n. 3, p. 672-681, 1994.

JARVIS, J. D.; WINNE, C. D.; TELFER, E. R. Storage of Bacteria in Liquid Nitrogen. **Journal of Medical Laboratory Technology.**, v. 24, p. 312-314, 1967.

JOHANSSON, I. *et al.* Adhesion of *Candida albicans*, but not *Candida krusei*, to Salivary Statherin and Mimicking Host Molecules. **Oral Microbiology and Immunology.**, v. 15, p. 112-118, 2000.

JOKELAINEN, K. *et al.* Increased Acetaldehyde Production by Mouthwashings from Patients with Oral Cavity, Laryngeal, or Pharyngeal Cancer. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research.**, v. 20, n. 7, p. 1206-1210, 1996.

- KARLSSON, J. O. M.; TONER, M. Long-term Storage of Tissues by Cryopreservation: Critical Issues. **Biomaterials.**, v. 17, p. 243-256, 1996.
- KEYNAN, A. *et al.* Activation of Bacterial Endospores. **Journal of Bacteriology.**, v. 88, n. 2 p. 313-318, 1964.
- KNAYSI, G.; CURRAN, H. R. Effects of Some Mechanical Factors on the Endospores of *Bacillus subtilis*. **Journal of Bacteriology.**, v. 82, p. 691-694, 1961.
- KURKIVUORI, J. *et al.* Acetaldehyde Production from Ethanol by Oral Streptococci. **Oral Oncology.**, v. 43, p. 181-186, 2007.
- LEVINSON, H. S.; HYATT, M. T. Distribution and Correlation of Events During Thermal Inactivation of *Bacillus megaterium* Spores. **Journal of Bacteriology.**, v. 108, p. 111-121, 1971.
- LI, H. *et al.* Salivary Nitrate – An Ecological Factor in Reducing Oral Acidity. **Oral Microbiology and Immunology.**, v. 22, p. 67-71, 2007.
- LOKEN, S. D.; DEMETRICK, D J. A Novel Method for Freezing and Storing Research Tissue Bank Specimens. **Human Pathology.**, v. 36, p. 977-980, 2005.
- MAGER, D. L. *et al.* Distribution of Selected Bacterial Species on Intraoral Surfaces. **Journal of Clinical Periodontology.**, v. 30, p. 644-654, 2003.
- MAGER, D L. The Salivary Microbiota as a Diagnostic Indicator of Oral Cancer: A Descriptive, Non-randomized Study of Cancer-free and Oral Squamous Cell Carcinoma Subjets. **Journal of Translation Medicine.**, p. 3-27, 2005.
- MARSH, P. D. Host Defenses and Microbial Homeostasis: Role of Microbial Interactions. **Journal Dental Research.**, v. 68, p. 1567-1575, 1989.
- MARSH, P. D. Microbial Ecology of Dental Plaque and its Significante in Health and Disease. **Advances in Dental Research.**, v. 8, n. 2, p. 263-271, 1994.
- MARSH, P. D.; BRADSHAW, D. J. Dental Plaque as a biofilm. **Journal of Industrial Microbiology.**, v. 15, p. 169-175, 1995.
- MARSH, P. D.; MARTIN, M. V. **Microbiologia Oral**. 4. ed. São Paulo: Santos, 2005. 38-42 p.
- MARTINS, C. A. P.; KOGA-ITO, C. Y.; JORGE, A. O. C. Presence of *Staphylococcus* spp. and *Candida* spp. in the Human Oral Cavity. **Brazilian Journal of Microbiology.**, v. 33, p. 236-240, 2002.
- MAZUR, P. The Role of Cell Membranes in the Freezing of Yeast and other Single Cells. **Annals of the New York Academy of Sciences.**, v. 125, p. 658-676, 1965.
- MAZUR, P. Cryobiology: the Freezing of Biological Systems. **Science.**, v.168, p. 939-949, 1970.

- MAZUR, P. Freezing of Living Cells: Mechanisms and Implications. **The American Journal of Physiology.**, v. 247, p. c125-c142, 1984.
- MIYAMOTO-SHINOHARA, Y. *et al.* Survival Rate of Microbes after Freeze-Drying and Long-Term Storage. **Cryobiology.**, v. 41, p. 251-255, 2000.
- MOORE, W. E. C.; MOORE, L. V. H. The Bacteria of Periodontal Diseases. **Periodontology 2000.**, v. 5, p. 66-77, 1994.
- MORRIS, C. B. Cryopreservation of Animal and Human Cell Lines. In: **Methods in Molecular Biology.** Totowa, NJ: Humana Press Inc., 1995. Cap. 18, p. 179-187.
- MORRIS, G. J. The Origin, Ultrastructure, and Microbiology of the Sediment Accumulating in Liquid Nitrogen Storage Vessels. **Cryobiology.**, v. 50, p. 231-238, 2005.
- MORRIS, G. J. *et al.* The High Viscosity Encountered During Freezing in Glycerol Solutions: Effects on Cryopreservation. **Cryobiology.**, v. 52, p. 323-334, 2006.
- MUTO, M. *et al.* Acetaldehyde Production by Non-pathogenic *Neisseria* in Human Oral Microflora: Implications for Carcinogenesis in Upper Aerodigestive Tract. **International Journal of Cancer.**, v. 88, p. 342-350, 2000.
- NASH, T. Chemical Constitution and Physical Properties of Compounds able to Protect Living Cells against Damage due to Freezing and Thawing. In: Meryman H. T. **Cryobiology.** New York: Academic press, 1966. p. 179-211.
- NG, D. P. K. *et al.* Effect of Storage Conditions on the Extration of PCR-quality Genomic DNA from Saliva. **Clinica Chimica Acta.**, v. 343, p. 191-194, 2004.
- NICOLAISEN, H.; HVIDT, A. Phase Behavior of the System Trehalose-NaCl-Water. **Cryobiology.**, v. 31, p. 199-205, 1994.
- NURKA, A. *et al.* Effects of Sample Collection and Storage Methods on Antipneumococcal Immunoglobulin A in Saliva. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology.**, v. 10, n. 3, p. 357-361, 2003.
- PASTER, B. J. *et al.* The Breadth of Bacterial Diversity in the Human Periodontal Pocket and Other Oral Sites. **Periodontology 2000.**, v. 42, p. 80-87, 2006.
- PEGG, D. E. Long-term Preservation of Cells and Tissues: A Review. **Journal of Clinical Pathology.**, v. 29, p. 271-285, 1976.
- PANOFF, J-M. *et al.* Cold Stress Responses in Mesophilic Bacteria. **Cryobiology.**, v. 36, p. 75-83, 1998.
- PEDERSEN, A. M. *et al.* Saliva and Gastrointestinal Functions of Taste, Mastication, Swallowing and Digestion. **Oral Diseases.**, v. 8, n. 3, p. 117-129, 2002.
- PICINNIN, F. B. **O Efeito do Controle da Placa Supragengival sobre Parâmetros Clínicos Periodontais em Pacientes Fumantes e nunca Fumantes.** 2005. 65 f.

Dissertação (Mestrado em Clínica Odontológica Ênfase em Periodontia) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

RUSSEL, J. B. **Química Geral**. 2. ed. São Paulo: Makron Books Ltda, 1994. p. 453-500.

SANDERS, J. W.; VENEMA, G.; KOK, J. Environmental Stress Responses in *Lactococcus lactis*. **FEMS Microbiology Reviews**., v. 23, p. 483-501, 1999.

SANDSKÄR, B.; MAGALHÃES, B. Cryopreservation of *Zoophthora radicans* (Zygomycetes, Entomophthorales) in Liquid Nitrogen. **Cryobiology**., v. 31, p. 206-213, 1994.

SCHENKELS, L. C.; VEERMAN, E. C.; NIEUW AMERONGEN, A. V. Biochemical Composition of Human Saliva in Relation to Other Mucosal Fluids. **Critical Reviews in Oral Biology and Medicine: An Official Publication of the American Association of Oral Biologists**., v. 6, p. 161-175, 1995.

SCHLAGENHAUF, U.; POMMERENCKE, K.; WEIGER, R. Influence of Toothbrushing, Eating and Smoking on Dentocult SM Strip Mutans Test Scores. **Oral Microbiology and Immunology**., v. 10, p. 98-101, 1995.

SIMIONE, F. P. **Cryopreservation Manual**. Nalge Nunc International Corp., 1998.

TANNER, A., *et al.* Microbiota of Health, Gingivitis and Initial Periodontitis. **Journal of Clinical Periodontology**., v. 25, p. 85-95, 1998.

THYLSTRUP, A.; FEJERSKOV, O. **Cariologia Clínica**. 2. ed. São Paulo: Santos, 1998. Cap. 2, p. 24.

TILLONEN, J. *et al.* Role of Yeasts in the Salivary Acetaldehyde Production from Ethanol Among Risk Groups for Ethanol – Associated Oral Cavity Cancer. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**., v. 23, n. 8, p. 1409-1415, 1999.

VÄKEVÄINEN, S. *et al.* Acetaldehyde Production and Other ADH-Related Characteristics of Aerobic Bacteria Isolated from Hypochlorhydric Human Stomach. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**., v. 25, n. 3, p. 421-423, 2001.

WELLS, J. E.; RUSSELL, J. B. Wy Do Many Ruminant Bacteria Die an Lyse So Quickly?. **Journal of Dairy Science**., v. 79, p. 1487-1495, 1996.

WHILLIAMS, N. B. Microbial Ecology of the Oral Cavity. **Journal Dental Research Supplement**., v. 42, n. 1, p. 509-520, 1963.

WHITTAKER, C. J.; KLIER C. M.; KOLENBRANDER P. E. Mechanisms of Adhesion by Oral Bacteria. **Annual Review of Microbiology**., v. 50, p. 513-552, 1996.

WOLFE, J.; BRYANT, G. Freezing, Drying, and/or Vitrification of Membrane- Solute-Water Systems. **Cryobiology**., v. 39, p. 103-129, 1999.

WOOD, T. H.; ROSENBERG A. M. Freezing in Yeast Cells. **Biochimica et Biophysica Acta.**, v. 25, p. 78-87, 1957.

ZHAO, G.; ZHANG, G. Effect of Protective Agents, Freezing Temperature, Rehydration Media on Viability of Malolactic Bacteria Subjected to Freeze-Drying. **Journal of Applied Microbiology.**, v. 99, p. 333-338, 2005.

4. ARTIGO CIENTÍFICO

AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE E DA VARIABILIDADE DA MICROBIOTA SALIVAR ARMAZENADA EM DIFERENTES TEMPERATURAS

Rojas¹ EU, Nascimento¹ GG, Cassiano¹ LS, Oliveira¹ MG, Van der Sand² ST, Chaves¹ ACM.

¹*Disciplina de Patologia Bucal, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.*

²*Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.*

Palavras-Chave: armazenamento de saliva, saliva, microbiota, nitrogênio líquido e congelamento.

Correspondência

Prof^a Anna Cecília Moraes Chaves

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Odontologia

Rua Ramiro Barcelos, 2492, Bom Fim

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil

CEP: 90035-003

Tel. +55 14 51 33085011

Fax. +55 14 51 33085320

e-mail: anna.chaves@ufrgs.br

INTRODUÇÃO

A boca e a saliva apresentam condições de estudo das interações entre as diferentes superfícies dentária e epitelial (membrana mucosa e língua) e a população microbiana (18). A saliva contém microrganismos oriundos da superfície dos dentes, da mucosa bucal, do sulco gengival e do dorso da língua, sendo esta a maior fonte de colonização primária dos microrganismos presentes (17, 41).

Alterações no ambiente bucal, como o acúmulo do biofilme bacteriano sobre a superfície dentária, predis põem ao desequilíbrio da homeostasia microbiana e a instalação de cárie dental e de doenças periodontais (43). A microbiota, ou sua alteração, é também investigada nos pacientes expostos a fatores de risco para câncer de boca, cigarro e álcool, os quais modificam o habitat local, em relação à microbiota de pacientes não expostos a esses fatores (9, 27, 28, 29, 34, 37, 51).

A variabilidade da microbiota bucal pode ser avaliada de diferentes formas, sendo uma delas a utilização de amostras de saliva. Após a coleta, a saliva deve ser armazenada se a sua análise for realizada num período posterior a 90 minutos, isto porque seus constituintes, assim como a microbiota presente na mesma, sofrem degradação (8). Segundo Chiappin *et al.* (2007), os espécimes salivares podem ser mantidos a 4°C quando forem analisados num período de 3 a 6 horas e a -20°C, -80°C e -196°C quando processados em dias ou meses após a sua coleta. O armazenamento por meio de criopreservação, pode ser conseguido e mantido em nitrogênio líquido (-196°C) e em freezer de ultra-baixa temperatura (-150°C) (49).

No processo de criopreservação o desafio é determinar como as células podem sobreviver a baixas temperaturas e retornar subsequente mente às condições fisiológicas. Vários fatores afetam a sobrevivência celular na criopreservação, entre eles, taxa de congelamento, taxa de descongelamento e regeneração celular (1, 15, 47, 48, 58, 60). Diferentes tipos de células necessitam taxas de congelamento (47, 57, 60) e de descongelamento (60) específicas. A interação entre essas taxas deve ser considerada quando se objetiva utilizar um método de armazenamento que preserve a viabilidade celular.

Durante a criopreservação, desde o momento em que se inicia a formação do primeiro cristal de gelo até a regeneração da célula, os fenômenos físico-químicos devem ser anulados ou reduzidos (48). Para isso, várias substâncias têm sido testadas como agentes crioprotetores, no entanto, o glicerol (propano-1,2,3-triol) é

um dos crioprotetores mais utilizados e efetivo, pois possui baixo peso molecular, é solúvel em água, pouco tóxico e viscoso (47, 52, 60).

A recuperação das células às condições de atividade metabólica também interferem na sua viabilidade, sendo que meios de cultura apropriados devem ser utilizados no processo de regeneração celular, permitindo a retomada dos processos metabólicos, interrompidos pelo congelamento, com o mínimo de distúrbio osmótico e físico (65).

Existem várias técnicas para preservação das células e cada tipo celular requer diferente método de armazenamento. A maioria dos trabalhos que avalia os efeitos do armazenamento de bactérias em baixas temperaturas, utiliza amostras de bactérias isoladas. Há poucos trabalhos que armazenaram saliva para análise da viabilidade microbiana, e os que utilizaram o nitrogênio líquido, mantiveram as amostras congeladas por um período de até 2 meses (4, 5).

O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito do armazenamento de saliva, a -20°C e a -196°C com e sem crioprotetor, sobre a viabilidade e a variabilidade microbiana presente na mesma.

METODOLOGIA

A amostra constituiu-se de indivíduos do sexo masculino acima de 40 anos de idade não-fumantes (nunca fumaram) e não-alcoolistas (faziam uso de no máximo 20g de álcool por semana). Deste experimento foram excluídos os pacientes com história de uso rotineiro de antisséptico bucal, antibioticoterapia ou uso de corticóides nos últimos 03 meses, portadores de doenças auto-imunes, assim como pacientes que comeram ou realizaram higiene bucal 03 horas antecedentes à coleta de saliva.

Coleta da saliva

Os 04 indivíduos foram instruídos para abster-se de comer, fumar, ingerir líquidos, ou realizar higiene bucal 3 horas antes da coleta da saliva. A coleta foi realizado entre 9:00h e 11:00h da manhã conforme Schlagenhaut, Pommerencke e Weiger (1995). Cada paciente recebeu uma goma de mascar sem açúcar, para estimular a produção de saliva, que foi mastigada por um período de 6 min. Durante

o primeiro minuto de estímulo, os pacientes foram instruídos a deglutir a saliva e nos próximos 5 min. a mesma foi expelida em frascos plásticos estéreis previamente refrigerados. Após a coleta as amostras de saliva foram homogeneizadas em um misturador tipo vórtex (Phoenix AP56, Brasil) durante 15 segundos e alíquotas de 300 µL cada, foram distribuídas em tubos tipo Eppendorff e em criotubos de 2 mL contendo uma concentração final de 10% de glicerol estéril (G) e em criotubos sem crioprotetor.

Armazenamento das amostras

Os criotubos com as amostras contendo ou não o crioprotetor armazenadas em nitrogênio líquido foram mantidas inicialmente a -20°C por um período de 8 horas e após armazenadas em nitrogênio líquido (N₂L). Os tubos tipo Eppendorff com as amostras contendo o crioprotetor armazenadas a -20°C foram colocadas a essa temperatura imediatamente após a preparação das mesmas.

Contagem e isolamento da população microbiana: avaliação da viabilidade e da variabilidade dos microrganismos

Diluições seriadas (10^{-1} - 10^{-5}) de 500µL da saliva foram preparadas em água peptonada 0,1% (Peptone Bacteriological® Himedia, Mumbai, Índia). As amostras foram semeadas em duplicata, pela técnica de espalhamento em superfície com o auxílio de uma alça de Drigalsky, em placas de Petri, contendo os seguintes meios de cultura: ágar padrão para contagem – PCA (Plate Count Agar® HiMedia, Mumbai, Índia); ágar tripticaseína de soja - TSA (Tryptone Soya Agar® HiMedia, Mumbai, Índia) e ágar sangue - AS (Columbia Blood Agar Base® HiMedia, Mumbai, Índia). As placas com os meios PCA e TSA foram incubadas a 37°C sob condições de aerobiose por 24-48h. As placas de AS foram incubadas a 37°C por 24-48h em condições de baixa concentração de oxigênio, em microaerofilia, e 5% de CO₂, utilizando-se Anaerobac® (Probac, São Paulo, SP, Brasil) em jarra de anaerobiose. Após o período de incubação realizou-se a contagem das unidades formadoras de colônia (UFC) dos microrganismos que cresceram no meio PCA com auxílio de uma lupa estereoscópica (Contador de Colônias Mecânico CP 602, Phoenix® Araraquara, SP, BR).

Isolamento bacteriano

Para avaliação da variabilidade da população microbiana foi realizada a identificação de uma média de 30 colônias por amostra de saliva, isoladas nos meios de cultura PCA, TSA e AS. A seleção das colônias foi realizada de forma randomizada, utilizando-se um mapa disposto sobre a placa de Petri, contendo 4 quadrados de 1cm². Colônias que apresentaram morfologia diferente selecionadas foram inoculadas por esgotamento em placas de TSA e incubadas a 37°C por 24h. Após o crescimento, as colônias isoladas foram repicadas em caldo tripticaseína de soja - TSB (Tryptone Soya Broth® HiMedia, Mumbai, Índia) e novamente incubadas a 37°C por 24h.

Armazenamento e identificação dos isolados

Uma vez crescidos os isolados em caldo TSB, foi realizada a coloração de Gram para confirmação da pureza das colônias. As amostras puras foram armazenadas em 15% de glicerol (V/V) estéril e estocadas à -20°C. Posteriormente iniciou-se uma seqüência de provas bioquímicas clássicas conforme descrição em literatura apropriada para a identificação microbiana (26).

Descongelamento das amostras

As amostras armazenadas em N₂L com e sem crioprotetor e em freezer à -20°C foram descongeladas após 03 e 10 meses. O descongelamento dos criotubos e dos tubos de Eppendorff ocorreu à temperatura ambiente, por no máximo 10 minutos e em seguida, as amostras foram avaliadas.

Avaliação da viabilidade e da variabilidade dos microrganismos após o congelamento

As amostras de saliva descongeladas foram homogeneizadas num misturador tipo vórtex, durante 15 segundos. Uma alíquota de 100 µL foi diluída em 900 µL de água peptonada 0,1% em diluições seriadas. Seguiram-se os mesmos procedimentos de semeadura, isolamento e identificação realizados no processamento das amostras antes do congelamento.

Avaliação da viabilidade microbiana utilizando-se meio de cultura seletivo

Para a avaliação da viabilidade de alguns microrganismos específicos, como *Streptococcus mitis* e *S. salivarius*, foi utilizado o meio de cultura seletivo Mitis Salivarius Agar® (MAS) suplementado com Bacitracina (0,2 UI/mL). Placas contendo o meio MAS foram semeadas com 40 µL das diluições de saliva de 10^{-2} e 10^{-3} e incubadas à temperatura de 37°C sob condições de baixa concentração de oxigênio por 24-48 horas. Após o período de incubação realizou-se a contagem de UFC das placas. Para a identificação microbiana selecionou-se uma média de 04 colônias de microrganismo por amostra, totalizando 48 colônias. O isolamento das colônias e sua identificação foram realizados conforme o descrito anteriormente.

A viabilidade desses microrganismos foi avaliada de duas formas: comparando-se a média da contagem de UFC em 23 placas após 3 e 10 meses de armazenamento em N₂L, N₂L (G) e à -20°C; e através da identificação do *Streptococcus mitis* e do *Streptococcus salivarius*, considerando sua presença ou ausência após 3 meses à -20°C e após 3 e 10 meses de armazenamento em N₂L e N₂L (G).

ANÁLISE ESTATÍSTICA

A variabilidade dos microrganismos das amostras de saliva foi estabelecida através de medidas de frequência dos microrganismos identificados nos diferentes métodos (N₂L (G), N₂L e -20°C) e tempo (imediatamente após a coleta, 3 e 10 meses) de armazenamento.

Para análise estatística da viabilidade dos microrganismos, foi considerado a média da contagem de UFC dos microrganismos em PCA da mesma amostra. O teste não-paramétrico de Wilcoxon foi utilizado para avaliação dos dados após a coleta e após 3 meses de armazenamento à -20°C. O teste não-paramétrico de Friedman foi utilizado para a avaliação dos dados após a coleta, 3 e 10 meses de armazenamento em N₂L e N₂L (G). Comparou-se a viabilidade dos microrganismos entre os diferentes métodos de armazenamento, N₂L, N₂L (G) e à -20°C, utilizando o teste de Friedman para amostras relacionadas.

Para análise estatística da viabilidade dos microrganismos, utilizando meio de cultivo seletivo, foi considerado a média da contagem de UFC das placas de MAS da mesma amostra, após 3 e 10 meses de armazenamento à -20°C, N₂L e N₂L (G), utilizando-se o teste não-paramétrico de Wilcoxon.

Na análise dos dados utilizou-se o software estatístico SPSS versão 13.0 e o programa Bioestat 4.0. O nível de significância estabelecido foi de 5%.

Em decorrência do número das amostras de saliva (n=4), o poder dos testes não-paramétricos foi menor que 80% quando a hipótese nula foi aceita, ou seja, quando não houve diferença estatisticamente significativa.

RESULTADOS

Para avaliação do efeito do armazenamento da saliva sobre a microbiota, foram selecionados quatro indivíduos não fumantes e não alcoolistas. A saliva coletada foi armazenada em nitrogênio líquido, com e sem glicerol, e a -20°C com glicerol. A população microbiana foi avaliada imediatamente após a coleta, e após 3 e 10 meses de armazenamento.

A tabela 1 descreve os dados referentes aos quatro indivíduos dos quais as amostras de saliva foram coletadas e estudadas. As seguintes variáveis foram consideradas: idade e pH salivar.

Tabela 1. Descrição das variáveis dos indivíduos dos quais foi coletada a saliva.

Variáveis	Média ± DP [▲]
Idade	48,75 ± 7,63
pH	7,75 ± 0,50

[▲]Desvio-padrão;

Fonte: Laboratório de Patologia Bucal FO-UFRGS.

O efeito do armazenamento da saliva foi avaliado por meio da determinação da viabilidade e da variabilidade da microbiota bucal.

VIABILIDADE DA MICROBIOTA BUCAL

A viabilidade da célula microbiana estabilizada através da criopreservação é definida como a capacidade da bactéria de crescer e se multiplicar após o descongelamento, em um meio de cultura apropriado. A comparação da contagem antes e após o congelamento indica o grau de recuperação ou sucesso do procedimento de preservação.

Para a avaliação da viabilidade da população microbiana presente nas amostras de saliva foi considerado a média do número de UFC no meio de cultura PCA. As amostras avaliadas foram a saliva processada imediatamente após a coleta, e 3 e 10 meses após armazenamento em N₂L(G) e em N₂L sem glicerol e aos 3 meses de armazenamento a -20°C (tabela 2).

Nas amostras congeladas foi aplicado o teste de Friedman e uma diferença estatisticamente significativa, na média do número de UFC, (***p=0.0183***) foi observado entre o tempo inicial e após 10 meses de armazenamento no N₂L (G), com valores de 2,1 X 10⁷ UFC/mL e 4,5 X 10⁶ UFC/mL respectivamente (tabela 2). Não houve diferença estatisticamente significativa, entre a média do número de UFC nas amostras, após a coleta e 3 meses e entre 3 e 10 meses de armazenamento. Nestes períodos foi observado uma redução de um fator na escala logarítmica entre os diferentes tempos de armazenamento.

O teste de Friedman quando aplicado nas amostras congeladas na condição de ausência de crioprotetor demonstrou uma diferença estatisticamente significativa (***p=0.0183***) entre a média do número de UFC das amostras analisadas após a coleta e 10 meses de armazenamento das amostras. Os valores da média de UFC foram de 2,1 X 10⁷ e 3,1 x 10⁵ UFC/mL respectivamente. Da mesma forma, não houve diferença estatisticamente significativa entre a média de UFC nas avaliações iniciais e 3 meses e entre 3 e 10 meses de armazenamento (tabela 2). O dado referente à amostra do paciente 3 não foi obtido em 10 meses pela quantidade de saliva insuficiente que foi produzida pelo mesmo.

A viabilidade da população microbiana presente nas amostras de saliva armazenada a -20°C foi avaliada imediatamente após a coleta e aos 3 meses de armazenamento. A análise do armazenamento por 10 meses, não foi realizada por motivos técnicos durante o processamento das amostras.

Na tabela 2 observa-se a média do número de UFC no meio de cultura PCA, das amostras de saliva armazenadas a -20°C. O teste de Wilcoxon foi aplicado e não mostrou diferença estatisticamente significativa (***p=0.0679***) entre a média do número de UFC das amostras de saliva avaliadas apesar da redução nas médias de UFC de 2,1 X 10⁷ e 2,2 x 10⁶ UFC/mL, respectivamente.

Para comparar a viabilidade da microbiota bucal entre os diferentes métodos de criopreservação, N₂L (G), N₂L e -20°C realizou-se a comparação da média do número de UFC no meio de cultura PCA, aos 3 meses de armazenamento. Não

houve uma alteração nos valores de UFC nos diferentes métodos de preservação, $4,5 \times 10^6$ UFC/mL (N₂L(G)), $1,6 \times 10^6$ UFC/mL (N₂L) e $2,2 \times 10^6$ UFC/mL (-20°C), ou seja, não houve diferença na viabilidade da microbiota bucal entre os diferentes métodos de criopreservação aos 3 meses de armazenamento.

Tabela 2. Média do número de UFC/mL, no meio de cultura PCA, das amostras de saliva avaliadas imediatamente após a coleta, aos 3 e 10 meses de armazenamento em Nitrogênio Líquido com e sem glicerol e a -20°C com glicerol.

PCA	Inicial [#]	N ₂ L (G) [#]	N ₂ L [#]	-20°C [#]
0	$2,1 \times 10^7 \pm 2,1 \times 10^7$			
3 meses [*]		$4,5 \times 10^6 \pm 4,6 \times 10^6$	$1,6 \times 10^6 \pm 1,6 \times 10^6$	$2,2 \times 10^6 \pm 2,3 \times 10^6$
10 meses ^ª		$4,5 \times 10^5 \pm 3,9 \times 10^5$	$3,1 \times 10^5 \pm 3,5 \times 10^5$	_____

[#]Média±desvio-padrão; ^{*}Teste de Wilcoxon (**$p=0.0679$**); ^ªTeste de Friedman (**$p=0.0183$**).

A avaliação da viabilidade contemplou também a análise de microrganismos específicos, entre eles, as bactérias *Streptococcus mitis* e *S. salivarius*, com a utilização do meio de cultura seletivo (MAS). A viabilidade foi avaliada por meio da média do número de UFC de cada amostra, e da identificação desses microrganismos, nas amostras de saliva armazenadas em N₂L (G), N₂L e a -20°C, aos 3 e 10 meses após a coleta. Não foi realizada avaliação inicial da saliva com o meio de cultura MAS pois o mesmo não estava disponível neste período.

O teste de Wilcoxon foi aplicado na média do número de UFC no meio MAS, das amostras armazenadas em N₂L com e sem glicerol. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os armazenamentos de 3 e 10 meses no N₂L(G) ($p=0.0679$), apesar da redução do número de UFC após 10 meses (tabela 3). Nas amostras armazenadas em N₂L sem glicerol também não foi observado uma diferença estatisticamente significativa ($p=0.109$) (tabela 3). Da mesma forma foi observado diferença nos valores da média de UFC entre os armazenamentos de 3 e 10 meses, $1,7 \times 10^6$ UFC/mL e $1,5 \times 10^5$ UFC/mL, respectivamente.

Na avaliação da viabilidade dos microrganismos específicos nas amostras armazenadas a -20°C, não houve diferença estatisticamente significativa utilizando o teste de Wilcoxon (tabela 3) (**$p=0,0679$**), na média do número de UFC no meio MAS,

entre as amostras armazenadas por 3 e 10 meses, médias de UFC $1,9 \times 10^6$ e $1,7 \times 10^5$, respectivamente.

Tabela 3. Média do número de UFC/mL, no meio de cultura MAS, das amostras de saliva armazenadas 3 e 10 meses de armazenamento em Nitrogênio Líquido com e sem glicerol e a -20°C com glicerol.

MAS	N ₂ L (G) [#]	N ₂ L [#]	-20°C [#]
3 meses*	$5,6 \times 10^6 \pm 3,6 \times 10^6$	$1,7 \times 10^6 \pm 1,1 \times 10^6$	$1,9 \times 10^6 \pm 1,4 \times 10^6$
10 meses*	$5,1 \times 10^5 \pm 3,1 \times 10^5$	$1,5 \times 10^5 \pm 1,8 \times 10^5$	$1,7 \times 10^5 \pm 1,9 \times 10^5$

[#]Média \pm desvio-padrão; *Teste de Wilcoxon ($p=0.0679$).

Além da média do número de UFC, a manutenção dos microrganismos, presentes no meio de cultura MAS, após 3 e 10 meses de armazenamento em N₂L (G), N₂L e a -20°C foi avaliada. O *Streptococcus mitis* foi observado em todas as amostras avaliadas. *S. salivarius* foi observado nas amostras avaliadas, após 3 meses de armazenamento em N₂L (G), N₂L e a -20°C , e após os 10 meses de armazenamento em N₂L (G) e a -20°C . No entanto nas amostras, armazenadas por 10 meses em N₂L, a espécie foi observada em 3 das 4 amostras avaliadas, redução essa que não pode ser considerada uma vez que não foram identificadas todas as colônias presentes nas placas e sim foi realizada uma escolha aleatória das mesmas.

VARIABILIDADE DA MICROBIOTA BUCAL

O gênero e as espécies de microrganismos e a frequência dos mesmos caracterizou a variabilidade da microbiota bucal das amostras de saliva. Esta variabilidade foi avaliada imediatamente após a coleta, 3 meses de armazenamento em N₂L (G), N₂L e -20°C , e 10 meses de armazenamento em N₂L (G) e N₂L, representados na tabela 4.

A microbiota bucal presente na saliva, avaliada imediatamente após a coleta, observa-se a presença de bactérias Gram positivas na forma de bastonetes (3,3%), *Streptococcus* sp. (73,1%), *Staphylococcus* sp. (18,2%), *Enterococcus* sp. (2,5%), *Stomatococcus mucilaginosus* (1,7%) e *Micrococcus* sp. (0,8%). Os microrganismos

predominantes foram os *Streptococcus* sp., entre eles, *S.* grupo *milleri* (15%), *S. mutans* (14,2%) e *S. mitis* (12,5%) (figura 1).

Na análise da variabilidade da microbiota bucal, da saliva armazenada em N₂L (G) e N₂L por 3 meses, observou-se um aumento no percentual de bastonetes Gram positivos (39% e 30%), a manutenção do grupo de *Staphylococcus* sp. (26,9% e 31,8%) e uma redução no percentual de *Streptococcus* sp. (24,8% e 29,8%), em comparação com a avaliação inicial (Bastonetes (3,3%), *Staphylococcus* sp. (18,2%) e *Streptococcus* sp. (73,1%)).

Nas amostras de saliva armazenadas a -20°C e avaliadas após 3 meses observa-se um comportamento similar ao armazenado em nitrogênio líquido: bastonetes Gram positivos (29%), *Staphylococcus* sp. (34,6%) e *Streptococcus* sp. (28,9%).

A variabilidade da microbiota bucal das amostras de saliva armazenadas em N₂L (G) e N₂L, por 10 meses, foram isoladas em ágar Sangue e ágar Mitis Salivarius. Desta forma avaliou-se especificamente a variabilidade do gênero *Streptococcus*. Nesta análise foi possível observar, que de forma geral, houve a manutenção das espécies observadas nas amostras de saliva armazenada por 3 meses e a processada imediatamente após a coleta (figura 1).

Tabela 4. Percentual de microrganismos presentes na saliva processada imediatamente após a coleta, 3 e 10 meses de armazenamento em nitrogênio líquido com e sem glicerol e após 3 meses de armazenamento em -20°C.

Tempo	0*	3 meses [#]			10 meses ^ª	
		Inicial (n=120)	N ₂ L (G) (n=118)	N ₂ L (n=118)	20°C (n=120)	N ₂ L (G) (n=72)
Bastonetes G+	3,3	39	30	29	15,25	19,25
<i>Enterococcus</i> sp.	2,6	7,61	6,74	5,06	1,59	4
<i>Micrococcus</i> sp.	0,95	0	0	0,83	8,27	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	8,27	6,67	11,75	9,27	0	1,92
<i>S. epidermidis</i>	3,3	3,4	2,5	3,32	0	0
<i>S. haemolyticus/schleiferi</i>	5,8	15,9	16,75	21,07	12	3,25
<i>S. saprophyticus</i>	0,82	0,89	0,82	0,9	1,57	0
<i>Stomatococcus mucilaginosus</i>	1,85	1,78	1,66	1,67	4,32	2,43
<i>Streptococcus</i> sp.	73,11	24,75	29,78	28,88	57	69,15
TOTAL	100%	100%	100%	100%	100%	100%

*Microrganismos isolados dos meios de cultura PCA, TSA e AS; [#] PCA, TSA, AS e MAS; ^ª AS e MAS; n= número de microrganismos identificados.

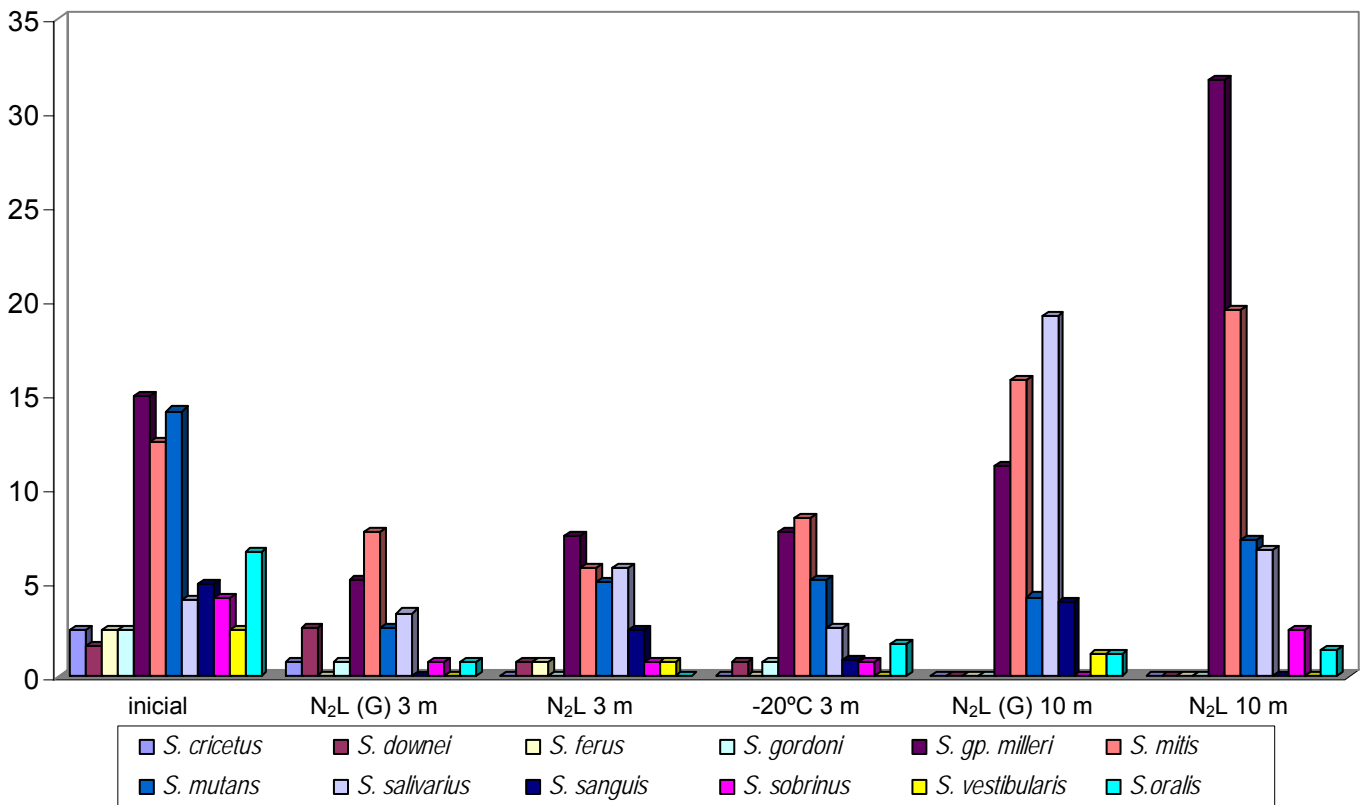


Figura 1. Percentual de *Streptococcus* sp. da saliva processada imediatamente após a coleta, após 3 e 10 meses de armazenamento em nitrogênio líquido com e sem glicerol e após 10 meses de armazenamento em -20°C.

DISCUSSÃO

A utilização da saliva para análise de seus constituintes tem sido empregada por vários autores, principalmente por ser um método não invasivo e de fácil coleta (6, 22, 25, 27, 28, 29, 34, 53, 54), no entanto poucos são os estudos que avaliaram a microbiota salivar após o armazenamento da saliva (4, 5, 33, 61).

Para avaliação da microbiota salivar a técnica de coleta da saliva é um fator importante a ser considerado. No presente trabalho foi utilizado coleta de saliva estimulada, que segundo Dawes, Tsang e Suelzle (2001), permite que as bactérias fracamente aderidas às superfícies dentárias e mucosas, sejam deslocadas pela ação mecânica da mastigação da goma. Apesar deste método de coleta ter sido utilizado em vários estudos (2, 4, 5, 13, 27, 28, 29, 33, 59, 61), existe variações quanto ao tempo e o padrão de coleta. Alguns autores utilizaram o método de coleta

total de saliva durante 5 minutos, sem desprezar o primeiro minuto e obtiveram um número de UFC de $3,6 \times 10^6$ /minuto. No entanto, quando a coleta foi realizada durante 1 minuto, o número de UFC aumentou para $2,8 \times 10^7$ /minuto (13). Portanto, neste trabalho o volume de saliva coletado no primeiro minuto foi desprezado, evitando assim uma contagem elevada de bactérias acumuladas na boca, permitindo ao mesmo tempo uma concentração inicial de bactérias alta ($2,1 \times 10^7$ UFC/mL). É necessário que a concentração de bactérias presentes na saliva coletada seja adequada. Segundo Mazur (1968), a viabilidade de leveduras é maior quando há uma concentração celular inicial alta.

A necessidade de manutenção da saliva, para avaliação de seus constituintes e da microbiota presente na mesma requer um método eficaz e seguro de armazenamento, para preservação das amostras (8). No presente trabalho, diferentes temperaturas de armazenamento foram adotadas, -20°C e -196°C com presença e ou ausência de crioprotetor.

O processo de congelamento e armazenamento da saliva em baixas temperaturas, para avaliação da microbiota bucal, especialmente bactérias, ainda não está bem esclarecido na literatura. Diversos trabalhos já demonstraram que diferentes técnicas de congelamento e temperaturas de armazenamento das amostras de bactérias isoladas, podem afetar a sua viabilidade (15, 16, 20).

Alguns autores têm utilizado para o armazenamento de amostras de saliva e de biofilme bacteriano, o congelamento a -20°C (6, 11, 30). Darout *et al.* (2002) observaram após 1 mês de armazenamento da saliva nesta temperatura, um número de células maior ou igual a 10^5 , UFC/mL sem identificação das amostras imediatamente após a coleta. Em nosso estudo, a média de UFC foi de 10^6 UFC/mL, das amostras de saliva armazenadas com glicerol por 3 meses a -20°C . A mesma temperatura de armazenamento foi utilizada por Callas, Haugh e Flynn (1989), para preservação da saliva e posterior avaliação de tiocianato, sem que houvesse alteração do mesmo, após um ano de preservação da saliva.

A preservação em N_2L é bastante utilizada, principalmente para criopreservação de sêmen humano (14), células isoladas e fragmentos de tecidos (3, 40). O armazenamento de saliva e avaliação de seus componentes, diferentes autores comprovaram sua eficácia quando avaliaram leveduras (4, 33, 61), bactérias (5), imunoglobulina A (54), tiocianato (6), nitrato e nitrito (39) e acetaldeído (27, 28, 29, 34).

Segundo Gilmour *et al.* (1978) e Zhao e Zhang (2005) a taxa de congelamento utilizada para o armazenamento de microrganismos, em baixas temperaturas, afeta a sua viabilidade. No presente trabalho, o armazenamento das amostras de saliva em N₂L foi realizado sem o controle da taxa de congelamento, devido à indisponibilidade de equipamento adequado. No entanto, para minimizar os possíveis efeitos deletérios da taxa de congelamento às células, o mesmo foi realizado conforme metodologia descrita por Harlow e Lane (1988) com modificações, onde, após a coleta, as amostras de saliva, com e sem a presença do crioprotetor foram mantidas a -20°C, durante 8 horas e posteriormente transferidas para o botijão de N₂L.

Estudos realizados por Wood e Rosenberg (1957), demonstraram que quando amostras de leveduras eram mantidas a uma temperatura de até -20°C, o congelamento de 90% da água celular livre ocorria em até 60 minutos. Portanto, independentemente da temperatura final de armazenamento todas as amostras preservadas em nosso estudo foram mantidas no -20°C por 8 horas e a taxa de congelamento utilizada foi considerada como lenta conforme a metodologia utilizada por Fonseca *et al.* (2001).

Estudos avaliando leveduras e bactérias, após o armazenamento da saliva em N₂L durante 2 meses e outro durante 20 dias utilizaram uma taxa de congelamento de 10°C/minuto. Os resultados obtidos com as amostras frescas e congeladas, foram comparáveis, em ambos os estudos (4, 5). Quando o congelamento é lento, há a redução do volume de água, formação de cristais de gelo extracelulares e aumento da concentração de solutos (1, 16, 47, 48). No presente trabalho procurou-se não utilizar uma taxa de congelamento rápida, para evitar a formação de pequenos cristais de gelo intracelulares, responsáveis pelo desequilíbrio osmótico durante o descongelamento. Uma taxa de congelamento satisfatória utilizada para manter a viabilidade de leveduras, é em torno de 7°C/minuto (1) e para uma ampla variedade de células 1°C/minuto (60) a 10°C/minuto (10).

O tempo necessário para o descongelamento de diferentes amostras, entre elas, bactérias, leveduras, células humanas e animais é variável e leva em consideração o tipo celular e a taxa de congelamento utilizada no momento do armazenamento (48). A maioria dos autores utiliza um descongelamento rápido, com banho - de - água de 30°C a 40°C durante 1 a 2 minutos (16, 58), ou 37°C durante 5

segundos (19). No entanto, Fonseca *et al.* (2001) observaram que diferentes temperaturas de descongelamento não afetaram as bactérias após o armazenamento. Em nosso trabalho, o descongelamento das amostras de saliva foi realizado à temperatura ambiente, em no máximo 10 minutos, pois, considerando que o congelamento das amostras foi lento, um descongelamento rápido poderia induzir as células a um choque osmótico resultando em morte quando estas retornassem ao meio isotônico (45, 64).

VIABILIDADE BACTERIANA

A viabilidade bacteriana que representa a capacidade do microrganismo de crescer e se multiplicar após o descongelamento quando inoculado em meio de cultura apropriado, pode ser alterada dependendo da técnica de congelamento, de descongelamento e a temperatura de armazenamento utilizada. Os resultados obtidos no presente trabalho sugerem que a técnica de congelamento e descongelamento lentos e as temperaturas de armazenamento utilizadas minimizaram os danos celulares decorrentes do processo de preservação de células em baixas temperaturas (48). A viabilidade dos microrganismos foi confirmada por meio da contagem de unidades formadoras de colônias (UFC). No momento da coleta, o número de UFC foi em média de $2,1 \times 10^7$ UFC/mL, sendo que após 3 meses de armazenamento em N₂L (G), N₂L e -20°C houve redução de uma escala logarítmica e após 10 meses de armazenamento, essa redução foi de duas escalas logarítmicas sendo neste caso estatisticamente significativa em comparação com a avaliação inicial. Fonseca *et al.* (2006), avaliando bactérias quando uma taxa de congelamento rápida (2500°C/minuto) e uma lenta (5°C/minuto) foram utilizadas, observaram números de UFC similares, $7,3 \times 10^6$ UFC/mL e $6,6 \times 10^6$ UFC/mL, após 1 mês de armazenamento a -20°C. No presente estudo, apesar da diminuição no número de UFC, as bactérias encontradas inicialmente continuaram presentes na saliva, confirmando a viabilidade das mesmas.

Além dos fatores citados anteriormente, o uso de um agente crioprotetor pode afetar a viabilidade microbiana (10). No presente estudo o glicerol foi utilizado como crioprotetor, pois este pode difundir-se para o interior da célula antes do congelamento e sair da célula durante e após o descongelamento (48), além de ter afinidade pela água e não ser tóxico à célula (52). Desta forma aumenta a viabilidade celular, pois minimiza os efeitos potencialmente deletérios das reações

químicas que ocorrem entre os meios intracelular e extracelular (52). Nesse estudo, após 3 e 10 meses de armazenamento da saliva em N₂L com glicerol e sem glicerol, não foi observado diferença significativa no número de UFC/mL. Os resultados aqui obtidos estão de acordo com os obtidos por Brambilla *et al.* (1992), que demonstraram que a contagem de leveduras de amostras de saliva armazenadas em N₂L, com ou sem glicerol, por 2 meses, foram bastante similares. Gilmour *et al.* (1978) armazenaram as bactérias *Streptococcus mutans*, *Fusobacterium nucleatum* e *Selenomonas* em N₂L, durante 12 meses, utilizando taxas de congelamento e descongelamento rápidas, e obtiveram 100% de recuperação das amostras armazenadas com crioprotetor e de 80% a 100% sem crioprotetor.

O uso de agentes crioprotetores para o armazenamento de bactérias isoladas é bastante difundido e com resultados que mostram a sua eficiência (10, 24, 48, 52), porém, a sua atuação no armazenamento de amostras de saliva ainda não está estabelecida. Assim consideramos neste estudo a possibilidade de a própria saliva ter agido como um agente crioprotetor. Fonseca *et al.* (2006), sugeriram que a formação dos cristais de gelo, durante o congelamento, seria limitada pela alta viscosidade do glicerol. Em decorrência do aumento da viscosidade, o processo de formação de gelo se torna dependente da taxa de congelamento utilizada, ou seja, a formação de gelo é menor com uma taxa de congelamento mais rápida (50). Ainda pode-se sugerir que a concentração de glicerol utilizada neste trabalho não tenha sido alta o suficiente para aumentar a proteção das células microbianas presentes nas amostras e por isso o resultado com e sem glicerol tenha sido tão semelhante. Mazur (1984) relatou que quando uma taxa de congelamento lenta é utilizada, o glicerol aumenta o volume de líquido extracelular a qualquer temperatura, ao mesmo tempo diminui a concentração de sais nesse volume, evitando dessa forma a morte celular no momento do descongelamento.

Analisando-se os resultados obtidos com as diferentes técnicas de armazenamento, N₂L (com e sem glicerol) e freezer a -20°C (com glicerol) pode-se considerar ambas as temperaturas de armazenamento de saliva eficazes. Apesar de não ter sido observado diferença entre esses métodos após os 3 meses de armazenamento, alguns autores observaram que quando amostras de bactérias eram avaliadas após um período maior de preservação, em diferentes temperaturas, a viabilidade era maior em temperaturas mais baixas (15, 16, 20).

Para avaliar a viabilidade de microrganismos específicos após o armazenamento, duas espécies bacterianas do gênero *Streptococcus* foram estudadas utilizando o meio de cultura seletivo agar Mitis Salivarius, para o isolamento de *Streptococcus mitis* e *S. salivarius* a partir da saliva após 3 e 10 meses de armazenamento das amostras. A fase de regeneração celular permite a retomada dos processos metabólicos interrompidos pelo congelamento e deve ocorrer com o mínimo distúrbio osmótico e físico. Segundo Zhao e Zhang (2005) uma forma de facilitar ou propiciar esta regeneração celular microbiana é a utilização de meios de cultura apropriados. A utilização do meio de cultura seletivo comprovou a capacidade das espécies de crescerem e se reproduzirem após o armazenamento da saliva a -196°C e -20°C (62). Após a identificação das bactérias, obteve-se recuperação do *Streptococcus mitis* em todas as amostras avaliadas. Já o *Streptococcus salivarius* esteve presente em todas as amostras avaliadas após 3 e 10 meses de armazenamento, com exceção de uma amostra armazenada sem glicerol.

VARIABILIDADE BACTERIANA

A variabilidade bacteriana, observada pela identificação das bactérias presentes nas amostras de saliva processadas imediatamente após a sua coleta, demonstrou a presença de cocos e bastonetes Gram-positivos, principalmente anaeróbios facultativos. Mais de 700 espécies bacterianas já foram identificadas na boca (56), e diferentes autores observaram bactérias específicas, como, *Staphylococcus* sp. (44) bastonetes (41) e *Streptococcus* sp. (17, 63, 41) em uma boca saudável.

A avaliação da microbiota salivar permite estabelecer a variabilidade bacteriana de indivíduos e pode ser utilizada para identificação de microrganismos relacionados: a doenças como a cárie dental (31, 42); doença periodontal (11, 12); a sua alteração quando pacientes são expostos a fatores de risco, como fumo e álcool, muitas vezes relacionada com o aumento de risco de desenvolvimento de câncer de boca (9, 27, 28, 29, 34, 37).

Após o armazenamento da saliva nas temperaturas de -196°C e -20°C foi observada uma diferença no percentual dos microrganismos identificados presentes antes do armazenamento, no entanto, a diversidade permaneceu a mesma. A análise da variabilidade da microbiota bucal da saliva, avaliada após 3 meses de

armazenamento em N₂L (G), N₂L e a -20°C mostrou manutenção no percentual de bastonetes Gram positivos e *Staphylococcus* sp. e uma redução no percentual de *Streptococcus* sp. quando comparados com a avaliação inicial.

A manutenção no percentual de bastonetes após o armazenamento, poderia ser explicado pela presença dos endósporos, no caso destes isolados serem de gêneros formadores dos mesmos. Endósporos são estruturas de resistência que se formam dentro das células e podem sobreviver em condições desfavoráveis. Quando expostos ao calor, eles podem germinar e tornarem-se células vegetativas metabolicamente ativas (7, 21, 24, 35, 36, 38).

Além dos bastonetes, houve também a manutenção de bactérias do gênero *Staphylococcus* após 3 meses de armazenamento em N₂L com e sem glicerol e a -20°C. Essa manutenção dos *Staphylococcus* sp. pode ser explicada pela agregação das células. A morfologia dos arranjos bacterianos desse gênero é uma característica resultante da divisão celular das mesmas que ocorre em mais de um plano, formando grupos de 8 ou mais células. Esse tipo de agregação poderia conferir maior resistência às mudanças de temperatura. Fonseca *et al.* (2006) avaliou a distribuição de células bacterianas em amostras armazenadas em N₂L utilizando diferentes taxas de congelamento e observou que com uma taxa de congelamento lenta, a disposição das bactérias ocorreu de forma concentrada.

Após 10 meses de armazenamento em N₂L, foram identificados apenas os microrganismos isolados dos meios de cultura agar sangue e agar mitis salivarius. Observou-se recuperação das bactérias do gênero *Streptococcus*, com um percentual em torno de 60% e 70% das amostras armazenadas com e sem glicerol, respectivamente, em comparação com a avaliação inicial dessas bactérias que foi em torno de 73%.

Em conclusão, os resultados do presente estudo demonstraram que o armazenamento de saliva a -196°C é um método eficaz nas condições estabelecidas no presente trabalho, quando a microbiota bucal é avaliada por um período de até 10 meses. A viabilidade microbiana foi mantida após o armazenamento da saliva por 3 meses a -20°C e por 10 meses a -196°C. O uso do crioprotetor glicerol na concentração de 10% (v/v) não alterou a viabilidade dos microrganismos após 3 e 10 meses de armazenamento a -196°C. Quando analisada a variabilidade da microbiota bucal nos diferentes tempos, mesmo tendo ocorrido alteração na frequência das bactérias identificadas, as mesmas continuaram presentes após o armazenamento.

O uso de meio de cultura seletivo confirmou a viabilidade das bactérias *Streptococcus mitis* e *S. salivarius* após 10 meses de armazenamento a -20°C e a -196°C.

O armazenamento de saliva em temperaturas criogênicas, para avaliação da microbiota bucal, permite sua utilização para qualificação em estudos epidemiológicos e longitudinais.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem aos professores e pesquisadores do Departamento de Microbiologia, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, pela disposição dos laboratórios e ajuda prestada na realização dos experimentos. À Disciplina de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da UFRGS, pelo fornecimento do sistema de armazenamento em N₂L, do Banco de Tecidos dessa disciplina. Ao doutorando Vinicius Coelho Carrard, às colegas Fernanda Visioli e Sabrina Pozatti Moure e à aluna do curso de graduação de Odontologia da UFRGS, Priscila Zanco Kerber, pela colaboração durante a pesquisa. Esse estudo foi financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES – Brasil), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e Programa de Iniciação Científica da UFRGS (BIC/UFRGS).

REFERÊNCIAS

1. Bank H, Mazur P. Visualization of freezing damage. *J Cell Biol* 1973; **57**: 729-742.
2. Bentley C, Crawford JJ, Broderius CA. Analytical and physiological variability of salivary microbial counts. *J Dent Res* 1988; **67**: 1409-1413.
3. Bonnas WA, High AS, Owen PJ, Devine DA. Expression of β -defensin genes by human salivary glands. *Oral Microbiol Immunol* 1999; **14**: 371-374.
4. Brambilla E, Strohmenger L, Vogel G. The effect of storage in liquid nitrogen on the isolation of oral yeasts in human saliva. *Arch Oral Biol* 1992; **37**: 237-239.

5. Brambilla E, Twetman S, Felloni A, Cagetti MG, Canegallo L, Garcia-Godoy F, Strohmer L. Salivary mutans streptococci and lactobacilli in 9- and 13-year-old Italian schoolchildren and the relation to oral health. *Clin Oral Invest* 1999; **3**: 7-10.
6. Callas PW, Haugh LD, Flynn BS. Effects of long-term storage on salivary thiocyanate concentration. *Addict Behav* 1989; **14**: 643-648.
7. Chan EC, Rutter PJ, Wills A. Abundant growth and sporulation of *Bacillus sphaericus* NCA Hoop 1-A-2 in a chemically defined medium. *Can J Microbiol* 1973; **19**: 151-154.
8. Chiapinn S, Antonelli G, Gatti R, De Palo EF. Saliva specimen: a new laboratory tool for diagnostic and basic investigation. *Clin Chim Acta* 2007.
9. Colman G, Beighton D, Chalk AJ. Cigarette smoking and the microbial flora of the mouth. *Aust Dent J* 1976; **21**: 111-118.
10. Corriel LL. Preservation, storage, and shipment. In: *Methods in Enzymology*, 1979; **58**: 29-36.
11. Darout IA, Albandar JM, Skaug N, Ali RW. Salivary microbiota levels in relation to periodontal status, experience of caries and miswak use in Sudanese adults. *J Clin Periodontol* 2002; **29**: 411-420.
12. Darveau RP, Tanner A, Page RC. The microbial challenge in periodontitis. *Periodontol* 2000 1997; **14**: 12-32.
13. Dawes C, Tsang RWL, Suelzle T. The effects of gum chewing, four oral hygiene procedures, and two saliva collection techniques, on the output of bacteria into human whole saliva. *Arch Oral Biol* 2001; **46**: 625-632.
14. Esteves SC, Spaine DM, Cedenho AP, Srougi M. Effects of the technique of cryopreservation and dilution/centrifugation after thawing on the motility and vitality of spermatozoa of oligoasthenozoospermic men. *Int Braz J Urol* 2003; 133-140.
15. Fonseca F, Béal C, Georges C. Operating conditions that affect the resistance of lactic acid bacteria to freezing and frozen storage. *Cryobiology* 2001; **43**: 189-198.
16. Fonseca F, Marin M, Morris GJ. Stabilization of frozen *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* in glycerol suspensions: freezing kinetics and storage temperature effects. *Appl Environ Microbiol* 2006; **72**: 6474-6482.

17. Gibbons RJ, Kapsimalis B, Socransky SS. The source of salivary bacteria. *Arch Oral Biol* 1964; **9**: 101-103.
18. Gibbons RJ. Bacterial adhesion to oral tissues: a model for infectious diseases. *J Dent Res* 1989; **68**: 750-760.
19. Gilmour MN, Turner G, Berman RG, Krenzer AK. Compact liquid nitrogen storage system yielding high recoveries of gram-negative anaerobes. *Appl Environ Microbiol* 1978: 84-88.
20. Gorman J, Adley CC. An evaluation of five preservation techniques and conventional freezing temperatures of -20° c and -85° c for long-term preservation of campylobacter jejuni. *Lett Appl Microbiol* 2004; **38**: 306-310.
21. Gould GW, Hitchins AD. Sensitization of bacterial spores to lysozyme and hydrogen peroxide with reagents which rupture disulphide bonds. *J Gen Microbiol* 1963; **33**: 413-423.
22. Gröschl M, Wagner R, Rauh M, Dörr HG. Stability of salivary steroids: the influences of storage, food and dental care. *Steroids* 2001; **66**: 737-741.
23. Harlow E, Lane D. *Atibodies a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory 1988: 258-260.
24. Hilliard CM, Davis MA. The germicidal action of freezinf temperatures upon bacteria. *J Bacteriol* 1918; **3**: 423-431.
25. Hintao J, Teanpaisan R, Changsuvivatwong V, Ratarasan C, Dahlen G. The microbiological profiles of saliva, supragengival an subgengival plaque and dental caries in adults with an without type 2 diabetes mellitus. *Oral Microbiol Immunol* 2007; **22**: 175-181.
26. Holt, J. G. *et al.* Biochemical tests for identification of medical bacteria. In: Macfaddin, J. F. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 3rd. edn. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1994: **43**: 483-623.
27. Homann N, Jousimies-Somer H, Jokelainen K, Heine R, Salaspuro M. High acetaldehyde levels in saliva after ethanol consumption: methodological aspects and pathogenetic implications. *Carcinogenesis* 1997; **18**: 1739-1743.
28. Homann N, Tillonen J, Muerman JH, Rintamäki H, Lindqvist C, Rautio M, Jousimies-Somer H, Salaspuro M. Increased salivary acetaldehyde levels in heavy drinkers and smokers: a microbiological approach to oral cavity cancer. *Carcinogenesis* 2000; **21**: 663-668.

29. Homann N, Tillonen J, Rintamäki H, Salaspuro M, Lindqvist C, Meurman JH. Poor dental status increases acetaldehyde production from ethanol in saliva: a possible link to increased oral cancer risk among heavy drinkers. *Oral Oncol* 2001; **37**: 153-158.
30. Hoover CI, Newbrun E. Survival of bacteria from human dental plaque under various transport conditions. *J Clin Microbiol* 1977; **6**: 212-218.
31. van Houte J. Role of micro-organisms in caries etiology. *J Dent Res* 1994; **73**: 672-681.
32. Jarvis JD, Winne CD, Telfer ER. Storage of bacteria in liquid nitrogen. *J Med Lab Tech* 1967; **24**: 312-314.
33. Johansson I, Bratt P, Hay DI, Schluckebier S, Strömberg N. Adhesion of *Candida albicans*, but not *Candida krusei*, to salivary statherin an mimicking host molecules. *Oral Microbiol Immunol* 2000; **15**: 112-118.
34. Jokelainen K, Heikkonen E, Roine R, Lehtonen H, Salaspuro M. Increased acetaldehyde production by mouthwashings from patients with oral cavity, laryngeal, or pharyngeal cancer. *Alcohol Clin Exp Res* 1996; **20**: 1206-1210.
35. Keynan A, Evenchik Z, Halvorson HO, Hastings JW. Activation of bacterial endospores. *J Bacteriol* 1964; **88**: 313-318.
36. Knaysi G, Curran HR. Effects of some mechanical factors on the endospores of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 1961; **82**: 691-694.
37. Kurkivuori J, Salaspuro V, Kaihovaara P, Kari K, Rautemaa R, Grönroos L, Muerman JH, Salaspuro M. Acetaldehyde production from ethanol by oral streptococci. *Oral Oncol* 2007; **43**: 181-186.
38. Levinson HS, Hyatt MT. Distribution and correlation of events during thermal inactivation of *Bacillus megaterium* spores. *J Bacteriol* 1971; **108**: 111-121.
39. Li H, Thompson I, Carter P, Whiteley A, Bailey M, Leifert C, Killham K. Salivary nitrate – an ecological factor in reducing oral acidity. *Oral Microbiol Immunol* 2007; **22**: 67-71.
40. Loken SD, Demetrick DJ. A novel method for freezing and storing research tissue bank specimens. *Hum Path* 2005; **36**: 977-980.
41. Mager DL, Ximenez-Fyvie LA, Haffajee AD, Socransky SS. Distribution of selected bacterial species on intraoral surfaces. *J Clin Periodontol* 2003; **30**: 644-654.

42. Marsh PD. Host defenses and microbial homeostasis: role of microbial interactions. *J Dent Res* 1989; **68**: 1567-1575.
43. Marsh PD. Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. *Adv Dent Res* 1994; **8**: 263-271.
44. Martins CAP, Koga-Ito CY, Jorge AOC. Presence of *Staphylococcus* spp. and *Candida* spp. in the human oral cavity. *Braz J Microbiol* 2002; **33**: 236-240.
45. Mazur P. The role of cell membranes in the freezing of yeast and other single cells. *Ann NY Acad Sci* 1965; **125**: 658-676.
46. Mazur P. Interaction of cooling velocity, temperature, and warming velocity of frozen and thawed yeast. *Cryobiology* 1968; **5**: 1-17.
47. Mazur P. Cryobiology: the freezing of biological systems. *Science* 1970; **168**: 939-949.
48. Mazur P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am J Physiol* 1984; **247**: c125-c142.
49. Morris CB. Cryopreservation of animal and human cell lines. In: *Methods in Molecular Biology*. Totowa, NJ, 1995; **38**: 179-187.
50. Morris GJ, Goodrich M, Acton E, Fonseca F. The high viscosity encountered during freezing in glycerol solutions: effects on cryopreservation. *Cryobiology* 2006; **52**: 323-334.
51. Muto M, Hitomi Y, Ohtsu A, Shimada H, Kashiwase Y, Sasaki H, Yoshida S, Esumi H. Acetaldehyde production by non-pathogenic *Neisseria* in human oral microflora: implications for carcinogenesis in upper aerodigestive Tract. *Int J Cancer* 2000; **88**: 342-350.
52. Nash T. Chemical Constitution and Physical Properties of Compounds able to Protect Living Cells against Damage due to Freezing and Thawing. In: Meryman HT, *Cryobiology*. New York: Academic press, 1966: 179-211.
53. Ng DPK, Koh D, Choo SGL, Ng V, Fu Q. Effect of storage conditions on the extraction of PCR-quality genomic DNA from saliva. *Clin Chim Acta* 2004; **343**: 191-194.
54. Nurka A, Obiero J, Käythy H, Scott JAG. Effects of sample collection and storage methods on antipneumococcal immunoglobulin A in saliva. *Clin Diagn Lab Immunol* 2003; **10**: 357-361.
55. Panoff J-M, Thammavongs B, Guéguen M, Boutibonnes P. Cold stress responses in mesophilic bacteria. *Cryobiology* 1998; **36**: 75-83.

56. Paster BJ, Ingar O, Jorn AA, Floyd ED. The breadth of bacterial diversity in the human periodontal pocket and other oral sites. *Periodontol 2000* 2006; **42**: 80-87.
57. Sanders JW, Venema G, Kok J. Environmental stress responses in *Lactococcus lactis*. *FEMS Microbiol Rev* 1999; **23**: 483-501.
58. Sandskär B, Magalhães B. Cryopreservation of *Zoophthora radicans* (zygomycetes, entomophthorales) in liquid nitrogen. *Cryobiology* 1994; **31**: 206-213.
59. Schlagenhauf U, Pommerencke K, Weiger R. Influence of toothbrushing, eating and smoking on dentocult SM Strip mutans[®] test scores. *Oral Microbiol Immunol* 1995; **10**: 98-101.
60. Simione FP. Cryopreservation manual. Nalge Nunc International Corp 1998.
61. Tillonen J, Homann N, Rautio M, Jousimies-Somer H, Salaspuro M. Role of yeasts in the salivary acetaldehyde production from ethanol among risk groups for ethanol – associated oral cavity cancer. *Alcohol Clin Exp Res* 1999; **23**: 1409-1415.
62. Wells JE, Russell JB. Why do many ruminal bacteria die and lyse so quickly?. *J Dairy Sci* 1996; **79**: 1487-1495.
63. Williams NB. Microbial ecology of the oral cavity. *J Dent Res Supplement* 1963; **42**: 509-520.
64. Wood TH, Rosenberg AM. Freezing in yeast cells. *Biochim Biophys Acta* 1957; **25**: 78-87.
65. Zhao G, Zhang G. Effect of protective agents, freezing temperature, rehydration media on viability of malolactic bacteria subjected to freeze-drying. *J Appl Microbiol* 2005; **99**: 333-338.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A avaliação da saliva permite estabelecer um perfil microbiano e relacioná-lo com os hábitos do paciente como higiene bucal, dieta e também consumo de fumo e álcool, fatores que afetam a homeostasia microbiana, alterando o crescimento dos microrganismos na boca.

A proposta inicial deste trabalho era avaliar a viabilidade e variabilidade da microbiota presente na saliva após 3, 6, 9 e 12 meses de armazenamento. A identificação dos microrganismos foi realizada utilizando provas bioquímicas clássicas, as quais são trabalhosas e tomam muito tempo para sua execução. Outras formas de identificação de microrganismos utilizadas na literatura seriam a identificação por meio da morfologia das colônias bacterianas baseados na utilização de meios específicos, a utilização de kits disponíveis comercialmente, além da identificação bacteriana por PCR. Acreditamos que o método de avaliação utilizado em nosso trabalho permitiu a identificação de espécies microbianas com segurança e o mesmo permitiu uma boa abrangência de identificação no que tange a microbiota bucal. A identificação por meio da morfologia das colônias se torna muito restrita e não é confiável, pois os meios de cultura seletivos não são tão específicos para permitir a identificação de espécies. A utilização de kits comercialmente disponíveis abreviariam o estudo, porém muitos microrganismos não seriam identificados por esta metodologia. A utilização da técnica de PCR permitiria a identificação das espécies e subespécies com precisão, porém são métodos dispendiosos e que não estavam disponíveis para uso neste trabalho.

Em função do tempo disponível para o trabalho no laboratório e do método de identificação utilizado foi possível a análise da viabilidade e da variabilidade apenas após 3 e 10 meses de armazenamento.

Um aspecto importante observado em nosso trabalho foi a alteração da frequência dos microrganismos avaliados mesmo após um curto período de armazenamento em nitrogênio líquido (3 meses). Este dado é importante na medida em que estudos que utilizarem diferentes tempos de armazenamento e ou avaliarem produtos do metabolismo bacteriano poderão apresentar um viés.

Sabe-se que a rotina de seleção de pacientes para os estudos assim como da coleta de saliva ocorre em tempos diferentes e que a análise dos mesmos sem a

padronização do tempo de armazenamento poderá apresentar resultados discrepantes.

Exemplificando, estudos que avaliam a produção de acetaldeído por bactérias, como os estreptococos do grupo viridans (KURKIVUORI *et al.*, 2007). A concentração de acetaldeído é dependente da concentração desses microrganismos na saliva. Portanto, os níveis de acetaldeído observados em amostras de saliva congeladas, podem estar reduzidos em função da alteração da frequência bacteriana.

A alteração na frequência das bactérias identificadas, após o armazenamento da saliva, pode ser minimizada por meio da utilização de meio de cultura seletivo, permitindo a recuperação dos microrganismos presentes. Utilizamos em nosso trabalho o meio agar mitis salivarius e também o meio de cultura enriquecido agar sangue.

Nossos resultados demonstraram que a viabilidade da microbiota salivar se manteve quando armazenada em temperaturas de -20°C por 3 meses e em -196°C por 10 meses. Como continuidade deste trabalho serão realizados novos descongelamentos, da saliva armazenada, após 18 e 24 meses, para confirmação da manutenção dos resultados obtidos neste trabalho.

Estas avaliações futuras permitirão comprovar a eficácia do armazenamento de saliva para avaliação da microbiota bucal, após períodos prolongados de criopreservação.

ANEXO 1

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

RESOLUÇÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa e a Comissão de Pesquisas da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul analisaram o Projeto:

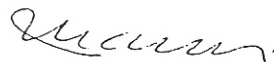
Número: 14/06

Título: AVALIAÇÃO DA VARIABILIDADE E DA VIABILIDADE DA MICROBIOTA BUCAL EM SALIVA ARMAZENADA EM DIFERENTES TEMPERATURAS

Investigador(es) principal(ais): Professoras Anna C. M. Chaves, Sueli Van Der Sand, C.D. Elisabete U. Rojas e os Acadêmicos Gustavo G. Nascimento, Luisa S. Cassiano

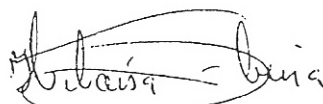
O Projeto foi aprovado na reunião do dia 18/04/2006, Ata nº 04/06 do Comitê de Ética em Pesquisa e da Comissão de Pesquisas, da UFRGS, por estar adequado ética e metodologicamente e de acordo com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde.

Porto Alegre, 19 de abril de 2006.



Prof^a. Marisa Maltz

Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisas



Prof^a. Heloísa Emília Dias da Silveira

Coordenadora da Comissão de Pesquisas

ANEXO 3

TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO

Projeto de pesquisa

“Avaliação da variabilidade e da viabilidade da microbiota bucal em saliva armazenada em diferentes temperaturas”.

Pesquisador responsável

Dr^a Anna Cecília Moraes Chaves

Objetivo do projeto

Este projeto visa determinar os diferentes tipos de microorganismos (micróbios) da saliva e analisar se eles sobrevivem após o congelamento da saliva em diferentes temperaturas por um determinado tempo.

Sobre a utilização da saliva em pesquisa

Você será submetido a um exame de seus dentes e gengiva e a uma coleta de saliva para identificação de microorganismos (micróbios) presentes na sua boca. Um dentista vai realizar o exame clínico e esta coleta, que não trará desconforto além do ato de mastigar a goma de mascar durante 6 min e após, expelir a saliva em um frasco. Posteriormente serão realizados testes laboratoriais com o material.

Nós gostaríamos de manter a saliva restante para pesquisas futuras. Se você concordar, sua saliva será mantida congelada e poderá ser utilizada em pesquisas para aumentar o conhecimento de doenças, como por exemplo, o câncer bucal.

A decisão de permitir que a saliva que sobra seja utilizada para pesquisas futuras é sua, e não influenciará o seu tratamento. Caso seja de sua vontade, mesmo após ter concordado, poderá em qualquer momento, desistir da participação na pesquisa.

No futuro, pesquisadores podem necessitar de mais informações sobre sua saúde. Garantimos que seu nome, endereço e telefone não serão revelados. No caso da descoberta de qualquer resultado que venha beneficiá-lo, você será informado.

Qualquer dúvida quanto a utilização da saliva coletada, será prontamente fornecida por um dos membros da equipe envolvida.

Fazendo sua escolha

Por favor, leia atentamente a pergunta e pense em sua resposta, circulando “Sim” ou “Não”.

1. Minha saliva pode ser utilizada para esta pesquisa e mantida para pesquisas futuras?

Sim

Não

Declaro que recebi cópia do presente termo de consentimento e estou de acordo com as explicações nele contidas e informadas pela Dr^a Elisabete Ulsenheimer Rojas.

Assinatura: _____

Data: _____

Assinatura do CD: _____

Telefone do Pesquisador responsável: (51) 3316-5011
3028-0845