

# Detecção de Periodontopatógenos, Glicoproteína Emmprin (Cd-147) e sua correlação com MMP-2 e MMP-9

Detection of Periodontopathogens, Glycoprotein Emmprin (CD-147) and its Correlation with MMP-2 and MMP-9

Telma B. L. BEDRAN<sup>1</sup>, Felipe A. Imeida de TOLEDO<sup>1</sup>, Fernanda ROCHA<sup>1</sup>, Luís Carlos SPOLIDORIO<sup>2</sup>, Denise M. P. SPOLIDORIO<sup>2</sup>

1 - Departamento de Diagnóstico Oral e Cirurgia, Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP), Araraquara, Brasil;

2 - Departamento de Fisiologia e Patologia, Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP), Araraquara, Brasil.

## 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 e possível perda dos dentes, em associação com a infecção por múltiplas espécies bacterianas. Estima-se que mais de 400 espécies colonizam o biofilme dental e algumas das espécies bucais relacionadas à doença periodontal estejam no biofilme subgengival como *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*. Entretanto, outros microrganismos podem estar relacionados a patologia desta doença, como *Filifactor alocis* e *Prevotella tannerae*. Esses microrganismos e seus subprodutos, como endotoxinas liberados o meio extracelular, levam ao estímulo da glicoproteína indutora de metaloproteinase (EMMPRIN, CD-147), que estimula a liberação de MMPs por fibroblastos e células endoteliais, levando a destruição do tecido. Com o objetivo de detectar *F. alocis*, *P. tannerae* e *T.*

*denticola*, glicoproteína EMMPRIN (CD-147) e sua correlação com MMP-2 e MMP-9, amostras de fluido subgengival de pacientes com periodontite crônica, foram coletados de sítios saudáveis e dentes antes do tratamento periodontal básico e após 60 dias do tratamento. Os respectivos DNAs das bactérias foram extraídos e trechos do gene 16S foram amplificados e posteriormente realizados PCR convencional para a análise microbiológica dos microrganismos. Para a quantificação do EMMPRIN (CD-147), MMP-2 e MMP-9 foi usado ELISA-Sandwich. Resultados demonstraram que o grupo doente aumentou significativamente *T. denticola*, *F. alocis* e *P. tannerae* quando comparados com sítios saudáveis. MMP-2 e MMP-9 foram detectados em altas concentrações com redução estatisticamente significativa após tratamento periodontal para MMP-2, mas não houve correlação com EMMPRIN.

**PALAVRAS-CHAVE:** EMMPRIN; Metaloproteinases; Bactérias; Periodontite crônica; Reação em Cadeia da Polimerase.

## 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 possui como fator etiológico local o biofilme dental<sup>1,4</sup>.

Estudos têm demonstrado a presença de novas espécies associadas à doença periodontal e um passo importante na compreensão da patogênese de qualquer doença infecciosa causada por comunidades microbianas mistas é o de proporcionar uma descrição pormenorizada da diversidade de espécies envolvidas<sup>5</sup>. A microbiota associada com as diversas formas de periodontite tem sido amplamente investigada por abordagens cultura-dependente e independente de cultura e novos patógenos candidatos surgiram como consequência destes esforços. Dentre esses patógenos, o *Filifactor alocis*, *Prevotella tannerae*, *P. endodontalis* foram inicialmente encontrados em infecções provenientes 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<sup>6,7</sup>.

As endotoxinas liberadas dos patógenos periodontais e presentes no sulco gengival desencadeiam o estímulo das células do hospedeiro na produção de glicoproteínas que podem estar

relacionadas com a reabsorção óssea, como o indutor de metaloproteinases (EMMPRIN-CD147)<sup>8,9</sup>.

EMMPRIN foi identificado originalmente sobre a superfície de células tumorais e sua expressão desencadeia a produção e secreção de grandes quantidades de metaloproteinases da matriz (MMPs) por fibroblastos e células endoteliais<sup>10,11</sup>.

Entre outras atividades, as MMPs são enzimas proteolíticas derivadas do hospedeiro, responsáveis pela degradação das fibras colágenas e estão intimamente envolvidas com a degradação de tecido durante o processo patológico como a perda de inserção e formação da bolsa periodontal<sup>12</sup>. MMP-2 e MMP-9 são colagenases tipo IV que se originam de células polimorfonucleares, fibroblastos, células epiteliais e bactérias orais patogênicas. Os níveis de MMP-9 estão aumentados durante a inflamação periodontal, embora isso não aconteça para os níveis de MMP-2<sup>13</sup>.

Nós hipotetizamos que novas espécies podem estar associadas à doença periodontal e que as endotoxinas liberadas pelos patógenos periodontais estimulam a produção de EMMPRIN-CD147 e, consequentemente de MMPs.

O objetivo do presente estudo foi detectar *F. alocis*, *P. tannerae*, *T. denticola*, *P. gingivalis*, *T. forsythia* and *P. endodontalis* e quantificar a glicoproteína EMMPRIN-CD147 e metaloprotei-

nases MMP-2 e MMP-9 de pacientes com periodontite crônica antes e após tratamento do periodontal básico de raspagem e alisamento radicular.

## MATERIAL E MÉTODOS

### *Seleção de Pacientes*

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Humana (Protocolo # 26/08). Para o cálculo da amostra foi utilizado o critério: poder do teste 90%, nível de significância 5% e 1.0 mm a diferença a ser detectada da profundidade de sondagem. A diferença padronizada do poder de estudo em 0,95 ( $1-\beta=0,95$ ) e intervalo de confiança  $\alpha=0,05$ .

Foram selecionados 20 pacientes (8 homens e 12 mulheres entre 35 e 55 anos) com doença periodontal crônica moderada (ARMITAGE<sup>14</sup>, 1999). Os critérios de inclusão foram: presença no mínimo de 20 dentes; mínimo de 3 sítios não adjacentes com sangramento a sondagem (BOP); Profundidade de Sondagem (PS)  $\geq 5$ mm e não estarem fazendo uso de antibiótico nos últimos 6 meses. Pacientes receberam instrução de higiene oral semanalmente por 30 dias e após esse período foi realizado o exame periodontal nos pacientes com índice de placa visível menor que 30%.

Os exames clínicos foram realizados por um examinador treinado e calibrado para o momento do exame e grupo de paciente avaliado. Foram determinados os índices de placa visível - (IPV, 0-1); sangramento marginal (ISM)<sup>15</sup>; profundidade de sondagem (PS); recessão gengival (RG); nível de inserção clínica (NIC); sangramento à sondagem (SS) 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, usando sonda periodontal.

### *Seleção e coleta de amostra subgengival e medida do volume do fluido crevicular*

Após 7 dias do exame clínico inicial e 60 dias após o término do tratamento periodontal básico foram coletadas amostras de 30 sítios posteriores não adjacentes com profundidade de sondagem entre 5 - 7 mm, positivos para o sangramento a sondagem e nível de inserção deveria ser  $\geq 5$ mm e as amostras foram estocadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento da análise. Resumidamente, para a coleta microbiológica, após remoção do biofilme supra-gengival, os sítios selecionados foram isolados com algodão e gentilmente secos com ar. As amostras foram coletadas com a utilização de dois cones de papel Endo Points® (nº 30) estéril, os quais foram introduzidos na bolsa periodontal até a porção mais apical permanecendo o mesmo por 30 segundos. Os cones de papel foram colocados em tubo estéril tipo *ependorf* estéril contendo 500  $\mu\text{L}$  de tampão TE (10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA, pH 8,0) e congelados à  $-20^{\circ}\text{C}$  até a extração do DNA para análise microbiológica por PCR semiquantitativo.

Em seguida foi realizada a coleta para o exame imunológico, a qual foi coletada 10 minutos após o término da coleta microbiológica, para evitar possíveis interferências de contaminação. A coleta do fluido subgingival foi realizada com filtro especial para fluido gengival - GCF (PerioPaper - Gingival Fluid Collection Strips- ProFlow Inc) que, após isolamento do campo, foi introduzido no sulco gengival permanecendo durante 30 segun-

dos. Após sua remoção, o volume de GCF foi determinado em equipamento eletrônico previamente calibrado (Periotron 8000, Oraflow Inc, NY, USA) e convertido em volume (ml) pela referência da curva padrão. Os filtros de papel foram colocados em tubo estéril contendo 100  $\mu\text{L}$  de PBS associado ao coquetel de inibidores de protease (BSA - 1 mg/ml, antipain - 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , aprotinin - 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , leupeptin hydrochloride - 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , N-ethylmaleimide - 1mM and N-Dodecyl-N,N-Dimethyl-3-Amonio-1-propanesulfonate - 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), para a manutenção da viabilidade das substâncias e congelados à  $-20^{\circ}\text{C}$  para posterior análise imunológica através do ELISA-sandwich.

### *Tratamento Periodontal Básico*

Após as coletas, foi instituído o tratamento periodontal básico não cirúrgico, sob anestesia local, incluindo raspagem, alisamento e polimento supragengival (SRP) utilizando instrumentação manual (McCall and Gracey Curettes and Hirschfeld File Scaler- Hu Friday). O polimento foi executado imediatamente após a SRP com taça de borracha macia e pasta profilática. Os pacientes foram instruídos e motivados quanto à higienização bucal correta por meio de ensino da técnica de escovação e fio dental semanalmente por 60 dias até a próxima coleta.

### *Análise Microbiológica*

#### *Bactérias e condições de crescimento*

As espécies *F. alocis* (ATCC 35896), *P. tanneriae* (ATCC 51259), *T. denticola* (ATCC 35405), *P. gingivalis* (ATCC 33277), *T. forsythia* (ATCC 43037) e *P. endodontalis* (E203) cresceram em meio Tryptone soy blood agar suplementado com hemina (5 mg/l) e menadiona (1 mg/l) por 7-15 dias a  $37^{\circ}\text{C}$  em 85%  $\text{N}_2$ , 5%  $\text{CO}_2$  e 10%  $\text{H}_2$  em câmara de anaerobiose (Don Whitley Scientific, England) e foram utilizadas como cepa padrão na técnica de PCR.

#### *Extração do DNA*

A extração do DNA das amostras obtidas dos sítios e das cepas de referência foi realizada utilizando método padrão. Resumidamente, as células foram lisadas a  $100^{\circ}\text{C}$  e o DNA foi extraído com fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1). O DNA foi precipitado com etanol e, posteriormente ressuspenso em tampão TE. A concentração do DNA foi determinada por espectrofotometria (Biomate 3 Spectrophotometer, Thermo Electron Corporation), e a relação entre a absorvância a 260 e 280 nm foram analisadas e valores entre 1.8 e 2.0 foram consideradas apropriadas. A suspensão de DNA foi usada para PCR semiquantitativo.

#### *PCR Semiquantitativo*

Inicialmente a presença de DNA nas amostras obtidas dos pacientes foram confirmadas através de reação de polimerase em cadeia (PCR), realizada em termociclador convencional (MyCycler™ thermal cyler - BioRad) utilizando oligonucleotídeos inespecíficos<sup>16</sup>: PC3mod = 5' GGACTAHAGGGTATCTA-AT 3'; P0mod= 5' AGAGTTTGATCMTGG 3'.

Foram utilizados primers específicos: *Filifactor alocis* (5'-AGG-TGGTTTAACAAGTTAGTGG-3', 5'-CTAAGTTGCTTAGC-TGTCTCG-3' - 594 pb)<sup>17</sup>, *Prevotella tanneriae* (5'-CCACATATCG-CATCTGACGTG-3', 5'-CAATCTGCACCCTACTTGG-3' - 536

pb)<sup>18</sup>, *Treponema denticola* (5'-TAATACCGAATGTGCTCATT-TACAT-3', 5'-TCAAAGAAGCATTCCCTCTTCTTCTTA-3'-316 pb)<sup>19</sup>, *P. gingivalis* (5'-AATCGTAACGGG CGACACAC-3', 5'-GGGTTGCTCCTTCATCACAC-3'-593pb)<sup>19</sup>, *T. forsythia* (5'-GCGTAT GTAACCTGCCCGCA-3', 5'-TGCTTCAGTGT-CAGTTATACCT-3'-641pb)<sup>19</sup> e *P. endodontalis* (5'-GCTGCAG-CTCAACTGTAGTC-3', 5'-CCGCTTCATGTCACCATGTC-3'-672pb)<sup>20</sup> e a otimização de cada par de primer está descrita na Tabela 1.

Tabela 1 - Condições de termociclagem e otimização de cada par de primer.

Primer	Condição da reação	Concen- tração de Mg2+	Unidades de Taq
Primer inespecífico	95 oC, 5min (1 ciclo); 96 oC, 30 seg, 45 oC, 30seg, 72 oC, 30seg (30 ciclos)	2,5mM	1U
<i>P. gingivalis</i>	95 oC, 2min. (1 ciclo); 95 oC, 30 seg, 60 oC, 1min., 72 oC, 1min. (36 ciclos)	2,5mM	1U
<i>T. forsythia</i>	95 oC, 2min. (1 ciclo); 95 oC, 30 seg, 60 oC, 1min., 72 oC, 1min. (36 ciclos)	1,5mM	1,25U
<i>P. endodontalis</i>	95 oC, 2min. (1 ciclo); 94 oC, 30 seg, 60 oC, 1min., 72 oC, 2min. (36 ciclos)	1,5mM	1,25U
<i>F. alocis</i>	95°C, 2 min (1 ciclo); 94°C, 30 s, 55°C, 1 min, 72°C, 2 min (36 ciclos)	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)	4,0 mM	1U
<i>T. denticola</i>	95°C, 2 min (1 ciclo); 95°C, 30 s, 60°C, 1 min, 72°C, 1 min (36 ciclos)	1,0 mM	1,25U

As reações de PCR foram otimizadas para cada oligonucleotídeo específico utilizado e realizada em volume final de 25 µL com DNA (50 ng/ul) e 1 mM de cada oligonucleotídeo do microrganismo específico. Todas as reações foram realizadas na presença de controle positivo, contendo DNA genômico específico do microrganismo em análise, e controle negativo, sem DNA molde. Os produtos do PCR foram analisados em eletroforese em gel de agarose a 1% em solução tamponada TBE 1X e acrescido de 0,5 uL do corante de brometo de etídio a 100 V por 90 min. (Invitrogen Tech-LineSM). A imagem obtida foi digitalizada para documentação e análise (Image Quant 100 – GE Healthcare).

**Análise Imunológica: quantificação de emmprin (cd-147), MMP-2 e MMP-9**

A concentração de EMMPRIN, MMP-2 e MMP-9 presente nas amostras do fluido gengival crevicular dos pacientes com periodontite crônica foi mensurado por meio da técnica de ELISA sanduíches (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA), de acordo com instruções do fabricante em espectrofotômetro a 450 nm (Multiskar Ascent – Lab- systems Uniscience, Vantaa/Finland) e foram realizados em duplicata. Os níveis de fluido

gengival crevicular (FGC) de EMMPRIN, MMP-2 e MMP-9 em cada amostra foi determinada usando os valores de concentração padrão do kit. Amostras de FGC foram testadas na diluição 1:4 para EMMPRIN, MMP-2 e MMP-9 de acordo com padronização prévia e 100 µl da diluição foi usada em cada poço da placa de ELISA, como recomendado pelo fabricante. Os resultados da quantificação de EMMPRIN, MMP-2 e MMP-9 foram expressos em ng/ml.

**Análise Estatística**

Os dados clínicos e microbiológicos foram analisados utilizando o software GraphPad Prism 5.0® (GraphPad Software, San Diego, CA). Para todos os testes foi considerado um nível de significância de 5%, portanto, foram considerados estatisticamente significantes todos os resultados que apresentaram valor de p≥0,05.

As variáveis idade, PS, NIC e SS dos indivíduos foram analisadas utilizando o teste t paramétrico quantitativo e as variáveis quantitativas (PS e NIC) ao teste de normalidade (D’Agostino), teste de Wilcoxon. Para identificar resultados estatisticamente significativos, utilizou-se o teste exato de McNemar.

Níveis de EMMPRIN e MMPs foram submetidos ao teste de Normalidade de D’Agostino para verificar se os mesmos ajustavam-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). A correlação de Spearman Rank Correlation (R) foi utilizada para correlacionar os índices de EMMPRIN com a produção de MMP-2 e MMP-9.

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.

**RESULTADOS**

A população investigada foi composta por 20 pacientes e não houve diferença estatisticamente significativa para a idade (46 ± 7.4) e número de dentes (23.55 ± 2.95) sendo considerada, portanto, uma amostra homogênea.

Os sítios aonde foram coletadas as amostras para análise microbiológica e imunológica obtiveram 100% de sangramento a sondagem no baseline com decréscimo para 13.33% após o tratamento preriodontal (p<0.0001). Pode-se observar que a PS (5.3 ± 0.54 mm, baseline) e NIC (5.4 ± 0.62 mm, baseline) mostraram redução estatisticamente significativa (p<0.0001) após terapia periodontal (3.6 ± 0.76 mm e 3.8 ± 0.95 mm para PS e NIC, respectivamente).

**Detecção de Microrganismos através do PCR convencional**

A Figura 1 ilustra a prevalência dos microrganismos analisados por PCR convencional. Diferenças significantes foram encontradas entre o baseline e 60 dias após o tratamento periodontal para todas as bactérias analisadas (p < 0.01).

A detecção de todas as bactérias analisadas, *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *P. endodontalis*, *F. alocis*, *P. tanneriae* e *T. denticola* antes do tratamento foram respectivamente: 46,6%, 56,6%; 53,3%; 23,3%;

23,3%; 30%, com redução estatisticamente significativa aos 60 dias para 10%, 20%, 3.3%, 10%, 10% e 16% respectivamente.

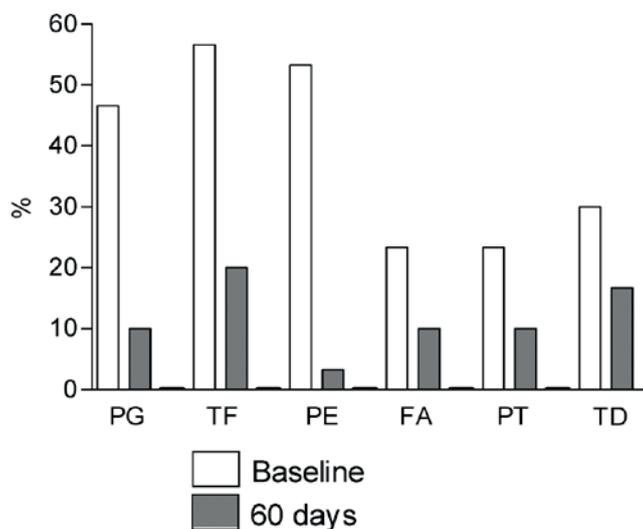


Figure 1 - Detecção das bactérias (%) nos diferentes períodos através do PCR convencional ( $p < 0.01$ ).

A média do fluido gengival crevicular (Periotron) está ilustrada na Figura 2. Não houve relação estatisticamente significativa entre o fluido crevicular antes e após o tratamento periodontal ( $p > 0.005$ ).

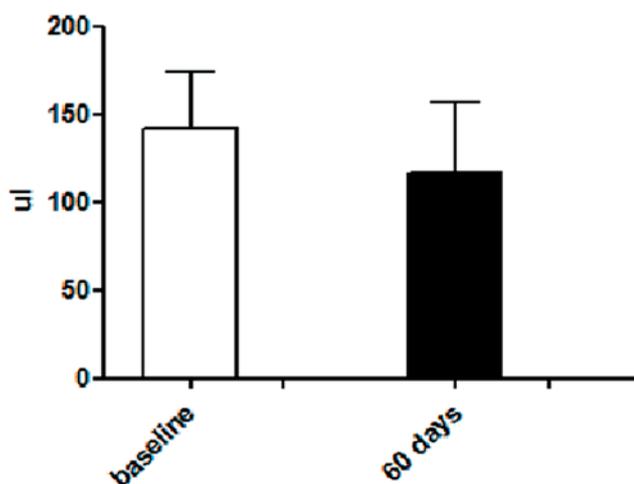


Figure 2 - Distribuição do volume do fluido gengival crevicular (média  $\pm$  desvio padrão) da coleta dos sítios no baseline e 60 dias após o tratamento periodontal (\*\*  $p > 0.05$ ).

### Emmprin, MMP-2 e MMP-9

A distribuição da quantidade total de EMMPRIN, MMP-2 e MMP-9 no baseline 60 dias após o tratamento está ilustrado na

A quantidade total de MMP-2 no baseline foi 5224 ng/ml, com redução estatisticamente significativa ( $p < 0,01$ ) após o tratamento para 3192 ng/ml.

A quantificação de MMP-9 no baseline (1433 ng/ml) foi maior quando comparado com MMP-2. Entretanto, MMP-9 não mostrou redução estatística após o tratamento periodontal (1192 ng/ml) ( $p > 0.005$ ).

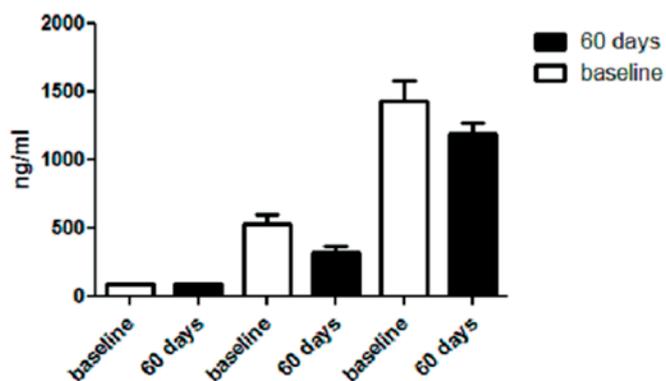


Figura 3 - A quantidade total de EMMPRIN no baseline e 60 dias foram respectivamente 0,90ng/ml e 0,89 ng/ml, e não foi encontrada diferença estatística ( $p > 0,05$ ).

### Correlação entre Emmprin E MMP-2 E MMP-9

Não houve correlação entre a quantidade total de EMMPRIN e MMP-2 ( $R = 0,25$ ) e EMMPRIN e MMP-9 ( $R = - 0,5$ ), entretanto houve forte correlação entre as quantidades totais de MMP-2 e MMP-9 ( $R = 0,975$ ,  $p < 0,05$ ).

### DISCUSSÃO

O presente estudo teve por objetivo detectar *F. alocis*, *P. tanmerae*, *T. denticola*, *P. gingivalis*, *T. forsythia* e *P. endodontalis*, bem como quantificar EMMPRIN-CD147, MMP-2 e MMP-9 em pacientes antes e após o tratamento periodontal básico. O tratamento periodontal foi eficaz para reduzir os parâmetros clínicos (SS, NIC, PS). Assim, a terapia de raspagem e alisamento radicular associado a instrução de higiene oral foi capaz de diminuir o sangramento a sondagem, a profundidade de sondagem e o nível de inserção clínica<sup>21</sup>.

Microrganismos e seus produtos são iniciadores de lesões periodontais. Os principais patógenos associados com a doença periodontal inclui *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, *T. forsythia*, *T. denticola* e *P. intermedia*. Entretanto, Kumar *et al.*<sup>22</sup> (2003), Tran *et al.*<sup>20</sup> (1997), Dahlen e Leonhardt<sup>23</sup> (2006), Bedran *et al.*<sup>24</sup> (2012) sugerem que outros microrganismos pobremente caracterizados podem estar associados com a doença periodontal. Outras espécies que também vem sendo estudadas e descritas na literatura e que mereceu destaque no presente estudo foram *Filifactor alocis*, *Prevotella tanmerae*<sup>25-27</sup> e que possivelmente podem estar associadas com o início e progressão da doença periodontal.

Através da técnica de PCR convencional os patógenos *P. gingivalis*, *T. forsythia* e *P. endodontalis* foram encontrados em maiores proporções no baseline e com redução estatisticamente significativa após 60 dias do tratamento periodontal e o mesmo ocorreu para *F. alocis*, *P. tanmerae* e *T. denticola*. Estes achados corroboram com

os trabalhos de Van Winkelhoff *et al.*<sup>28</sup> (2002) que avaliaram a presença dos patógenos *T. forsythia* e *P. gingivalis* e com os achados de Boutaga *et al.*<sup>29</sup> (2006), que detectaram a presença destes dois microrganismos em maiores quantidades em pacientes com doença periodontal quando comparados com pacientes com ausência de doença. Ashimoto *et al.*<sup>19</sup> (1996) avaliaram a presença de *T. forsythia* e outros microrganismos na doença periodontal e encontraram mais de 70% de sítios com presença deste patógeno, mostrando o potencial patogênico do mesmo. Estas duas bactérias (*T. forsythia* e *P. gingivalis*) podem ser encontradas frequentemente em sítios doentes assim como em sítios saudáveis. Segundo Holt, Ebersole<sup>26</sup> (2005) e Kesavalu *et al.*<sup>30</sup> (2007), *P. gingivalis*, *T. forsythia* e *T. denticola* levam a um processo imunoinflamatório e, conseqüentemente, reabsorção óssea, caracterizando assim a influência desses microrganismos no processo de doença periodontal.

Diversos trabalhos disponíveis na literatura disponível também já identificaram com certa frequência *T. denticola*<sup>31</sup> em sítios acometidos com periodontite crônica. Outros microrganismos como o *F. alocis* vem sendo constantemente identificado em casos de infecções endodônticas e periapicais e, possivelmente, pode estar associado também a casos de infecções periodontais<sup>32, 17</sup>, como sugere os resultados do presente estudo. Os resultados foram estatisticamente significantes entre a ocorrência de *T. denticola*, *F. alocis* e *P. tanneriae* no baseline ( $p < 0,01$ ) e redução após 60 dias. Resultados de Kumar *et al.*<sup>22</sup> (2003) mostraram a presença de três novos patógenos associados a doença periodontal, *F. alocis*, *P. tanneriae* e *P. endodontalis* sendo que estes apresentavam-se em maiores proporções em pacientes com doença periodontal e em proporções semelhantes a outros patógenos como *P. gingivalis*, mostrando que esses três patógenos possuíam potencial de influenciar na progressão da doença periodontal.

Considerando-se a similaridade entre a microbiota da doença periodontal e infecções pulpares, verificou-se que *P. endodontalis* pode ser detectado em bolsas periodontais na mesma proporção. Este patógeno já foi identificado na microbiota subgingival de humanos, entretanto existem poucos relatos na literatura que mostram a sua prevalência na doença periodontal<sup>24</sup>.

Os patógenos *P. gingivalis* e *T. forsythia* usados rotineiramente como diagnóstico em amostras da microbiota subgingival, confirmaram sua associação com os casos de doença periodontal, ou seja, foram encontrados em maior quantidade no baseline, como também, *P. endodontalis*, com potencial patogênico devido a sua associação com *P. gingivalis* e *T. forsythia*.

Porém, ainda existem poucos estudos na literatura que mostram esta associação do *P. endodontalis* nos casos de doença periodontal. Dessa maneira, novos estudos longitudinais e controlados deverão ser realizados para se avaliar o potencial patogênico do *P. endodontalis* ao longo do curso da doença periodontal e o efeito do tratamento periodontal em longo prazo na sua eliminação.

Diante dos resultados obtidos, 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<sup>33</sup>. Além disso, 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 conseqüente capacidade de desenvolver 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 forneça resultados de detecção, caracterização e quantificação para desenhar de forma mais completa o perfil das comunidades microbianas<sup>34</sup>.

Nesse estudo, foi quantificada a produção de EMMPRIN em amostras de fluido subgingival de pacientes portadores de periodontite crônica e associando os resultados com a produção de MMP-2 e MMP-9. MMPs são considerados mediadores da destruição tecidual e estão fortemente correlacionados com a doença periodontal. MMP-2 e MMP-9 são colagenases tipo IV que se originam de células polimorfonucleares, macrófagos, fibroblastos, célula epitelial e bactéria oral patogênica. Níveis de MMP-9 estão aumentados durante o processo de inflamação periodontal, embora isto não ocorra para os níveis de MMP-2. Neste trabalho, a redução de MMP-2 foi estatisticamente significativa, mas não para os níveis de MMP-9 após tratamento periodontal.

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 em gengiva saudável<sup>35</sup>.

Produtos bacterianos também podem estimular a produção de MMPs. Tanabe, Grenier<sup>36</sup> (2008), evidenciaram que o lipopolissacarídeo (LPS) de *A. actinomycetemcomitans* pode induzir macrófagos, alterando a secreção de MMP-9, fator de necrose tumoral- $\alpha$  e interleucina 1- $\beta$ . Chang *et al.*<sup>7</sup> 2002, determinaram o efeito de *P. endodontalis* e *P. 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. 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.

O presente estudo aponta a idéia e sugere que EMMPRIN pode contribuir, pelo menos em parte, para aumentar os níveis de outras metaloproteinasas da matriz extracelular do tecido conjuntivo periodontal, como relatado por Feldman *et al.*<sup>11</sup> (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 aumentou a secreção de MMP-3.

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.

## CONCLUSÃO

Frente às evidências científicas expostas, pode-se concluir que as bactérias *Filifactor alocis* e *Prevotella tanneriae* podem ser considerados potenciais marcadores da doença periodontal. Além disso, o

tratamento periodontal foi efetivo nos sítios doentes na redução dos níveis de MMP-2 e MMP-9 e o EMMPRIN não esteve associado à produção de MMP-2 e MMP-9.

## REFERÊNCIAS

01. 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 (5): 537-40.
02. Guiver M, Levi K, Oppenheim BA. Rapid identification of *Candida* species by TaqMan PCR. *J Clin Pathol.* 2001; 54 (5): 362-66.
03. Laugisch O, Schacht M, Guentsch A, Kantyka T, Sroka A, Stenicke HR, Pfister W, Sculean A, Potempa J, Eick S. Periodontal pathogens affect the level of protease inhibitors in gingival crevicular fluid. *Mol Oral Microbiol.* 2012; 27 (2): 45-56.
04. 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 (10): 1359-62.
05. O'Shea M, Willenbrock F, Williamson RA, Cockett MI, Freedman RB, Reynolds JJ, Docherty AJ, Murphy G. Site-directed mutations that affect 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.
06. Allen CM. Diagnosing e managing oral candidosis. *J Am Dent Assoc.* 1992; 123(1): 77-78.
07. 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 (2): 90-3.
08. 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(8): 755-72.
09. 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 (7): 638-644.
10. Dahlén G, Leonhardt A. A new checkerboard panel for testing bacterial markers in periodontal disease. *Oral Microbiol Immunol.* 2006; 21 (1): 6-11.
11. 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 and Infection.* 2011; 13 (14-15): 1261-9.
12. Ryan ME, Golub LM. Modulation of matrix metalloproteinase activities in periodontitis as a treatment strategy. *Periodontol.* 2000; 24: 226-38.
13. Koromantzos PA, Makrilakis K, Dereka X, Offenbacher S, Katsilambros N. Effect of Non-Surgical periodontal Therapy on C-Reactive Protein, Oxidative Stress, and Matrix Metalloproteinase (MMP)-9 and MMP-2 Levels in Patients With Type 2 Diabetes: A Randomized Controlled Study. *J Periodontol.* 2012; 83 (1): 3-10.
14. Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodont.* 1999; 4 (1): 1-6.
15. Ainamo J, Bay I. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. *Int Dent J.* 1975; 25(4): 229-35.
16. Wilson KH, Blitchington RB, Greene RC. Amplification of bacterial 16S ribosomal DNA with polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 1990; 28(9): 1942-6.
17. Siqueira JF, Roças I. Simultaneous Detection of *Dialister pneumosintes* and *Filifactor alocis* in Endodontic Infections by 16SrDNA-directed Multiplex PCR. *J Endod.* 2004; 30 (12): 851-4.
18. 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(2): 110-4.
19. 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 (4): 266-73.
20. Tran T, Flynn MJ, Chen C, Slots J. *Porphyromonas endodontalis* in subgingival plaque. *Clin Infect Dis.* 1997; 25 Suppl 2: 222-3.
21. Greenstein G. Periodontal response to mechanical non-surgical therapy: A review. *J Periodontol.* 1992; 63 (2): 118-130.
22. Kumar PS, Griffen AL, Barton JA, Paster BJ, Moeschberger ML, Leys EJ. New bacterial species associated with chronic periodontitis. *J Dent Res.* 2003; 82 (5): 338-44.
23. Dahlén G, Leonhardt A. A new checkerboard panel for testing bacterial markers in periodontal disease. *Oral Microbiol Immunol.* 2006; 21(1): 6-11.
24. Bedran TB, Marcantonio RA, Spin Neto R, Mayer MP, Grenier D, Spolidorio LC, Spolidorio DP. *Porphyromonas endodontalis* in chronic periodontitis: a clinical and microbiological cross-sectional study. *Journal of Oral Microbiology.* 2012; 4. doi: 10.3402/jom.v4i0.10123.
25. 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 Periodontol Res.* 2009; 44 (1): 125-32.
26. 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.
27. 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 (5): 1698-1704.
28. Van Winkelhoff AJ, Loos BG, van der Reijden WA, van der Velden U. *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus* and other putative periodontal pathogens in subjects with and without periodontal destruction. *J Clin Periodontol.* 2002; 29 (11): 1023-8.
29. Boutaga K et al. 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 (1): 79-86.
30. Kesavalu L, Sathishkumar S, Bakthavatchalu V, Matthews C, Dawson D, Steffen M, Ebersole JL. Rat model of polymicrobial infection, immunity, and alveolar bone resorption in periodontal disease. *Infect Immun.* 2007; 75 (4):1704-12.
31. Mineoka, Awano, Rikimaru, 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 (4): 670-676.
32. Sakamoto M, Siqueira-Junior JF, Roças IN, Benno Y. Bacterial reduction and persistence after endodontic treatment procedures. *Oral Microbiol Immunol.* 2007; 22 (1): 19-23.

33. 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): 1-11.
34. Jung IY, Choi BK, Kum KY, Yoo YJ, Yoon TC, Lee SJ. 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 (3): 329-34.
35. 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 (3): 469-476.
36. 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 (3): 372-7.

## 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, in association with infection with multiple species of bacteria. It is estimated that more than 400 species colonize the biofilm and some oral species related to periodontal disease is present in the subgingival including *P. gingivalis*, *T. forsythia* and *T. denticola*. However, other organisms may be related of this disease, as *Filifactor allocis* and *Prevotella tanneriae*. These microorganisms and 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 objec-

tive of this study was to detect *F. allocis*, *P. tanneriae*, *T. denticola* and the glycoprotein EMMPRIN (CD-147) and its correlation with MMP-2 and MMP-9 in subgingival fluid samples of patients with chronic periodontitis. Fluids were collected from healthy and disease subgingival sites of 20 healthy individuals before basic periodontal treatment and after of 60 days of treatment. Their DNAs were extracted and portions of the 16S gene were amplified and performed conventional PCR. 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. allocis* 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.