

UNILEÃO
CENTRO UNIVERSITÁRIO
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

JULIANA ALVES CRUZ

**O USO DA SALIVA COMO MEIO DE DIAGNÓSTICO PARA DOENÇA PERIODONTAL:
REVISÃO DE LITERATURA**

JUAZEIRO DO NORTE-CE
2021

JULIANA ALVES CRUZ

**O USO DA SALIVA COMO MEIO DE DIAGNÓSTICO PARA DOENÇA PERIODONTAL:
REVISÃO DE LITERATURA**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à
Coordenação do Curso de Graduação em Odontologia
do Centro Universitário Doutor Leão Sampaio, como
pré-requisito para obtenção do grau de Bacharel.

Orientador (a): Profa. Me. Karine Figueredo da Costa

JUAZEIRO DO NORTE-CE
2021

JULIANA ALVES CRUZ

**O USO DA SALIVA COMO MEIO DE DIAGNÓSTICO PARA DOENÇA
PERIODONTAL : REVISÃO DE LITERATURA**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à
Coordenação do Curso de Graduação em
Odontologia do Centro Universitário Doutor Leão
Sampaio, como pré-requisito para obtenção do grau
de Bacharel.

Aprovado em 25/06/2021.

BANCA EXAMINADORA

**PROFESSOR (A) MESTRE KARINE FIGUEIREDO DA COSTA
ORIENTADOR (A)**

**PROFESSOR (A) MESTRE LUCIANA MARA PEIXOTO ARAUJO
MEMBRO EFETIVO**

**PROFESSOR (A) ESPECIALISTA RAVENA PINHEIRO TELES
MEMBRO EFETIVO**

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Deus que sempre foi maravilha comigo e que está ao meu lado todo tempo.

Dedico aos meus pais, por nunca terem medido esforços para me proporcionar um ensino de qualidade, e a meus irmãos que sempre esteve comigo em todas as horas.

Dedico a meu noivo pelo companheirismo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por tudo que sou e pelo que me destes, por me permitir ultrapassar todos os obstáculos encontrados ao longo da realização deste trabalho. Por ter me proporcionado saúde, paciência, e discernimento durante toda a graduação. Obrigada Deus por tudo de maravilhoso na minha vida, pela coragem, força e segurança.

Agradeço a Maria do Socorro Alves Cruz (Mãe), pelo apoio incondicional, por ter sido meu alicerce e por estar presente em todas as fases de minha vida. Obrigado por existir e estar sempre ao meu lado. Não hesito em afirmar que você é a minha maior incentivadora em todos os aspectos e quesitos de vida. E a meu pai José Pereira da Cruz (in memoriam), agradeço por todo carinho, amor e cuidado. Seus ensinamentos e valores alimentaram minha alma e conduziram meus passos até aqui. Obrigada por tudo pai.

Á José Pereira da Cruz Filho (irmão) agradeço por ser um pai para mim, obrigada por estar sempre ao meu lado, pelo apoio, cumplicidade e por ser esse excelente irmão em todas as horas. Obrigado por existir e estar sempre ao meu lado sendo minha base em todos os sentidos. A Cleciana Alves Cruz (irmã), obrigada por todo amor e esperança, pelas palavras de conforto, pelos incentivos incondicionais, a tranquilidade que me passou todos esses anos. Você é o meu maior exemplo de força e determinação em tudo que faz.

Agradeço a Romildo Jônatas (noivo), por estar ao meu lado durante o meu percurso acadêmico. Obrigada pelo apoio, companheirismo e carinho durante toda jornada enfrentada.

RESUMO

A saliva humana é um fluido biológico de fácil acesso e que abrange diversas substâncias relacionadas com doenças, conhecidas como biomarcadores que favorece um meio potencial de diagnóstico. A saliva é uma fonte de informações clínicas relevantes, pois ela envolve biomarcadores específicos, e algumas mudanças qualitativas na composição destas, podem ter valor no diagnóstico da doença periodontal. Desse modo, a saliva pode ser utilizada como ferramenta para triagem, avaliação da severidade e do estado atual da doença periodontal. A doença periodontal, provoca uma sequência de alterações dos tecidos periodontais que resultam na perda de inserção e na destruição do osso alveolar. Os biomarcadores englobam um aspecto mais amplo de doenças do que apenas as ligadas ao periodonto. Para o reconhecimento da periodontite, é importante que seja feito um diagnóstico, o quanto antes, para evitar assim, efeitos danosos na saúde bucal do paciente. O objetivo deste estudo é analisar o uso da saliva como meio de diagnóstico para doença periodontal e assim procurar os testes que são possíveis de serem realizados com saliva, sejam eles laboratoriais ou clínicos, para detecção de componentes salivares comprovadamente alterados em situação de doença, além da possibilidade de monitorar a eficácia do tratamento periodontal. A saliva tem a presença de enzimas, proteínas específicas e não específicas, anticorpos e outras substâncias que estão entre os potenciais biomarcadores salivares de doenças periodontais, orais e de certas doenças de tecidos distantes. E assim a saliva se tornou o assunto de interesse do estudo, tendo em vista, a facilidade do uso e coleta de saliva, procedimento não invasivo, para assim a possível detecção da doença periodontal. Esse estudo trata-se de uma revisão de literatura narrativa, na qual a busca bibliográfica foi realizada nas bases de dados Google acadêmico e MEDLINE/ PubMed, no período de agosto de 2020 a maio de 2021, selecionando estudos sobre testes salivares para diagnóstico de doença periodontal. A saliva é relativamente segura para coleta, ela oferece um meio não invasivo e uma maneira simples de auxiliar na descoberta de doenças orais e sistêmicas, e espera-se que com isso a saliva possa ser usada para fins de triagem, diagnóstico e prognóstico de diversas doenças.

Palavras-chave: Diagnóstico Salivar. Doenças periodontais. Teste Saliva.

ABSTRACT

Human saliva is an easily accessible biological fluid that encompasses several disease-related substances known as biomarkers that favor a potential means of diagnosis. Saliva is a source of relevant clinical information, as it involves specific biomarkers, and some qualitative changes in their composition may be of value in the diagnosis of periodontal disease. Thus, saliva can be used as a tool for screening, assessing the severity and current status of periodontal disease. Periodontal disease causes a sequence of changes in periodontal tissues that result in attachment loss and alveolar bone destruction. Biomarkers encompass a broader aspect of diseases than just those linked to the periodontium. For the recognition of periodontitis, it is important that a diagnosis is made, as soon as possible, to avoid harmful effects on the patient's oral health. The objective of this study is to analyze the use of saliva as a means of diagnosis for periodontal disease and thus look for tests that are possible to be carried out with saliva, whether laboratory or clinical, to detect salivary components proven to be altered in a disease situation, in addition to the possibility of monitoring the effectiveness of periodontal treatment. Saliva has the presence of enzymes, specific and non-specific proteins, antibodies and other substances that are among the potential salivary biomarkers of periodontal and oral diseases and of certain diseases of distant tissues. And so saliva became the subject of interest in the study, considering the ease of use and collection of saliva, a non-invasive procedure, for the possible detection of periodontal disease. This study is a narrative literature review, in which the bibliographic search was performed in the academic Google and MEDLINE/PubMed databases, from August 2020 to May 2021, selecting studies on salivary tests for disease diagnosis periodontal. Saliva is relatively safe for collection, it offers a non-invasive and simple way to aid in the discovery of oral and systemic diseases, and it is hoped that with this saliva can be used for screening, diagnosis and prognosis of various illnesses.

Keyword: Saliva diagnosis. Periodontal diseases. Saliva Test.

LISTA DE SIGLAS

ALT	Alanina Aminotransferase
AST	Aspartato Aminotransferase
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Doença Periodontal
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática
HIV	Imunodeficiência Humana
IL	Interleucinas
MIP	Proteínas Inflamatórias Macrófagos
MMP	Metaloproteinases de Matriz
NIC	Nível de Inserção Clínica
NIH	<i>National Institutes of Health</i>
PCR	Proteína C-reativa
pH	Potencial Hidrogeniônico
PoC	Testes de Periodontite Pontuais
PS	Profundidade de Sondagem
RNA	Ácido Ribonucleico
SS	Sangramento à Sondagem
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral- α

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	09
2 METODOLOGIA	11
3 REVISÃO DE LITERATURA	12
3.1 SALIVA.....	12
3.2 DOENÇA PERIODONTAL.....	13
3.3 RELAÇÃO DA SALIVA E A DOENÇA PERIODONTAL.....	14
3.4 BIOMARCADORES SALIVARES.....	15
3.4.1 Biomarcadores salivares na doença periodontal.....	16
3.5 EXAMES DIAGNÓSTICOS.....	18
3.5.1 Diagnóstico clínico periodontal.....	18
3.5.2 Diagnóstico microbiológico e enzimático.....	18
3.5.3 Diagnóstico imunológico.....	20
3.6 TESTE SALIVAR RÁPIDO.....	22
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	23
REFERÊNCIAS	24

1 INTRODUÇÃO

A saliva é um biofluido que possui componentes provenientes das superfícies das mucosas, sulcos gengivais e superfícies dentárias, a saliva apresenta microorganismos que podem fornecer uma visão sobre a relação do hospedeiro com o ambiente, já que são eles que colonizam a boca junto com outras substâncias exógenas existentes no biofluido bucal (PODZIMEK *et al.*, 2016). A saliva é uma fonte de informações clínicas relevantes, pois ela envolve biomarcadores específicos, e algumas mudanças qualitativas na composição de biomarcadores podem ter valor diagnóstico na descoberta da doença periodontal (GIANNOBILE *et al.*, 2009; RATHANAYAKE *et al.*, 2017).

A periodontite é proveniente de uma inflamação crônica nos tecidos de suporte dos dentes que leva à destruição do tecido conjuntivo e do osso, provocada por persistente infecção bacteriana. A periodontite avança sem causar desconforto devido a sua natureza crônica, isso leva, com frequência, os pacientes a buscarem atendimento profissional apenas após uma destruição considerável do periodonto. Sendo assim, o diagnóstico precoce da periodontite torna-se importante (JI e CHOI, 2015). As doenças periodontais são altamente prevalentes na população, inicia-se com uma inflamação localizada a nível de gengiva, chamada de gengivite, que acontece devido ao acúmulo de biofilme bacteriano inespecífico e a má higienização. Caso não haja tratamento, alguns casos podem progredir para a periodontite, doença multifatorial com patogênese complexa, dessa forma fica clara a importância da descoberta precoce da doença periodontal (FUENTES *et al.*, 2014; KINANE *et al.*, 2017).

Atualmente, a doença periodontal é determinada por parâmetros clínicos tradicionais, como profundidade de sondagem (PS), nível de inserção clínica (NIC) e sangramento à sondagem (SS), no entanto, esses parâmetros são insuficientes para determinar locais onde a doença está ativa, para quantificar a resposta ao tratamento ou avaliar a susceptibilidade à progressão futura. A saliva pode ser utilizada como ferramenta para triagem/ diagnóstico, avaliação da severidade e gravidade, além do prognóstico da doença periodontal, o uso da saliva como complemento aos exames clínicos e radiográficos é de interesse da comunidade científica. Assim, o uso da saliva é promissor na realização do diagnóstico da doença do periodonto para evitar maiores problemas bucais (GIANNOBILE *et al.*, 2009).

A saliva tem potencial para uso como diagnóstico não invasivo, sendo assim, utilizada para diagnóstico precoce e monitoramento de doenças sistêmicas como câncer, doenças infecciosas ou cardiovasculares (CHOJNOWSKA *et al.*, 2018) ou doenças orais como doenças periodontais, peri-implantar e cárie dentária (RATHNAYAKE *et al.*, 2017). Usar a saliva como

material para diagnóstico é possível, devido a presença de vários componentes orgânicos e inorgânicos que são nela secretados, e isso é cada vez mais importante para diagnóstico e monitoramento de doenças (CHOJNOWSKA *et al.*, 2018).

Existem alguns métodos diagnósticos que podem ser utilizados para detecção das doenças periodontais, para descoberta de patógenos periodontais, como: 1) Testes microbiológicos usados para comprovar a ligação entre bactérias e as alterações nos parâmetros clínicos, especialmente o nível de inserção; As técnicas de cultura imunológicas estão incluídas neste grupo; 2) Métodos desenvolvidos para a descoberta de bactérias em medicamentos e a sua modificação para reconhecer patógenos periodontais; este grupo insere as sondas de Ácido Desoxirribonucleico (DNA) e Proteína C-reativa (PCR) (LÓPEZ *et al.*, 2009). Os testes imunológicos podem ser utilizados para analisar reação antígeno - anticorpo e também de espécies bacterianas. Esses métodos são mais adequados para identificar microrganismos específicos em amostras clínicas, promovendo uma estimativa quantitativa ou semiquantitativa dos microrganismos-alvo, com a vantagem de não precisarem de bactérias cultiváveis (VIANA *et al.*, 2006). Dessa forma, alguns testes imunológicos utilizados para diagnóstico periodontal são: 1) Microscopia de imunofluorescência; 2) Aglutinação em látex; 3) Ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) (LÓPEZ *et al.*, 2009).

A saliva tem a presença de enzimas, proteínas específicas e não específicas, anticorpos e outras substâncias que estão entre os potenciais biomarcadores salivares de doenças periodontais, orais e de certas doenças de tecidos distantes. E assim a saliva se tornou o assunto de interesse do estudo, tendo em vista, a facilidade do uso e coleta de saliva, procedimento não invasivo, para assim a possível detecção da doença periodontal.

O estudo tem como objetivo geral analisar o uso da saliva como meio de diagnóstico para doença periodontal, procurando os testes que são possíveis de serem realizados com saliva, sejam eles laboratoriais ou clínicos, para detecção de componentes salivares comprovadamente alterados em situação de doença, além da possibilidade de monitorar a eficácia do tratamento periodontal.

2 METODOLOGIA

Este estudo é uma revisão de literatura narrativa, na qual a busca bibliográfica foi realizada nas bases de dados Google acadêmico e *Medical Literature Analysis and Retrieval System Online* (MEDLINE/ PubMed), no período de agosto de 2020 a maio de 2021, selecionando estudos sobre testes salivares para diagnóstico de doença periodontal. Os seguintes descritores foram utilizados para seleção dos artigos: “diagnóstico salivar”, “doença periodontal” e “teste salivar”.

Os artigos foram selecionados após leitura do título e resumo seguindo os critérios de inclusão utilizados: (a) revisão sistemática; (b) estudo clínico randomizado; (c) série de casos; (d) estudos em humanos; (e) estudos que mostram que é possível sugerir diagnóstico. Publicações em português, inglês e espanhol. Os critérios de exclusão foram (a) duplicidade de artigos; (b) artigos que não abordavam o tema proposto; (c) Idioma que não fosse português, inglês e espanhol. Essa revisão apresenta uma breve visão geral dos estudos sobre testes de diagnóstico salivar desde 2005.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 SALIVA

A saliva é um fluido biológico excretado pelas glândulas salivares maiores e menores, sua composição e secreção dependem da glândula da qual a saliva é secretada, bem como idade do paciente, sexo e tipo de fator estimulador. A saliva humana é composta em sua maior parte por água (94-99%), proteínas (especialmente glicoproteínas), lipídios, carboidratos, sais e nitrogênio, além de ureia, ácido úrico, aminoácidos e creatinina. Além das excreções das glândulas salivares, a saliva inclui fluido crevicular gengival, componente do soro, bactérias e metabólitos bacterianos, células epiteliais esfoliadas e leucócitos. Os adultos secretam em torno de 0,5 a 1 litro de saliva por dia, a secreção é controlada pelo sistema nervoso autônomo (CHOJNOWSKA *et al.*, 2018).

A saliva é incolor, inodora com potencial Hidrogeniônico (pH) variando entre 6,6 a 7,1 (ZHANG *et al.*, 2016) e apresentam várias funções na cavidade oral, como enxágue, solubilização de substâncias alimentares, eliminação de alimentos e bactérias, lubrificação de tecidos moles, formação de bolo alimentar, diluição de detritos, deglutição, fala e facilitação da mastigação. Além disso, os componentes da saliva contribuem para o revestimento da mucosa, da digestão e defesa antibacteriana (RATHNAYAKE *et al.*, 2017).

A saliva tem sido amplamente pesquisada nos últimos anos, explorando sua capacidade de ser uma ferramenta de diagnóstico, e tem sido considerada tão valiosa quanto o sangue. Apresenta diversas vantagens como disponibilidade, facilidade, baixo custo de coleta e métodos de coletas não invasivos, além de ser de fácil armazenamento. Os compostos presentes na saliva são caracterizados por alta estabilidade. A composição da saliva depende do estado fisiológico do corpo, sendo assim fornece informações relevantes sobre para detecção de doenças sistêmicas ou orais (WOŹNIAK *et al.*, 2019).

A saliva total pode ser obtida por coleta estimulada ou não estimulada. Na coleta estimulada é realizada através de estimulação mastigatória ou gustativa (mascar parafina ou colocar ácido cítrico na boca do paciente) (FUENTES *et al.*, 2014). A coleta não estimulada é mais frequentemente utilizada, o paciente deixa acumular saliva no assoalho bucal e depois dispensa em um recipiente calibrado. Os pacientes não devem comer ou beber, nem escovar os dentes por pelo menos duas horas antes da coleta salivar. O ciclo circadiano também influencia nos resultados, sendo que a coleta deve preferencialmente ser realizada entre 8 e 10 horas da

manhã e evitar o uso de qualquer medicação pelo menos 8 horas antes da coleta (CHOJNOWSKA *et al.*, 2018).

Há uma grande diversidade de biomarcadores na saliva, algumas biomoléculas são encontradas quando o indivíduo apresenta alterações decorrentes de alguma patologia presente. Os anticorpos presentes na saliva demonstram ser substitutos do sangue na detecção de patologias virais como as hepatites A, B e a Imunodeficiência Humana (HIV), rubéola, além de outras alterações sistêmicas como a neurocisticercose. A saliva também pode ser usada para estudos epidemiológicos e para doenças da cavidade oral, como a cárie, periodontite e neoplasias orais (OLIVEIRA JÚNIOR e GUERRA, 2010).

Os biomarcadores são moléculas biológicas encontradas no sangue, em fluidos corporais e tecidos, que servem como indicadores de um processo normal ou anormal, ou de uma condição de doença. Os biomarcadores salivares da doença periodontal podem se originar tanto da bactéria quanto do hospedeiro. Conforme a periodontite progride, a inflamação gengival, a destruição do tecido mole e a destruição óssea ocorrem sequencialmente e liberam proteínas ou metabólitos associados na saliva (JI e CHOI, 2015).

Embora encontre vários desafios, o uso de saliva para diagnósticos baseados em fluido oral parece promissor para futura aplicação no diagnóstico das doenças periodontais e para avaliar o prognóstico e resultados do tratamento cirúrgico e não cirúrgico periodontal (GIANNOBILE *et al.*, 2014).

3.2 DOENÇA PERIODONTAL

As doenças periodontais são iniciadas e sustentadas por microrganismos do biofilme dental, esse pode compreender cerca de 150 espécies em um único indivíduo, sendo que aproximadamente 800 espécies já foram identificadas na placa bacteriana humana. A presença do biofilme isolado não é suficiente para o desenvolvimento da doença periodontal (DP), a doença ocorre quando há uma disbiose e reação imunológica exagerada do hospedeiro à presença microbiana. A suscetibilidade do indivíduo também influencia a evolução da doença, mudar da condição de gengivite que é reversível para uma periodontite, irreversível (KINAN *et al.*, 2017).

A prevalência das doenças periodontais é alta, podendo atingir até 90% da população mundial, sendo mais prevalente em indivíduos adultos. A forma mais branda da doença periodontal é a gengivite, uma condição inflamatória dos tecidos moles provocada pelo acúmulo de biofilme bacteriano tendo resposta imune frente esse biofilme. Contudo, a gengivite é

reversível e não atinge as estruturas de suporte subjacentes dos dentes. A periodontite ocorre após a gengivite em hospedeiros susceptíveis e é iniciada pela resposta imunológica e inflamatória do indivíduo e pode ter como pior resultado a perda de dentes nos adultos, podendo ser influenciado ainda por fatores genéticos e ambientais (PIHLSTROM e MICHALOWICZ, 2005).

A doença periodontal provoca uma sequência de alterações dos tecidos periodontais que resultam na perda de inserção e na destruição do osso alveolar. Em alguns, mas não em todos os pacientes, a história natural da doença periodontal causa a perda de um ou mais dentes. Contudo, a doença periodontal engloba um espectro mais amplo de doenças do que apenas a periodontite, e para o seu reconhecimento é importante que seja feito o diagnóstico, o quanto antes, para evitar efeitos danosos na saúde bucal do paciente. Desse modo, o diagnóstico clínico da doença periodontal é feito pela identificação de vários sinais e sintomas nos tecidos periodontais que anunciam a condição patológica (HIGHFIELD, 2009).

A periodontite é uma doença silenciosa, frequentemente subclínica, que pode afetar de forma negativa a alimentação, a estética e em especial a fala dos pacientes. Essas consequências ocorrem, pois, a perda de função causada pela ausência de dente prejudica a mastigação e, conseqüentemente a digestão que influencia a nutrição e a dieta do indivíduo. Esse efeito na nutrição desastrosa em alguns pacientes, devido a dentição não funcionar de forma correta pode ter impacto na sobrevivência e aumentando as visitas hospitalares e aparecimento de algumas morbidades (KINANE *et al.*, 2017).

Assim, a prevenção, diagnóstico e o tratamento da doença periodontal destinam-se ao controle do biofilme bacteriano e outros fatores de risco, na interrupção da progressão da doença e na tentativa de reparar o suporte dentário perdido durante o desenvolvimento da periodontite (PIHLSTROM e MICHALOWICZ, 2005).

3.3 RELAÇÃO DA SALIVA E A DOENÇA PERIODONTAL

A saliva pode ser coletada constantemente com o mínimo de incômodo possível para o paciente, isso ocorre por ela ser uma coleta simples, não invasiva e segura. Assim, uma ferramenta importante para diagnosticar a periodontite é usando a saliva que é considerada um fluido biológico perfeito. Existem vários parâmetros clínicos para detectar a periodontite, e uma sequência de biomarcadores favoráveis já foi encontrada na saliva, o que a torna promissor na detecção da doença periodontal (JI e CHOI, 2015).

A resposta do sistema imune do paciente e a reabsorção de osso alveolar, acionam alguns biomarcadores microbianos na saliva, sinalizando a presença de uma doença periodontal. Os biomarcadores salivares geralmente se referem a presença de inflamação, porém é possível encontrar moléculas que sinalizam doença periodontal através de processos de quebra do colágeno e remodelação óssea (KINNEY *et al.*, 2007).

Existem testes para diagnóstico de doença periodontal através da saliva, onde é feita uma coleta salivar e enviada para análise em laboratório, para investigar a reação em cadeia da DNA-polimerase, a fim de concluir diagnósticos e alertar sobre possíveis patologias subsequentemente. Em um dos testes é possível detectar o tipo e a quantidade de microorganismos patogênicos periodontais na saliva. No resultado laboratorial é visto todas as propriedades patogênicas, isso auxilia na decisão mais correta de tratamento para o paciente. Já no outro teste é possível constatar a probabilidade genética de ter periodontite (KIM *et al.*, 2013).

Existem testes realizados no momento do atendimento que são rápidos, reproduzíveis e baratos para detecção de biomarcadores para medir carga inflamatória. Esses testes são realizados com a triagem de pacientes com a doença periodontal e locais onde a doença está ativa, além de prever progressão, monitorar tratamento e manutenção periodontal (RATHNAYABE *et al.*, 2017).

3.4 BIOMARCADORES SALIVARES

De acordo com o *National Institutes of Health* (NIH), um biomarcador é um indicador que pode medir e avaliar com precisão os processos biológicos normais, processos patogênicos ou respostas farmacológicas à intervenção terapêutica. Em síntese, os biomarcadores são importantes dentro do corpo, pois são habilitados para identificação da fisiologia do paciente de forma imparcial (YOSHIZAWA *et al.*, 2013)

Algumas doenças sistêmicas têm sido identificadas na saliva, e assim se destacam alguns tipos de biomarcadores inflamatórios associados à doenças sistêmicas e orais, tal como as interleucinas-1 β , interleucina 6 e interleucina 8 (IL-1 β , IL-6 e IL-8), Fator de Necrose Tumoral-alfa (TNF- α) e Metaloproteínas de Matriz (MMP) -8 e -9. Desse modo, houve um crescimento no número de marcadores moleculares específicos para distintas doenças, como câncer oral e de mama, doenças cardiovasculares e vírus do HIV, e doenças periodontais também estão sendo identificados (RATHNAYAKE *et al.*, 2013).

Anticorpos, microorganismos, DNA, RNA, lipídios, metabólitos e proteínas estão incluídos na variedade de biomarcadores existentes. Modificações em sua organização, concentração, função ou ação são capazes de se relacionar ao início, progressão ou mesmo regressão de um transtorno específico ou mesmo mostrar a resposta do corpo a ele. A referência de biomarcador ou assinatura molecular apresenta uma série de biomarcadores seguros e específicos para certas doenças. A presença, a localização e até mesmo a probabilidade de doenças são úteis para determinar, compreender e avaliar a importância da assinatura do biomarcador de um indivíduo. Assim, os biomarcadores servem como instrumento vantajoso e atrativo na detecção, na análise de risco, diagnóstico, prognóstico e acompanhamento de algumas doenças (YOSHIZAWA *et al.*, 2013).

O campo da biologia molecular leva ao diagnóstico, à descoberta e à competência dos biomarcadores salivares na constatação de inúmeras doenças orais. Dessa maneira, os biomarcadores são as assinaturas moleculares e indicadores do processo biológico, patológico normal e do feedback farmacológica ao tratamento, logo, os biomarcadores salivares são capazes de oferecer informações úteis para a detecção, diagnóstico e prognóstico da doença periodontal (KHURSHID *et al.*, 2018).

3.4.1 Biomarcadores salivares na doença periodontal

Na identificação da doença periodontal os biomarcadores salivares podem ter origem tanto bacteriana quanto do hospedeiro. Assim, com a progressão da periodontite ocorrem algumas manifestações tais como: inflamação gengival, a destruição do tecido mole e a destruição óssea elas acontecem basicamente nessa ordem, e proporcionam a liberação de proteínas ou metabólitos ligados a saliva (JI e CHOI, 2015). Várias citocinas são secretadas como segmentos da resposta inata por células residentes (fibroblastos, células epiteliais) e neutrófilas em tecidos periodontais infectados (GUNCU *et al.*, 2015).

Inúmeras citocinas são liberadas por causa da resposta imune presentes nas células que estão no tecido periodontal infectado, entre elas a interleucina-1beta (IL-1 β), uma citocina indicativa de periodontite. Desse modo, o que é responsável por começar o processo de degradação da matriz extracelular que está relacionada à periodontite, são as MMP presentes no indivíduo. Inicialmente uma enzima que é concedida pelos neutrófilos que atuam na quebra de colágeno que é a MMP-8, ela tem uma enorme capacidade para ser um biomarcador da periodontite. Diversos estudos apontam que há um acréscimo na quantidade dessa enzima em

pacientes que apresentam a doença periodontal, se comparados com pacientes saudáveis. (LIMA *et al.*, 2020).

O acúmulo de proteínas e polipeptídeos presentes na saliva são importantes na preservação da saúde bucal e da homeostase, uma vez que o aumento da frequência e da gravidade da doença bucal geralmente pode estar relacionado a alterações quantitativas e qualitativas do proteoma da saliva (HEMADI e HUANG, 2017).

O biomarcador ideal para o diagnóstico da periodontite precisa apresentar algumas características, como: (1) diagnosticar a presença de doença periodontal, (2) refletir a gravidade da doença, (3) monitorar a resposta da doença ao tratamento e (4) prever o prognóstico / progresso da doença no paciente (JI e CHOI, 2015). Um biomarcador que teve excelente retidão diagnóstica para periodontite foi a proteína-1 alfa inflamatória de macrófago (MIP-1 α), e também duas leucinas, a interleucina-1 beta (IL-1 β) e a interleucina-6 (IL-6), mostraram valores para diagnósticos aceitáveis. Contudo, foi avaliado em único estudo um biomarcador considerado excelente, que é a Proteínas Inflamatórias Macrófagos (MIP-1 α) que aponta com maior precisão diagnóstica o fator salivar como chave do biomarcador. Já o IL-6 e IL-1 β são reconhecidos como biomarcadores principais com precisão diagnóstica aceitável para periodontite (SUKRITI *et al.*, 2019).

Desse modo, existem alguns desafios encontrados para o diagnóstico de doença periodontal, e os principais que utilizam a saliva como meio de coleta são três: (1) os testes atuais são baseados em um pequeno número de biomarcadores potenciais, (2) os testes não são avaliações em tempo real "verdadeira" e (3) os testes são intensos com base em citocinas microbianas e inflamatórias gerais que podem ou não ser particulares da doença. A bioinformática adequada precisa aumentar a conquista para que os biomarcadores validados detenham o poder de distinguir doenças orais, isso é importante para que a análise salivar para doenças periodontais seja clinicamente considerável. O teste avalia o estado periodontal do paciente instantaneamente durante o tempo em que ele está no consultório odontológico, e o teste precisa também ser em tempo real. Por fim, os biomarcadores precisam analisar os perigos da futura atividade da doença periodontal por meios compreensíveis e possíveis, não devendo diagnosticar unicamente a doença em si (KIM *et al.*, 2013).

Assim, alguns biomarcadores podem ter melhor precisão quando usados em combinação. A combinação de IL-1 β , IL-6 e MIP-1 α e IL-1 β , IL-6, MMP-8 e MIP-1 α foram apontados como grupos favoráveis na distinção entre gengivite e periodontite (SUKRITI *et al.*, 2019).

3.5 EXAMES DIAGNÓSTICOS

3.5.1 Diagnóstico clínico periodontal

Dentistas em geral procuram uma forma correta, segura e de preferência não invasiva de diagnosticar o estado atual da doença periodontal, e com isso acompanhar a resposta à terapia e verificar o grau de suscetibilidade à progressão futura da doença. As ferramentas de diagnóstico convencionais, como a profundidade de sondagem, sangramento na sondagem e nível de inserção clínica, são para identificar pacientes que estão em risco de progressão da doença (GUNCU *et al.*, 2015).

Modificações na gengiva indicam a presença de gengivite e/ou periodontite, como ao observar perda de inserção periodontal e presença bolsa periodontal na sondagem. É importante saber identificar as dimensões das bolsas periodontais, que podem ser verticais ou horizontais, além disso, deve-se ter uma atenção especial ao examinar possíveis lesões de furca. Outros fatores a serem avaliados no exame de diagnóstico são a mobilidade e deslocamento dos dentes (HIGHFIELD, 2009).

As classificações das doenças periodontais ainda se baseiam quase inteiramente nas avaliações clínicas tradicionais, apesar de uma maior compreensão da etiologia e patogênese das infecções periodontais. O diagnóstico periodontal é realizado considerando: 1) presença ou ausência de sinais clínicos de inflamação (por exemplo, sangramento na sondagem); 2) profundidades de sondagem; 3) extensão e padrão de perda de inserção clínica e osso; 4) históricos médicos e dentários do paciente; e 5) presença ou ausência de sinais e sintomas diversos, incluindo dor, ulceração e quantidade de placa e cálculo observáveis (ARMITAGE, 2003). As radiografias proporcionam uma técnica diagnóstica secundária e que conseguem comprovar a presença de perda óssea marginal, confirmando assim a perda de inserção dos elementos investigados (HIGHFIELD, 2009).

3.5.2 Diagnóstico microbiológico e enzimático

O diagnóstico salivar microbiano não é um conceito novo (YOSHIKAWA, *et al.* 2013). Vários patógenos periodontais específicos foram identificados na cavidade oral dos indivíduos (Ex.: *Tanarella forsythensis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Agregatibacter actinomycetemcomitans*), a justificativa para o uso da análise microbiana para o monitoramento da periodontite é direcionar os patógenos relacionados como a doença para

identificar doenças periodontais específicas; identificar susceptibilidade aos antibióticos de organismos que colonizam os locais doentes; prever atividade da doença. O objetivo do monitoramento é monitorar a doença e orientar o tratamento). No entanto testes microbianos falharam em prever a progressão da doença (TABBA, *et al.*, 2005)

As técnicas estudadas com o Ácido Desoxirribonucleico (DNA) e o Ácido Ribonucleico (RNA) são baseadas na aplicação de cruzamento do DNA com sucessões complementares de DNA ou RNA. Devido à alta sensibilidade e especificidade, é de suma importância esses testes na constatação de patógenos de difícil cultura, de microorganismos que constituem uma microbiota mista ou dos que se encontra em pequena quantidade, sendo a técnica mais sensível para a descoberta de patógenos periodontais. Contudo, ainda se torna clinicamente questionável, já que a identificação de um único patógeno não está imediatamente ligada a um exato diagnóstico, pois o mais comum é a associação de diversas espécies para o surgimento de sinais clínicos de doenças que envolvem o periodonto (LÓPEZ *et al.*, 2009).

Os testes de identificação microbiana não influenciam na tomada de decisão clínica, sendo assim o valor clínico do teste perde sua essência. Estratégias envolvendo além da identificação microbiana, a resposta do hospedeiro pode melhorar a capacidade do teste e prever doenças periodontais futuras (TABBA, *et al.*, 2005).

Diversas enzimas estão sendo utilizadas como biomarcadores na avaliação do avanço das doenças periodontais. A Aspartato aminotransferase (AST) é uma enzima que tem sido utilizada como marcador biológico no diagnóstico de diversas doenças humanas, como a necrose hepática, infarto do miocárdio e outros quadros agudos, crônicos ou necróticos. Os níveis de atividade enzimática estão ligados à destruição ativa do tecido do periodonto, já que está presente no citoplasma das células e é excretada na morte celular. Confirmando a possibilidade de diagnóstico de inflamação periodontal através dos níveis de AST. A Alanina Aminotransferase (ALT) é uma enzima citoplasmática e sua presença extracelular nos revela uma atividade de lesão celular do tecido. Assim, ocorre a evidência de um aumento da atividade de ALT no ligamento periodontal mediante à repetida renovação do tecido ou condições patológicas (WOŻNIAK *et al.*, 2019).

Enzimas, proteínas específicas e não específicas, anticorpos e outras substâncias estão entre os potenciais biomarcadores salivares de doenças periodontais e de certas doenças de tecidos afetados. E desse modo, a saliva se transformou no assunto importante entre os especialistas em proteômica, pesquisa da composição sequencial de proteínas individuais (PODZIMEK *et al.*, 2016). Os constituintes mais importantes de saliva são as glicoproteínas compreendendo as proteínas mucinais e as não mucinosas. Glicoproteínas macromoleculares

(mucinas) compõem aproximadamente 26% das proteínas salivares. As mucinas salivares efetuam um papel significativo na homeostase da cavidade oral, criando uma membrana adquirida, envolvendo os tecidos moles e duros que revestem a cavidade oral. A saliva mucinosa lubrifica as paredes da cavidade oral e alimento durante a mastigação, por isso sua importância no diagnóstico de várias doenças orais (CHOJNOWSKA *et al.*, 2018).

3.5.3 Diagnóstico imunológico

A saliva apresenta muitos marcadores de doenças que retratam o estado de saúde não só cavidade oral, mas também de todo o corpo. A maior parte dos marcadores de doenças estão presentes no sangue como anticorpos, interleucinas, marcadores de neoplasia, também estão presentes na saliva, ela também pode ser aplicada na detecção de algumas alterações patológicas precoces em humanos (por exemplo, vírus, infecções, doenças auto imunológicas, cânceres). A forma fácil, não invasiva e a coleta de amostra conveniente da saliva pode facilitar significativamente os processos bioquímicos e toxicológicos diagnosticados em crianças e adultos (CHOJNOWSKA *et al.*, 2018).

O desenvolvimento de testes diagnósticos é benéfico para o paciente, pois o uso de assinaturas periodontais para algumas doenças classificadas é feito com base no fenótipo do indivíduo. Organismos específicos do biofilme ou exposições às bactérias periodontopatogênicas pode ter a capacidade de afetar a inflamação dos tecidos locais em alguns pacientes via mudanças epigenéticas como resultado de hipermetilação do DNA dentro dos núcleos dos tecidos moles afetados ao longo do tempo em uma doença crônica como periodontite (GIANNOBILE *et al.*, 2014).

Os testes de Periodontite Pontuais (PoC) são complementares para exames clínicos e radiográficos através de biomarcadores específicos da doença na saliva. A saliva total inclui biomarcadores locais e sistêmicos, e isso aumenta a probabilidade de uso da saliva como meio de diagnóstico para doença periodontal (RATHNAYAKE *et al.*, 2017). Assim, o uso de diagnósticos POC que identificam a doença no contexto da interação hospedeiro-microorganismo provavelmente levará a terapias mais efetivas (GIANNOBILE *et al.*, 2014).

Alguns biomarcadores da doença aumentam a especificidade e a sensibilidade ao alcançar o diagnóstico e o prognóstico. A especificidade e a sensibilidade precisam ser julgadas quando se trata da utilidade da saliva testes de diagnóstico / rastreio em clínicas. A sensibilidade de um teste descreve sua capacidade de identificar adequadamente pacientes com a doença (RATHNAYAKE *et al.*, 2017). A interface biofilme-gengiva apresenta um ponto de vista

epidemiológico molecular que os fenótipos clínicos dos pacientes se equivalem aos fenótipos biológicos com base em anticorpos resposta, níveis de biofilme microbiano e local citocinas pró-inflamatórias (GIANNOBILE *et al.*, 2014).

O uso de alguns testes levou à evolução de um protótipo rápido, preciso e em tempo real para avaliação de múltiplas doenças, incluindo doença periodontal. *Novel technologies* como lab-on-a-chip- e dispositivos microfluídicos têm a capacidade para gerenciar fluidos orais complexos como saliva e fluido das fendas gengivais, que determina em um paciente periodontal o perfil de risco de doença, atividade de doença atual é suscetível a intervenções terapêuticas. Esta conduta deve acelerar a tomada de decisão clínica e monitoramento da progressão da doença episódica em umas doenças infecciosas crônicas como a periodontite (GIANNOBILE *et al.*, 2009). Os testes imunológicos rápidos usados para diagnóstico periodontal são:

1. Aglutinação em látex

É uma técnica que utiliza amostras de biofilme subgengival e mistura em uma suspensão de fragmentos de látex revestidos com determinados anticorpos. Essa mistura causa uma reação com antígenos bacterianos e posteriormente é possível ver uma aglutinação em torno de 2 a 5 minutos. Um modelo desse método é a detecção de antígenos de *Porphyromonas gingivalis*; *Agregatibacter actinomycetemcomitans* e *Tannerella forsythus* em amostras de placa bacteriana (LÓPEZ *et al.*, 2009).

2. Elisa

É um teste que abrange a correlação de anticorpos aos condutos das placas de poliestireno que deverá conter antígenos bacterianos ou nas membranas incluídas no seu apoio para absorção. Essa correlação é sinalizada através de uma reação de cor, podendo ser analisada visualmente ou dimensionada por um espectrofotômetro, onde a cor quanto mais intensa, maior indicativo de quantidade de bactérias presentes na amostra. É possível obter uma identificação veloz e quantitativa de patógenos periodontais (VIANA *et al.*, 2006).

3. Imunoensaio de membrana

É um método que tem como finalidade a identificação clínica de patógenos periodontais, é coletada amostra do paciente e testada contra anticorpos exclusivos de três espécies: *P. intermédia*, *A. actinomycetemcomitans* e *P. gingivalis*. Os complexos antígeno-anticorpo formados na membrana de um poço são detectados pela adição de um segundo anticorpo marcado com enzima, junto com um substrato enzimático colorido. Os pontos separados indicam a presença de três espécies diferentes, enquanto a intensidade da cor indica o número relativo de bactérias. O teste indica resultados positivos ou negativos e pode ser realizado em 10 minutos. O limite de detecção para as três espécies varia entre 10⁴ e 10⁵ células bacterianas (LÓPEZ *et al.*, 2009).

3.6 TESTE SALIVAR RÁPIDO

O desenvolvimento de testes rápidos, sensíveis, precisos, reproduzíveis e baratos são necessários para serem aplicados clinicamente e detectar a doença periodontal (RATHNAYABE *et al.*, 2017). O objetivo do diagnóstico salivar é ser capaz de fornecer informações sobre o estado de saúde dos pacientes durante um check up regular. Um dos principais obstáculos é que muitos biomarcadores estão disponíveis em quantidade muito baixas na saliva, e a detecção é um desafio. Atualmente as pesquisas têm buscado criar dispositivos de ponto de atendimento (PoC) que permitirão resultados rápidos com mecanismos de detecção sensível (FUENTES, YAKOB & WONG, 2014).

Os testes rápidos exigem o mínimo de treinamento e recursos mínimos. No futuro, os dentistas serão capazes de rastrear pacientes em ambientes não odontológicos, permitindo tratamentos personalizados (GIANNOBILE, 2012). PerioSafe é um teste PoC baseado em um imunoenensaio de MMP-8 ativo para medir carga inflamatória da periodontite. Esse teste identifica e rastreiam locais e pacientes com periodontite, diferencia locais ativos, prevê a progressão da doença e pode ser utilizado para monitorar o tratamento, bem como a manutenção (RATHNAYAKE *et al.*, 2017).

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A saliva humana é um fluido biológico de fácil acesso e que abrange diversas substâncias relacionadas á doença periodontal, o que proporciona um meio potencial de diagnóstico. Assim, alguns pontos positivos da saliva é que ela tem uma fonte de informações clínicas relevantes, pois envolve biomarcadores específicos, que levam ao diagnóstico de doenças da cavidade oral ou sistêmicas. Ela apresenta também diversas vantagens como disponibilidade, baixo custo de coleta, métodos de coletas não invasivos, e possui um prático armazenamento. Desse modo, os compostos presentes na saliva são caracterizados por sua alta estabilidade.

A saliva tem potencial diagnóstico para doença periodontal alcançado por testes laboratoriais e ao lado da cadeira, coleta-se 5 ml do enxague bucal para detectar alterações de proteínas salivares, citocinas, marcadores imunológicos e presença de algumas bactérias periodonto patogênicas. Apesar da grande variedade de testes feitos por meio do fluxo salivar, não existe um que consiga de forma específica apresentar todas as características ideais, tornando assim, necessário uma avaliação do profissional para cada caso, selecionando o que se enquadre a diferentes situações. É interessante saber a quantidade de microorganismos capazes de induzir doença, para assim, clinicamente, o profissional conseguir interferir no desenvolvimento desses patógenos, evitando o surgimento ou reaparecimento de patologias.

Embora encontre vários desafios, o uso de saliva-diagnósticos baseados em fluido oral parece promissor para ajudar no diagnóstico das doenças periodontais e para prognosticar os resultados do tratamento periodontal. A saliva é relativamente segura para a sua coleta e isso pode diminuir o risco de propagação de várias doenças. Desse modo, a saliva oferece um meio não invasivo e uma maneira simples de auxiliar no diagnóstico de doenças orais e sistêmicas, e espera-se que com isso a saliva possa ser usada para fins de triagem, diagnóstico e prognóstico de diversas doenças.

REFERÊNCIAS

- ARMITAGE, G. A. Science and Therapy Committee of the American Academy of Periodontology. Diagnosis of periodontal diseases. **J.Periodontol.** v. 74, n. 8, p. 1237-47, Aug. 2003.
- CHOJNOWSKA, S.; BARAN, T.; WILIŃSKA, I.; SIENICKA, P.; CABAJ-WIATER, I.; KNAŚ, M. Human saliva as a diagnostic material. **Advances in Medical Sciences.** v. 63, p. 185-191, Mar. 2018.
- FUENTES, L.; YAKOB, T.; WONG, D.T.W. Emerging horizons of salivary diagnostics for periodontal disease. **British Dental Journal.** v. 217, p. 567-573. 2014.
- GIANNOBILE, W. V.; BEIKLER, T.; KINNEY, J.S. Salivary diagnostics for periodontal diseases. **The Journal of the American Dental Association – JADA.** v. 143 (Sulp. 10). p. 5-11. Sept. 2014.
- GIANNOBILE, W. V.; BEIKLER, T.; KINNEY, J.S.; RAMSEIER, C. A.; MORELLI, T.; WONG, D.T. Saliva as a diagnostic tool for periodontal disease: current state and future directions. **Periodontology 2000.** v. 50, 1, p.52-64. Apr. 2009.
- GÜNCÜ, G; YILMAZ, D; KÖNÖNEN, E; GÜRSOY, U.K Peptídeos antimicrobianos salivares na detecção precoce de periodontite. **Front Cell Infect Microbiol.** v. 5, n. 99, 2015.
- HEMADI, A.S; HUANG, R. Salivary proteins and microbiota as biomarkers for early childhood caries risk assessment. **Int J Oral Sci.** v. 9, n. 11, nov. 2017.
- HIGHFIELD, J. Diagnosis and classification of periodontal disease. **Australian Dental Journal.** sept. 2009.
- JI, S.; CHOI, Y. Point-of-care diagnosis of periodontitis using saliva: technically feasible but still a challenge. **Front Cell Infect Microbiol.** v. 3, n. 5, p.65. Sep. 2015.
- KHURSHID, Z.; ZAFAR, M. S.; KHAN, R.S.; NAJEEB, S.; SLOWEY, P. D. **Chapter Two - Role of Salivary Biomarkers in Oral Cancer Detection. **Advances in Clinical Chemistry.** v. 86, p. 23-7. July. 2018.

KIM, J. J.; KIM, C. J.; CAMARGO, P. M. Salivary biomarkers in the diagnosis of periodontal diseases. **J Calif Dent Assoc.** v. 1, n.2, p.119–124. Feb. 2013.

KINANE, D. F.; PANAGIOTA, G.; STATHOPOULOU & PANOS, N. P. Periodontal diseases. **Nature Reviews Disease Primers.** Jun. 2017.

KINNEY, J. S; RAMSEIER, C. A; GIANNOBILE, W.V. Oral Fluid–Based Biomarkers of Alveolar Bone Loss in Periodontitis. **ANNALS of the new york academy of sciences.** April. 2007.

LIMA, M.P.; DANTAS, V.F.; MENDES, J.L; COSTA NETO, R.E; LIMA JÚNIOR, J.A; SOUZA, S.L.X. Biomarcadores salivares no diagnóstico e no monitoramento de patologias orais e sistêmicas. **Rev Cubana Estomatol.** v. 57, n.1, may. 2020.

LÓPEZ, F.; CRUZ, M.; OVANDO, V.U.; CAMPILLO, C. M. Métodos de diagnóstico microbiológico en la enfermedad periodontal. **Cient Dent.** v. 6, n. 2, p. 93-101. 2009.

OLIVEIRA JÚNIOR, J. J.; GUERRA, R. N. M.; Biomarcadores imunológicos na saliva. **Rev. Ciênc. Saúde.** v.12, n.2, p.136-145. Jul-dez. 2010.

PALUSZKIEWICZA, C.; PIĘTA, E.; WOŹNIAK, M.; PIERGIES, N.; KONIEWSKAB, A.; ŚCIERSKIB, W.; MISIOŁEKB, M.; KWIATEK, W. M. Saliva as a first-line diagnostic tool: A spectral challenge for identification of cancer biomarkers. **Journal of Molecular Liquids.** v. 307. Jun. 2020. Author links open overlay pane.

PIHLSTROM, B. L.; MICHALOWICZ, B. S. Periodontal diseases. **ISSUE 9499.** v. 366, p. 1809-1820. Nov. 2005.

PODZIMEK, S.; VONDRACKOVA, L.; DUSKOVA, J.; JANATOVA, T.; BROUKAL, Z. Marcadores salivares para doenças periondontais e gerais. **Dis Markers.** Abr. 2016.

RATHNAYAKE, N.; ÅKERMAN, S.; KLINGE, B.; LUNDEGREN, N.; JANSSON, H.; TRYSELIUS, Y.; SORSA, T.; GUSTAFSSON, A. Salivary Biomarkers for Detection of Systemic Disease. **Plos One.** v. 24, April. 2013.

RATHNAYAKE, N.; GIESELMANN, D.R.; HEIKKINEN, A. M.; TERVAHARTIALA, T.; SORSA, T. Salivary Diagnostics—Point-of-Care diagnostics of MMP-8 in dentistry and medicine. **Diagnostics.** v. 7, n. 1. P. 7. Jan. 2017.

SUKRITI, K.C.; WANG, X. Z.; GALLAGHER, J.E. Diagnostic sensitivity and specificity of host-derived salivary biomarkers in periodontal disease amongst adults: Systematic review. **Journal of Clinical Periodontology Wiley**. Octob. 2019.

VIANA, A.C.; CALABRICHB, C. F. C.; ORRICO, S. R. P. Diagnóstico laboratorial da infecção periodontal. **Revista de Odontologia da UNESP**. v. 35, n. 2, p. 133-141. 2006.

WOŹNIAK, M.; PALUSZKIEWICZ, C.; KWIATEK, W. M. Saliva as a non-invasive material for early diagnosis. **Institute of Nuclear Physics, Polish Academy of Sciences**. v. 66, n. 4, p. 383-388. 2019.

YOSHIZAWA, J. M.; SCHAFER, C. A.; SCHAFER, J. J.; Farrell, J. J.; PASTER, B. J.; WONG, D. T. W. Salivary Biomarkers: Toward Future Clinical and Diagnostic Utilities. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 26, n. 4, p. 781–791. Oct. 2013.

ZHANG, C.Z.; CHENG, X. Q.; LI, J. Y.; ZHANG, P.; YI, P.; XU, X.; ZHOU, X. D. Saliva in the diagnosis of diseases. **Int J Oral Sci**. v. 3, n. 3, Sep. 2016.