

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA**

FELIPE ALMEIDA DE TOLEDO

**DETECÇÃO DE DIFERENTES MICRORGANISMOS NA PERIODONTITE
CRÔNICA, DA GLICOPROTEÍNA EMMPRIN (CD-147) E SUA CORRELAÇÃO
COM A PRODUÇÃO DE MMP-2 E MMP-9**

ARARAQUARA

2012

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA**

FELIPE ALMEIDA DE TOLEDO

**DETECÇÃO DE DIFERENTES MICRORGANISMOS NA PERIODONTITE
CRÔNICA, DA GLICOPROTEÍNA EMMPRIN (CD-147) E SUA CORRELAÇÃO
COM A PRODUÇÃO DE MMP-2 E MMP-9**

**Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Odontologia – Área de Periodontia da
Faculdade de Odontologia de Araraquara
para obtenção do título de Mestre em
Odontologia.**

**Orientadora: Prof^a Dr^a Denise Madalena
Palomari Spolidorio**

**ARARAQUARA
2012**

Toledo, Felipe Almeida de

Detecção de diferentes microrganismos na periodontite crônica, da glicoproteína emmprin (CD-147) e sua correlação com a produção de MMP-2 e MMP-9 / Felipe Almeida de Toledo. - Araraquara: [s.n.], 2012.

97 f. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia

Orientadora: Profa. Dra. Denise Madalena Palomari Spolidorio

1. Metaloproteinase da matriz 2. Candida albicans 3. Treponema denticola 4. Periodontite crônica 5. Reação em cadeia da polimerase.

I. Título

FELIPE ALMEIDA DE TOLEDO

**DETECÇÃO DE DIFERENTES MICRORGANISMOS NA PERIODONTITE CRÔNICA,
DA GLICOPROTEÍNA EMMPRIN (CD-147) E SUA CORRELAÇÃO COM A
PRODUÇÃO DE MMP-2 E MMP-9.**

COMISSÃO JULGADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE

Presidente e Orientador: Profa. Dra. Denise Madalena Palomari Spolidorio

2º examinador: Prof. Dr. José Eduardo Cezar Sampaio

3º examinador: Profa. Dra. Juliana Rico Pires

Araraquara, 23 de março de 2012

DADOS CURRICULARES

Felipe Almeida de Toledo

- Nascimento** 03 de outubro de 1985 – Aparecida – SP
- Filiação** Thércio Alaor de Toledo
Maria Bernardete de Almeida Toledo
- 2005-2008** Graduação em Odontologia
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP
- 2006-2008** Estágio de Iniciação Científica no Departamento de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo Facial e Periodontia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP

Orientador: Profa. Dra. Daniela Bazan Palioto
- 2007-2008** Bolsista FAPESP de Iniciação Científica (2006/06931-2)

Orientador: Profa. Dra. Daniela Bazan Palioto
- 2009-2011** Especialização em Periodontia

Escola de Aperfeiçoamento Profissional da Associação Paulista de Cirurgiões-Dentistas – São Paulo – SP
- 2010-2012** Pós-graduação em Odontologia – Mestrado em Periodontia

Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP

Dedico este trabalho...

Àqueles que mais amo:

Minha mãe, **Bernardete** e meu pai, **Thércio** que por amor dedicaram da vida os melhores momentos para tornar possível minha existência e a conquista de meus sonhos;

Minha irmã, **Fernanda**, pela companhia e amor que nos une a cada dia, me dando força a cada caminhada;

Agradecimentos

À minha orientadora Profa. Dra. Denise Madalena Palomari Spolidorio, pela amizade, orientação, disponibilidade e atenção dedicada durante esses dois anos de convivência acadêmica.

À Profa. Dra. Daniela Bazan Palioto, do Departamento de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo Facial e Periodontia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP, por ter me apresentado à Periodontia, abrindo as portas para que eu chegasse até o curso de Mestrado, pelo apoio, carinho e dedicação dispensada.

À Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, em nome do **Ilmo Sr. Diretor, Prof. Dr. José Cláudio Martins Segalla**, e da **Ilma Sra. Vice-Diretora, Profa. Dra. Andreia Affonso Barretto Montandon**, pela oportunidade de ganho profissional.

À Capes, pela concessão da Bolsa de Estudos.

Ao coordenador do curso de Pós-graduação – Área de Periodontia **Prof. Dr. Carlos Rossa Junior** e a todos os professores **Dr. Joni Augusto Cirelli, Profa. Dra. Rosemary Adriana Chiérici Marcantonio, Prof. Dr. Élcio Marcantonio, Prof. Dr. José Eduardo Cezar Sampaio, Profa. Dr. Silvana R P Orico, Prof. Dr. Luís Carlos Spolidorio, Profa. Dra. Raquel Mantuaneli Scarel Caminaga** pelos conhecimentos adquiridos.

A todos os **funcionários do Departamento de Diagnóstico e Cirurgia e Fisiologia e Patologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP**, em nome dos funcionários **Regina Lúcia, Zezé, D. Maria, Ester e Juliana Pirola** pelo carinho a mim dispensado.

Aos **funcionários da Biblioteca** da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, pela atenção e disponibilidade em auxiliar.

Aos **funcionários da Seção de Pós-graduação**, da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, **em especial a Mara**, pela amizade, carinho e dedicação em nos auxiliar.

Aos meus amigos companheiros de turma de Mestrado: **Fabiana Alves Paula, Fausto Frizzera Borges Filho, Fernanda Regina Godoy Rocha, Giovana Anovazzi, Livia Sertori Finoti, Luiz Guilherme Freitas de Paula, Marcell Costa de Medeiros, Pablo Ramalho Lucas, Rafael Scaf de Molon e Sabrina Cruz Tfaile Frasnelli**, pela amizade, pelas experiências compartilhadas, pela cumplicidade e pelos bons momentos de convivência durante todo o curso. Especialmente à minha melhor amiga **Fabiana Alves Paula (Fabi)**, pelo convívio diário, compartilhando todos os momentos desta longa jornada, sempre ao meu lado, me fazendo com toda certeza uma pessoa mais feliz.

Às meninas do laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular do Departamento de Fisiologia e Patologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, **Amanda Fontana, Marília Ferreira Correia, Marianne Nicole Marques Nogueira e Telma Blanca Lombardo Bedran**, pela amizade e colaboração neste trabalho.

A todos os **colegas e amigos de Pós-graduação**, da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, em especial, a **Luana Carla Pires e João Paulo Steffens**, pelos bons momentos de convivência.

À **minha querida mãe**, por sempre me apoiar, me escutar e compartilhar todos os momentos desta etapa de minha vida.

À **minha tia Dulce e meus primos, Camila e Paulo Renato**, por sempre me receberem com tanto carinho em sua casa em Guaratinguetá.

À **minha amiga Pâmela Aparecida Diniz**, pela orientação estatística e disponibilidade.

À toda minha família e amigos, que sempre torceram por mim.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

"O valor das coisas não está no tempo em que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis".

Fernando Pessoa

SUMÁRIO

Lista de Tabelas	14
Resumo	13
Abstract	15
1 Introdução	17
2 Revisão da Literatura	20
2.1 Métodos de Identificação Microbiana	20
2.2 <i>Filifactor alocis</i>	21
2.3 <i>Prevotella tannerae</i>	22
2.4 <i>Treponema denticola</i>	23
2.5 <i>Candida albicans</i>	24
2.6 EMMPRIN (CD-147)	26
2.7 Metaloproteinases de matriz (MMPs)	27
3 Proposição	34
4 Material e método	35
4.1 Perfil da amostra	35
4.2 Adequação do meio bucal	37
4.3 Exame clínico	37
4.4 Análise microbiológica	39
4.4.1 Coleta das amostras	39
4.4.2 Preparo das Cepas padrão	39
4.4.3 Preparo das amostras coletadas	40
4.4.4 Reação em Cadeia da Polimerase semi-quantitativo	41
4.4.5 Otimização das reações	42
4.5 Análise Imunológica	43
4.5.1 Coleta das amostras	43

4.5.2 EMMPRIN	44
4.5.3 MMP-2 e MMP-9	46
4.6 Tratamento Periodontal Básico	47
4.7 Análise Estatística	48
5 Resultado	50
5.1 Padronização da metodologia	50
5.2 Identificação microbiana	51
5.3 Quantificação de EMMPRIN (CD-147)	53
5.4 Quantificação de MMPs por ELISA	54
5.5 Correlação entre EMMPRIN e MMP-2 e MMP -9	56
6 Discussão	57
7 Conclusão	70
8 Referências	71
9 Apêndice	90
10 Anexos	93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Expressão de Metaloproteinase pelos 5 principais tipos celulares	31
Tabela 2 - Oligonucleotídeos para a identificação das espécies avaliadas	42
Tabela 3 - Coquetel imunológico	44
Tabela 4 - Condições de termociclagem e otimização de cada par de primer	50
Tabela 5 - Prevalência dos microrganismos nos grupos doente e sadio	53
Tabela 6 - Correlação entre EMMPRIN e MMP-2	56
Tabela A1 - Especificações de concentração do antígeno e DO para a curva padrão do ELISA - EMMPRIN (CD-147)	90
Tabela A2 - Especificações de concentração do antígeno e DO para a curva padrão do ELISA - MMP-2	91
Tabela A3 - Especificações de concentração do antígeno e DO para a curva padrão do ELISA - MMP-9	91

Toledo FA. Detecção de diferentes microrganismos na periodontite crônica, da glicoproteína EMMPRIN (CD-147) e sua correlação com a produção de MMP-2 e MMP-9 [dissertação mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2012.

Resumo

A periodontite é uma doença infecciosa caracterizada pela secreção de uma variedade de mediadores inflamatórios que levam a destruição dos tecidos de suporte dental, incluindo o osso alveolar e possível perda dos dentes, em associação com a infecção por múltiplas espécies de bactérias gram-negativas. Estima-se que mais de 400 espécies microbianas colonizam o biofilme dental e algumas das espécies bucais relacionadas à doença periodontal apresentem-se no biofilme subgengival incluindo *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*. Entretanto, outros microrganismos podem também estar relacionados a patologia desta doença, como *Filifactor alocis*, *Prevotella tanneriae* e *Candida albicans*. Estes microrganismos juntamente com seus subprodutos como as endotoxinas liberadas no meio extracelular levam ao estímulo da glicoproteína Indutora de Metaloproteinases (EMMPRIN-CD147) a qual estimula a liberação de metaloproteinases da matriz (MMPs) pelas células do hospedeiro, por exemplo, fibroblastos e células endoteliais levando assim a destruição tecidual. Com o objetivo de detectar novos patógenos relacionados à doença periodontal como *F. alocis*, *P. tanneriae*, *C. albicans* e *T. denticola* e também avaliar a glicoproteína EMMPRIN (CD- 147) e sua correlação com MMP-2 e MMP-9 em amostras de fluido subgengival de pacientes com periodontite crônica, foram coletadas amostras de fluido subgengival de sítios sadios e doentes de 20 indivíduos com periodontite crônica antes do tratamento periodontal básico, e após um período de 60 dias do tratamento foi realizada nova coleta de sítios sadios e doentes. Os respectivos DNAs foram extraídos e trechos do gene 16S foram amplificados e posteriormente realizados PCR convencional

para a análise microbiológica dos microrganismos em estudo. Para a análise imunológica e quantificação de EMMPRIN-CD147, MMP-2 e MMP-9 foi utilizado a técnica de ELISA-Sanduiche. Os resultados demonstraram que o grupo doente mostrou valores significativamente elevados de *T. denticola*, *F. alocis* e *P. tanneriae* quando comparado com sítios sadios. MMP-2 e MMP-9 foram detectados em concentrações elevadas, com redução estatisticamente significativa após o tratamento periodontal para MMP-2 e sem correlação com EMMPRIN.

Palavras-chave: Metaloproteinase de matriz. *Treponema denticola*. *Candida albicans*. Periodontite crônica. Reação em cadeia da polimerase.

Toledo FA. Detection of different microorganisms in chronic periodontitis, glycoprotein EMMPRIN (CD-147) and its correlation with production of MMP-2 and MMP-9 [dissertação mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2012.

Abstract

Periodontitis is an infectious disease characterized by the secretion of a variety of inflammatory mediators that lead to destruction of tooth supporting tissues, including the possible loss of alveolar bone and teeth, in association with infection with multiple species of gram-negative bacteria. It is estimated that more than 400 species of microorganisms colonize the biofilm and some oral species related to periodontal disease is present in the subgingival including *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* and *Treponema denticola*. However, other organisms may also be related to pathology of this disease, as *Filifactor allocis*, *Prevotella tanneriae* and *Candida albicans*. These microorganisms along with subproducts such as endotoxins released into the extracellular lead to the stimulation of metalloproteinase inducer glycoprotein (EMMPRIN, CD-147), which stimulates the release of MMPs by host cells, like fibroblasts and endothelial cells, thus leading to tissue destruction . The objective of this study was to detect new pathogens related with periodontal disease such as *F. allocis*, *P. tanneriae*, *C. albicans*, *T. denticola* and also the glycoprotein EMMPRIN (CD-147) and its correlation with MMP-2 and MMP-9 in subgingival fluid samples of patients with chronic periodontitis. Fluid were collected from healthy and disease subgingival sites of 20 healthy individuals with chronic periodontitis before basic periodontal treatment, and after a period of 60 days of treatment was performed new collection of healthy and diseased sites. Their DNAs were extracted and portions of the 16S gene were amplified and subsequently performed conventional PCR for the microbiological analysis of the microorganisms this study. For immunological analysis and quantification of EMMPRIN (CD-147),

MMP-2 and MMP-9 was used ELISA-Sandwich. Results demonstrated that the disease group showed significantly high amounts of *T. denticola*, *F. alocis* and *P. tanneriae* when compared with health sites. MMP-2 and MMP-9 were detected in high concentrations with statistically significantly reduction after periodontal treatment to MMP-2, but without correlation with EMMPRIN.

Keywords: Matrix metalloproteinase. *Treponema denticola*. *Candida albicans*. Chronic Periodontitis. Polymerase Chain Reaction.

1 Introdução

A periodontite é uma doença infecciosa de patogênese complexa que se caracteriza clinicamente pela destruição dos tecidos de suporte do dente, podendo evoluir até a perda dentária, e que possui como fator etiológico local o biofilme dental. Este biofilme e as respostas associadas ao hospedeiro estão envolvidos na patogênese da doença periodontal (Bordador et al.¹⁵, 2000; Gomes et al.³³, 2008; Guiver et al.³⁵, 2001; Laugisch et al.⁶¹, 2012; Moore et al.⁶⁸, 1994; Roças et al.⁸⁵, 2009).

Um importante passo para compreender a patogênese da periodontite e qualquer outra doença infecciosa causada por uma microbiota variada é obter descrições detalhadas das diversas espécies envolvidas (Genco et al.³², 1996; Huse et al.⁴³, 2008). Com isso o diagnóstico microbiológico baseado em cultura bacteriana ou técnicas de biologia molecular tornam-se ferramentas de grande valia no estudo e na compreensão dos microrganismos envolvidos na patogênese da doença periodontal (Paster et al.⁷⁸, 2001). Os periodontopatógenos são microrganismos gram-negativos anaeróbios restritos e facultativos e o *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* e *Tanerella forsythia*, são as principais espécies bacterianas associadas à doença periodontal, possuindo importante papel dessa patogênese (Hanazawa et al.³⁹, 1985; Huse et al.⁴³, 2008; Lauer-Fields et al.⁶⁰, 2003; Paster et al.⁷⁸, 2001).

Diversos estudos tem demonstrado a presença de novas espécies associados às doenças periodontais e estes microrganismos ainda necessitam serem melhor estudados a fim de se verificar a sua relação com essa patologia (Kerkela et al.⁵⁴, 2003; O'Shea et al.⁷⁴, 1992). Dentre esses patógenos, o *Filifactor alocis* e *Prevotella tanneriae* foram inicialmente encontrados em infecções originárias da polpa, sendo posteriormente também isolados de bolsas periodontais e outros sítios da cavidade bucal. Assim permanece uma lacuna para determinar sua prevalência e real papel na periodontite (Allen⁵, 1992; Chang et al.¹⁹, 2002; Kanekura et al.⁵², 2000) sendo que esses microrganismos poderiam estar significativamente associadas com a doença periodontal por encontrarem-se em maiores concentrações em sítios doentes quando comparados à sítios sadios (Chang et al.¹⁹, 2002).

A presença de endotoxinas relacionadas aos microrganismos no sulco gengival desencadeia o estímulo das células do hospedeiro na produção de algumas glicoproteínas, que podem estar relacionadas com a reabsorção óssea, como o indutor de metaloproteinases (EMMPRIN-CD147) (Alexander et al.⁴, 1996; Eick et al.²⁴, 2002; Nehme et al.⁷², 1993; Samaranayake et al.⁸⁸, 2002). O EMMPRIN é uma molécula membro da super família das imunoglobulinas descrito por Biswas¹³ (1982) e que pode promover a expressão e ativação de metaloproteinases (MMP) (Chang et al.¹⁹, 2002), que são enzimas relacionadas à degradação de matriz

extracelular em processos fisiológicos e patológicos, sendo consideradas as principais responsáveis pela perda tecidual característica da doença periodontal.

Com o aprimoramento de técnicas moleculares, os conhecimentos sobre a etiopatogênese de várias doenças, avançam de forma rápida, e conseqüentemente os diagnósticos ganham notáveis reforços permitindo traçar melhores protocolos de tratamentos para as mais variadas patologias que envolvem o estudo da doença periodontal (Barbosa e Silva et al.¹⁰, 2006; Iacono et al.⁴⁴, 2007; Jalava et al.⁴⁵, 1999; Reynolds et al.⁸⁴, 1994; Siqueira-Júnior et al.⁹⁸, 2000).

A análise da literatura disponível demonstra uma preocupação constante dos pesquisadores em ampliar os conhecimentos que envolvem o estudo da doença periodontal relacionado aos microrganismos, contribuindo para um maior entendimento desse processo levando assim, os pesquisadores a ampliar os estudos nessa área de atuação.

2 Revisão da Literatura

2.1 Métodos de Identificação Microbiana

A doença periodontal consiste em uma infecção, que difere das demais patologias por ser acometida por uma variedade de microrganismos, particularmente anaeróbios gram-negativos (Dymock et al.²³, 2006; Garlet et al.³¹, 2006; Nonnenmacher et al.⁷³, 2004). Dentre as principais espécies encontram-se o *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola* os quais podem ser identificados nos estados de saúde e doença periodontal.

Técnicas de biologia molecular têm sido ferramentas de grande valia para pesquisadores no intuito de detectar espécies de difícil cultivo ou não cultiváveis e servem de apoio na etiologia das pesquisas e tratamentos clínicos para a seleção do tratamento periodontal básico e complementar. Assim o avanço nos métodos diagnósticos e desenvolvimento de técnicas de biologia molecular, permitem um melhor entendimento sobre o papel desses novos microrganismos na patogênese da doença periodontal (Barbosa e Silva et al.¹⁰, 2006).

Um método de identificação microbiana rápida e confiável é útil para associar organismos específicos com doença periodontal. As técnicas de identificação microbiana periodontal incluem cultura, métodos de diagnósticos moleculares. Entretanto, métodos de cultura

são demorados, caros e o crescimento de alguns microrganismos pode ser falho.

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) oferece um método de detecção altamente sensível e específico para as bactérias em amostras biológicas (Ashimoto et al.⁸, 1996). O PCR tornou-se uma importante ferramenta de diagnóstico microbiológico, por ser um método rápido, sensível e específico na detecção de microrganismos. Baseia-se na detecção de sequências específicas de DNA e consegue distinguir espécies bacterianas semelhantes, como *Prevotella intermedia* e *Prevotella nigrescens*. O método de PCR convencional é efetivo na detecção de microrganismos de difícil cultivo e detecta seres viáveis como não viáveis. Porém, pode não ser capaz de detectar microrganismos em baixas quantidades (Moore et al.⁶⁹, 1994).

2.2 *Filifactor alocis*

A periodontite é uma infecção bacteriana crônica inflamatória que leva à destruição do ligamento periodontal e do osso de suporte ao dente. Sua etiologia tem sido um campo vasto de pesquisa nos últimos tempos de modo que a bolsa periodontal é capaz de acomodar um grande número de patógenos, de modo que, é difícil diferenciar entre bactérias comensais e patógenos verdadeiros.

Nas últimas décadas, a pesquisa científica detectou um número crescente de espécies bacterianas no biofilme subgengival e outros habitats da cavidade oral humana (Dymock et al.²³, 2006).

Filifactor alocis foi isolado pela primeira vez em 1985 a partir do sulco gengival humano como *Fusobacterium alocis* e posteriormente reclassificado como *Filifactor alocis* (Haffajee et al.³⁸, 1992). É um microorganismo gram-positivo, obrigatoriamente anaeróbio, porém seus mecanismos de patogenicidade não são muito bem reconhecidos. Foi descoberto em pacientes que sofrem de periodontite crônica generalizada por Paster et al.⁷⁸, 2001. *F.alocis* foi detectado em número elevado em pacientes com deterioração periodontal em comparação com pacientes com condições periodontais estáveis, sendo assim, proposto como um potencial marcador para a doença periodontal ativa (Kerkela et al.⁵⁴, 2003; Stingu et al.¹⁰⁵, 2012).

2.3 *Prevotella tanneriae*

O desenvolvimento de técnicas de isolamento de espécies bacterianas possibilitou a identificação de novas espécies ou de novas nomeações. O gênero *Prevotella* é composto em sua maioria por microrganismos sacarolíticos pigmentados, possuindo 7 espécies (*P. corporis*, *P. intermedia*, *P. denticola*, *P. loescheii*, *P. melaninogenica*), e as duas novas espécies *P. nigrescens* e *P.tanneriae* foram descritas por Jousimies-Somer et al.⁴⁹, 1997.

Prevotella tannerae obtido do fluido gengival humano é um microrganismo obrigatoriamente anaeróbio, não-formador de esporos, sem mobilidade, gram-negativo, apresenta-se em forma de bastonete, fermentador de carboidratos e produtor de ácido succínico e acético. Algumas cepas de *Prevotella tannerae* produzem colônias que apresentam pigmento preto e que crescem obrigatoriamente em ágar-sangue (McAvin et al.⁶⁴, 2001).

2.4 *Treponema denticola*

O gênero *Treponema* são microrganismos espiroquetas helicoidais, móveis e gram-negativo. O *Treponema denticola* é uma espécie periodontopatógena explícita pertencente ao complexo vermelho. Este complexo é de particular interesse, pois está associado ao sangramento à sondagem periodontal, um importante parâmetro das doenças periodontais destrutivas (Nonnenmacher et al.⁷³, 2004). Portanto, relacionado à destruição tecidual característica da doença periodontal. Estritamente anaeróbio, sendo o periodontopatógeno mais sensível ao oxigênio. Seu sítio ecológico primário é o biofilme subgengival, vilosidades da língua e tonsilas. Possui a capacidade de invadir tecidos e de se coagregar com o *Porphyromonas gingivalis* e *Fusobacterium nucleatum*, sendo, portanto, um microrganismo com importância na progressão da doença periodontal.

A capacidade dessa espécie de percorrer ambientes viscosos possibilita que migrem pelo fluido crevicular gengival e penetrem no epitélio e tecido conjuntivo. Alguns espiroquetas possuem a capacidade de degradar o colágeno e até mesmo a dentina. O *Treponema denticola* produz enzimas proteolíticas, que podem destruir as imunoglobulinas (IgA, IgM, IgG). É também associado à etiologia da periodontite crônica, periodontite agressiva, gengivite ulcerativa necrosante e gengivite associada ao sistema endócrino.

2.5 *Candida albicans*

Os fungos são seres uni ou multicelulares que habitam diversos ecossistemas, sendo classificados como Reino *Fungi* (Simonson,⁹⁶ 1992). O Reino *Fungi* é responsável por abrigar uma vasta diversidade de espécies; no entanto, poucas dessas espécies produzem doença em seres humanos. Entre os principais patógenos fúngicos estão as espécies de leveduras do gênero *Candida*. Essas espécies podem causar diversas doenças, que variam de infecções mucosas superficiais, até infecções invasivas potencialmente fatais.

Este gênero é composto por cerca de 150 espécies de leveduras, das quais algumas apresentam importância médica, incluindo *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. kefyr*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii* e *C. dubliniensis* (Boutaga¹⁶, 2007).

C. albicans é a espécie mais frequentemente isolada do organismo humano, tanto como microrganismo comensal como

patógeno oportunista (Boutaga¹⁶, 2007). Infecções causadas por *C. albicans* também estão associadas a pacientes em tratamento com quimioterápicos, antibióticos de amplo espectro e corticosteróides, deficiência na imunidade celular, transplantes, uso de cateter venoso, respiração bucal, uso de próteses totais e aparelhos ortodônticos, entre outros (Alexander et al.⁴, 1996).

Esta espécie tem sido considerada importante patógeno, principalmente por viver como comensal e causar infecções em vários grupos populacionais humanos e em diferentes sítios anatômicos, cadaqual com suas condições ambientais distintas (Pinheiro et al.⁸¹, 2003).

Quando coloniza superfícies epiteliais, *C. albicans* encontra-se na forma leveduriforme. Ambientes favoráveis como fluido crevicular gengival e bolsas gengivais, promovem desenvolvimento de hifas e tubos germinativos, os quais possuem habilidade em penetrar no tecido hospedeiro levando a inflamações (Huse et al.⁴³, 2008).

Na cavidade oral, *Candida albicans* coloniza a língua, palato e mucosa bucal e pode ocorrer na placa subgengival de adultos com periodontite crônica. No estudo de Reynaud et al.⁸³ 2001, a prevalência de indivíduos examinados com *Candida* em bolsas periodontais foi em torno de 15,6%. *Candida albicans* também pode contribuir com o desenvolvimento de doença periodontal necrosante em pacientes portadores de HIV (Murray⁷⁰, 2001).

2.6 EMMPRIN (CD-147)

CD-147 é uma proteína de membrana amplamente expressa no plasma e que tem implicação em uma variedade de atividades fisiológicas e patológicas. É mais conhecido por sua capacidade de funcionar como indutor de metaloproteinases da matriz extracelular, vindo daí seu outro nome para essa proteína, EMMPRIN, mas também tem sido demonstrado que essa proteína tem a capacidade de regular a expressão de linfócitos e atuar na espermatogênese (Siqueira-Júnior et al.⁹⁸, 2011).

EMMPRIN tem sido caracterizada sob uma variedade de nomes em diferentes espécies: antígeno OX-47 e CE9 em ratos (Feres et al.²⁸, 2001; Montagner et al.⁶⁷, 2012), GP42 e basigina em camundongos (Altruda et al.⁶, 1989; Laugisch et al.⁶¹, 2012). Em seres humanos, esta proteína foi descoberta por Biswas et al.¹⁴ 1995, como fator estimulante de colagenase de células derivadas de tumor. Mais tarde verificou-se que o CD147 se expressa não só sobre o câncer, mas também sobre as células normais (Biswas¹³, 1982; Dahlén et al.²⁰, 2006), em diferentes tipos celulares, incluindo células hematopoiéticas, células epiteliais e endoteliais (Dahlén et al.²⁰, 2006). É uma proteína de cadeia longa de aminoácidos com uma massa molecular estimada entre 44 a 66 kDa (Emingil et al.²⁵, 2008).

Sua expressão desencadeia a produção e secreção de grandes quantidades de MMPs por fibroblastos e células endoteliais. Altos níveis de EMMPRIN solúvel em fluido gengival foram associados a

graves níveis de inflamação periodontal, sendo mais encontrado em sítios que apresentam gengiva inflamada do que na gengiva saudável (Emingil et al.²⁵, 2008).

Emingil et al.²⁶ 2006, avaliaram a expressão de MMP-7 e EMMPRIN em amostras de fluido crevicular de pacientes com diferentes tipos de doença periodontal e sugeriram que EMMPRIN estaria relacionado com o aumento da severidade da doença periodontal e que esta molécula pode estar associada com a regulação e progressão desta doença.

Curiosamente, terapias periodontais que resultem em melhoria de parâmetros clínicos estão associados a níveis reduzidos de EMMPRIN em fluido gengival crevicular. Para fornecer mais apoio ao papel do EMMPRIN na periodontite, Liu et al.⁶² 2010, estudaram periodontite induzida por ligaduras em ratos e demonstraram que a expressão de EMMPRIN é dependente da inflamação correlacionada com a perda de osso alveolar e degradação de fibras colágenas.

2.7 Metaloproteinases de matriz (MMPs)

A matriz extracelular é constituída por um complexo, em proporções variáveis, de inúmeras proteínas fibrosas (colágeno e elastina) embebidas em um gel hidrofílico de polissacarídeos, que se organizam formando uma rede, em parte responsável pela grande diversidade morfológica, funcional e patológica dos diversos tecidos. A quantidade de matriz é variável com o tipo de tecido, sendo

abundante principalmente nos tecidos conjuntivos. Além de servir como suporte para as células, a matriz extracelular exerce influência no desenvolvimento, migração, proliferação, forma e funções metabólicas das células (Jervøe-Storm et al.⁴⁷, 2005).

As metaloproteinase de matriz (MMPs) influenciam diversos processos fisiológicos e patológicos, incluindo aspectos do desenvolvimento embriogênico, morfogênese tecidual, processo de reparo e doenças inflamatórias. MMPs compreendem um grupo de contínuo crescimento de enzimas proteolíticas dependentes de zinco e cálcio divididas de acordo com a especificidade do substrato. Assim, subdividem-se em collagenases (MMP-1/ collagenase de fibroblastos, MMP-8/collagenase de neutrófilos, MMP-13 e MMP-18); estromelinas (MMP-3, MMP-10 e MMP-11); gelatinases (MMP-2/A e MMP-9/B); matrilisina (MMP-7 e MMP-26), metaloproteinases tipo membrana (MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17, MMP-24 e MMP-25) e outros (MMP-20/ Enamelisina, MMP-12/ elastase de macrófagos (Birkedal-Hansen et al.¹¹, 1993).

As metalopoteinases são expressas por diversas células estromais em respostas a estímulos, como também, pela maioria das células inflamatórias que invadem o tecido durante eventos de remodelamento in vivo (Birkedal-Hansen et al.¹¹, 1993).

O conhecimento de sua estrutura terciária é crucial para o completo entendimento de suas propriedades funcionais e associações com disfunções.

Gelatinases A e B, MMP-2 e MMP-9 respectivamente, são distinguidas pela inserção de três repetições cabeça-cauda ricas em cisteína, em seus domínios catalíticos. A atividade da gelatinase A foi observada no tecido sinovial reumatóide por Harris e Krane, em 1972, que em retrospecto, era possivelmente a MMP-2. A atividade da gelatinase foi separada da colagenase-1 e da estromelisina -1, em meio de cultura de osso de coelho sendo denominada como gelatinase A com 72 kDa. A seqüência da MMP-2 inclui um domínio com uma tripla repetição de fibronectina tipo II inserida no seu domínio catalítico, contribuindo para a ligação da enzima ao substrato da gelatina. Isto faz da MMP-2 uma das metaloproteinases com estrutura mais longa (Miyachi et al.⁶⁶, 1990).

Outra gelatinase, em leucócitos polimorfonucleares, foi descrita por Sopata et al.¹⁰¹ 1974. Uma enzima similar encontrada em macrófagos de coelhos era capaz de digerir o colágeno tipo V, permitindo uma designação inicial de colagenase tipo V. A atividade da colagenase e da gelatinase de neutrófilos foi separada, as enzimas purificadas e caracterizadas seguindo a seqüência de cDNA. Gelatinase B, ou MMP-9, estruturalmente, é a maior das gelatinases, incluindo três domínios de fibronectina e um domínio colagênico tipo V. O peso molecular de cerca de 92 kDa permitiu outra designação: gelatinase B 92 kDa (Miyachi et al.⁶⁶, 1990).

As MMPs são sintetizadas como zimogênios inativos que requerem ativação. Posteriormente, mostrou-se a existência de

inibidores endógenos de MMPs, chamados inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs) (Nagase et al.⁷¹, 2006). Existem ainda MMPs com perfil próprio de expressão, localização na superfície celular, ativação, inibição e degradação, bem como espectro de substratos preferenciais.

A multiplicidade das MMPs com funções distintas e às vezes sobrepostas, provavelmente atua como uma proteção contra qualquer perda de controle regulatório.

Entre outras atividades, as MMPs são enzimas responsáveis pela degradação das fibras colágenas inseridas na raiz dentária, permitindo a migração apical e a extensão lateral do epitélio da bolsa periodontal. A seqüela clínica do aumento patológico da destruição do colágeno é a perda de inserção e formação da bolsa periodontal (Ryan et al.⁸⁶, 2000).

Cada um dos principais tipos celulares do tecido periodontal de humanos é capaz de expressar um grupo de MMP quando devidamente estimulados, como demonstra a Tabela 1. Além disto, diferentes tipos celulares expressam diferentes grupos de MMP e diferentes citocinas geram diferentes efeitos na mesma célula. Entretanto, diferentes tipos celulares não necessariamente responderão da mesma maneira a uma determinada citocina. Em função disto, e das várias interações sinérgicas e antagônicas que existem entre duas ou mais citocinas, parece que diferentes infiltrados inflamatórios podem variar consideravelmente no que se

refere ao potencial destrutivo (Reynolds et al.⁸⁴, 1994; Séguier et al.⁹², 2000). Este fato pode ser a chave para entender porque a inflamação gengival pode ou não evoluir para a destruição tecidual e perda de inserção (Birkedal-Hansen et al.¹², 2008).

Apesar das diferenças com relação às taxas de hidrólise de colágeno entre as diferentes MMPs, os sítios de hidrólise no colágeno têm sido determinados para várias MMPs e ocorrem na mesma região do colágeno intersticial. De qualquer forma três aspectos devem ser considerados para a atividade colagenolítica: a habilidade de ligar-se ao colágeno eficientemente, a habilidade de desenrolar a tripla hélice e a habilidade de clivar as tiras individuais da tripla hélice (Lauer-Fields et al.⁶⁰, 2003).

Tabela 1 - Expressão de Metaloproteinase pelos 5 principais tipos celulares

Leucócito	MMP-8, MMP-9
Fibroblasto	MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-11
Queratinócito	MMP-1, MMP-2, MMP-9, MMP-10
Macrófago	MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9
Célula endotelial	MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9

MMP-2 e MMP-9 tem despertado interesse por ser encontrada em várias doenças inflamatórias como periodontite, bronquite, asma e artrite. Destacam-se juntamente com a MMP-8 por serem predominantemente presentes no tecido gengival inflamado, saliva e fluido sulcular e perimplantar. O nível e grau de ativação destas enzimas parece aumentar com o aumento da atividade e gravidade

da doença periodontal e diminuir em seguida ao tratamento com raspagem e alisamento radicular (Lauer-Fields et al.⁶⁰, 2003).

Os colágenos tipo I e III produzidos pelos fibroblastos do ligamento periodontal e gengiva, são os componentes predominantes da matriz extracelular do periodonto. A clivagem inicial do colágeno do ligamento periodontal e da gengiva é uma peça chave das lesões periodontais progressivas e ativas causada por colagenases intersticiais derivadas de células do hospedeiro (Killi et al.⁵⁵, 2002). A destruição irreversível dos tecidos periodontais normalmente associada ao aprofundamento do sulco gengival diferencia a periodontite da gengivite, sendo refletida pela presença de MMP-2 e MMP-9 em altos níveis em sítios acometidos com doença periodontal ativa. Na gengivite pode haver níveis ligeiramente elevados de MMP-2 e MMP-9, mas ela estará na proforma latente e inativa (Socransky et al.¹⁰⁰, 1998). Em função destas evidências, vários estudos têm avaliado o papel e o valor diagnóstico das formas de gelatinase no tecido conjuntivo de portadores de doença periodontal e perimplantar nas mais diversas situações (Ryan et al.⁸⁶, 2000).

É importante ressaltar que a presença de MMPs no fluido gengival crevicular não necessariamente indica que as MMPs medidas no fluido estão presentes no tecido na mesma concentração ou na mesma forma (latente ou ativa). Já que as MMPs podem ligar-se às proteínas da matriz sem clivagem, supõe-se que haja variação considerável entre os níveis do fluido crevicular e tecido. De fato, a

quantidade de enzima no fluido gengival crevicular pode simplesmente refletir a liberação de enzimas não ligadas na lâmina própria da gengiva ou, alternativamente, a liberação da enzima de células presentes no fluido gengival crevicular (Tanabe et al.¹⁰⁶, 2008).

3 Proposição

O presente estudo apresentou como objetivos:

- Avaliar a prevalência dos patógenos *P. tannerae*, *F. alocis*, *C. albicans*, *T. denticola*, em bolsas periodontais de pacientes com periodontite crônica.
- Avaliar a prevalência da glicoproteína Indutora de Metaloproteinases (EMMPRIN-CD147) em sítios periodontais de pacientes com periodontite crônica.
- Correlacionar o papel do EMMPRIN-CD147 com a produção de MMP-2 e MMP-9.

4 Material e método

A amostragem de fluido gengival utilizada nesse trabalho correspondentes aos sítios sadios e doentes (ausência e presença de periodontite crônica) foi obtida de pesquisa prévia realizada no Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular sob orientação da Prof^a Dr^a. Denise Madalena Palomari Spolidorio e envolveu o recrutamento de pacientes da Clínica de Periodontia do Curso de Pós-Graduação em Odontologia do Departamento de Diagnóstico e Cirurgia da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP sob orientação clínica da Profa. Dra. Rosemary Adriana Chiérici Marcantonio. O artigo científico decorrente desta pesquisa prévia está em análise para publicação em revista científica.

A seguir, estão descritas como foram obtidas as amostras e a descrição da metodologia empregada.

4.1 Perfil da amostra

O cálculo da amostra foi baseado nos dados publicados em estudo prévio recente que utilizaram técnica de PCR em tempo real na detecção de patógenos (Jervøe-Storm et al.⁴⁸, 2007). Foi considerado o poder do teste de 90%, nível de significância de 5% e a diferença a ser detectada de 1,5 mm e como parâmetro, a profundidade de sondagem. A diferença padronizada do poder de estudo em 0,95 ($1-\beta=0,95$) e um intervalo de confiança $\alpha=0,05$ determinou uma amostra de pelo menos 17 pacientes para receber o tratamento.

Para o presente estudo foram selecionados 20 pacientes considerando as possíveis perdas que poderiam ocorrer.

Para este estudo, foram selecionados 20 pacientes que procuraram a Clínica de Periodontia do curso de pós-graduação em Odontologia do Departamento de Diagnóstico e Cirurgia da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, sendo 8 homens e 12 mulheres, com idade entre 35 e 55 anos que apresentavam doença periodontal crônica moderada ou severa generalizada segundo os critérios estabelecidos pela Academia Americana de Periodontia (Armitage⁷, 1999).

Os critérios de inclusão foram: 1) idade entre 25 e 55 anos; 2) presença no mínimo de 20 dentes; 3) mínimo de 3 sítios não adjacentes com sangramento a sondagem (SS), perda de inserção \geq 3mm e Profundidade de Sondagem (PS) \geq 5mm e 3 sítios saudáveis com ausência de SS e PS \leq 3mm; 4) Apresentar no máximo 3 dentes com presença de lesões de furca grau II segundo os critérios estabelecidos pela Academia Americana de Periodontia⁷.

Os critérios de exclusão foram: 1) tratamento periodontal nos últimos 12 meses; 2) doença sistêmica com interferência no processo saúde-doença periodontal, como *diabetes mellitus*, doença cardiovascular, hipertensão; 3) uso de antibiótico nos últimos seis meses; 4) uso de anti-inflamatórios e antissépticos bucais nos últimos três meses; 5) gestação, amamentação ou uso de contraceptivos hormonais; 6) fumantes e ex-fumantes a menos de 5 anos. Cada

voluntário recebeu as informações a respeito da pesquisa, seus objetivos, importância e benefícios. A adesão do paciente à pesquisa foi de forma espontânea. Para isso todos assinaram termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 2), elaborado de acordo com as normas do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP (protocolo nº26/2008 – Anexo 1) e somente após assinatura do mesmo, este foi considerado participante do estudo.

4.2 Adequação do meio bucal

Os pacientes receberam instrução de higiene oral semanalmente durante 30 dias para utilização de escova dental pela técnica de Bass, creme dental Oral-B Pró-Saúde Menta Fresca 70g®, fio dental Oral-B Essential Floss 50m – Encerado Menta® e outros meios complementares (escova interdental compacta cônica Oral-B® e escova de língua Bitufo DuplaAção®, anti-séptico bucal Oral-B®) de acordo com as necessidades individuais de cada um. Estes procedimentos de adequação do meio bucal visaram a padronização do grau de higiene oral dos pacientes. Após 30 dias de instrução de higiene oral foi realizado o exame periodontal.

4.3 Exame clínico

Todos os índices clínicos bem como as coletas microbiológicas e imunológicas foram sempre realizados por um único examinador

cego, treinado e previamente calibrado para o momento do exame e grupo de paciente avaliado.

Para calibrar o examinador do estudo, 180 sítios apresentando profundidade de sondagem ≥ 5 mm foram selecionados aleatoriamente em 10 pacientes (18 sítios por paciente em dentes multi e uni-radulares). O examinador mensurou a profundidade da bolsa periodontal em 2 ocasiões, em um intervalo de 7 dias. Os dados foram submetidos a análise de concordância Kappa e obteve o valor de 0,915 com um intervalo de 95% de confiança. Portanto não houve diferenças estatisticamente significantes entre os exames e por isso o examinador foi considerado calibrado e cego para o grupo de estudo.

O exame clínico foi realizado com o uso de sonda periodontal milimetrada tipo Willians[®].

Foram determinados os seguintes índices: índice de placa visível - (IPV) (Ainamo³, 1975); índice de sangramento marginal (ISM) (Ainamo³, 1975); profundidade de sondagem (PS); recessão gengival (RG); nível de inserção clínica (NIC); sangramento à sondagem (SS) foi determinado através da presença (+) ou ausência (-) de sangramento observado durante 30 segundos, após a primeira inserção da sonda na bolsa periodontal; mobilidade e lesão de furca.

Para seleção dos dentes para coleta do fluido crevicular em caso de mais de dois sítios doentes e sadios foi padronizado a escolha de sítios superiores posteriores não vizinhos para os sítios doentes e superiores anteriores não vizinhos para os sítios sadios.

Foram selecionados por paciente, dois sítios doentes e sangrantes com profundidade de sondagem maior ou igual a 5 mm e perda de inserção maior ou igual a 3 mm e dois sítios sadios com ausência de perda de inserção e sangramento e profundidade de sondagem menor que 3 mm. Os dentes selecionados não apresentaram qualquer disfunção em relação à oclusão, utilização de prótese e restaurações.

4.4 Análise microbiológica

4.4.1 Coleta das amostras

Após 1 semana da realização do exame clínico, o biofilme bacteriano supragengival foi removido com o auxílio de gaze estéril. Foi feita uma lavagem e a área foi isolada com rolo de algodão e o sítio foi seco com jato de ar. Dois cones de papel Endo Points® (nº 30) estéril (primeiramente foi inserido o primeiro e após 5 minutos de sua remoção foi inserido o segundo cone) foram introduzidos no sulco ou bolsa gengival até a porção mais apical (portanto, foram coletados 4 sítios por paciente; 2 sadios e 2 doentes para a técnica de PCR) por um período de tempo de 30 segundos, sendo assim coletadas as amostras do biofilme subgengival. Os cones de papel foram colocados em tubos tipo *ependorf* estéril contendo 500 µL de tampão TE (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA, pH 8.0) e congelados à -20°C até a extração do DNA para análise microbiológica por PCR semi-quantitativo.

4.4.2 Preparo das Cepas Padrão

Inicialmente os microrganismos *T. denticola* (ATCC 35405), *F. alocis* (ATCC 35896) e *P. tanneriae* (ATCC 51259) foram cultivados e mantidos em câmara de anaerobiose a 37°C com 80% N₂, 10% CO₂, 10% H₂ e *Candida albicans* (ATCC 36802) foi incubada a 37°C em aerobiose para servirem como padrão para posterior comparação com as amostras obtidas de pacientes.

Inicialmente os microrganismos foram cultivados em placas contendo *Tryptic Soy Broth* (TSB) suplementado (extrato de levedura, hemina, menadiona, ágar e sangue desfibrinado de carneiro) e *Candida albicans* foi cultivada em *Sabouraud Dextrose Agar*. Após o crescimento bacteriano e fúngico, cada microrganismo foi transferido para tubos com 5ml TSB caldo e foram incubados novamente com o tempo que varia de acordo com as exigências fisiológicas de cada microrganismo para seu crescimento. Após o crescimento, foram realizadas 10 diluições seriadas em solução salina de cada microrganismo e semeadas em placas de cultura para determinação do valor de UFC (Unidades formadoras de colônias) por ml. Após o crescimento e contagem de UFC/ml, os microrganismos foram coletados, lavados, centrifugados e congelados a -20°C para posterior extração de DNA.

4.4.3 Preparo das Amostras Coletadas

As amostras obtidas dos sítios foram descongeladas a temperatura ambiente e agitadas em vortex por um minuto. Em

seguida, foram fervidas a 97 °C por 10 minutos e centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi colocado em novo tubo contendo 100µL de TE e a extração do DNA bacteriano foi realizada com fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1), para remoção de proteínas e separação de ácidos nucleicos seguido da precipitação com sal/etanol e posteriormente ressuspendido em TE (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA, pH 8.0) e congeladas a -20°C até serem processadas. O mesmo procedimento foi utilizado para purificação do DNA bacteriano a partir da cultura pura de cada espécie de interesse, para uso em controles positivos.

4.4.4 Reação em Cadeia da Polimerase semi-quantitativo - PCR

Para análise microbiológica foi utilizada a reação de polimerase em cadeia (PCR), para identificar a presença das seguintes bactérias: *T. denticola* (*Td*), *F. alocis* (*Fa*), *P. tanneriae* (*Pt*) e *Candida albicans* (*Ca*).

Os pares de oligonucleotídeos (5' - 3'), ou seja, os primers específicos para cada bactéria foram sintetizados pela Life Technologies do Brasil Ltda., São Paulo - SP.

As sequências utilizadas para as bactérias estão descritas na Tabela 2 e foram baseadas no estudo de Ashimoto et al⁶. (1996).

Inicialmente a presença de bactérias foi confirmada através de reação de polimerase em cadeia (PCR), realizada em termociclador

convencional (MyCycler™ thermal cycler - BioRad) utilizando oligonucleotídeos inespecíficos.

PC3mod = 5' GGACTAAGGGTATCTAAT 3'

POmod= 5' AGAGTTTGATCTGG 3'

As amostras positivas para a reação inespecífica foram, então, processadas em reação de PCR, utilizando os oligonucleotídeos (Tabela 2).

Tabela 2 - Oligonucleotídeos para a identificação das espécies avaliadas

Microrganismo	Oligonucleotídeos	Fragmento esperado	Referências
<i>T. denticola</i>	5' TAA TAC CGA ATG TGC TCA TTT ACA T 3' 5' TCA AAG AAG CAT TCC CTC TTC TTC TTA 3'	316pb	Ashimoto et al ⁸ , 1996
<i>F. alocis</i>	5' CAG GTG GTT TAA CAA GTT AGT GG 3' 5' CTA AGT TGT CCT TAG CTG TCT CG 3'	594 pb	Rôças et al ⁸⁵ , 2003
<i>P. tanneriae</i>	5'CCA CAT ATC GCA TCT GAC GTG 3' 5'TCA ATC TGC ACC CTA CTT GG 3'	536 pb	Seol et al ⁹³ , 2006
<i>C. albicans</i>	5'GGG TTT GCT TGA AAG ACG GTA 3' 5' TTG AAG ATA TAC GTG GTG GAC GTT A 3'	452 pb	Sardi et al ⁸⁹ , 2011

4.4.5 Otimização das Reações

Os oligonucleotídeos foram dissolvidos em solução estéril contendo Tris HCl (10mM – pH 7,6) e EDTA (1mM – pH 8,0) em volume calculado para concentração final de 25 µM.

As reações de PCR foram realizadas em tubos específicos e otimizadas para cada oligonucleotídeo específico utilizado. A reação de PCR foi realizada em volume final de 25 µL, contendo aproximadamente 1 µM de cada oligonucleotídeo da bactéria

específica (Invitrogen Tech-LineSM), 100 μM de dNTPs (Invitrogen Tech-LineSM) 1 a 2,5mM de Mg^{2+} e, de 0,625 a 2 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen Tech-LineSM). Os tubos com as amostras foram submetidas ao Vortex por 10 segundos para homogeneização da solução e, em seguida, foi obtida uma alíquota. Todas as reações foram realizadas na presença de controle positivo, contendo DNA genômico específico da bactéria em análise, e controle negativo, sem DNA molde.

A presença do DNA amplificado foi observada em eletroforese em gel de agarose a 1% (Invitrogen Tech-LineSM) em solução tamponada TBE 1X (Tris 1M; Ácido bórico 0,9M; EDTA 0,5M) e acrescido de 0,5 μL do corante de brometo de etídio (Invitrogen Tech-LineSM). As bandas presentes no gel foram observadas imediatamente com o auxílio de transluminador de luz ultravioleta e a seguir foi obtida imagem digitalizada do gel para documentação e análise (Image Quant 100 – GE Healthcare). As fotografias obtidas foram armazenadas para posterior análise da presença das bactérias investigadas.

4.5 Análise Imunológica

Os exames imunológicos foram realizados em duplicata, para cada sítio.

4.5.1 Coleta das Amostras.

A coleta para o exame imunológico foi realizada após o término da coleta microbiológica, período de aproximadamente 10 minutos para cada sítio coletado, para evitar possíveis interferências de contaminação. Para essa nova coleta, o fluido crevicular foi colhido com filtro especial para fluido gengival (PerioPaper#) que, após isolamento do campo, foi introduzido no sulco gengival permanecendo durante 30 segundos. Após sua remoção, este foi medido utilizando-se o equipamento específico para esta metodologia (Periotron 8000*). Como meio de transporte do fluido coletado, foram utilizados 100 µL de uma solução à base de PBS associada a um coquetel de inibidores de protease (Tabela 3), para a manutenção da viabilidade das substâncias e imediatamente congelados em freezer à -20°C.

Tabela 3 - Composição do coquetel imunológico

- solução tampão fosfato	500 ml
- soro de albumina bovina (BSA, 1mg/ml)	500 µg
- antipain (1µg/ml)	500 µg
- aprotinin (1µg/ml)	500 µg
- leupeptin hydrochloride (1µg/ml)	500 µg
- N-ethylmaleimide (1mM)	62,5 mg
-N-Dodecyl-N,N-Dimethyl-3-Ammonio-1-propanesulfonate (50µg/ml)	25,0 mg

Periopaper (Gingival Fluid Collection Strips)- ProFlow Inc.

* Periotron 8000- Oraflow Inc. 9

4.5.2 EMMPRIN (CD-147)

As amostras do fluido coletado foram descongeladas, agitadas em vortex e centrifugadas. O kit enzimático para imunoenensaio Duo

Set ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) específico foi utilizado para medir a quantidade de EMMPRIN (CD-147), presente nas amostras de fluido crevicular. A concentração de EMMPRIN nas amostras é diretamente proporcional à intensidade de coloração (absorbância a 450 nm) resultante da aplicação do reagente estreptavidina conjugada com peroxidase (*Streptavidin-HRP*). O teste foi realizado seguindo-se as instruções do fabricante. Os padrões foram obtidos a partir de oito diluições seriadas formadas por uma solução de EMMPRIN padrão que apresenta concentração inicial de 40000 pg/ml. Primeiramente em cada poço foi adicionado 50 µl do Diluente de Ensaio (Assay Diluent RD1X), seguindo com o acréscimo de 50 µl dos padrões e das amostras em cada poço. A placa foi coberta com o adesivo de proteção e incubada por 2 horas em temperatura ambiente no agitador. Após esse período o conteúdo dos poços foram removidos e a placa lavada 4 vezes com a solução tampão (Wash Buffer). Após a lavagem foi adicionado a cada poço 200 µl do anticorpo específico para detecção de EMMPRIN (EMMPRIN Conjugate). Novamente a placa foi incubada por um novo período de 2 horas e após esse período repetiu-se a lavagem e aspiração com a solução tampão. A cada poço foram adicionados 200 ul do substrato composto pelos reagentes de cor (peróxido de hidrogênio estabilizado e cromógeno tetrametilbenzidina estabilizado). Após 30 minutos de incubação em temperatura ambiente e sob proteção da luz foi adicionado 50 µl solução finalizadora (Stop Solution – ácido sulfúrico)

em cada poço. Ao término foi feita a leitura das placas com absorvância de 450 nm.

A absorvância foi convertida na concentração de EMMPRIN por amostra, de acordo com as curvas padrões, em cada tempo, e os resultados finais foram expressos em microgramas por mililitro ($\mu\text{g/ml}$) de concentração de EMMPRIN presente no fluido crevicular.

4.5.3 MMP-2 e MMP-9

O conteúdo de MMP-2 e MMP-9 nas amostras de fluido crevicular gengival foi medido com Kit ELISA comercialmente disponível (R & D Systems Inc., Minneapolis, MN, EUA). Os padrões foram obtidos a partir de diluições seriadas formadas por uma solução de MMP-2 e MMP-9 padrão que apresentam concentração inicial respectivamente de 100 ng/ml e 20 ng/ml.

As amostras foram diluídas e adicionadas a uma placa de poliestireno de 96 poços, coberta previamente com anticorpos monoclonais contra a MMP específica. Inicialmente foi adicionado a cada poço 100 μl do diluente de ensaio (Assay Diluent RD1-74 para MMP-2 e Assay Diluent RD1-34 para MMP-9). Em cada poço foram dispensados 50 μl da amostra para análise de MMP-2 e 100 μl da amostra para análise de MMP-9. A placa foi incubada por 2 horas em temperatura ambiente e, posteriormente, lavada com solução tampão (Wash Buffer). Foram adicionados a cada poço 200 μl de anticorpo policlonal contra a MMP específica total conjugada a peroxidase.

Novamente a placa foi incubada por 2 horas nas mesmas condições anteriores. A lavagem com solução tampão e a aspiração foram repetidas por mais quatro vezes. A cada poço foram adicionados 200 µl do substrato contendo peróxido de hidrogênio e cromógeno tetrametilbenzidina estabilizado. Após 30 minutos de incubação em temperatura ambiente, foi adicionada a solução finalizadora (Stop solution – 50 µl de ácido sulfúrico em cada poço). A determinação da densidade óptica de cada poço foi realizada por espectrofotômetro com absorção a 450 nm. Cada placa possui uma curva padrão obtida pela diluição seriada de Solução Padrão da MMP específica fornecida pelo fabricante.

4.6 Tratamento Periodontal Básico

Após a coleta microbiológica, foi instituído o tratamento periodontal básico: raspagem, alisamento e polimento supragengival e após 7 dias foi realizado a raspagem e alisamento radicular subgengival (RAR).

Os pacientes foram submetidos aos procedimentos de raspagem supra e subgengival de toda a arcada dentária, sendo dois quadrantes por semana, sob anestesia local pela técnica de bloqueio regional e instrumentação manual com foices, limas e curetas universais e específicas (tipo Gracey) com duração de 45 a 60 minutos por quadrante. Esta raspagem foi realizada até que a

superfície radicular se tornasse a mais lisa possível. O polimento foi executado imediatamente após a RAR com taça de borracha macia montada em motor de baixa rotação e pasta profilática de granulação fina na região raspada em cada sessão. Os pacientes também foram instruídos e motivados quanto à higienização bucal correta por meio de ensino da técnica de escovação (método de Bass) e fio dental.

4.7 Análise estatística

Os dados das variáveis quantitativas (Níveis de EMMPRIN, MMPs) foram submetidos ao teste de Normalidade de D'Agostino para verificar se os mesmos ajustam-se a distribuição normal de probabilidades. Os dados das variáveis que satisfizeram essa condição foram submetidos a testes estatísticos paramétricos (Teste *t* de Student pareado ou ANOVA 1 critério) e os demais foram analisados utilizando-se testes estatísticos não paramétricos análogos aos paramétricos (Kruskall-Wallis ou Wilcoxon).

Os dados das variáveis qualitativas (periodontopatógenos através do PCR convencional) foram dicotomizados em presente ou ausente e a análise estatística foi realizada por meio do teste Qui-quadrado.

O teste de *Spearman Rank Correlation (R)* foi utilizado para correlacionar os índices de EMMPRIN com a produção de MMP-2 e MMP-9, representado através da seguinte fórmula:

$$R = 1 - \left(\frac{6 \sum d^2}{n(n^2 - 1)} \right)$$

Os valores de R refletem a seguinte situação: resultados próximos de -1: correlação negativa. Próximo de 0: correlação não linear e resultados próximos de 1: correlação positiva.

Para todos os testes foi considerado um nível de significância de 5%, portanto, e foram considerados estatisticamente significantes todos os resultados que apresentaram valor de $p \leq 0,05$. Os dados foram submetidos à análise estatística utilizando o software GraphPad Prism 5.0® (GraphPad Software, San Diego, CA), adequado e específico para os diferentes testes, nas diferentes análises estatísticas realizadas.

5 Resultado

5.1 Padronização da metodologia

A Tabela 4 mostra as condições de termociclagem e otimização de cada par de *primer*. Pode-se observar que há pequena variação na temperatura de desnaturação do DNA (94-96°C) comparando-se as reações entre os diferentes microrganismos. Os ciclos das reações variam entre 36 a 38 e a temperatura de anelamento dos primers ocorre entre 45°C para o *primer* inespecífico, 55°C para o *F. alocis*, 56°C para o *P. tanneriae*, 53°C para a *C. albicans* e 60°C para o *T. denticola*. A concentração de Mg²⁺ utilizada varia entre 1,0 mM a 4,0 mM e as unidades de Taq entre 0,625U para a *C. albicans* até 2U para o *F. alocis*.

Tabela 4 - Condições de termociclagem e otimização de cada par de *prime*

<i>Primer</i>	Condição da reação	Concentração de Mg ²⁺	Unidades de Taq
<i>Primer</i> inesp.	96°C, 3 min (1 ciclo); 96°C, 30 s, 45°C, 30 s, 72°C, 30 s (30 ciclos), 72°C, 10 min (1 ciclo)	2,5 mM	1U
<i>F. alocis</i>	95°C, 2 min (1 ciclo); 94°C, 30 s, 55°C, 1 min, 72°C, 2 min (36 ciclos), 72°C, 10 min (1 ciclo)	2,0 mM	2U
<i>P. tanneriae</i>	94°C, 5 min (1 ciclo); 94°C, 1 min, 56°C, 1 min, 72°C, 2 min (36 ciclos), 72°C 10 min (1 ciclo)	4,0 mM	1U
<i>C. albicans</i>	94°C, 5 min (1 ciclo); 94°C, 1 min, 53°C, 1 min, 72°C, 30 s (38 ciclos), 72°C, 10 min	2,5 mM	0,625U
<i>T. denticola</i>	95°C, 2 min (1 ciclo); 95°C, 30 s, 60°C, 1 min, 72°C, 1 min (36 ciclos); 72°C, 2 min	1,0 mM	1,25U

5.2 Identificação microbiana

O Gráfico 1 ilustra a presença de DNA nas amostras (grupo doente e sadio) com a utilização de *primer* inespecífico. A presença de DNA foi positiva em 93,33% das amostras em ambos os grupos.

Dos 20 pacientes iniciais, totalizando 40 sítios doentes e 40 sítios sadios, houve perda de pacientes após o período de tratamento periodontal, deste modo, optou-se por utilizar apenas as amostras de pacientes presentes nos momentos antes e após terapia periodontal, totalizando 30 sítios doentes e 30 sítios sadios.

Após o tratamento periodontal nenhuma bactéria foi detectada quando foi realizado o PCR convencional do gene 16srRNA, provavelmente por inadequação da técnica de extração, contaminação de amostras ou inadequação na armazenagem das amostras. Dessa forma optou-se por não mostrar esses dados.

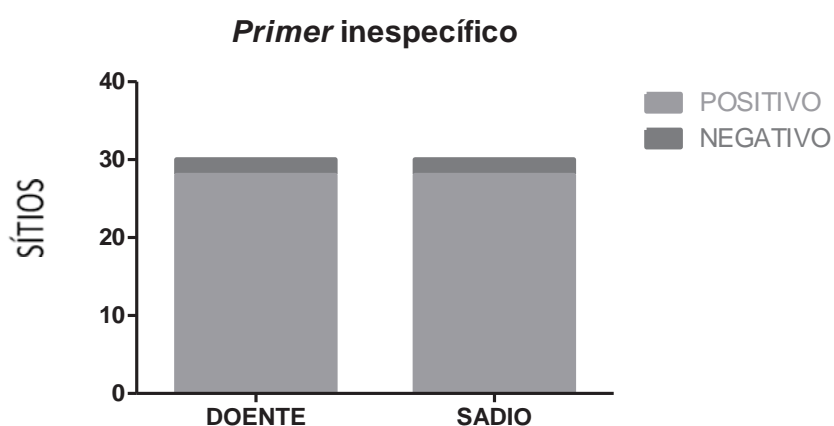
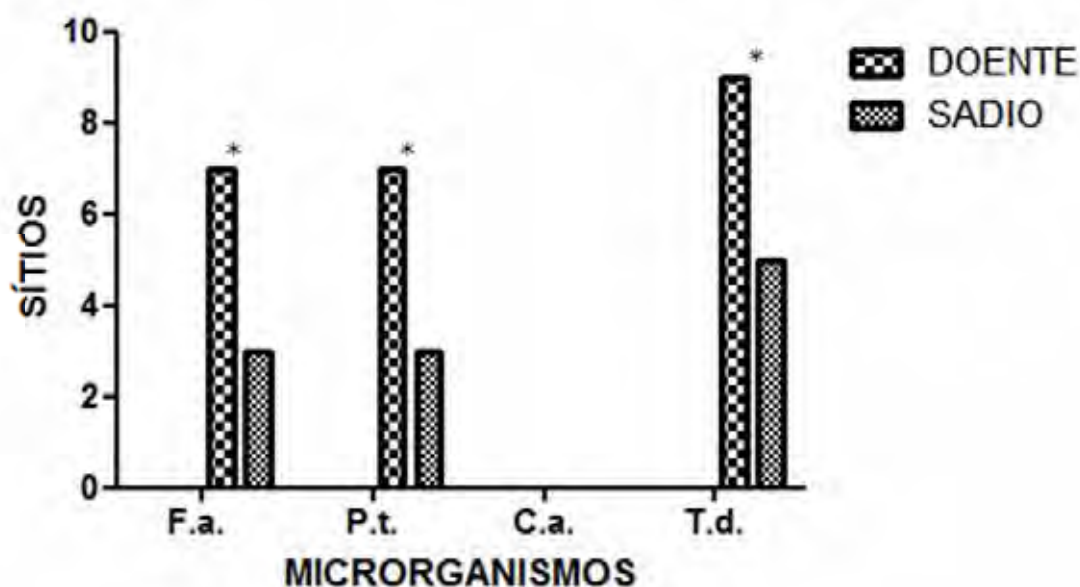


GRÁFICO 1 - Detecção de DNA nas amostras com utilização de *primer* inespecífico por técnica de PCR convencional.

$p < 0,0001$ - Teste Qui-quadrado

Pode-se observar no Gráfico 2 a prevalência dos microrganismos analisados (*F. alocis*, *P. tanneriae*, *T. denticola* e o fungo *C. albicans* nos grupos doente e sadio). Nota-se maior presença de *Filifactor alocis* e *Prevotella tanneriae* em 7 dos 30 sítios doentes (23,33%) e em 3 dos 30 sítios sadios (10%).

Não houve detecção de *C. albicans* em nenhum dos grupos (doente e sadio) utilizando a técnica de PCR convencional. *T. denticola* esteve presente em 9 dos 30 sítios doentes (30%) e em 5 dos 30 sítios sadios (16,66%).



* diferença estatística entre grupos doente e sadio. $p < 0,01$ (Teste Qui-quadrado).

GRÁFICO 2 - Prevalência dos microrganismos nos sítios doentes e sadios por PCR convencional.

A Tabela 5 ilustra comparativamente (%) a prevalência observada na distribuição de *F. alocis*, *P. tanneriae*, *T. denticola* por

PCR convencional. No grupo doente, *T. denticola* foi o microrganismo mais freqüente (30%), enquanto que *F. alocis* (23,33%) e *P. tanneriae* (23,33%) foram encontrados em menores proporções.

Tabela 5 - Prevalência dos microrganismos nos grupos doente e sadio

Microrganismo	Grupo Doente	Grupo Sadio
<i>F. alocis</i>	23,33%	10%
<i>P. tanneriae</i>	23,33%	10%
<i>C. albicans</i>	0%	0%
<i>T. denticola</i>	30%	16,66%

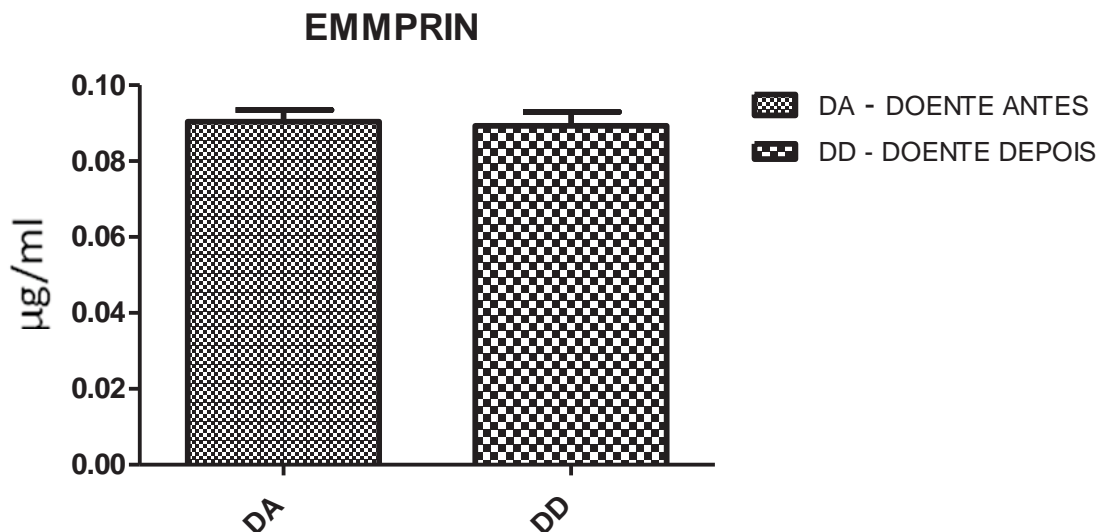
5.3 Quantificação de EMMPRIN (CD-147) por ELISA

No grupo sadio antes e após tratamento periodontal básico houve detecção muito abaixo do esperado da glicoproteína e das gelatinases. Devido a esse fator, os dados foram inviabilizados e não considerados nos resultados, visto a impossibilidade de diferenciar os dois grupos. A respectiva curva padrão de EMMPRIN encontra-se no apêndice (Figura A1).

O resultado para a quantificação da glicoproteína EMMPRIN (CD-147) para sítios doentes antes e após tratamento periodontal básico pode ser observado no Gráfico 3.

Os valores absolutos evidenciaram EMMPRIN em amostras de fluido subgingival antes e depois do tratamento periodontal básico, porém, em valores de 0,090 µg/ml para amostras antes do tratamento e 0,089 µg/ml para amostras após o tratamento

periodontal). Não houve diferença estatisticamente entre doente antes e doente depois ($p > 0,05$).



Teste t de Student ($p > 0,05$).

GRÁFICO 3 – Quantificação ($\mu\text{g/ml}$) da glicoproteína EMMPRIN em sítios doentes antes e após terapia periodontal.

5.4 Quantificação de MMPs por ELISA

O resultado para a quantificação de MMP-2 para sítios doentes antes e após tratamento periodontal básico estão representados no Gráfico 4. Curva padrão no apêndice (Figura A2).

No grupo doente valores absolutos evidenciaram MMP-2 em amostras de fluido subgengival antes e depois do tratamento periodontal básico, com os respectivos valores ($0,5224 \mu\text{g/ml}$ para amostras antes do tratamento e $0,3192 \mu\text{g/ml}$ para amostras após o tratamento periodontal). Houve diferença estatisticamente

significante para MMP-2 ($p < 0,01$) com valores maiores para os sítios doente antes do tratamento periodontal.

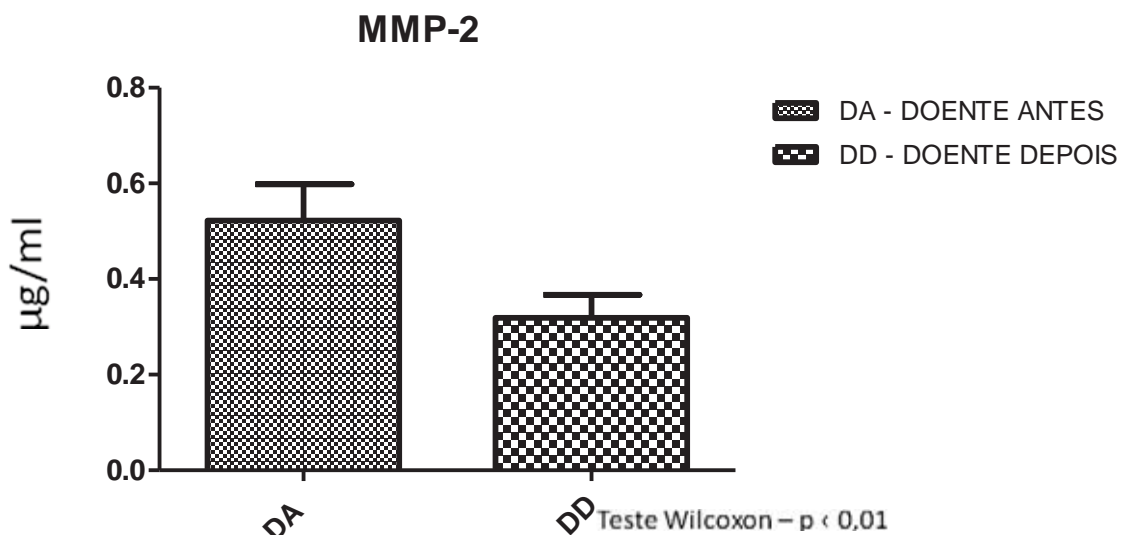


GRÁFICO 4 - Quantificação (ug/ml) de MMP-2 nos grupos DA e DD.

O Gráfico 5 ilustra a quantificação de MMP-9. Os valores de MMP-9 nas amostras do presente estudo evidenciaram os valores absolutos de 1,433 µg/ml e 1,192 µg/ml respectivamente para os grupos DA e DD. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os 2 grupos analisados ($p > 0,05$). Curva padrão no apêndice (Figura A3).

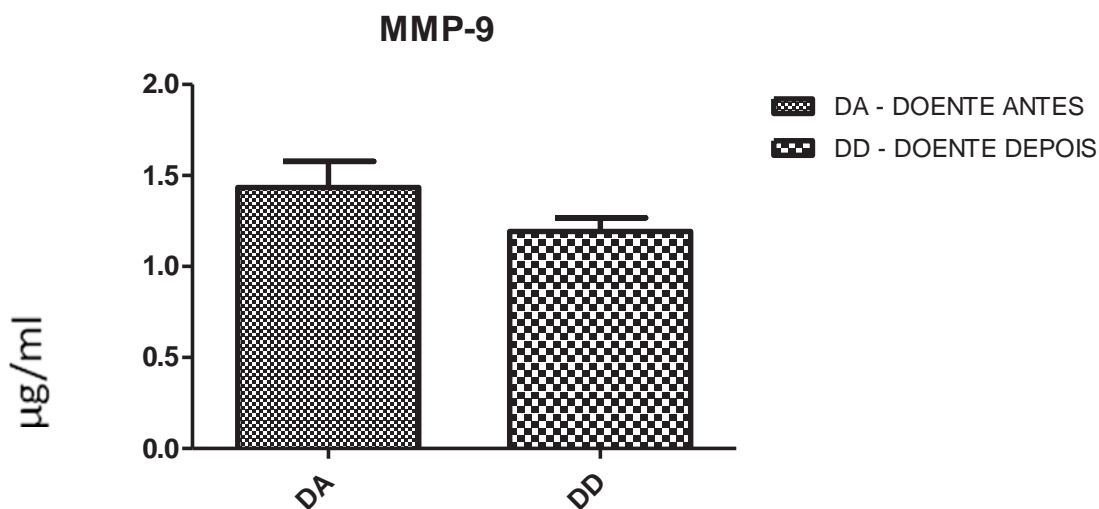


GRÁFICO 5 - Quantificação (ug/ml) de MMP-9 nos grupos DA e DD.

5.5 Correlação entre EMMPRIN (CD-147) e MMP-2 e MMP-9.

A correlação entre EMMPRIN e MMP-2, EMMPRIN e MMP-9 e MMP-2 e MMP-9 é apresentado nas Tabela 6. Não houve correlação entre a quantidade total de EMMPRIN e MMP-2 ($R= 0,25$) e EMMPRIN e MMP-9 ($R= - 0,5$, $p < 0,0001$). Houve forte correlação positiva entre as quantidades totais de MMP-2 e MMP-9 ($R= 0,975$, $p < 0,05$).

Tabela 6 - Correlação entre EMMPRIN e MMP-2, EMMPRIN e MMP-9 e

MMP-2 e MMP-9

	DA	DD	R
EMMPRIN x MMP-2 (µg/ml)	0,090 0,5224	0,089 0,3192	0,25
EMMPRIN x MMP-9 (µg/ml)	0,090 1,433	0,089 1,192	-0.5
MMP-2 x MMP- 9	0,5224* 1,433*	0,3192* 1,192*	0,975

* $p < 0,05$

6 Discussão

A doença periodontal é uma doença infecciosa de patogênese complexa que se caracteriza clinicamente pela perda dos tecidos de suporte do dente. A análise da literatura disponível relata a ocorrência de mais de 700 espécies bacterianas no meio bucal, sendo que aproximadamente 400 espécies encontradas no biofilme subgingival são correlacionadas com a evolução desta patologia bucal (Aas et al.¹, 2005; Iacono et al.⁴⁴, 2007; O'Shea et al.⁷⁴, 1992).

As espécies bacterianas mais comuns relacionadas à doença periodontal incluem *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola* e *Prevotella intermedia*. Contudo, outras espécies vem sendo estudadas e descritas na literatura e que possivelmente podem estar associadas com o início e progressão da doença periodontal (Aas et al.¹, 2005; Chang et al.¹⁹, 2002; O'Shea et al.⁷⁴, 1992). Dentre esses microrganismos e que mereceu destaque no presente estudo estão o *Filifactor alocis*, *Prevotella tanneriae* e *Candida albicans* (Dong et al.²², 2009; Holt et al.⁴², 2005; Martin et al.⁶³, 2002; Simonson⁹⁶, 1992).

Na odontologia, a cultura bacteriana é um método clássico de diagnóstico de microrganismos periodontopatogênicos residentes no biofilme subgingival. É um método capaz de identificar novas espécies, de oferecer mensuração quantitativa das espécies viáveis e de realizar teste de resistência antibiótica. O resultado disso é que a

cultura bacteriana é considerada o padrão ouro no diagnóstico microbiológico periodontal e continua sendo um importante meio de diagnóstico de diversas doenças (Atieh⁹, 2008).

Porém os métodos tradicionais para identificação de patógenos, do qual se destaca o método de cultura bacteriana, acarretam inúmeros problemas e falhas, sendo muitas vezes adequados para análise de rotina, mas nem sempre na detecção de microrganismos em particular. As limitações associadas aos métodos tradicionais consistem na incapacidade de detectar alguns microrganismos, por serem métodos limitados a patógenos com características de crescimento conhecidas; na fraca discriminação entre microrganismos com características comportamentais semelhantes; na aparência visual não específica; na detecção demorada de microrganismos de crescimento lento. Além disso, muitas bactérias, fora do seu habitat natural, desenvolvem mecanismos específicos de diferenciação celular como resposta à deficiência de nutrientes ou outros tipos de condições ambientais adversas como pH e a salinidade (Odden et al.⁷⁵, 2001).

Deste modo, têm-se desenvolvido métodos moleculares adequados, por exemplo, a técnica de PCR permite, a partir de um pequeno fragmento do DNA de interesse, característico de um dado microrganismo, a sua amplificação até um número detectável. É possível, em poucas horas, a síntese in vitro de uma grande quantidade de um dado fragmento de DNA, cerca de 10^6 vezes ou

mais, a partir de poucas moléculas de um fragmento específico, sem que para isso seja necessária a sua clonagem prévia e replicação em célula hospedeira. Dessa forma, esse método de identificação torna-se mais específico, menos suscetível a falhas e mais seguro que os outros métodos de identificação bacteriana.

Os protocolos de PCR descritos no capítulo de material e método revelaram, na sua maioria, eficácia, sensibilidade e boa resolução na detecção de genes específicos de cada microrganismo patogênico do presente estudo, em amostras de fluido subgingival de pacientes portadores de periodontite crônica. Para garantir que os resultados obtidos da pesquisa de microrganismos patogênicos por PCR estão corretos seguiram-se uma série de etapas para a implementação do padrão de reação de PCR para cada microrganismo estudado. A realização da técnica de pesquisa por PCR para *Filifactor alocis*, *Prevotella tanneriae* e *Treponema denticola* estão de acordo com os resultados de Ashimoto et al.⁸ 1996, Seol et al.⁹³, 2006, Siqueira et al.⁹⁷ 2011, e Siqueira-Junior et al.⁹⁸ 2000 e conduziram a resultados de sucesso dada a obtenção de produtos da amplificação com o tamanho esperado, respectivamente 594 pb, 529 pb e 316 pb. O fato de não se verificar a presença das bandas correspondentes ao produto da amplificação de *Candida albicans* se dá pelo fato de que apesar do volume de amostra utilizado para o PCR, esta pode conter o microrganismo ou até não conter o microrganismo de interesse, impedindo dessa forma a visualização do fragmento de amplificação

esperado. Esses resultados com *Candida albicans* estão em desacordo com os achados de Sardi et al.⁸⁹ 2011, que através da utilização da técnica de PCR convencional encontrou diversas espécies do gênero *Candida* e outras bactérias periodontopatógenas em sítios acometidos com periodontite crônica e diabetes *mellitus*.

A implementação dos protocolos para a detecção dos microrganismos do presente estudo tornou-se de suma importância e, após otimização das condições de PCR, descritas na literatura (Paster et al.⁷⁸ 2001; Roças et al.⁸⁵ 2009), verificou-se que a partir de um menor volume de solução de DNA total, 2 µl, se observou a banda correspondente ao controle positivo. Os resultados negativos do PCR podem sugerir que as amostras analisadas estivessem danificadas devido à idade, tempo e condições de armazenagem bem como o tipo de microrganismo, que pode ter contribuído para a não ocorrência da amplificação, como também sugerido por Mineoka et al.⁶⁵ 2008 que encontrou resultados similares na detecção de diversos periodontopatógenos, mas outros microrganismos não ocorreu a amplificação de DNA bacteriano. Por outro lado, dado que o controle positivo é visível, mas as amostras positivas não apresentaram as bandas correspondentes ao produto da amplificação, pode presumir-se a inexistência de *C. albicans* nas amostras do presente estudo.

Hannula et al.⁴⁰ 2001, em estudo in vitro, avaliaram o efeito de algumas bactérias sobre o biofilme de *Candida*, incluindo *Prevotella*

nigrescens e *P. gingivalis*, observando redução na contagem de leveduras quando estes microrganismos foram co-cultivados com *Candida*. Possivelmente metabólitos produzidos pelos anaeróbios poderiam interferir com a fisiologia do biofilme ou devido à presença de bactérias que poderiam inibir o crescimento do biofilme.

Para analisar a composição da microbiota na mucosa e em sítios subgengivais de indivíduos saudáveis e em indivíduos com periodontite agressiva e periodontite crônica, Urzua et al.¹⁰⁹ 2008 usaram métodos fenotípicos e genotípicos. Os autores observaram que *C. albicans* foi capaz de colonizar bolsas periodontais em pacientes com periodontite crônica, contrariando os achados do presente estudo.

Através da técnica de PCR convencional o patógeno *T. denticola* foi encontrado em maiores proporções (30%), nos sítios doentes do que em sítios saudáveis (16,66%). *F. alocis* e *P. tanneriae* foram encontrados nas proporções de, 23,33% nos sítios doentes com e em 10% dos sítios saudáveis. Esses achados estão de acordo com os estudos de Ashimoto et al.⁸ 1996 e Siqueira et al.⁹⁸ 2000, nos quais encontram a presença de bactérias em maiores proporções em sítios doentes quando comparados a sítios saudáveis. Diversos trabalhos na literatura disponível também já identificaram com certa frequência *Treponema denticola* (Mineoka et al.⁶⁵ 2008) em sítios acometidos com periodontite crônica e outros microrganismos como o *Filifactor alocis* vem sendo constantemente identificado em casos de infecções

endodônticas e periapicais e possivelmente pode estar associado também a casos de infecções periodontais (Sakamoto et al.⁸⁷ 2007; Simonson et al.⁹⁶, 1992; Siqueira-Junior et al.⁹⁷ 2011), como sugere os resultados do presente estudo. Os resultados mostraram uma correlação significativa entre a ocorrência de *T. denticola*, *F. alocis* e *P. tanneriae* em sítios doentes ($p < 0,01$) quando comparados com sítios saudáveis. Diante dos resultados obtidos e de acordo com o levantamento bibliográfico realizado, é importante ressaltar que a maioria das metodologias moleculares informa apenas a presença ou ausência de determinadas bactérias. Devemos atentar para a interpretação dessas informações, pois o número de bactérias encontradas pode ser significativo em relação ao papel de cada espécie na etiopatogenia das alterações periodontais. Algumas bactérias podem representar apenas um papel ecológico enquanto outras estão diretamente ligadas aos danos causados ao hospedeiro (Pinheiro et al.⁸¹ 2003).

Dessa maneira, novos estudos com amostragem maior devem ser realizados para melhor interpretação dos resultados e quantificação exata de microrganismos que geram a doença periodontal, através da técnica de PCR em tempo real, pois apenas a presença do microrganismo não significa que o sítio possa ser considerado doente.

Através dos relatos da literatura e os resultados apresentados no presente trabalho, pode-se observar que novos microrganismos

ainda serão correlacionados com a etiopatogenia da periodontite crônica. Entretanto, fica o desafio em meio à detecção de tantas espécies, de saber qual a importância e as implicações clínicas destes achados laboratoriais. De qualquer maneira, as interações bacterianas parecem ser o elemento chave para o crescimento e a sobrevivência dos microrganismos em seu habitat e consequente capacidade de produzir doença. Além disso, a complexidade do sistema subgingival periodontal favorece o surgimento de uma comunidade microbiana bastante diversificada. Assim, para um diagnóstico ideal seria necessário o uso conjunto de metodologias que fornece resultados de detecção, caracterização e quantificação para desenhar de forma mais completa o perfil das comunidades microbianas (Gomes et al.³³, 2008; Jung et al.⁵⁰,2001).

Estudos de Dahlén²⁰ 2006, sugerem que *P. tannerae* e *F. alocis* poderiam estar significativamente associadas com a doença periodontal por encontrarem-se em maiores concentrações em sítios doentes quando comparados à sítios saudáveis.

A progressão da doença periodontal é caracterizada pelos processos de degradação da matriz extracelular e reabsorção óssea os quais resultam da reação imuno-inflamatória iniciada em resposta a agressão pelos microrganismos do biofilme dental e suas toxinas. A severidade do dano tecidual na doença periodontal é proporcional aos níveis de citocinas e mediadores pró-inflamatórios presentes nos

sítios periodontais doentes (Gabison et al.³⁰, 2008; Nehme et al.⁷², 1993).

Na complexa rede de citocinas estabelecida com a reação inflamatória associada à doença periodontal, diversos mediadores biológicos são produzidos, incluindo as metaloproteinases de matriz extracelular (MMPs), as quais podem ter um importante papel nos processos de degradação da matriz extracelular e reabsorção óssea. Sua relevância nestes processos está relacionada ao amplo padrão de substratos das metaloproteinases, que inclui colágenos tipo I, II e IV, e também ao fato dos tecidos periodontais mineralizados e não-mineralizados apresentarem elevada proporção de colágeno em sua composição; o que justifica o papel de destaque desta colagenase no desenvolvimento das lesões periodontais e também em outras alterações de caráter inflamatório crônico com aspectos histológicos de degradação de matriz extracelular semelhantes aos da doença periodontal (Junqueira et al.⁵¹, 2000).

As MMPs constituem um grupo de endopeptidases cálcio-zinco dependentes, com atividade hidrolítica de amplo espectro para as proteínas e outros componentes extracelulares como colágeno, elastina, laminina, fibronectina e proteoglicanos (Birkedal-Hansen et al.¹¹, 1993; Haffajee et al.³⁸, 1992; Jervøe-Storm et al.⁴⁷, 2005; Miyauchi et al.⁶⁶, 1990). Essas enzimas estão amplamente distribuídas em indivíduos saudáveis, desempenhando papel importante em processos fisiológicos como a cicatrização de feridas e

a reabsorção óssea (Moore et al.⁶⁹, 1994; Sardi et al.⁸⁹, 2011). No entanto, o principal interesse nas MMPs diz respeito ao seu papel em certos mecanismos patológicos onde a proteólise da matriz extracelular é sua característica chave (Mineoka et al.⁶⁵, 2008).

Diversos trabalhos demonstram que mediadores inflamatórios têm importante papel no estímulo da produção de MMPs por diferentes células como fibroblastos, neutrófilos, macrófagos, entre outras (Accorsi-Mendonça et al.², 2008). Produtos bacterianos também podem estimular a produção de MMPs. Tanabe, Grenier¹⁰⁶ (2008), evidenciaram que o lipopolissacarídeo (LPS) de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* pode induzir macrófagos, alterando a secreção de MMP-9, fator de necrose tumoral- α e interleucina 1- β . Chang et al.¹⁹ 2002, determinaram o efeito de *Porphyromonas endodontalis* e *Porphyromonas gingivalis*, na produção e secreção de MMPs através da cultura celular de macrófagos. Os resultados apresentados neste trabalho indicaram a presença de MMP-2 e MMP-9 e o aumento de expressão desta gelatinase em sítios doentes antes do tratamento periodontal quando comparadas com sítios doentes depois do tratamento periodontal, como mostra os Gráficos 4 e 5. Deste modo, a produção e ativação de MMPs, induzidas por substâncias de origem microbiológicas, pode ser uma das vias de degradação tecidual na patogênese de lesões periodontais.

Resultados de análises imunoquímicas (Sorsa et al.¹⁰², 2006) que usaram anticorpos específicos para MMP-2 e MMP-9 são consistentes com os resultados de vários de estudos enzimológicos prévios. Sorsa et al.¹⁰², (2006) demonstraram que MMP-2 e MMP-9 são as gelatinases presentes na matriz extracelular de indivíduos com periodontite crônica. Além disto, estudos recentes através da técnica ELISA demonstraram que os níveis de MMP-2 e MMP-9 em portadores de periodontite crônica, reduziram significativamente após terapia periodontal de RAR (Tsarev et al.¹⁰⁸, 2000), e que estão de acordo com os resultados aqui apresentados (Gráficos 4 e 5).

Um outro fator estimulador da atividade gelatinolítica das MMPs é a enzima indutora de metaloproteinases, conhecida como EMMPRIN CD-147. EMMPRIN é encontrado na superfície de diversos tipos de células epiteliais, que podem induzir células do hospedeiro como a secretar MMPs (Person et al.⁸⁰, 2008). Sua expressão desencadeia a produção de metaloproteinases por células endoteliais e fibroblastos, estando, portanto, relacionado com a severidade e progressão da doença periodontal (Eick et al.²⁴, 2002; Emingil et al.²⁶, 2006).

Nesse estudo, foi analisada a incidência da expressão de EMMPRIN em amostras de fluido subgengival de pacientes portadores de periodontite crônica e associando os resultados com a produção de MMP-2 e MMP-9. Os resultados mostraram que EMMPRIN é detectado em sítios doentes e sadios e parece não estar diretamente relacionado na indução da expressão das metaloproteinases (Tabela

6). Foi relatado que a expressão de MMPS e provavelmente a gravidade da resposta inflamatória nos sítios acometidos com periodontite crônica é correlacionada com a quantidade de EMMPRIN presente em sítios periodontais doentes. O presente estudo aponta a idéia e sugere que EMMPRIN pode contribuir, pelo menos em parte, para aumentar os níveis de outras metaloproteinases da matriz extracelular do tecido conjuntivo periodontal, como relatado por Feldman et al.²⁷ 2011, onde níveis elevados de MMP-3 foram encontrados em sítios de periodontite ativos e que além de induzir a secreção de IL-6 em fibroblastos gengivais, EMMPRIN também aumenta a secreção de MMP-3.

ELISA é uma técnica baseada na reação antígeno/anticorpo. Os resultados apresentados mostraram os valores protéicos de EMMPRIN iguais nos sítios doentes antes e após terapia periodontal e MMP-2 e MMP-9 estatisticamente maiores em sítios doentes antes do tratamento periodontal básico quando comparados aos sítios doentes após o tratamento periodontal. O trabalho de Shin et al.⁹⁴ 2002, avaliaram a expressão protéica de MMP-2, MMP-9 e outras metaloproteinases através de ELISA, com anticorpos monoclonais, em tecidos pulparem inflamados e em lesões periapicais. Os autores evidenciaram valores maiores de MMP-2 e MMP-9 durante a inflamação pulpar e alta correlação positiva com a atividade gelatinolítica. Dessa maneira, esses estudos sugerem que as MMPs tem um importante papel na degradação de tecidos pulparem. Do

mesmo modo, pode-se sugerir esse papel gelatinolítico das MMPs nos tecidos periodontais, como demonstra os resultados acima, visto que, tecido pulpar e matriz extracelular são diferentes tipos de tecido conjuntivo. A maior incidência de MMPs em sítios doentes previamente ao tratamento periodontal demonstra ativa participação no desenvolvimento e manutenção na patogênese da doença periodontal.

Como a capacidade de EMMPRIN induzir a produção e secreção de MMPs por células do hospedeiro está bem documentada na literatura disponível (Gabison et al.³⁰, 2005; Kanekura et al.⁵², 2000), funções adicionais de mecanismos de interação entre EMMPRIN e outras proteínas inflamatórias da periodontite poderiam ser estudadas, para se compreender o papel desempenhado por EMMPRIN na inflamação e destruição dos tecidos acometidos por doença periodontal, como por exemplo a interação entre EMMPRIN e a secreção de citocinas pró-inflamatórias IL-6 e MMP-3 e proteínas quinases (MAPK), ou até mesmo como ocorre o mecanismo de transdução do sinal de ativação entre EMMPRIN e as MMPs. Estudos futuros envolvendo outras MMPs participantes no processo de degradação tecidual, através de diferentes estímulos, podem contribuir para esclarecer o processo inflamatório da doença periodontal.

Em função da complexidade das moléculas e respostas imunoinflamatórias envolvidas na progressão da doença periodontal,

verifica-se a necessidade de se estudar várias MMPs simultaneamente, destacando a presença da forma ativa já que esta reflete melhor a progressão temporal da lesão do que somente a quantidade total da enzima.

7 Conclusão

Baseado nos resultados obtidos e dentro das condições experimentais desse trabalho, conclui-se que:

- *Filifactor alocis* e *Prevotella tanneriae* podem ser considerados potenciais marcadores da doença periodontal;
- O tratamento periodontal foi efetivo nos sítios doentes na redução dos níveis de MMP-2 e MMP-9.
- EMMPRIN não está associada a produção de MMP-2 e MMP-9.

8 Referências*

- 1- Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol.* 2005; 43: 5721-32.
- 2- Accorsi-Mendonça T, Paiva KB, Zambuzzi WF, Cestari TM, Lara VS, Sogayar MC, et al. Expression of matrix metalloproteinase -2 and -9 and RECK during alveolar bone regeneration in rat. *J Mol Histol.* 2008; 39: 201-8.
- 3- Ainamo J, Bay I. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. *Int Dent J.* 1975; 25: 229-35.
- 4- Alexander DC, Martin JC, King PJ, Powell JR, Caves J, Cohen ME. Interleukin-1 beta, prostaglandin E2, and immunoglobulin G subclasses in gingival fluid in patients undergoing periodontal therapy. *J Periodontol.* 1996; 67: 755-72.
- 5- Allen CM. Diagnosing e managing oral candidosis. *J Am Dent Assoc.* 1992;123:77-8.
- 6- Altruda F, Cervella P, Gaeta ML et al. Cloning of cDNA for a novel mouse membrane glycoprotein (gp42): shared identity to histocompatibility antigens, immunoglobulins and neural-cell adhesion molecules. *Gene.* 1989; 85: 445-51.

*De acordo com o estilo Vancouver. Disponível em:

http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

- 7- Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol.* 1999; 4: 1-6.
- 8- Ashimoto A, Chen C, Bakker I, Slots J. Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. *Oral Microbiol Immunol.* 1996; 11: 266-73.
- 9- Atieh MA. Accuracy of real-time polymerase chain reaction versus anaerobic culture in detection of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*: a meta-analysis. *J Periodontol.* 2008; 79: 1620-9.
- 10- Barbosa e Silva E, Peruchi CMS, Toledo BEC. Bases clínicas e biológicas do estágio atual da terapia periodontal mecânica. *RPE: Rev Int Periodontia Clín.* 2006; 3: 89-99.
- 11- Birkedal-Hansen H, Moore WG, Bodden MK, Windsor LJ, Birkedal-Hansen B, DeCarlo A, et al. Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1993; 4: 197-250.
- 12- Birkedal-Hansen H, Yamada S, Windsor J, Pollard AH, Lyons G, Stetler-Stevenson W et al. Matrix Metalloproteinases. *Curr Protoc Cell Biol.* 2008;10: 10-8.
- 13- Biswas, C. Tumor cell stimulation of collagenase production by fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun.* 1982; 109: 1026-34.

- 14- Biswas C, Zhang Y, DeCastro R, Guo H, Nakamura T, Kataoka H, et al. The human tumor cell-derived collagenase stimulatory factor (renamed EMMPRIN) is a member of the immunoglobulin superfamily. *Cancer Res.* 1995; 55: 434-9.
- 15- Bordador LC, Li X, Toole B, Chen B, Regezi J, Zardi L, et al. Expression of emmprin by oral squamous cell carcinoma. *Int J Cancer.* 2000; 85:347-52.
- 16- Boutaga K, Savelkoul PH, Winkel EG, van Winkelhoff AJ. Comparison of subgingival bacterial sampling with oral lavage for detection and quantification of periodontal pathogens by real-time polymerase chain reaction. *J Periodontol.* 2007; 78: 79-86.
- 17- Cannon RD, Holmes AR, Mason AB, Monk BC. Oral *Candida*: clearance, colonization, or candidiasis? *J Dent Res.* 1995; 74:152-61.
- 18- Chau I, Rigg A, Cunningham D. Matrix metalloproteinase inhibitors an emphasis on gastrointestinal malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2003; 45: 151-76.
- 19- Chang Y, Lai C, Yang S, Chan Y, Hsieh Y. Stimulation of matrix metalloproteinases by black-pigmented *Bacteroides* in human pulp and periodontal ligament cell cultures. *J Endod.* 2002; 28: 90-3.
- 20- Dahlén G, Leonhardt A. A new checkerboard panel for testing bacterial markers in periodontal disease. *Oral Microbiol Immunol.* 2006; 21: 6-11.

- 21- DeCastro R, Zhang Y, Guo H. Human keratinocytes Express EMMPRIN, an extracellular matrix metalloproteinase inducer. *J Invest Dermatol.* 1996; 106: 1260-5.
- 22- Dong W, Xiang J, Li C, Cao Z, Huang Z. Increased expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer is associated with matrix metalloproteinase-1 and -2 in gingival tissues from patients with periodontitis. *J Periodontal Res.* 2009; 44: 125-32.
- 23- Dymock D, Weightman AJ, Scully C, Wade WG: Molecular analysis of microflora associated with dentoalveolar abscesses. *J Clin Microbiol.* 1996, 34: 537-42.
- 24- Eick S, Pfister W. Comparison of microbial cultivation and a commercial nucleic acid based method for detection of periodontopathogenic species in subgingival plaque samples. *J Clin Periodontol.* 2002; 29:638-44.
- 25- Emingil G, Atilla T, Sorsa T, Tervahartiala T. The effect of adjunctive subantimicrobial dose doxycycline therapy on GCF EMMPRIN levels in chronic periodontitis. *J Periodontol.* 2008; 79: 469-76.
- 26- Emingil G, Tervahartiala T, Mäntylä P, Määtä M, Sorsa T, Atilla G. Gingival crevicular fluid matrix metalloproteinase (MMP)-7, extracellular MMP inducer, and tissue inhibitor of MMP-1 levels in periodontal disease. *J Periodontol.* 2006; 77: 2040-50.

27- Feldman M, La VD, Bedran T, Spolidorio D, Grenier D. *Porphyromonas gingivalis*-mediated shedding of extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) by oral epithelial cells: a potential role in inflammatory periodontal disease. *Microbes Infect.* 2011; 13: 1261-9.

28- Feres M, Gonçalves C. O impacto do diagnóstico microbiológico na terapêutica periodontal. In: Opperman RC, Rosing CK. *Periodontia ciência e clínica*. São Paulo: Artes Médicas; 2001. p. 39-56.

29- Fossum S, Mallet S, Barclay AN. The MRC OX-47 antigen is a member of the immunoglobulin superfamily with an unusual transmembrane sequence. *Eur J Immunol.* 1991; 21: 671-9.

30- Gabison EE, Hoang-Xuan T, Mauyiel A, Menashi S. EMMPRIN/CD147, an MMP modulator in cancer, development and tissue repair. *Biochimie.* 2008; 87: 361-8.

31- Garlet GP, Cardoso CR, Silva TA, Ferreira BR, Avila-Campos MJ, Cunha FQ, et al. Cytokine pattern determines the progression of experimental periodontal disease induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* through the modulation of MMPs, RANKL, and their physiological inhibitors. *Oral Microbiol Immunol.* 2006; 21: 12-20.

32- Genco RJ, Kornman K, Williams R, Offenbacher S, Zambon JJ, Ishikawa I. Consensus report periodontal disease: pathogenesis and microbial factors. *Ann Periodontol.* 1996; 1: 926-32.

- 33- Gomes BPFA, Pinheiro ET, Jacinto RC, Zaia AA, Ferraz CCR, Souza-Filho FJ. Microbial analysis of canals of root-filled teeth with periapical lesions using polymerase chain reaction. *J Endod.* 2008; 34: 537-40.
- 34- Guillot E, Mouton C. PCR-DNA probe assays for identification and detection of *Prevotella intermedia* sensu stricto and *Prevotella nigrescens*. *J Clin Microbiol.* 1997; 35: 1876-82.
- 35- Guiver M, Levi K, Oppenheim BA. Rapid identification of *Candida* species by TaqMan PCR. *J Clin Pathol.* 2001; 54: 362-6.
- 36- Guo H, Zucker S, Gordon MK, Toole BP, Biswas C. Stimulation of matrix metalloproteinase production by recombinant extracellular matrix metalloproteinase inducer from transfected Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem.* 1997; 3(272): 24-7.
- 37- Haffajee AD, Socransky SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal disease. *Periodontol 2000.* 1994; 5: 78-111.
- 38- Haffajee AD, Socransky SS, Smith C, Dibart S. The use of DNA probes to examine the distribution of subgingival species in subjects with different levels of periodontal destruction. *J Clin Periodontol.* 1992; 19: 84-91.

39- Hanazawa S, Nakasa K, Ohmori Y, Miyoshi T, Amano S, Kitano S. Functional role of interleukin-1 in periodontal disease: induction of interleukin 1 production by *Bacteroides gingivalis* lipopolysaccharides in peritoneal macrophages from C3H/HeN and C3H/HeJ mice. *Infect Imm.* 1985; 50: 262-70.

40- Hannula J, Dogan B, Slots J, Okte E, Asikainen S. Subgingival strains of *Candida albicans* in relation to geographical origin and occurrence of periodontal pathogenic bacteria. *Oral Microbiol Immunol.* 2001; 16: 113-8.

41 – Heikinheimo K, Salo T. Expression of basement membrane type IV collagen and type IV collagenases (MMP-2 and MMP-9) in human fetal teeth. *J Dent Res.* 1995; 74: 1226-34.

42- Holt SC, Ebersole JL. *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Tannerella forsythia*: the “red complex”, a prototype polybacterial pathogenic consortium in periodontitis. *Periodontol* 2000. 2005; 38: 72-122.

43- Huse SM, Dethlefsen L, Huber JA, Mark Welch D, Relman DA, Sogin ML. Exploring microbial diversity and taxonomy using SSU rRNA hypervariable tag sequencing [Internet]. *PLoS Genet.* 2008; 4(11): e1000255. Epub 2008 Nov 21. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19023400>

- 44- Iacono KT, Brown AL, Greene MI, Saouaf SJ. CD147 immunoglobulin superfamily receptor function and role in pathology. *Exp Mol Pathol*. 2007; 83: 283-95.
- 45- Jalava J, Eerola E. Phylogenetic analysis of *Fusobacterium alocis* and *Fusobacterium sulci* based on 16S rRNA gene sequences: proposal of *Filifactor alocis* (Cato, Moore and Moore) comb. nov. and *Eubacterium sulci* (Cato, Moore and Moore) comb. nov. *Int J Syst Bacteriol*. 1999, 49(Pt 4): 1375-9.
- 46- Jarvensivu A, Hietanen J, Rautemaa R, Sorsa T, Richardson M. Candida yeast in chronic periodontitis tissues and subgingival microbial biofilms in vivo. *Oral Dis*. 2004; 10: 106-12.
- 47- Jervøe-Storm PM, Koltzsch M, Falk W, Dörfler A, Jepsen F. Comparison of culture and real-time PCR for detection and quantification of five putative periodontopathogenic bacteria in subgingival plaque samples. *J Clin Periodontol*. 2005; 32: 778-83.
- 48- Jervøe-Storm PM, Alahdab H, Koltzsch M, Koltzsch M, Fimmers R, Jepsen S. Comparison of curet and paper point sampling of subgingival bacteria as analyzed by real-time polymerase chain reaction. *J Periodontol*. 2007; 78: 909-17.
- 49- Jousimies-Somer H. Recently described clinically important anaerobic bacteria: taxonomic aspects and update. *Clin Infect Dis*. 1997; 25(Suppl 2): 578-87.

- 50- Jung IY, Choi BK, Kum KY, Yoo YJ, Yoon TC, Lee SJ et al. Identification of oral spirochetes at the species level and their association with other bacteria in endodontic infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2001; 92: 329-34.
- 51- Junqueira LC, Carneiro J. *Biologia celular e molecular.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000.
- 52- Kanekura T, Chen X, Kanzaki T. Basigin (CD147) is expressed on melanoma cells and induces tumor cell invasion by stimulating production of matrix metalloproteinases by fibroblasts. *Int J Cancer.* 2000; 99: 520-8.
- 53- Kanekura T, Miyauchi T, Tashiro M, Muramatsu T. Basigin, a new member of the immunoglobulin superfamily: genes in different mammalian species, glycosylation changes in the molecule from adult organs and possible variation in the N-terminal sequences. *Cell Struct Funct.* 1991; 16: 23-30.
- 54- Kerkela E, Saarialho-Kere U. Matrix metalloproteinase in tumor progression: focus on basal and squamous cell skin cancer. *Esp Dermatol.* 2003; 12: 109-25.
- 55- Kiili M, Cox SW, Chen HY, Wahlgren J, Maise P, Eley BM, et al. Collagenase-2 (MMP-8) and collagenase-3 (MMP-13) in adult periodontitis: molecular forms and levels in gingival crevicular fluid and immunolocalization in gingival tissue. *J Clin Periodontol.* 2002; 29: 224-32.

- 56- Kozarov E, Sweier D, Shelburne C, Progulske-Fox A, Lopatin D. Detection of bacterial DNA in atheromatous plaques by quantitative PCR. *Microbes Infect.* 2006; 8: 687-93.
- 57- Kuboniwa M, Amana A, Shizukuishi S. Hemoglobin-binding protein purified from *Porphyromonas gingivalis* is identical to lysine-specific cysteine proteinase(Lysgingipain). *Biochem Biophys Res Commun.* 1998; 249: 38-43.
- 58- Kumar PS, Griffen AL, Barton JA, Paster BJ, Moeschberger ML, Leys EJ. New bacterial species associated with chronic periodontitis. *J Dent Res.* 2003; 82: 338-44.
- 59- Lauer-Fields JL, Juska D, Fields GB. Matrix metalloproteinases and collagen catabolism. *Biopolymers.* 2002; 66: 19-32.
- 60- Lauer-Fields JL, Sritharan T, Stack MS, Nagase H, Fields GB. Selective hydrolysis of triple-helical substrates by matrix metalloproteinase-2 and -9. *J Biol Chem.* 2003; 278: 18140-5.
- 61- Laugisch O, Schacht M, Guentsch A, Kantyka T, Sroka A, Stennicke HR. Periodontal pathogens affect the level of protease inhibitors in gingival crevicular fluid. *Mol Oral Microbiol.* 2012; 27 :45-56
- 62- Liu L, Li C, Cai X, Xiang J, Cao Z, Dong W. The temporal expression and localizations of extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) during the development of periodontitis in an animal model. *J. Periodontal Res.* 2010; 45: 541-9.

63- Martin EF, Nadkarni MA, Jacques NA, Hunter N. Quantitative microbiological study of human carious dentine by culture and real-time PCR: association of anaerobes with histopathological changes in chronic pulpitis J Clin Microbiol. 2002; 40: 1698–704.

64- McAvin JC, Reilly PA, Roudabush RM. Sensitive and specific method for rapid identification of *Streptococcus pneumoniae* using real-time fluorescence. J Clin Microbiol. 2001; 39: 3446-51.

65- Mineoka T, Awano S, Rikimaru T, Kurata H, Yoshida A, Ansai T, et al. Site-Specific development of periodontal disease is associated with increased levels of *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Tannerella forsythia* in subgingival plaque. J Periodontol. 2008; 79: 670-6.

66- Miyauchi T, Kanekura T, Yamaoka A, Ozawa M, Myyazawa S, Muramatsu T. Basigin, a new broadly distributed member of the immunoglobulin superfamily, has strong homology with both the immunoglobulin V domain and the beta-chain of major histocompatibility complex class II antigen. J Biochem. 1990; 107: 316-23.

67- Montagner F, Jacinto RC, Signoretti FG, Sanches PF, Gomes BP. Clustering behavior in microbial communities from acute endodontic infections. J Endod. 2012; 38: 158-62

68- Moore LV, Johnson JL, Moore WE. Descriptions of *Prevotella tanneriae* sp. And *Prevotella enoeca* sp. From the human gingival crevice and emendation of the description of *Prevotella zooglyphiformans*. Int J Syst Bacteriol. 1994; 44: 599-602.

69- Moore WE, Moore LV. The bacteria of periodontal diseases. Periodontol 2000. 1994; 5: 66-77.

70- Murray GI. Matrix metalloproteinases: a multifunctional group of molecules. J Pathol. 2001; 195: 135-7.

71- Nagase H, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs [review]. Cardiovasc Res. 2006; 69: 562-73.

72- Nehme CL, Cesario MM, Myles DG, Koppel DE, Bartles JR. Breaching the diffusion barrier that compartmentalizes the transmembrane glycoprotein CE9 to the posterior-tail plasma membrane domain of the rat spermatozoon. J Cell Biol. 1993; 120: 687-94.

73- Nonnenmacher C, Dalpke A, Mutters R, Heeg K. Quantitative detection of periodontopathogens by real-time PCR. J Microbiol Methods. 2004; 59: 117-25.

74- O'Shea M, Willenbrock F, Williamson RA, Cockett MI, Freedman RB, Reynolds JJ, et al. Site-directed mutations that alter the inhibitory activity of the tissue inhibitor of metalloproteinases-1: importance of the N-terminal region between cysteine 3 and cysteine 13. *Biochemistry*. 1992; 31(42):10146-52.

75- Odden A., Athreya V, Linnell JD, Karanth KU. The effect of *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* biofilms formed on different surfaces. *J Bacteriol*. 2001; 183: 3526-32.

76- Offenbacher S, Katz V, Fertik G, Collins J, Boyd D, Maynor G, et al. Periodontal infection as a possible risk factor for preterm low birth weight. *J Periodontol*. 1996; 67: 1103-13.

77- Page R. The role of inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontal disease. *J Periodontal Res*. 1991; 26: 230-42.

78- Paster BJ, Boches SK, Galvin JL, Ericson RE, Lau CN, Levanos VA, et al. Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J Bacteriol*. 2001; 183: 3770-83.

79- Pereira-Cenci T, Deng DM, Kraneveld EA, Manders EMM, Del Bel Cury AA, et al. The effect of *Streptococcus mutans* and *Candida glabrata* on *Candida albicans* biofilms formed on different surfaces. *Arch Oral Biol*. 2008; 53: 755-64.

80- Persson GR, Hitti J, Paul K, Hirschi R, Weibel M, Rothen M, et al. *Tannerella forsythia* and *Pseudomonas aeruginosa* in subgingival bacterial samples from parous women. J Periodontol. 2008; 79: 508-16.

81- Pinheiro ET, Gomes BPFA, Ferraz CCT, Sousa ELR, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. Int Endod J. 2003; 36: 1-11.

82- Raj PA, Rajkumar L, Dentino AR. Novel molecules for intra-oral delivery of antimicrobials to prevent and treat oral infectious diseases. Biochem J. 2008; 409: 601-9.

83- Reynaud AH, Nygaard-Østby B, Boygard GK, Eribe ER, Olsen I, Gjermo P. Yeasts in periodontal pockets. J Clin Periodontol. 2001; 28: 860-4.

84- Reynolds JJ, Hembry RM, Meikle MC. Connective tissue degradation in health and periodontal disease and the roles of matrix metalloproteinases and their natural inhibitors. Adv Dent Res. 1994; 8: 312-9.

85- Rôças IN, Siqueira JF Jr. Prevalence of new candidate pathogens *Prevotella baroniae*, *Prevotella multisaccharivorax* and as-yet-uncultivated *Bacteroides* clone X083 in primary endodontic infections. J Endod. 2009; 35: 1359-62.

86- Ryan ME, Golub LM. Modulation of matrix metalloproteinase activities in periodontitis as a treatment strategy. *Periodontol* 2000. 2000; 24: 226-38

87- Sakamoto M, Siqueira-Junior JF, Roças IN, Benno Y. Bacterial reduction and persistence after endodontic treatment procedures. *Oral Microbiol Immunol*. 2007; 22: 19-23.

88- Samaranayake LP, Cheung LK, Saramanayake YH. Candidiasis and other fungal diseases of the mouth. *Dermatol Ther*. 2002; 15: 251-69.

89- Sardi JCO, Duque C, Camargo GACG, Hofling JF, Gonçalves RG. Periodontal conditions and prevalence of putative periodontopathogens and *Candida* spp. In insulin-dependent type 2 diabetic patients with chronic periodontitis – A pilot study. *Arch Oral Biol*. 2011; 56: 1098-105

90 – Sato T, Ota T, Watanabe M, Imada K, Nomizu M, Ito A. Identification of an active site of EMMPRIN for the augmentation of matrix metalloproteinase-1 and -3 expression in a co-culture of human uterine cervical carcinoma cells and fibroblasts. *Gynecol Oncol*. 2009; 114: 337-42.

91- Schmid J, Herd S, Hunter PR, Cannon RD, Yasin MSM, Samad S et al. Evidence for a general-purpose genotype in *Candida albicans*, highly prevalent in multiple geographical regions, patients types and types of infection. *Microbiology*. 1999; 145:2405-13.

- 92- Séguier S, Godeau G, Brousse N. Collagen fibers and inflammatory cells in healthy and diseased human gingival tissues: a comparative and quantitative study by immunohistochemistry and automated image analysis. *J Periodontol.* 2000; 71: 1079-85.
- 93- Seol JH, Cho BH, Chung CP, Bae KS. Multiplex polymerase chain reaction detection of black-pigmented bacteria in infections of endodontic origin. *J Endod.* 2006; 32: 110-4.
- 94- Shin SJ, Lee JL, Baek SH, Lim SS. Tissue levels of matrix metalloproteinases in pulps and periapical lesions. *J Endod.* 2002; 28: 313-5.
- 95- Shirtliff ME, Peters BM, Jabra-Rizk MA. Cross-kingdom interactions: *Candida albicans* and bacteria. *FEMS Microbiol Lett.* 2009; 299: 1-8
- 96- Simonson LG, Robinson PJ, Pranger RJ, Cohen ME, Morton HE. *Treponema denticola* and *Porphyromonas gingivalis* as prognostic markers following periodontal treatment. *J Periodontol.* 1992; 63: 270-3.
- 97- Siqueira JF, Roças I. Simultaneous Detection of *Dialister pneumosintes* and *Filifactor alocis* in Endodontic Infections by 16SrDNA-directed Multiplex PCR. *Mol Oral Microbiol.* 2011; 26: 365-73.

- 98- Siqueira-Junior JF, Roças IN, Faveri A, Santos KRN. Detection of *Treponema denticola* in endodontic infection by 16S rRNA gene directed polymerase chain reaction. *Oral Microbiol Immunol*. 2000; 15: 335-7.
- 99- Sixou M. Diagnostic testing as a supportive measure of treatment strategy. *Oral Dis*. 2003; 9: 54-62.
- 100- Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol*. 1998; 25: 134.
- 101- Sopata I, Dancewicz AM. Presence of a gelatin-specific proteinase and its latent form in human leucocytes. *Biochim Biophys Acta*. 1974; 370: 510-23.
- 102- Sorsa T, Tjardelhane L, Konttinen YT, Lauhio A, Salo T, Lee HM, et al. Matrix metalloproteinases: contribution to pathogenesis, diagnosis and treatment of periodontal inflammation. *Ann Med*. 2006; 38: 306-21.
- 103- Stashenko P, Fujiyoshi P, Obermesser MJ, Prostack L, Haffajee AD, Socransky SS. Levels of interleukin 1 in tissue from sites of active periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 1991; 18: 548-54.
- 104- Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior [review]. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2001; 17: 463-516.

105- Stingu CS, Jentsch H, Eick S, Schaumann R, Knofler G, Rodloff A. Microbial profile of patients with periodontitis compared with healthy subjects. *Quintessence Int.* 2012; 43: 23-31.

106- Tanabe SI, Grenier D. Macrophage tolerance response to *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* lipopolysaccharide induces differential regulation of tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta and matrix metalloproteinase 9 secretion. *J Periodontal Res.* 2008; 43: 372-7.

107- Tavares WL, Neves de Brito LC, Teles RP, Massara ML, Ribeiro Sobrinho AP, Haffajee AD, et al. Microbiota of deciduous endodontic infections analysed by MDA and Checkerboard DNA-DNA hybridization. *Int Endod J.* 2011; 44: 225-35. -

108- Tsarev VN, Nikolaeva EN, Nosik AS. Use of molecular genetic systems for diagnostics of inflammatory diseases of oral mucosa and periodontium. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol.* 2000; 7: 69-73.

109- Urzua B, Hermosilla G, Gamonal J, Morales-Bozol, Canals M, Barahona S, et al. Yeast diversity in the oral microbiota of subjects with periodontitis: *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* colonize the periodontal pockets. *Med Mycol.* 2008; 46: 789-93.

110- Vu TH, Werb Z. Matrix metalloproteinase: effectors of development and normal physiology. *Genes Dev.* 2000; 14: 2123-33.

- 111- Whittaker RH, Margulis L. Protist classification and the Kingdoms of organisms. *Byosystems*. 1978; 10: 3-18.
- 112- Yurchenki V, S. Constant, Eisenmesser E, Burkrinsky M. Cyclophilin-CD147 interactions: a new target for anti-inflammatory therapeutics. *Clin Experiment Immunol*. 2010; 160: 305-17.
- 113- Zambon JJ. Periodontal diseases: microbial factors. *Ann Periodontol*. 1996; 1: 879-925.
- 114- Zijngel V, Harmsen HJM, Kleinfelder JW, van der Rest ME, Degener JE, Weelling GW. Denaturing gradient gel electrophoresis analysis to study bacterial community structure in pockets of periodontitis patients. *Oral Microbiol Immunol*. 2003; 18: 59-65.
- 115- Zucker S, Hymowitz M, Rollo EE, Mann R, Conner CE, Cao J, et al. Tumorigenic potential of extracellular matrix metalloproteinase inducer. *Am J Pathol*. 2001; 158: 1921.

9 Apêndice

9.1 Curva padrão de EMMPRIN (CD-147) e MMPs.

Os valores de densidade óptica (DO), lidos com absorvância de 450 nm e concentração do antígeno para detecção de EMMPRIN (CD-147) estão descritos na Tabela 7 e representados na Figura 1.

Tabela A1 - Especificações de concentração do antígeno e DO para a curva padrão do ELISA. EMMPRIN (CD-147)

Concentração do Ag (pg/ml)	EMMPRIN (DO)
4000	2,027
2000	1,128
1000	0,614
500	0,316
250	0,163
125	0,086
62,5	0,048
0	0,010

EMMPRIN test 160911

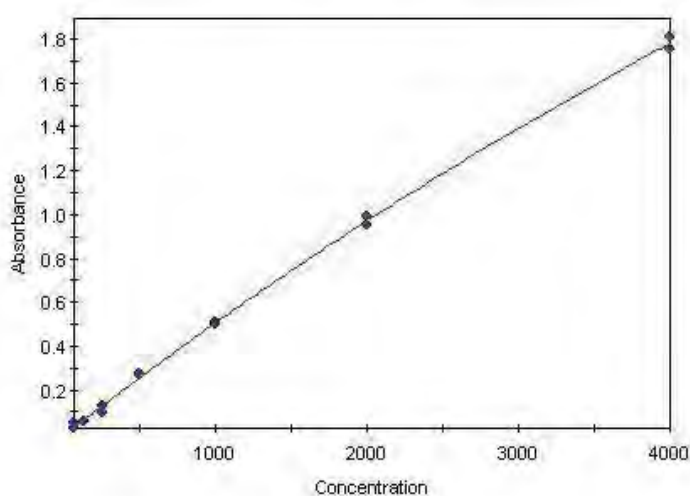


FIGURA A1 - Curva padrão do EMMPRIN (CD-147)

◆ Standards
◆ Suppressed Stds
— Standard Curve

Os valores de densidade óptica (DO), lidos com absorvância de 450 nm e concentração do antígeno para detecção de MMP-2 e MMP-9 estão descritos na Tabela 8 e 9 e representados nas Figuras 2 e 3 respectivamente.

Tabela A2 - Especificações de concentração do antígeno e DO para a curva padrão do ELISA. MMP-2

Concentração do Ag (ng/ml)	MMP-2 (DO)
50	2,600
25	1,530
12,5	0,851
6,25	0,454
3,13	0,238
1,56	0,132
0,78	0,078
0	0,024

Tabela A3 - Especificações de concentração do antígeno e DO para a curva padrão do ELISA. MMP-9

Concentração do Ag (ng/ml)	MMP-9 (DO)
20	2,662
10	1,640
5	0,904
2,5	0,520
1,25	0,290
0,625	0,172
0,312	0,110
0	0,040

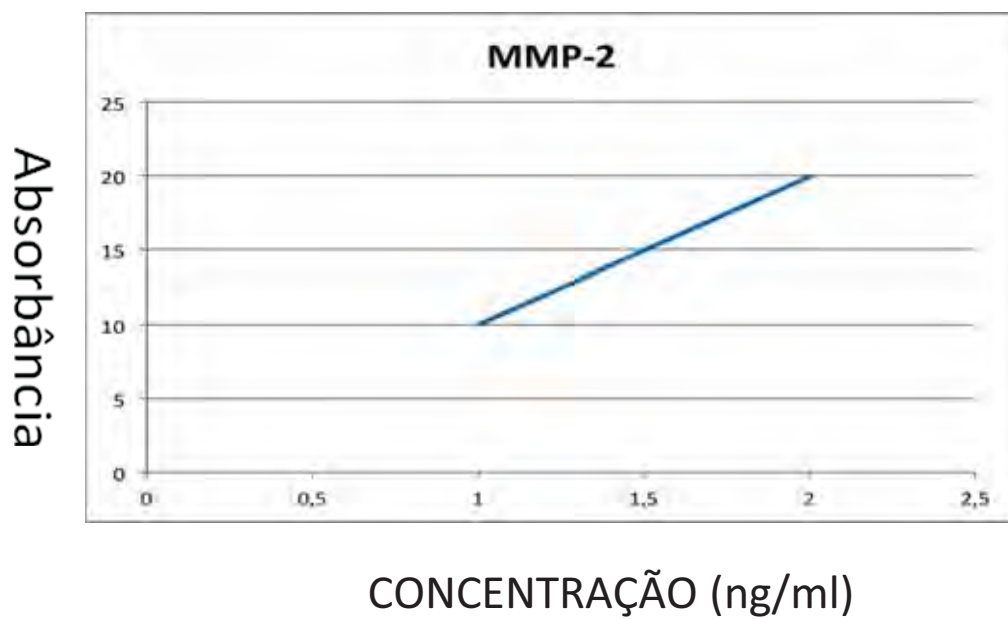


FIGURA A2 -
Curva padrão da
MMP-2.

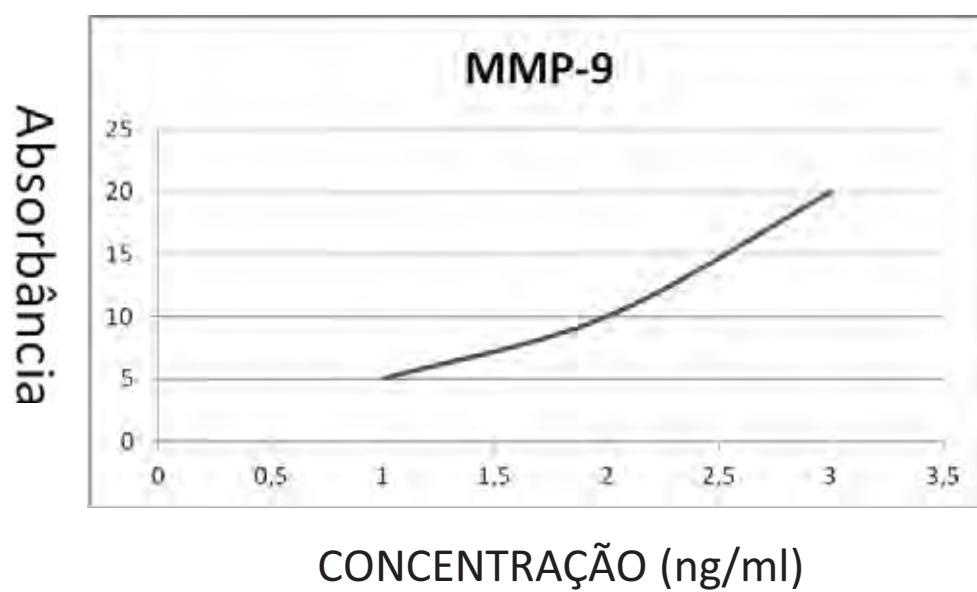


FIGURA A3 -
Curva padrão do
MMP-9.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA



Comité de Ética em Pesquisa

Certificado

CERTIFICAMOS que o projeto de pesquisa submetido sob o nº 001/2010, de natureza PROBABILITÁRIA, sob o título "ANÁLISE DE RISCO DE CONTAMINAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE ÁGUA PARA USO DOMÉSTICO EM ARARAQUARA - SP" foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Araraquara em 15/05/2010, tendo sido aprovado pelo Conselho de Ética em Pesquisa (CEP) em 15/05/2010, sob o nº 001/2010, tendo sido aprovado pelo Conselho de Ética em Pesquisa (CEP) em 15/05/2010.

WE CERTIFY that the research project titled "ANÁLISE DE RISCO DE CONTAMINAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE ÁGUA PARA USO DOMÉSTICO EM ARARAQUARA - SP" was approved by the Probabilistic Research Ethics Committee of the Faculty of Dentistry of Araraquara on 15/05/2010, having been approved by the Research Ethics Council (CEP) on 15/05/2010, under the number 001/2010, under the number 001/2010, having been approved by the Research Ethics Council (CEP) on 15/05/2010.

Araraquara, 15 de Maio de 2010.

Prof. Dr. Antônio Aparecido Corrêa
Coordenador

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Por este instrumento particular, declaro, para os devidos fins éticos e legais, que eu (nome completo): _____ (nacionalidade) _____, (profissão) _____, portador do R.G. _____, IDADE _____, residente à Rua/Av _____, nº _____, cidade de _____, Estado de _____, Nº de telefone: _____ concordo em participar da pesquisa intitulada "Efeito da terapia periodontal na microbiota subgingival. Parâmetros clínicos e microbiológicos comparativos de PCR semi quantitativo e PCR em tempo real." e declaro que tomei ciência e que fui esclarecido de maneira a não me restarem dúvidas sobre a minha participação no estudo, de acordo com os termos abaixo relacionados:

- 1- Esta pesquisa tem por objetivo verificar o resultado do tratamento da inflamação da gengiva (gingivite) e raiz do dente (doença chamada de periodontite), através de exames clínicos e exames de laboratório. Nessa pesquisa, inicialmente, será feita um questionário de saúde geral e seus hábitos de higiene bucal, será realizado exame clínico de rotina dos dentes (avaliação da presença de lesões de cárie e restaurações) e da gengiva. Os possíveis desconfortos relacionados a essa seleção são aqueles decorrentes de um exame de rotina e do tratamento da gengiva. Serão tomadas todas as medidas para garantir que o exame e o tratamento sejam seguros, tais como uso de materiais descartáveis e de instrumentos esterilizados.
- 2- Após esses primeiros exames, poderei ser ou não selecionado para o estudo. Se não for selecionado, os benefícios associados a minha participação nesse exame são o acesso a um diagnóstico preciso da minha condição bucal, bem como esclarecimento e encaminhamento para tratamento, de acordo com minhas necessidades. Se for selecionado, e tendo aceito participar como voluntário, será marcada nova data a ser agendada pelo pesquisador responsável, para a realização de um exame radiográfico (radiografias) de todos os dentes. É coletada amostras do fluido do sulco gengival (líquido presente entre a gengiva e o dente) para avaliação da infecção presente (microbiológico). Esses exames são absolutamente seguros e comensais tratamentos de gengiva.
- 3- Fica, ainda, assegurado o direito ao sigilo de todos os dados coletados dos participantes selecionados ou não, sendo que, em nenhum momento, será permitido acesso de outra pessoa a estes dados, além do pesquisador ou do próprio indivíduo.
- 4- A partir da início do estudo, será chamado a comparecer semanalmente, com horário agendado, por 3 meses, a clínica de periodontia (tratamento de gengiva e da raiz do dente)

 (Assinatura)

 (Assinatura)

para receber os exames e tratamento de gengiva e periodonto necessários, bem como o acompanhamento adequado. O tratamento a ser realizado é conhecido, seguro e faz parte de todos os tratamentos de gengiva já existentes. Faz-se uma raspagem dos dentes e da raiz do dente (remoção do tártaro), o qual poderá ser realizado sob anestesia local quando se fizer necessário, polimento e instrução de higiene oral.

- 4- Essa raspagem visa deixar os dentes e a raiz mais lisos, facilitando a minha escovação, e diminuindo a inflamação da gengiva. Poderia apresentar alguma sensibilidade dos dentes após esta raspagem, o que é uma consequência de qualquer tratamento da gengiva, não sendo um resultado específico do tratamento que irei receber. Caso sinta essa sensibilidade será feita uma aplicação tópica de um gel para diminuir a minha sensibilidade chamado de dessensibilizante.
- 5- Em todas as visitas será tomado o cuidado com o meu controle de placa (limpeza da boca) para a garantia da minha saúde gengival. A periodontite, se não for tratada, pode levar a perda dos dentes.
- 6- Estou ciente de que os riscos frente aos procedimentos nos quais serei submetido estão relacionados à utilização de anestésicos locais da rotina no atendimento odontológico. Complicações relacionadas ao uso de anestésicos serão evitadas pela avaliação de história anterior de reações alérgicas a algum tipo de anestésico ou alterações na pressão arterial. Caso seja informada alguma alteração, serei encaminhado para avaliação médica e somente poderei participar do estudo quando houver autorização do profissional. Quanto à realização de radiografias e os riscos de exposição à radiação, usarei avental e colar de chumbo como medida de proteção, o exame será realizado dentro da quantidade de radiação permitida e por técnico capacitado, o que evitará as tomadas repetidas e desnecessárias.
- 7- Os conhecimentos adquiridos, com o presente estudo, serão importantes, firmemente, para a prevenção e tratamento das doenças da gengiva, pois poderão contribuir para que melhores diagnósticos da gengivite e periodontite sejam desenvolvidos. É importante ressaltar que toda e qualquer dúvida em relação a esse estudo será esclarecido pelo pesquisador responsável e que poderei requisitar esse esclarecimento a qualquer momento.
- 8- Já esclarecido que não terei gastos extras, a não ser o deslocamento, o que meu consentimento não tira a responsabilidade dos profissionais que estão realizando esta pesquisa.
- 9- Estou ciente que minha participação é voluntária e tenho plena liberdade para desistir da referida pesquisa, retirando o meu consentimento a qualquer momento, sem sofrer nenhum tipo de penalização no atendimento a que necessito.

PROFESSOR (a) Dr. V. 23/02
 Assinado em 23/02/2012
 05/05/2012

10-Autorizo, para os devidos fins, o uso, a divulgação e publicação em revistas científicas, brasileiras ou estrangeiras, dos dados obtidos na pesquisa. Recebi a garantia de que a minha identidade não será divulgada, assegurando a minha privacidade.

Caso haja qualquer problema ou dúvida durante minha participação na pesquisa, terei plena liberdade de contactar:

Telma Bianca Lombardo Bedran: (16) 3335-9559/ (016) 9345-4733

Comitê de Ética em Pesquisa: (16) 3301-6432/6434.

Por esse instrumento particular, declaro, para fins de Ética e Legislação em Pesquisa, que eu,

Nascido (a) em ____/____/____, portador do RG _____ (Órgão Expedidor _____), residente _____ N° _____ Bairro _____, cidade _____, Estado _____, que li e entendi as informações acima citadas e concordo em participar da pesquisa: "Efeito da terapia periodontal na microbiota subgingival. Parâmetros clínicos e microbiológicos comparativos de PCR semi quantitativo e PCR em tempo real," recebendo os exames (para análise clínica e microbiológica) e tratamento especificados.

_____ de _____ de _____

Assinatura do voluntário: _____

Assinatura do pesquisador: _____

Protocolo CEP P-23/07
Aprovado em Reunião
CEP 09 / 07

Autorizo a reprodução deste trabalho.
(Direitos de publicação reservados ao autor)
Araraquara, 23 de março de 2012
FELIPE ALMEIDA DE TOLEDO