



UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA E EXPERIMENTAL DO POTENCIAL
PATOGENICO DA *Entamoeba gingivalis* NA DOENÇA PERIODONTAL
HUMANA**

SIBELI BONAFÉ SANTOS CEMBRANELLI

Uberaba

2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

SIBELI BONAFÉ SANTOS CEMBRANELLI

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA E EXPERIMENTAL DO POTENCIAL
PATOGENICO DA *Entamoeba gingivalis* NA DOENÇA PERIODONTAL
HUMANA**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Medicina Tropical e Infectologia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Medicina Tropical e Infectologia; área de concentração Parasitologia e Imunologia Aplicadas.

Orientadora: Prof. Dra. Eliane Lages-Silva

Uberaba

2010

**Catálogo – na – fonte: Biblioteca da Universidade
Federal do Triângulo Mineiro (UFTM)**

Cembranelli, Sibeli Bonafé Santos.

Caracterização genética e experimental do potencial patogênico da *Entamoeba gingivalis* na doença periodontal humana/ Sibeli Bonafé Santos Cembranelli. - - 2010.

137 f. ; 5 tab. ; 9 fig.

Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical e Infectologia
– Área de concentração Parasitologia e Imunologia Aplicadas)
– Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG,
2010.

Orientadora: Profa. Dra. Eliane Lages Silva.

1. *Entamoeba gingivalis*. 2. Patogenicidade. 3.
Caracterização genética. 4. Doença periondontal. I. Título. II.
Lages-Silva, Eliane.

SIBELI BONAFÉ SANTOS CEMBRANELLI

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA E EXPERIMENTAL DO POTENCIAL
PATOGENICO DA *Entamoeba gingivalis* NA DOENÇA PERIODONTAL
HUMANA**

Esta dissertação foi julgada adequada à obtenção do título de Mestre em Medicina Tropical e Infectologia e aprovada em sua forma final pelo Curso de Mestrado em Medicina Tropical e Infectologia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro.

Uberaba, 04 de novembro de 2010.

Profª. e orientadora Dra. Eliane Lages-Silva
Universidade Federal do Triângulo Mineiro- UFTM

Profª. Dra. Lúcia de Fátima Menezes Feitosa
Universidade Federal do Rio de Janeiro- UFRJ

Prof. Dr. Dalmo Correia Filho
Universidade Federal do Triângulo Mineiro- UFTM

DEDICO

Ao meu saudoso “PAPAI” Osmar; que eu tenho certeza que nunca me abandonou, apenas partiu, mas sua presença é sempre constante por onde eu ando. Você sempre irá me acompanhar...

Ao meu amado esposo Marcello; que soube entender a ausência da minha presença, sempre compartilhando as inquietações e as conquistas durante este período. Eu te amo muito!!!

À minha amada mãe Neide; que sempre me ouviu e me apoiou nos momentos de desânimo e de alento. Que mesmo estando distante, torceu pela conquista desta vitória.

Ao meu filhote Vincenzo: Meu coração e alma se inundam de amor, felicidade e curiosidade pela pessoinha que ainda não conheço e que mudará tudo para sempre!!!

AGRADECIMENTOS

À Prof. Dra. Eliane Lages-Silva, na qualidade de **orientadora** e **amiga**; pela competência profissional e pelo tempo que generosamente me dedicou transmitindo-me os melhores e mais profundos ensinamentos com paciência, lucidez e confiança. Você soube me guiar para um caminho de mudanças e crescimento. Obrigada por tudo e principalmente pela nossa amizade!

Aos Profs. Dr. Luís Eduardo Ramírez e Mário León Silva-Vergara, por me abrirem as portas desta Universidade;

À UFTM e aos professores do programa de Pós Graduação em Medicina Tropical e Infectologia, pela oportunidade de crescimento, aprendizagem, pela realização profissional e pessoal;

À secretária do CPGMTI Joyce Nascimento, por toda ajuda concedida;

À FUNEPU e à disciplina de Doenças Infecciosas e Parasitárias (DIP), em nome do Prof. Dr. Dalmo Correia Filho que me possibilitou a coleta de material dos pacientes HIV/SIDA;

À secretária Sílvia da FUNEPU, pela hospitalidade, agilidade e auxílio que permitiram parte da realização deste estudo;

Ao cirurgião dentista Dr. José Tarcísio Borges por me ceder parte das amostras coletadas neste estudo;

À Universidade de Taubaté, responsável pela minha formação profissional, principalmente ao Prof. Dr. José Roberto Cortelli e a toda disciplina de Periodontia, que nos recebeu para a coleta de material e que muito contribuiu com este trabalho;

Ao CNPq pela bolsa de estudos concedida;

Ao Prof. Dr. Dalmo Correia Filho e Profa Dra. Lúcia de Fátima Menezes Feitosa que aceitaram o convite para participar desta banca, proporcionando sugestões que servirão para o crescimento, aprendizagem e incentivo à pesquisa.

Ao amigo César Gómez Hernández pelas múltiplas e inestimáveis contribuições.

Ao colega Tsai Hsin Ju, pelas traduções dos artigos em mandarim. Muito obrigada, você me caiu do céu!

Ao biólogo Luciano Paiva que me auxiliou na manipulação com os animais, suportando meu medo e meus escândalos. Obrigada!

Ao amigo Gabriel Antônio Nogueira Nascentes pela competência, sugestões, busca de resultados, ensinamentos e empenho na análise estatística deste trabalho.

Ao aluno de Iniciação Científica Túlio Thomaz Richinho, por ter compartilhado comigo parte dos experimentos desta pesquisa.

À amiga e mestrandia Poliana Lucena que compartilhou comigo momentos deste trabalho, sempre com muita dedicação e disposição.

À amiga Prof. Dra. Marlene Cabrini dos Santos por toda ajuda prestada;

Ao amigo e Prof. Dr. Wendell Meira pela revisão do abstract;

À técnica Pollyana Pinheiro pela ajuda na Histologia;

Ao amigo Henrique Borges Kappel, pelo auxílio na LSSP-PCR;

Ao amigo Kennio Ferreira Paim, pelo auxílio na utilização do programa Gel Compar II;

À amiga Karine Rezende de Oliveira pela amizade e ajuda na formatação desta dissertação;

Aos amigos, funcionários e colegas do Laboratório de Parasitologia que comigo conviveram; e suportaram o mau cheiro das minhas culturas;

Aos amigos: Sandra e Filipinho, Rosi e Gabriel; Karine e César; Keila e Jean; Ramírez, Eliane, Fernandinha e Geromim; Wendell e Claudia; Cris Pissetti, Glenda Presotto, Márcia e Júlio Guedes; Pollyana e Juames, companheiros dos meus momentos mais descontraídos em Uberaba;

A todos os pacientes, principais responsáveis por este trabalho. Muito obrigada!

A Deus, que sempre me foi presente nas horas mais providenciadas da minha vida.

*Você foi criado para construir
pirâmides e versos, descobrir
continentes e mundos, e caminhar,
sempre, com um saco de
interrogações na mão e uma caixa
de possibilidades”*

Nizan Guanaes

RESUMO

As pesquisas envolvendo os protozoários da boca são limitadas e conduzidas em poucos países, sobretudo, no que se refere à patogenicidade da *Entamoeba gingivalis* (*E. gingivalis*) que ocupa uma posição controversa na pesquisa científica. O objetivo deste estudo foi avaliar a frequência de *Entamoeba gingivalis* no total de 177 indivíduos de três diferentes grupos: HIV/SIDA (n=51), clínico com doença periodontal (n=31) e não clínicos (n=95) e caracterizar os perfis biológicos e genéticos de suas populações. As amostras de *E. gingivalis* foram coletadas em diferentes sítios bucais por meio de técnicas do raspado gengival, cones de papel absorvente e lavado bucal. O cultivo do parasito foi avaliado em 20 meios de cultura e o potencial patogênico pela inoculação do parasito no tecido gengival de *Rattus norvegicus* imunocompetentes e imunossuprimidos. A presença dos trofozoítos nas amostras clínicas e experimentais foi avaliada pelo exame direto a fresco (EF) e pela amplificação da SSU do gene 18S do rRNA por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) específica e a caracterização genética pela LSSP-PCR (*Low stringency single specific primer- PCR*). A frequência geral de *E. gingivalis* foi de 33,3% (59/177), sendo maior no grupo de pacientes HIV/SIDA 58,8% (30/51), seguido pelo grupo clínico 35,5% (11/31) e não clínico 19,0% (18/95). Os dados clínicos e epidemiológicos mostraram maior frequência do parasito nos indivíduos do gênero feminino 56,5% (100/177); com idade superior a 35 anos de idade 42,7% (35/82); com condição de higiene bucal ruim 64,3% (27/42) ou presença de periodontite no grupo clínico 47,4% (9/19) e em tabagistas 65,6% (21/32). No grupo HIV/SIDA não foi detectado caráter oportunista associado ao nível de linfócitos TCD4⁺ < 200 células/mm³ (p=0,771) e carga viral (p=0,139). Não houve correlação com a presença do parasito e pH salivar (p=0,075). A análise comparativa do EF e PCR no diagnóstico de *E. gingivalis* em 91 pacientes não apresentou diferença significativa entre ambos, que detectaram 76,9% de casos positivos sendo 46,1% EF+/PCR+ ; 57,1% EF+; 65,9% PCR+; 10,1% EF+/ PCR-; 19,8% EF-/PCR+ e 23,1% EF-/PCR- com concordância fraca pela análise do coeficiente Kappa (k=0,355). O raspado foi mais eficiente (p<0,001) na detecção do parasito pelo EF que o lavado, respectivamente 31,6% (56/177) e 6,5% (9/139), sendo o último positivo exclusivamente no grupo HIV/SIDA. A positividade nas amostras de um mesmo paciente pelo EF e PCR nas amostras supragengivais foi respectivamente de 35,5%

(11/31) e 61,3% (19/31) e nas amostras subgingivais de 12,9% (4/31) e 38,7% (12/31) mostrando maior parasitismo na região supragengival.

O meio BDM tamponado com HEPES com adição de antibióticos 48 horas após início do cultivo e o uso do amido de arroz em solução, permitiu o melhor crescimento e manutenção *in vitro* de quatro isolados do parasito que permaneceram em cultura por um período médio de $42,7 \pm 38,3$ dias e apresentaram comportamento biológico diversificado, isolado-dependente de acordo com suas semelhanças foram divididos em dois grupos U-C/U-301 e U-E/U-M.

Na infecção experimental em ratos não foram evidenciadas alterações significativas ao nível macro e microscópico nem foi possível detectar a presença do parasito ou seu DNA.

A análise da variabilidade genética da SSU do gene 18S do rRNA pela LSSP-PCR diretamente das amostras bucais demonstrou a distribuição das populações de *E. gingivalis* em dois grupos, sendo um deles associado à patogenicidade agrupando a maioria das amostras HIV/SIDA e do grupo clínico (periodontite e/ou gengivite). Foi evidenciada maior similaridade entre os perfis genéticos de populações obtidas de um mesmo sítio bucal em diferentes pacientes do que entre as amostras de um mesmo paciente como foi detectado entre as amostras subgingivais T14, T21 e T24 (60,3%) e as supragengivais T21 e T24 (75,7%) e T11 e T14 (64,7%). Esse dado sugere a associação de populações específicas do parasito por sítios distintos na cavidade bucal, possivelmente relacionadas com a microbiota residente ou mesmo às condições ambientais como a anaerobiose. Portanto, nossos resultados ampliam novas perspectivas para conduzir outras investigações envolvendo *E. gingivalis* pois a mesma mantém uma posição muito incerta na história da pesquisa.

Palavras chaves: *Entamoeba gingivalis*. Patogenicidade. Caracterização genética. Doença periondontal.

ABSTRACT

The research involving protozoa species from the mouth are limited and conducted in a few countries, particularly in relation to the pathogenicity of *Entamoeba gingivalis* (*E. gingivalis*) which develops a controversial position in scientific research. The aim of this study was to evaluate the frequency of the *Entamoeba gingivalis* in a total of 177 individual from three different groups: HIV/AIDS (n=51), clinical periodontal disease (n=31) and nonclinical (n=95) and characterize the biological and genetic profiles of their populations. The *E. gingivalis* samples were collected in different oral sites through three different techniques: scraping gum, absorbent paper cones and mouthwash. The parasite cultivation was evaluated in 20 different medium and the pathogenic potential by inoculation of the parasite in the gingival tissue of immunocompetent and immunosuppressed *Rattus norvegicus*. The presence of trophozoites in experimental and clinical samples was evaluated by direct fresh examination (FE) and amplification of the 18S SSU- rRNA gene by polymerase chain reaction (PCR) followed by specific genetic characterization using LSSP-PCR (*Low stringency single specific primer- PCR*). The overall frequency of *E. gingivalis* was 33,3% (59/177), but the group analysis showed a higher score for the HIV/AIDS group, 58,8% (30/51), followed by clinical group 35,5% (11/31) and non-clinical, 19,0% (18/95). The clinical and epidemiological data showed a higher frequency of the parasite in female individuals 56,5% (100/177), in the subjects presenting aged over 35 years 42,7% (35/82), the ones with poor oral hygiene 64,3% (27/42) or periodontitis within the clinical group 47,4% (9/19) and in smokers 65.6% (21/32). In the HIV/AIDS group the opportunism associated with level of $CD4^+ < 200$ cells/mm³ (p = 0,771) and viral load (p=0,139) was not detected. There was no correlation among the parasite presence and salivary pH (p=0,075). Comparative analysis of FE and PCR for the diagnosis of *E. gingivalis* in 91 patients showed no significant difference between them, since in 76,9% of positive cases, 46,1% were FE+/PCR+; 57,1% FE+; 65,9% PCR+; 10,1% FE+/PCR-; 19,8% FE-/PCR+ and 23,1% FE-/PCR- demonstrating a weak agreement after the Kappa coefficient analysis (k=0,355). Scraping showed a higher efficacy (p<0,001) for the parasite detection by FE when compared to mouthwash, with values of 31,6% (56/177) and 6,5% (9/139) respectively, while the latter was positive only in the HIV/AIDS group. The positivity detected by PCR and FE in samples from the same patients obtained from supragingivals was respectively 35,5% (11/31) and

61.3% (19/31) and from subgingival of 12,9% (4/31) and 38,7% (12/31) showing higher parasitism in the supragingival region.

The BDM medium buffered with HEPES with the addition of antibiotics 48 hours after the beginning of the cultivation and use of rice starch in solution, allowed the better growth and maintenance *in vitro* of four parasite strains that remained in culture for the average of $42,7 \pm 38,3$ days and featured diverse biological-dependent and isolated according to their similarities were divided into two groups U-C/U-301 and U-E/U-M.

In the experimental infection, mice did not show significant changes neither at the macro and microscopic examem nor at the parasite DNA detection via PCR.

The genetic variation analysis within the 18S SSU-rRNA gene by LSSP-PCR directly from oral samples showed the distribution of *E. gingivalis* populations into two groups, one associated with pathogenicity grouping most of the samples from the HIV/AIDS and the clinical group (periodontitis/gingivitis). A higher similarity was observed between the genetic profiles of populations derived from the same site in different dental patients than among samples from the same patient, since this was found between the subgingival samples T14, T21 and T24 (60,3%); T21 and T24 supragingivais (75,7%) and T11 and T14 (64,7%). This data suggest the association of specific populations of the parasite by different sites in the oral cavity, possibly related to local or even to microbes with environmental conditions such as anaerobiosis. Therefore, our results extended new opportunities for conducting other investigations involving *E. gingivalis* because it took a highly uncertainty in this research history.

Keywords: *Entamoeba gingivalis*. Pathogenicity. Genetic characterization. Periondontal disease.

LISTA DE ABREVIATURAS

× g= Gravidade

μg= Micrograma

μL= Microlitro

μM= Micro molar

CIC= Conforme informação do cliente

cm²= Centímetro quadrado

CV= Carga viral

dNTP= Desoxirribonucleotídeos trifosfatados

EDTA= Ethylenediamine tetraacetic acid

EF= Exame direto a fresco

EGO-1= Iniciador (1)

EGO-2= Iniciador (2)

GN= Gengivite

HE= Hematoxilina eosina

K₂HPO₄= Fosfato de potássio dibásico

Kb= Kilo base

KH₂PO₄= Fosfato de potássio monobásico

LSSP-PCR= *Low stringency single specific primer- PCR*

LTCD4⁺= Linfócitos TCD4⁺

M= Molar

MG= Estado de Minas Gerais

MgCl₂= Cloreto de magnésio

mL= Mililitro

mM= Mili molar

mm= Milímetro

mm² = Milímetro quadrado

MM= Marcador molecular

Na₂HPO₄ = Fosfato de sódio dibásico

NaCl= Cloreto de sódio

NaH₂PO₄= Fosfato de sódio monobásico

NaOH = Hidróxido de sódio

OR= Odds ratio

°C= Grau centígrado

p= Valor de significância

pb= Pares de base

PCR= Reação em cadeia da polimerase

ph= Potencial hidrogeniônico

PR= Periodontite

RAR= Raspagem e alisamento radicular

rRNA= RNA ribossomal

sb= subgengival

SP= Estado de São Paulo

sp= supragengival

SSU-rRNA= Menor subunidade ribossomal do RNA ribossomal

TBE= Tampão Tris/Borato/EDTA

Tris-HCl= Tris hidrocloreto

UFTM= Universidade Federal do Triângulo Mineiro

UI= Unidade internacional

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Trofozoíto de <i>Entamoeba gingivalis</i> . 400×.	27
FIGURA 2 – Meio BDM tamponado modificado neste estudo	56
FIGURA 3 – Morfologia não característica de <i>Entamoeba gingivalis</i> encontrada em cultura do isolado U-301	62
FIGURA 4 – Gel de poliacrilamida 7,5% representativo da PCR específica da amplificação do gene 18S da SSU-rRNA de <i>Entamoeba gingivalis</i> e controles negativos de bactérias bucais e outras espécies de amebas	80
FIGURA 5 – Análise comparativa dos perfis de LSSP-PCR em gel de poliacrilamida 7,5% corado pela prata, realizado com os iniciadores EGO-1 e EGO-2	82
FIGURA 6 – Comparação dos perfis de LSSP-PCR em gel de poliacrilamida 7,5% corado pela prata representativo das populações de <i>Entamoeba gingivalis</i> presente nas amostras bucais dos pacientes HIV/SIDA, grupo clínico e não clínico	85
FIGURA 7 – Fenograma total correspondente aos perfis de LSSP-PCR nas populações de <i>Entamoeba gingivalis</i> presentes nas amostras bucais e sua associação com dados clínicos e epidemiológicos	89
FIGURA 8 – Análise da variabilidade genética da região 18S da SSU-rRNA de <i>E. gingivalis</i> de amostras clínicas de Taubaté/SP, detectada pela LSSP-PCR com o iniciador EGO-1 e sua associação com dados clínicos e epidemiológicos ...	90
FIGURA 9 – Análise da variabilidade genética da região 18S da SSU-rRNA de <i>E. gingivalis</i> de amostras de pacientes HIV/SIDA detectada pela LSSP-PCR com o iniciador EGO-1 e sua associação com dados clínicos e epidemiológicos ...	91

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 – Frequência de <i>Entamoeba gingivalis</i> , segundo GIAZZI, 1992	30
QUADRO 2 – Meios de cultura citados na literatura e utilizados neste experimento	46
QUADRO 3 – Modificações e associações dos meios de cultura desenvolvidas neste estudo	46
QUADRO 4 – Comportamento <i>in vitro</i> dos isolados de <i>Entamoeba gingivalis</i>	60
QUADRO 5 – Avaliação do pH salivar nas amostras bucais dos pacientes HIV/SIDA e grupo não clínico e sua associação com a presença de <i>Entamoeba gingivalis</i>	75

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Frequência de escovação diária em relação à positividade de <i>Entamoeba gingivalis</i> nos grupos HIV/SIDA, clínico e não clínico	70
TEBELA 2 – Tabagismo em relação à frequência de <i>Entamoeba gingivalis</i> nos grupos HIV/SIDA, clínico e não clínico	70
TABELA 3 – Análise do tecido gengival de ratos infectados com diferentes isolados de <i>Entamoeba gingivalis</i>	83
TABELA 4 – Análise macroscópica do tecido gengival de ratos infectados com os três diferentes tipos de inóculo	84
TABELA 5 – Análise do tecido gengival de ratos infectados em relação a sua condição imunológica	84

LISTA DE PRANCHA

PRANCHA 1 – Trofozoítos de <i>Entamoeba gingivalis</i> em meio BDM tamponado. 400×.	65
---	----

LISTA DE GRÁFICOS

- GRÁFICO 1** – Quantificação de trofozoítos de *Entamoeba gingivalis* do isolado U-C de acordo com os repiques realizados..... 61
- GRÁFICO 2** – Quantificação de trofozoítos de *Entamoeba gingivalis* do isolado U-301 de acordo com os repiques realizados..... 62
- GRÁFICO 3** – Quantificação de trofozoítos de *Entamoeba gingivalis* do isolado U-E de acordo com os repiques realizados. 63
- GRÁFICO 4** – Quantificação de trofozoítos de *Entamoeba gingivalis* do isolado U-M de acordo com os repiques realizados. 64
- GRÁFICO 5** – Frequência geral de *Entamoeba gingivalis* na população estudada e nos grupos HIV/SIDA, clínico e não clínico. 67
- GRÁFICO 6** – Distribuição da porcentagem de indivíduos parasitados com *Entamoeba gingivalis* nos grupos HIV/SIDA, clínico e não clínico em relação ao gênero..... 68
- GRÁFICO 7** – Distribuição da porcentagem de indivíduos parasitados com *Entamoeba gingivalis* nos grupos HIV/SIDA, clínico e não clínico em relação à idade 68
- GRÁFICO 8** – Frequência de *Entamoeba gingivalis* nos grupos HIV/SIDA, clínico e não clínico em relação ao número de escovações diárias 70
- GRÁFICO 9** – Frequência de *Entamoeba gingivalis* no grupo HIV/SIDA em relação à condição de higiene bucal 71
- GRÁFICO 10** – Frequência de *Entamoeba gingivalis* no grupo não clínico em relação a higiene bucal. 71
- GRÁFICO 11** – Frequência de *Entamoeba gingivalis* no grupo clínico em relação ao tipo de doença periodontal 72
- GRÁFICO 12** – Distribuição da porcentagem de *Entamoeba gingivalis* em relação ao tabagismo em toda população estudada 72

GRÁFICO 13 – Frequência de <i>Entamoeba gingivalis</i> em relação ao nível de linfócitos TCD4 ⁺ nos pacientes do grupo HIV/SIDA.....	74
GRÁFICO 14 – Frequência de <i>Entamoeba gingivalis</i> em relação a carga viral nos pacientes do grupo HIV/SIDA	74
GRÁFICO 15 – Frequência de <i>Entamoeba gingivalis</i> em relação aos métodos de diagnóstico: exame a fresco e PCR nos grupos HIV/SIDA, clínico e não clínico	77
GRÁFICO 16 – Positividade de <i>Entamoeba gingivalis</i> através da realização do exame a fresco e PCR nos grupos HIV/SIDA, clínico e não clínico	77
GRÁFICO 17 – Comparação do tipo de coleta da amostra bucal no diagnóstico da <i>E. gingivalis</i> em relação ao exame a fresco e PCR nos grupos HIV/SIDA, clínico e não clínico	79
GRÁFICO 18 – Sensibilidade da PCR e exame direto a fresco na detecção de <i>Entamoeba gingivalis</i> nos grupos HIV/SIDA e clínico.....	79

SUMÁRIO

1. Introdução	
1.1 Cavidade bucal, microbiota e instalação da doença periodontal	22
1.2 Taxonomia, características morfológicas e biológicas de <i>Entamoeba gingivalis</i>	24
1.3 Cultura de <i>Entamoeba gingivalis</i>	27
1.4 Habitat e mecanismos de transmissão	28
1.5 Dados epidemiológicos	29
1.6 Patogenicidade	31
1.7 Características genéticas de <i>Entamoeba gingivalis</i>	33
2. Justificativa	35
3. Hipótese	37
4. Objetivos	
4.1 Objetivo Geral	39
4.2 Objetivos Específicos	39
5. Material e Métodos	
Desenho experimental	41
5.1 Aspectos éticos	42
5.2 Grupos de estudo	42
5.3 Critérios de inclusão e exclusão	42
5.4 Anamnese e exame clínico	42
5.5 Coleta e processamento das amostras pelo método do raspado gengival, lavado bucal e avaliação do pH salivar	43
5.5.1 Amostras gengivais	43
5.5.2 Amostras da cavidade bucal e avaliação do pH salivar	44
5.6 Diagnóstico parasitológico de <i>Entamoeba gingivalis</i> pelo exame direto a fresco	44
5.7 Padronização dos meios de cultura	45
5.8 Manutenção das culturas	47
5.9 Cultura de bactérias	48
5.10 Experimentação animal	48
5.11 Extração de DNA de <i>Entamoeba gingivalis</i> das amostras bucais	49
5.11.1 Extração de DNA de <i>Entamoeba gingivalis</i> por lise alcalina	49
5.11.2 Extração de DNA de <i>Entamoeba gingivalis</i> por guanidina fenol/ clorofórmio	50
5.11.3 Extração de DNA de <i>Entamoeba gingivalis</i> por guanidina fenol/clorofórmio com fervura	50
5.11.4 Extração de DNA de <i>Entamoeba gingivalis</i> de tecido gengival de ratos	50
5.12 PCR (Reação em cadeia da polimerase) específica	51
5.13 Caracterização genética de <i>Entamoeba gingivalis</i> : LSSP-PCR (Low stringency single specific primer-PCR)	52
5.14 Análise estatística	53
6. Resultados	
6.1 Padronização e manutenção das culturas de <i>Entamoeba gingivalis</i>	55
6.2 Análise da frequência de <i>Entamoeba gingivalis</i>	59
6.3 Comparação dos métodos utilizados no diagnóstico de <i>Entamoeba gingivalis</i>	74

6.4 Comparação do tipo de coleta da amostra bucal no diagnóstico de <i>Entamoeba gingivalis</i> pelo exame a fresco e PCR.....	78
6.5 Experimentação animal	80
6.5.1 Observação macroscópica	80
6.5.2 Observação microscópica.....	83
6.6 PCR específica no tecido gengival de ratos	83
6.7 Caracterização genética: LSSP-PCR (Low stringency single specific primer-PCR).....	83
6.7.1 Amostras do grupo HIV/SIDA, clínico e não clínico	88
6.7.2 Amostras do grupo clínico: Taubaté/SP.....	90
6.7.3 Amostras do grupo HIV/SIDA.....	91
7. Discussão	
7.1 Análise da frequência de <i>Entamoeba gingivalis</i> em relação aos fatores clínicos e epidemiológicos	93
7.2 Avaliação da frequência de <i>Entamoeba gingivalis</i> e métodos de coleta	97
7.3 Comportamento biológico de <i>Entamoeba gingivalis in vitro</i> e <i>in vivo</i>	101
7.3.1 Padronização da cultura e manutenção <i>in vitro</i>	101
7.3.2 Comportamento em modelos experimentais	107
7.4 Caracterização genética das populações de <i>Entamoeba gingivalis</i>	109
8. Conclusões.....	111
9. Perspectivas	114
10. Referências.....	116
11. Apêndice.....	127
11.1 Termo de consentimento livre e esclarecido	128
12. Anexos	
12.1 Anexo A	131
12.2 Anexo B	132
12.3 Anexo C	133
12.4 Anexo D	135

1.Introdução

1.1 Cavidade Bucal, Microbiota e Instalação da Doença Periodontal

A cavidade bucal constitui o primeiro segmento do aparelho digestivo humano, sendo uma das partes mais heterogêneas do organismo formada por tecidos e estruturas complexas e irregulares, como os dentes, sulco gengival, mucosas, dorso da língua e surpreendentemente, muito pouco é conhecido sobre a microbiota de uma cavidade bucal saudável. Dados na literatura relatam a detecção de mais de 700 espécies bacterianas ou filotipos diferentes na boca, das quais mais de 50% não têm sido cultivadas (PRIETO & CALVO, 2004; AAS et al., 2005). A maioria destas bactérias são comensais e ocupam diferentes microhabitats (PASTEUR et al., 2001) e algumas têm sido associadas às doenças bucais como a cárie e periodontopatias ou ainda a doenças sistêmicas como a endocardite bacteriana e pneumonia (AAS et al., 2005).

A doença periodontal constitui um conjunto de alterações produzidas por certas bactérias provenientes da placa subgengival, que se limitam à gengiva e às estruturas de suporte dos dentes como o ligamento periodontal e osso alveolar. As bactérias Gram negativas anaeróbias são os principais agentes patogênicos desta infecção, e constituem uma placa bacteriana específica que atua na destruição tecidual e na reabsorção óssea alveolar, sendo as espécies mais importantes e prevalentes no sítio subgengival, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* e *Tannerella forsythensi* (AL-SAEED, 2003; MARTÍNEZ & RUÍZ, 2004; AAS et al., 2005). Na cavidade bucal também são detectadas a presença de fungos (*Candida* sp, *Histoplasma capsulatum*), vírus (herpes simples, papilomavírus) e protozoários (*Entamoeba gingivalis* e *Trichomonas tenax*) (PRIETO & CALVO, 2004).

A doença periodontal é classificada em gengivite, quando superficial e limitada à gengiva e periodontite quando a infecção se estende aos tecidos mais profundos, destruindo a inserção de tecido conjuntivo ao cimento, formando bolsas, reabsorvendo o tecido ósseo alveolar, causando mobilidade nos dentes podendo prosseguir até a sua queda. O tratamento é difícil e pode causar graves danos ao ser humano. Outros fatores, além do microbiano, são imprescindíveis para a instalação da doença periodontal e influenciam na patogenicidade dos microrganismos. As características genéticas predisponentes do indivíduo, idade, qualidade da higiene bucal, tabagismo, falta de controle odontológico, doenças debilitantes, imunodepressão, diabetes descompensado, atuam e aceleram o processo destrutivo da doença periodontal, (MARTÍNEZ & RUÍZ, 2004).

O diabetes *melitus* por si só não é causa da doença periodontal, porém quando associado à presença da placa bacteriana são observados quadros patológicos como gengivite marginal moderada com desenvolvimento de lesão periodontal e uma tendência à atrofia alveolar difusa (NOCITO-MENDOZA et al., 2003).

Há evidências de que *E. gingivalis* pode causar periodontite avançada em pacientes imunodeprimidos (LIU et al., 2001). Em toda literatura revisada, o estudo de LUCH et al., (1998) é o único que associa a presença de *E. gingivalis* com pacientes infectados pelo vírus HIV (*Human Immunodeficiency Virus*). A saliva auxilia na proteção imunológica contra outras doenças e em indivíduos com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) em uso da medicação HAART (*highly active antiretroviral therapy*) ocorrem alterações na sua composição e redução do seu fluxo, fato que favorece a evolução de lesões cáries e doença periodontal (FILHO & GIOVANI, 2009).

1.2 Taxonomia, Características Morfológicas e Biológicas de *Entamoeba gingivalis*

Amebas são organismos unicelulares, pertencentes ao reino Protista e a maioria dos gêneros e espécies encontradas na natureza é de vida livre e são consideradas de pouca importância para a saúde humana (PEREZ-JAFE, 1997).

Entamoeba gingivalis habita a cavidade bucal e pertence à família *Endamoebidae*, sub-ordem *Tubulina* e gênero *Entamoeba*. Neste gênero existem várias espécies que infectam os seres humanos tais como: *Entamoeba histolytica/dispar*, *Entamoeba coli*, *Entamoeba hartmanni*, e *Entamoeba gingivalis* (PEREZ - JAFE, 1997). *E. histolytica* é a única espécie considerada patogênica para os seres humanos e tem como habitat o intestino grosso, onde pode invadir a mucosa intestinal e se disseminar para outros órgãos. Esta espécie não é agente etiológico de infecções bucais, contudo existem relatos na literatura que a associam à doença periodontal, justificando sua presença decorrente da disseminação via hematogênica ou linfática, a partir de foco intestinal ou após intervenções cirúrgicas, ou ainda pelo contato oro anal (MORALES, 2005).

E. gingivalis apresenta grande interesse histórico, pois foi provavelmente a primeira ameba descoberta no ser humano (CUEVAS et al., 2006) e sua primeira descrição foi na Rússia, por Gross em 1849, onde o parasito foi isolado do cálculo dentário e denominado *Amoeba gingivalis* (GOTTLIEB & MILLER, 1971; GANNON & LINKE, 1989; 1990; NOCITO-MENDONZA et al., 2003; HUANG et al., 2009).

Posteriormente, o parasito foi renomeado várias vezes como *Amiba bucalis* (STEINBERG,1862), *Amoeba kartulisi* (DOFLEIN, 1901), *Entamoeba maxillaris* (KARTULIS,1906) sendo novamente denominada *Entamoeba kartulisi* por DOFLEIN em 1911. Contudo, *Entamoeba gingivalis gros* é o nome atualmente aceito e foi alterado por BRUMPT (1913), sendo as denominações anteriores consideradas sinônimos desta espécie (revisado por DOBELL, 1920).

Posteriormente, a presença de *E.gingivalis* foi detectada por outros pesquisadores na boca humana (GRASSI, 1879) e em secreção purulenta de abscessos alveolares (FLEXNER, 1892; KARTULIS 1893), sendo também relatada em outros animais como cão, gato e macaco (revisado por DOBELL, 1920; CHEN et al., 1999; SOSA et al., 2003).

A maioria dos autores descreve que *E. gingivalis* possui apenas a forma de trofozoíto no seu ciclo vital, não formando cistos (JASKOSKI, 1963; JÚNIOR & MACHADO, 1995; AL-SAEED, 2003; GHARAVI et al., 2006). No entanto, existem relatos baseados em estudos microscópicos de amostras clínicas e de cultura que defendem a teoria de que estas amebas podem apresentar formas císticas imaturas com 2-4 núcleos e maduras com oito núcleos (WANTLAND et al.,1960).

Os trofozoítos de *E. gingivalis* possuem maior rapidez na formação e emissão de pseudópodes ativos do que as demais espécies de amebas (WANTLAND, 1960; JIAN et al., 2008; HUANG et al., 2009) e estes podem ser explosivos, uni ou multidirecionais e apresentar morfologia variável, às vezes grandes e lobópodes, filopódios, ou ainda formas que lembram estrelas, galhos, chapéu, agulha e fita (DOBELL, 1920; WANTLAND et al., 1963; GHARAVI et al., 2006; AL- SAEED, 2003). Os dados referentes ao seu tamanho são controversos e variam entre 5-35µm, com média entre 24,67 ×17,8 µm (JASKOSKI, 1963; PEREZ-JAFE et al., 1997; CHEN et al .,1999; AL-SAEED, 2003). Em geral os trofozoítos de *E.gingivalis* são encontrados em forma de fita o que facilita seu diagnóstico parasitológico (CHEN et al., 1999), porém sua semelhança morfológica com os de *E. histolytica* pode gerar equívocos (JASKOSKI, 1963). Uma diferença marcante entre *E. gingivalis* e *E. histolytica* está nos elementos por elas fagocitados. Ambas fagocitam bactérias, restos celulares e eritrócitos, no entanto, apenas *E. gingivalis* endocita leucócitos (WANTLAND & WANTLAND, 1958; RACHMAN & ROSENBERG, 1986). Contudo, apesar dos trofozoítos de *E. gingivalis* serem comparativamente menores que os de *E. histolytica*, existem relatos de que *E. gingivalis* pode ser maior do que os esta outra espécie de ameba e, atualmente, a

utilização de técnicas moleculares tem sido considerada como imprescindível para o seu diagnóstico (JIAN et al., 2008).

Vários estudos foram realizados para tentar evidenciar o desenvolvimento do parasito, assim como sua morfologia e composição das estruturas de suas organelas como núcleo, cariossomo, cromossomo, glicogênio e corpos cromatóides (WANTLAND et al., 1960). O ectoplasma e endoplasma de *E. gingivalis* são muito bem diferenciados, e o citoplasma granuloso apresenta-se repleto de vacúolos contendo inclusões peculiares e ausência de DNA, mostrando-se hialino no local onde os pseudópodes são formados (DOBELL, 1920; WANTLAND et al., 1960).

A presença de grânulos de glicogênio no citoplasma evidencia que a principal fonte de energia destas amebas seja a glicose, semelhante ao que ocorre com *E. histolytica* (JÚNIOR & MACHADO, 1995). A presença de mitocôndrias é discutida e os dados na literatura são controversos, alguns autores mencionam que esse protozoário não possui tal organela (KIKUTA et al., 1996; HERNÁNDEZ et al., dados não publicados) e outros destacam sua presença nas proximidades do núcleo do parasito (WANTLAND et al., 1960; KELLER et al., 1967) evidenciando-as por meio de microscopia eletrônica de transmissão (JÚNIOR & MACHADO, 1995) como estruturas típicas, com forma ovóide ou irregular, coberta por uma densa membrana externa e uma membrana interna que invagina para formar cristas tubulares que compõem a matriz (KELLER et al., 1967) contendo poucas cristas (JÚNIOR & MACHADO, 1995). Outra característica é a ausência de complexo de Golgi e retículo endoplasmático (JÚNIOR & MACHADO, 1995).

O núcleo de *E. gingivalis* é muito difícil de ser visualizado em trofozoítos vivos e oscila entre a forma esférica e ovóide, medindo aproximadamente 3,5 a 4,0 μm de comprimento por 2,5 a 3,0 μm de largura (DOBELL, 1920; KELLER et al., 1967). Seu cariossomo é grande e central com um padrão grosseiro de cromatina periférica (DOBELL, 1920; GHARAVI et al., 2006; JIAN et al., 2008).

O seu mecanismo de reprodução não é claramente descrito, e ocorre por divisão binária em processos de mitose (CHIAVARO, 1914; SMITH & BARRET, 1915; DOBELL, 1920). É possível que exista reprodução por conjugação (CRAIG, 1916), contudo, esta observação não foi confirmada pela maioria dos autores, sendo aceita a hipótese de que não haja nenhum desenvolvimento sexual nesta espécie (revisados por DOBELL, 1920).

Estudos com microscopia eletrônica e relacionados com mecanismos de excreção de *E. gingivalis*, sugerem a presença de estruturas arredondadas em forma de bolha, sobressaindo da superfície da célula associadas com mecanismos de defecação. Porém estes autores adverte a necessidade de maiores estudos para explicar os mecanismos de eliminação de partículas do interior do parasito (KELLER et al., 1967).



Figura 1: Trofozoíto de *Entamoeba gingivalis* 400×

Foto: S.B.S.Cembranelli

1.3 Cultura de *Entamoeba gingivalis*

Assim como outras espécies de amebas, *E. gingivalis* tem sido dificilmente cultivada em meio artificial (KELLER et al., 1967). Até os dias de hoje, o cultivo xênico de *E.gingivalis* tem sido realizado com pouco sucesso. De acordo com alguns autores, essa dificuldade deve-se ao grande número e à variedade bacteriana presente na boca, que desfavorece seu crescimento. Os problemas encontrados na manutenção das culturas têm desestimulado o seu estudo *in vitro* e refletindo na falta de conhecimento do verdadeiro papel de *E.gingivalis* na doença periodontal (GANNON & LINKE, 1989; 1990; 1992).

Muitos trabalhos têm sido realizados para se estabelecer um meio de cultivo adequado para *E. gingivalis*. Nestas modificações, em busca de melhores condições de sobrevivência e crescimento do parasito, com adição e exclusão de vários nutrientes de meios já estabelecidos para o cultivo de parasitos intestinais. Após inúmeras tentativas em desenvolver e/ou modificar meios de cultivos para estas amebas, GANNON & LINKE (1992), tentaram cultivar *E. gingivalis* em um “*Ecologen*”, uma câmara com compartimentos diversos usada para o estudo de interações entre microrganismos, neste caso, utilizando bactérias como *Yersinia enterocolitica* e *Crithidia* sp. Após todo procedimento, estes resultados indicaram que o metabolismo celular produzido pelas bactérias em um dos compartimentos causou um efeito benéfico para o crescimento de *E. gingivalis*, pois não ocorreu competição por nutrientes. Aparentemente, nenhuma tentativa tem sido realizada para o cultivo de *E. gingivalis* na ausência de bactérias (CLAYTON JR & BALL, 1954).

As condições de cultura deste parasito não são fáceis de serem estabelecidas, sendo a temperatura ótima para o crescimento entre 34,5 a 35°C e o pH ideal 6,7 (CHEN et al., 1999, 2000). Até o presente momento, não existe nenhum estudo relacionado ao cultivo contínuo deste parasito. Os relatos de sucesso ocorreram com um grupo de pesquisadores na China que conseguiu cultivar três isolados desta ameba em meio com base sólida de ovo por um determinado período de tempo (CHEN et al., 2000).

1.4 Habitat e Mecanismo de Transmissão

Normalmente este parasito é encontrado ao redor dos dentes e gengiva, no sulco gengival e em lesões de cárie. Tem sido também isolado em criptas da tonsila palatina, no seio maxilar, no ápice de dentes extraídos e em polpas dentárias extirpadas de pacientes com doença periodontal (SMITH & BARRET, 1915; GOTTLIEB & MILLER, 1971; GHARAVI et al., 2006).

Dados na literatura citam também localizações ectópicas de *E. gingivalis* como a vagina e útero sendo considerados ambientes adequados para o crescimento do parasito (GHARAVI et al., 2006). Contudo, CLARK & DIAMOND (1992), observaram não ser comum a ocorrência de espécies de *Entamoeba* no útero. Existem relatos de sua presença induzindo sintomas e inflamação na exocérvix uterina de mulheres que faziam

o uso de dispositivo intra-uterino (RACHMAN & ROSENBERG, 1986) e no pulmão (JIAN et al., 2008).

Apesar de ser um dado inconclusivo, os organismos morfológicamente semelhantes à *E. gingivalis* foram encontrados em material de punção aspirativa de um nódulo no pescoço de uma paciente com carcinoma de língua. Estes estavam associados com processos inflamatórios agudos e crônicos e apresentavam fragmentos basófilos de núcleos de leucócitos e debris celulares em seu citoplasma (PEREZ-JAFFE et al., 1997).

A transmissão da *E. gingivalis* ocorre por meio da saliva presente em fômites contaminados, compartilhamento de alimentos, beijo na boca, sendo equivalente à transmissão das bactérias causadoras da cárie dentária (JASKOSKI, 1963; JÚNIOR & MACHADO, 1995; NOCITO-MENDONZA et al., 2003; GHARAVI et al., 2006; JIAN et al., 2008; HUANG et al., 2009).

1.5 Dados Epidemiológicos

E. gingivalis é cosmopolita (SANTOS, 2001) e sua frequência na população geral oscila entre 6,9 a 86,4% (CAMBON, 1979; CHEN et al., 2000; GHARAVI et al., 2006; CUEVAS et al., 2006), variando de acordo com a idade do indivíduo e região geográfica estudada. No levantamento bibliográfico realizado por GIAZZI em 1992, destacam-se as seguintes frequências de *E. gingivalis*:

Quadro 1: Frequência de *Entamoeba gingivalis*, segundo GIAZZI, 1992

REFERÊNCIA	% <i>Entamoeba. gingivalis</i>
CARNERI, 1957	50,0
WANTLAND et al., 1958	41,0
WANTLAND & WANTLAND, 1960	23,0
GRISI & CARNERI, 1961	53,1
JASKOSKY, 1963	51,0
GOTTILIEB et al., 1968	61,0
MACHADO et al., 1968	45,4
BLAKE, 1968	60,0
WANTLAND & LAUER, 1970	29,0
CARNERI & GIANNONE, 1970	37,6
ROUSSET & LAUVERGEAT, 1971	29,6
LA PIERRE & ROUSSET, 1973	41,0
DELAUNAY & ROUSSET, 1976	19,5
CAMBON, 1979	86,4
FEKI et al., 1981	32,7
FERRARA, 1986	56,0
GRASSI et al., 1986	56,0

Existe uma relação direta entre a frequência de *E. gingivalis* e a idade, sendo esta maior em indivíduos na faixa etária entre 21- 40 anos de idade (WANTLAND & LAUER, 1968; GHARAVI et al., 2006), porém, alguns dados demonstram sua presença na cavidade bucal de 75% ou mais dos indivíduos acima de 40 anos (HERNÁNDEZ et al., dados não publicados). Em indivíduos jovens a frequência de *E. gingivalis* é menor, sendo detectada em 21% de adolescentes de 11 a 15 anos de idade na Guatemala (POMES et al., 2000) e em 8,7% em crianças de 3 a 14 anos de idade no México, sendo este último um dos poucos relatos existentes na literatura com pacientes nesta faixa etária (CUEVAS et al., 2006).

A maioria dos autores relata não haver diferença significativa entre a frequência deste parasito e o gênero (JÚNIOR & MACHADO, 1995). Alguns dados demonstram que *E. gingivalis* pode ser mais detectada em mulheres (WANTLAND & LAUER,

1968; el HAYAWAN & BAYOUMY, 1992; GHABANCCHI et al., 2010), outros que está mais presente em indivíduos do gênero masculino (VRABLIC et al., 1991; HUANG et al., 2009) sendo sugerido que sua menor frequência em mulheres seja devido ao maior cuidado com a saúde bucal que estas apresentam (GHARAVI et al., 2006).

1.6 Patogenicidade

As pesquisas envolvendo os protozoários da boca são muito limitadas e têm sido conduzidas em poucos países (JASKOSKI, 1963; GHARAVI et al., 2006). A patogenicidade de *E. gingivalis* e *T. tenax*, ocupa uma posição bastante incerta na pesquisa científica e ambos parasitos têm sido encontrados tanto em indivíduos com baixa condição de higiene bucal e doença periodontal como em amostras de pacientes com boas condições de higiene bucal. A maior frequência e quantidade destes protozoários são observadas naqueles que exibem estágios progressivos da doença periodontal (KOFOID, 1929; WANTLAND et al., 1963).

A patogenicidade da *E. gingivalis* é contraditória, pois alguns autores a consideram como um microrganismo comensal, não patogênico, que coloniza o tecido gengival. (CLAYTON JR. & BALL 1954; AL-SAEED, 2003). Porém, de acordo com várias pesquisas epidemiológicas é evidente que este parasito esteja mais relacionado aos pacientes com higiene bucal deficiente/doença periodontal, especificamente com a gengivite, do que nos indivíduos com saúde bucal (WANTLAND & WANTLAND, 1958; GOTTLIEB & MILLER, 1971; CHEN et al., 1999; 2000). Dados experimentais também demonstram que *E. gingivalis* pode causar lesões tumorais em um pequeno período de tempo (CHEN et al., 2000). Desde tempos atrás, tem-se sugerido que este parasito age como agente patogênico por meio de uma relação de simbiose com certas bactérias da boca (DOBELL, 1920; HUANG et al., 2009). Existem vários relatos mostrando a associação do parasito com espécies de *Actinomyces* (LYONS, T, dados não publicados; RACHMAN & ROSENBERG, 1986; PEREZ-JAFE et al., 1997), inclusive quando este se encontra em localizações ectópicas como a vagina e útero (GHARAVI et al., 2006).

Os trofozoítos da *E. gingivalis* podem aderir-se à superfície epitelial e a atividade de seus pseudópodes e a liberação de enzimas produzir lise dos tecido (HERNÁNDEZ et al., dados não publicados) periodontais. A patogenicidade parece

estar relacionada com a presença de vacúolos associados com diversos tipos de enzimas como a hidrolase presente nos lisossomas e com a liberação de radicais de oxigênio que podem lisar células e causar destruição das membranas celulares do tecido gengival. O delgado glicocálix também pode estar intimamente relacionado com a virulência no processo de adesão entre o parasito e o substrato (JÚNIOR & MACHADO, 1995).

Pelo fato de *E. gingivalis* ser capaz de fagocitar alguns tipos celulares e bactérias, há indícios que esta possa afetar a ecologia da boca favorecendo a formação da placa bacteriana pelo transporte ativo de bactérias para superfície celular ou para os vacúolos, auxiliando no progresso de lesões gengivais (NOCITO-MENDONZA et al., 2003). Um fator relevante e que merece maiores estudos é o fato de *E. gingivalis* fagocitar hemácias, capacidade não atribuída aos microrganismos não patogênicos (BASS & JOHNS, 1915). Intensa eritrofagocitose tem sido observada em amebas presentes nos pacientes portadores de doença periodontal avançada, semelhante ao observado com *E. histolytica* nos quadros de diarreia sanguinolenta (GOTTLIEB & MILLER, 1971). A patogenicidade de *E. gingivalis* se assemelha à *E. histolytica*, onde ambas apresentam a capacidade de ingerir hemácias. Contudo, presença destes protozoários em mucosas saudáveis, não excluem seu potencial de doença (JASKOSKI, 1963).

Há evidências de três estudos experimentais na literatura envolvendo inoculação de *E. gingivalis* na gengiva de ratos (CHEN et al., 2000; LIU et al., 2001; AL-SAEED 2003). Estes autores buscaram acelerar o processo patológico das lesões imunossuprimindo os animais com corticóides e observaram a formação de abscessos principalmente no grupo de animais inoculados com a ameba e bactérias (CHEN et al., 2000).

Outros pesquisadores tentaram induzir o crescimento de *E. gingivalis* na boca, reto e no cólon de gatos e no cólon de cães por meio da inoculação de secreção purulenta contendo trofozoítos de *E. gingivalis*, e em ambos casos não foram bem sucedidos, porém, concluíram que *E. gingivalis* é especificamente distinta de *E. histolytica* e que a infecção intestinal é provavelmente impossível (DOBELL, 1920). Em 1916, HECKER, avaliou a causa da piorréia injetando um lavado de *E. gingivalis* em suínos. Mesmo através de repetidas inoculações, os resultados foram negativos e não causou piorréia (citado por DOBELL, 1920).

1.7 Características genéticas de *Entamoeba gingivalis*

As espécies de *Entamoeba* não são muito diversificadas ao nível morfológico, como o tamanho do cisto, número de núcleos por cistos e aparência da cromatina e é possível que certas variações morfológicas não reflitam em diferenças ao nível de espécie. Como resultado dessa variabilidade morfológica, tem sido demonstrado uma significativa diversidade genética entre organismos morfológicamente indistinguíveis (CLARK et al., 2006).

Apesar do recente seqüenciamento do genoma da *E. histolytica* que apresenta 24 Mb e 14 cromossomos (BAXT & SLINGH, 2008) pouco se sabe sobre as características genéticas da *E. gingivalis* que apresenta uma concentração elevada de ácido nucléico (WANTLAND et al., 1960) e possui seis cromossomos (CHILD, 1926; WANTLAND et al., 1960).

As sequências de rRNA tem sido usadas para detectar ou identificar microrganismos e desvendar a relação filogenética de muitas espécies de *Entamoeba*. A clonagem de uma sequência do gene do rRNA de *E. gingivalis* permitiu determinar a posição filogenética desta espécie que ficou posicionada próxima à *E. histolytica* e o desenvolvimento de uma sonda espécie-específica. Essa sonda foi denominada de PEG-1 e hibridiza com o DNA de *E. gingivalis* e não com os outros protozoários e fungos juntamente analisados, podendo ser usada para detectar e identificar esta espécie de ameba. (YAMAMOTO et al., 1995).

KIKUTA et al., (1996) seqüenciaram os genes da menor subunidade ribossomal (SSU-rRNA) de *Entamoeba gingivalis*, construíram uma sonda de DNA e desenvolveram um protocolo de hibridização *in situ* para detectar especificamente *E. gingivalis*. A partir desses dados foi possível desenvolver um par de iniciadores denominados EGO- 1 e EGO- 2, para a identificação e diagnóstico clínico desta espécie de amebas (KIKUTA et al., 1996).

2. Justificativa

O comportamento biológico e genético das populações da *E. gingivalis* é pouco estudado sobretudo pela dificuldade na sua identificação morfológica e manutenção *in vitro*. Apesar do parasito ser considerado um comensal para o homem, existem controvérsias no que se refere ao seu potencial patogênico. Os dados na literatura são escassos e mostram a necessidade de maiores estudos sobre esse parasito.

3.Hipótese

A espécie *E. gingivalis* pode ser constituída por populações heterogêneas com características fenóticas e genéticas associadas ou não à patogenicidade. A integração de dados clínicos-odontológicos e parasitológicos podem ser fundamentais para elucidar o comportamento deste parasito.

4.Objetivos

2.1 Objetivo geral

Avaliar a frequência de *Entamoeba gingivalis* em pacientes periodontalmente saudáveis, com doença periodontal e em pacientes HIV/SIDA e caracterizar os perfis biológicos e genéticos de suas populações.

2.2 Objetivos específicos

2.2.1 Determinar a frequência de *E. gingivalis* em indivíduos periodontalmente saudáveis e com doença periodontal.

2.2.2 Determinar a frequência de *E. gingivalis* em indivíduos HIV/SIDA e sua relação com a saúde bucal do mesmo.

2.2.3 Padronizar o cultivo e manutenção *in vitro* dos isolados de *E. gingivalis*.

2.2.4 Avaliar o potencial patogênico das populações de *E. gingivalis in vivo* e sua relação com a imunossupressão, utilizando o modelo *Rattus norvegicus albinus*, da linhagem Wistar.

2.2.5 Identificar as populações de *E. gingivalis* por meio da PCR específica.

2.2.6 Determinar a variabilidade intra-específica através do gene da SSU-rRNA das populações de *E. gingivalis* por meio da LSSP-PCR.

2.2.7 Correlacionar características genéticas das populações *E. gingivalis* com o potencial patogênico das mesmas.

5. Materiais e Métodos

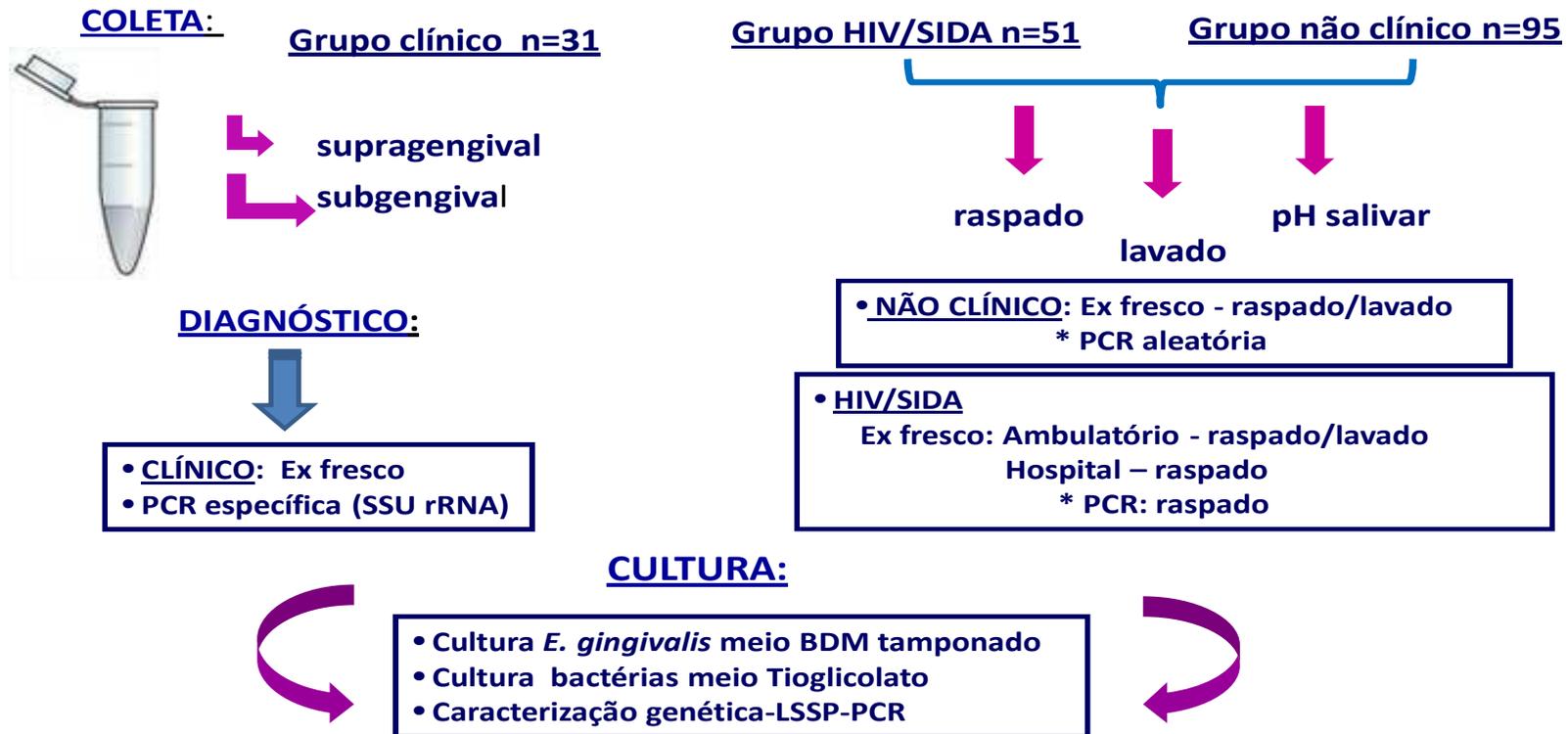
Desenho experimental

Padronização da cultura para *E. gingivalis* – 20 meios

Grupos:



- I- HIV/SIDA ambulatório e hospital
- II- Clínico (Taubaté/SP e Consultório particular Uberaba)
- III- Não clínico: Funcionários + alunos UFTM



3.1 Aspectos éticos

Este estudo foi realizado de acordo com os Princípios Éticos para a Experimentação Animal e para Seres Humanos, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Triângulo Mineiro sob protocolos nº 74 e 1377. (Anexos A e B)

3.2 Grupos de estudo

Participaram deste estudo 177 indivíduos de ambos os gêneros com idade entre 15 e 76 anos de idade os quais foram divididos entre os seguintes grupos:

Grupo 1: 51 pacientes HIV/SIDA atendidos no ambulatório e internados no Hospital das Clínicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM), município de Uberaba, Estado de Minas Gerais;

Grupo 2: Grupo clínico, com 31 pacientes com doença periodontal (gingivite e/ou periodontite) que estavam sob tratamento periodontal na Clínica da Faculdade de Odontologia da Universidade de Taubaté (UNITAU), município de Taubaté, Estado de São Paulo e em uma clínica particular no município de Uberaba, Estado de Minas Gerais.

Grupo 3: Grupo não clínico, com 95 funcionários e alunos da UFTM com grau de higiene bucal variado.

3.3 Critérios de inclusão e exclusão

Foram incluídos no estudo todos os indivíduos que aceitaram em participar da pesquisa, assinando o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice A) e que preenchessem os requisitos propostos para cada grupo de estudo. Foram excluídos todos os indivíduos edêntulos, que faziam uso ou não de prótese total superior e inferior.

3.4 Anamnese e exame clínico

Durante a realização da anamnese foram avaliados os dados pessoais, uso de medicamentos e tempo de uso, hábitos nocivos à saúde e as condições de saúde geral e bucal. Para os indivíduos HIV/SIDA também foram avaliados dados sobre a carga viral

e contagem de linfócitos TCD4⁺. Estes dados foram anotados em um prontuário elaborado para o estudo (Anexo C).

Todo o exame clínico para avaliação das condições da cavidade bucal dos pacientes foi analisado por um cirurgião dentista e os dados anotados em fichas clínicas para posterior análise. A avaliação dos pacientes do grupo dois (portadores de doença periodontal) foi realizada em ambiente odontológico utilizando espelho plano nº5, sonda exploradora (Duflex®) e classificada em gengivite e/ou periodontite. Nos pacientes dos grupos 1 e 3 (funcionários, alunos e indivíduos HIV/SIDA) o exame clínico foi realizado em ambiente não odontológico com o auxílio de espátula de madeira esterilizada, luz artificial e as condições de higiene bucal classificada em boa ou ruim.

3.5 Coleta e processamento das amostras pelo método do raspado gengival, lavado bucal e avaliação do pH salivar

As amostras para avaliar a presença de *E. gingivalis* nos indivíduos selecionados foram coletadas na região gengival através do método do raspado e da introdução de cones de papel absorvente e, da cavidade bucal através do método do lavado. A coleta das amostras e a verificação do pH salivar foram realizadas pelo mesmo operador com exceção dos seis pacientes do grupo 2 atendidos em uma clínica particular em Uberaba/MG.

Todos os dados foram anotados em fichas numeradas para cada indivíduo e as amostras identificadas em espécime, data, local da coleta e número do paciente. As amostras foram mantidas em temperatura ambiente até serem transportados ao laboratório de Parasitologia da UFTM, respeitando o período máximo de duas horas entre a coleta e seu processamento.

3.5.1 Amostras gengivais

Os sítios dentais para a coleta das amostras gengivais foram aleatoriamente selecionados, independente do número de dentes na boca e presença ou não de doença periodontal. Nos indivíduos do grupo 2 foram realizadas coletas de amostras supragengival (cálculo e/ou placa bacteriana) e subgengival (fluido crevicular) as quais foram analisadas individualmente. As amostras subgengivais foram obtidas com auxílio

de cone de papel absorvente nº 30 (Tanari®), inseridos na porção mais apical do sítio selecionado e mantidos no local por 30 segundos, enquanto as supragengivais foram realizadas por raspado gengival com auxílio de uma cureta periodontal McCall 13/14 (Neumar®).

Nos grupos 1 e 3, a coleta do material pelo método do raspado foi realizada com auxílio de palito de madeira esterilizado (HUANG et al., 2009).

Cada amostra coletada era transferida para tubos de microcentrífuga (*Eppendorf* - 1,5 mL-USA) contendo 1mL de solução fisiológica (NaCl 0,9%) estéril, onde 100 µL destes eram destinados à cultura de *E. gingivalis* e 10 µL para cultura de bactérias. Os 850 µL restantes eram concentrados por centrifugação a $7840 \times g$ e utilizados para exame a fresco, PCR específica e caracterização genética com as amostras preservadas em guanidina- EDTA (guanidina-HCl 6M e EDTA dissódico 0,2, pH 8,0).

3.5.2 Amostras da cavidade bucal e avaliação do pH salivar

A coleta de amostras para avaliar a presença de *E. gingivalis* na cavidade bucal e saliva foi realizada por meio do lavado bucal nos indivíduos dos grupos 1 e 3, exceto nos pacientes internados (grupo 1) os quais, em sua maioria, se encontravam em uso respiradores artificiais, sondas parenterais e/ou com transtornos psicológicos. O lavado bucal foi obtido por meio do bochecho com 10 mL de solução fisiológica (NaCl 0,9%) estéril durante 30 segundos, o qual era descartado em tubos plásticos com tampa de rosca de 50 mL, estéreis (Falcon nº 50). Essas amostras eram centrifugadas a $2205 \times g$ por 5 minutos.

A avaliação do pH salivar de cada paciente foi realizada diretamente na cavidade bucal com indicador universal de pH 0-14 (Merck®). As fitas de papel eram colocadas debaixo da língua durante 3 segundos e comparadas visualmente com o padrão colorimétrico apresentado na embalagem do material.

3.6 Diagnósticos parasitológico de *E. gingivalis* pelo exame direto a fresco

O diagnóstico de *E. gingivalis* nas amostras gengivais e do lavado bucal foi realizado pela visualização dos trofozoítos no exame direto a fresco e também pela amplificação da região 18S do rRNA por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) a qual será descrita posteriormente.

As amostras gengivais coletadas em solução fisiológica (850 μ L) foram homogeneizadas em agitador de tubos (Vortex) durante 10 segundos, removendo nas amostras subgengivais os cones de papel utilizados na coleta, com auxílio de pinças clínicas esterilizadas. Em seguida, foram centrifugadas por 20 segundos a $7840 \times g$ desprezando-se o sobrenadante. O material concentrado ou “*pellet*” das amostras foi utilizado para a realização do exame direto a fresco e o restante, preservado em guanidina-EDTA para análise molecular.

O exame a fresco foi realizado com 3 μ L da amostra concentrada, colocada em lâminas de microscopia e recoberta com um quarto de lamínula $22 \times 22\text{mm}^2$ com o objetivo de diminuir o campo microscópico e facilitar a visualização do parasito. A análise do material deve ser executada rapidamente evitando que os trofozoítos diminuam sua mobilidade em decorrência da desidratação da amostra. Foi utilizado um microscópio óptico (Olympus®) com aumento de $400 \times$ utilizando o condensador baixo para diminuir a intensidade luminosa e aumentar o contraste (WANTLAND et al., 1963). O diagnóstico foi considerado positivo quando se detectava a presença de trofozoítos emitindo pseudópodes multidirecionais, com ectoplasma periférico hialino e muito refringente, endoplasma mais escuro, granuloso, com vacúolos e ocasionalmente o núcleo (WANTLAND et al., 1963; GANNON & LINKE, 1992).

3.7 Padronização dos meios de cultura

Diante das dificuldades e controvérsias relacionadas com a manutenção *in vitro* de *E. gingivalis*, foram avaliados 20 meios de cultura com intuito de permitir um crescimento adequado e prolongado de *E. gingivalis*, sendo alguns destes classicamente citados na literatura para crescimento de protozoários (Quadro 2) e aqui modificados (Quadro 3).

Quadro 2. Meios de cultura citados na literatura e utilizados neste experimento

TIPO DE CULTURA	MEIO USADO	REFERÊNCIA
Axênica	TYI	DIAMOND et al.,1978
	TYI-S-33	DIAMOND et al.,1978
	YIS	DIAMOND et al.,1995
	TTY-SB	GANNON & LINKE,1989
Mista	Pavlova	NEVES, D.P., 2003
Bifásico com base de ovo	LE	BRAND et al.,1943
	BDM	BOECK & DRBOHLAV,1925
Amebas de vida livre	Ágar soja	FORONDA,1979
Bacteriológico	Ágar sangue	BROWN, J.H.; 1919
Definido/ Comercial	F-12	Invitrogen ®

Quadro 3. Modificações e associações dos meios de cultura desenvolvidas neste estudo

DENOMINAÇÃO	MEIO DE CULTURA USADO	MODIFICAÇÕES
TTY-SB-M	TTY-SB	0,004% de sangue humano
YIS-M	YIS	Substituição KH_2PO_4 / K_2HPO_4 por NaH_2PO_4 / Na_2HPO_4
Pavlova-M	Pavlova	Uso de amido em solução 0,6%
LE glicosado LE + TTY-SB LE + TYI-S-33 LE + Pavlova-M	Meio bifásico com base sólida de ovo com solução de Locke's: LE e BDM	-Adição de glicose 0,25mg/mL na solução de Locke's -Substituição da solução de Locke's por meio de cultura
LE - HEPES BDM -HEPES	Meio bifásico com base sólida de ovo + solução de Locke's	Solução de Locke's tamponada com HEPES 25mM - pH 6,7
TTY-SB-M	TTY-SB	pH 7,2-7,4 e vermelho de fenol 0,002% (indicador de pH)

A estes meios de cultura, foram testados vários antibióticos e antifúngicos em diferentes concentrações, como: penicilina G (Novafarma®) 1.000UI; 500UI e 100UI/mL, gentamicina (Cristalia®) 100mg/mL, estreptomicina (Ouro Fino®) 500 µg/mL, norfloxacin (Medley®) 100 µg/mL e nistatina (Teuto®) 12 UI/mL, adição e exclusão de nutrientes, diferentes quantidades de inóculos (500; 250; 100 e 50 µL), assim como tubos de ensaio de plástico e vidro de diversos tamanhos, quantidade de meio de cultura por tubo (2, 5 e 8 mL), amido de arroz em pó (0,03mg/ mL) e solução (0,6%), fatores estes primordiais para o sucesso do cultivo desta espécie de ameba.

Aos meios bifásicos com base sólida de ovo foi avaliada a eficácia de três variações da solução de Locke's, sendo elas: solução de Locke's glicosada (0,25 mg/mL); solução de Locke's modificada (com solução de amido de arroz 0,6%) e solução de Locke's HEPES tamponada (pH 6,7), conforme descrito na tabela 03.

3.8 Manutenção das culturas

As culturas de *E. gingivalis* foram iniciadas com 100 µL das amostras concentradas, os quais eram semeados em meio de cultura BDM-HEPES: com base sólida de ovo e 8 mL de solução de Locke's tamponada (pH 6,7), contendo 50 µL de solução de amido de arroz 0,6%, em tubos de vidro com tampa de rosca 1,6 x 160 mm.

De acordo com CLAYTON & BALL (1954) a cultura inicial deve ser mantida sem adição de antibióticos nas primeiras 48 horas. Após esse período 1.000 UI de penicilina e 500 µg de estreptomicina por mL era acrescentado na fase líquida do meio tanto no tubo de cultura inicial ou “cultura mãe” quanto nos sucessivos repiques. As leituras e repiques destas culturas foram realizados a cada 48 horas e mantidos em estufa bacteriológica à 35°C (GANNON & LINKE, 1989).

Antes da realização da leitura e repique, as culturas eram submersas em água gelada durante 10 minutos para que os trofozoítos se soltassem das paredes do tubo de ensaio (GANNON & LINKE, 1989) e da superfície plana da base de ovo quando o tubo fosse homogeneizado. Aproximadamente dois terços desta fase líquida eram desprezados, o restante da cultura homogeneizado manualmente e transferidos para tubos plásticos de 1,5 mL (tipo *Eppendorf*) e concentrado em microcentrífuga a 7840 × g durante 20 segundos. Após desprezar o sobrenadante, 3 µL do material concentrado ou “pellet” era examinado pelo exame a fresco entre lâmina e lamínula e, quando

positivo era quantificado em câmara de Neubauer, sendo a viabilidade dos trofozoítos avaliada através do azul de tripan 0,02%. O volume do inóculo utilizado nos repiques foi de 100 µL do material concentrado, independente do número de parasitos presentes na amostra de acordo com metodologia proposta por GANNON & LINKE (1990). As amostras positivas eram armazenadas em guanidina EDTA (Guanidina-HCl 6M e EDTA dissódico 0,2, pH 8.0) a 4°C para posterior análise biomolecular.

3.9 Cultura de bactérias

O cultivo de bactérias foi realizado em meio Tioglicolato (BioCen do Brasil®) com alíquotas de 10 µL das amostras sub e supragengivais. Após 48 horas de incubação a 37°C, as culturas eram repicadas para meio novo, para serem inoculadas em animais e também criopreservadas em glicerol 10% em Tioglicolato e mantidas a -80°C.

3.10 Experimentação animal

A patogenicidade de *E. gingivalis* foi avaliada *in vivo* em ratos (*Rattus norvegicus*, Albinus Wistar) machos, pesando aproximadamente 200-300 gramas de peso corporal. Foram utilizados animais provenientes do Biotério da Disciplina de Parasitologia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro/ UFTM mantidos em gaiolas individuais com água e ração *ad libitum*.

A infecção dos animais foi realizada com cinco isolados denominados U-E; U-C; U-M; T10 e U-301, obtidos de cultura em fase exponencial. Para cada experimento foram utilizados seis animais divididos em dois grupos: um deles correspondente aos animais imunocompetentes (Grupo IC) e o outro destinado à imunossupressão (Grupo IS) com succinato sódico de prednisolona (Nova Farma®) o qual foi administrado em três doses de 0,01mg/g de peso corporal a cada quatro dias, pela via intra-peritoneal. A imunossupressão foi realizada antes da inoculação de *E. gingivalis* no tecido gengival e a cada dose de imunossupressor os animais eram pesados e reavaliados fisicamente.

A avaliação da patogenicidade das amebas foi realizada pela inoculação de *E. gingivalis* + bactérias (1), bactérias presentes na amostra bucal (2) e solução fisiológica estéril 0,9% (3) como controle negativo. O inóculo de *E. gingivalis* foi obtido após cultivo de 72 horas para permitir um maior crescimento dos trofozoítos,

sendo o mesmo período de tempo utilizado para as culturas das bactérias em meio Tioglicolato.

O inóculo não foi padronizado e variou de acordo com o crescimento do estoque no meio de cultura, visando obter o maior número possível de trofozoítos.

Os animais foram previamente anestesiados com solução injetável de Cetamina (Ketamin ®) 50mg/mL na dose de 0,1 mL/100g de peso corporal via intra-muscular. Em seguida, cada animal recebeu 0,1 mL de cada inóculo na região da bolsa periodontal entre os dois incisivos inferiores administrados com o auxílio de uma seringa de 1mL e agulha 30x8mm (agulha de insulina), seguido de hemostasia com compressa de gaze estéril. Após a inoculação, os animais ficavam em observação até a recuperação da anestesia e eram colocados em gaiolas individuais identificadas. A cada 24 horas, durante 15 dias foi realizado um exame clínico com auxílio uma lupa estereoscópica visando à formação ou não de lesões clínicas características e os dados observados foram anotados em fichas apropriadas.

Decorrido até 15 dias após o inóculo e se o animal não apresentasse nenhum sinal de alteração no tecido gengival, estes eram eutanasiados por asfixia em câmara contendo éter. Um pequeno fragmento de tecido, aproximadamente 0,3 cm² era retirado com bisturi (lâmina nº 10 Free- Bac®) e acondicionado em *Eppendorf* estéril para análise biomolecular. Após a obtenção deste fragmento, a mandíbula era retirada em bloco, lavada com soro fisiológico, armazenada e fixada em solução de formol tamponado a 10% por no mínimo 10 dias para posterior processamento histopatológico. O material foi desidratado em álcool, diafanizados em xilol e incluídos em parafina e posteriormente foram feitos cinco cortes transversais de 3-4µm e corados pela hematoxilina e eosina (HE).

3.11 Extração de DNA de *E. gingivalis* das amostras bucais

Para selecionar a técnica ideal para extração de DNA de *E. gingivalis* foram comparados previamente três métodos de lise e extração de DNA: pelo fenol clorofórmio nas amostras em Guanidina/EDTA com e sem fervura e pela lise alcalina de amostras congeladas.

3.11.1 Extração de DNA de *E. gingivalis* por lise alcalina:

Antes de iniciar a lise de DNA, as amostras de *E. gingivalis* foram submetidas ao choque térmico com fervura em banho-maria e imersão em gelo seco para permitir uma distribuição homogênea das sequências alvo presentes na amostra. À estas amostras, foram adicionados NaOH (1M) e 30 µL de óleo mineral, agitados por 20

Em seguida, foi acrescentado Tris-HCl (130 mM, pH 7,0) para neutralização destas amostras. O DNA foi diluído em 40 µL de água mili-Q estéril. As amostras foram estocadas a 4°C até o momento do uso.

3.11.2 Extração de DNA de *E. gingivalis* por guanidina-fenol/clorofórmio

A extração das amostras de *E. gingivalis* foram realizadas com igual volume (v/v), fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1) e clorofórmio: álcool isoamílico (24:1). Essa mistura foi homogeneizada em agitador Orbitron por 5 minutos e centrifugada a $13440 \times g$ por 5 minutos. A precipitação do DNA ocorreu na presença de 40 µg de glicogênio (*Boehringer Mannheim*, Alemanha) e 10% de acetato de sódio (3M, pH= 5,2) e o dobro do volume, etanol absoluto (Merk®) gelado, mantidos em banho de gelo durante 15 minutos. Após centrifugação e volatização do etanol, o precipitado obtido foi ressuscitado em 30 µL de água mili-Q estéril e estocada a 4°C.

Através desta técnica, também foram extraídos DNA de amostras de bactérias que fazem parte da microbiota bucal, de *Trichomonas tenax*, *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba moshkovskii* e amebas de vida livre para serem usadas como controles negativos.

3.11.3 Extração de DNA de *E. gingivalis* por guanidina-fenol/clorofórmio com fervura:

Esta técnica foi igualmente realizada como a acima citada, com exceção de que estas amostras foram submetidas à fervura prévia a 100°C por 15 minutos antes de qualquer procedimento de extração.

Para as três técnicas descritas, foi realizado um controle negativo, ou seja, contendo apenas os reagentes utilizados durante a extração de DNA destas amostras.

3.11.4 Extração de DNA de *E. gingivalis* de tecido gengival de ratos

Os tecidos gengivais de ratos foram recortados em fragmentos de aproximadamente 0,3 cm², lavados exaustivamente com solução fisiológica estéril e congelados. Para o processamento desse material, este foi transferido para uma placa de Petri estéril onde foram totalmente macerados e picotados com auxílio de uma lâmina de bisturi e palito de madeira e transferido para tubos de microcentrífuga de 1,5 mL. A extração de DNA foi realizada pela técnica da lise alcalina no qual os fragmentos de tecidos foram misturados com NaOH (0,013M), recobertos com óleo mineral e fervidos em banho maria durante 10 minutos e neutralizados com Tris-HCl (130mM, pH 7,0). O lisado foi diluído 1:10 em água milli-Q estéril e estocado a 4°C até o momento do uso. (VAGO et al., 1996 a; VAGO et al., 2000). Na extração de DNA de tecidos também foi realizado um controle negativo das amostras.

3.12 PCR específica

Para o diagnóstico específico de *E. gingivalis* foram utilizados iniciadores que amplificam a menor subunidade da região 18S do rRNA desta espécie: EGO-1 (5'-GAATAGGCGCATTTTCGAACAGG-3') e EGO-2 (5'-TCCCCTAGTAAGGTACTACTC-3'). A reação foi realizada em um volume final de 25µL, contendo: Tampão 1X; água milli-Q estéril; 1,5 mM MgCl₂; 200-500 µM de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP e dTTP); 0,2 µM de cada iniciador (EGO-1 e EGO-2); 2,5 UI *Taq* DNA polimerase Platinum (*Promega, Madison, WI, USA*); 3 µL de DNA e 30µL de óleo mineral.

O programa de amplificação consistiu de uma desnaturação inicial a 94°C (3,5 minutos) e 39 ciclos com desnaturação a 94°C (1 minuto), anelamento a 60 °C (1 minuto) e extensão a 72°C (1 minuto), seguida de extensão final de 4 minutos (KIKUTA et al., 1996) em um termociclador MJ Research PTC-100. Os produtos amplificados foram visualizados por eletroforese em gel de poliacrilamida 6%, corados pelo nitrato de prata 0,2% e marcador de peso molecular de 1kb (*Invitrogen*) para visualização das bandas específicas de 1.400 pb correspondentes à amplificação do DNA de *E. gingivalis* nas amostras avaliadas.

Na PCR foram utilizados controles negativos e positivos sendo também avaliada a especificidade dos iniciadores em amostras de bactérias, *Trichomonas tenax*, *E. histolytica*, *E. moshkovskii* e amebas de vida livre.

3.13. Caracterização genética de *E. gingivalis*

3.13.1 LSSP-PCR (*Low stringency single specific primer- PCR*)

O produto da PCR específica de *E. gingivalis* foi purificado em gel de agarose 1,5% (1,0% agarose comum e 0,5% agarose *low melting*) em TBE 1X (89mM Tris-borato, 2mM EDTA pH=8,0) preparado com água bidestilada estéril, em presença de 0,5 µg/mL de brometo de etídeo. As bandas de 1.400 pb foram visualizadas em um transiluminador de luz ultravioleta de comprimento de onda longo, e coletadas com auxílio de um bisturi estéril. Após aquecimento em banho maria, as amostras foram homogeneizadas e diluídas 1:10 em água milli-Q estéril, sendo, então utilizadas como DNA molde para as reações de LSSP-PCR (VAGO et al., 2000)

Como a reação de LSSP-PCR é realizada como um único iniciador específico, utilizado sob condições de baixa estringência, todos os experimentos devem ser executados de modo a evitar qualquer tipo de contaminação química e bacteriológica (PENA et al., 1994; BARRETO et al., 1996). Desta maneira, alguns cuidados foram observados:

- Desinfecção da cuba de eletroforese com HCl 0,25N e NaOH 0,5N (1 hora cada) e água bidestilada estéril;
- Exposição de todo material utilizado (cuba de eletroforese, pipetas, ponteiros, etc) à radiação ultravioleta (30 minutos)
- Aplicação do DNA no gel de agarose com intervalo de uma canaleta vazia entre cada amostra.

Na reação de LSSP-PCR as amostras de DNA foram re-amplificadas em condições de baixa estringência (BARRETO et al., 1996) utilizando um único iniciador específico correspondente ao EGO-1 (5'-GAATAGGCGCATTTCGAACAGG-3'). A mistura desta reação teve um volume final de 12 µL contendo 1,5 mM MgCl₂, 0,2mM de cada dNTP's (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 1,0 unidade de *Taq* DNA polimerase, 45 pmol do iniciador EGO-1 e 3µL de DNA (fragmento de 1.400 pb purificado em agarose e diluído 1:10), cobertos com 30 µL de óleo mineral. A amplificação foi realizada com 40

ciclos abrangendo desnaturação a 94°C (1 minuto), anelamento a 30°C (1 minuto) e extensão a 72°C (1 minuto), precedidos de desnaturação inicial a 94°C (5 minutos). Após os 40 ciclos foi realizada uma extensão adicional a 72°C durante 7 minutos. Os produtos de LSSP-PCR foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida a 7,5%, corados pela prata, gerando um perfil composto por múltiplas bandas. A análise dos perfis obtidos reflete a sequência de nucleotídeo do DNA usado como molde, compondo sua “assinatura gênica” (PENA et al., 1994).

A análise dos perfis de “assinaturas gênicas” das amostras de *E. gingivalis*, obtidas pela reação de LSSP-PCR, foi realizada visualmente em foto digitalizada do gel, onde os padrões de bandas foram marcados, e submetidos à análise de proporção de bandas compartilhadas entre cepas e construção de fenogramas com o *software* Gel Compar II (Applied Maths NV).

3.14 Análise Estatística

Os dados obtidos dos pacientes HIV/SIDA, grupo clínico e não clínico foram organizados em uma planilha do programa Microsoft Excel 2007 e submetidos às análises estatísticas por meio do programa Statsoft Statistica 8.0. A associação entre a positividade no exame a fresco para *E. gingivalis* e cada uma das variáveis categóricas estudadas foi realizada por meio do teste do qui-quadrado clássico ou, quando necessário, utilizou-se o qui-quadrado com correção de Yates ou o teste exato de Fisher. Para avaliar a força de associação entre as variáveis estudadas, foi calculado o Odds Ratio (OR) com intervalo de confiança de 95% (IC95%). Os dados obtidos a partir da observação macroscópica na experimentação animal também foram analisados por meio do teste do qui-quadrado e suas variações. A concordância entre os resultados obtidos pelo exame a fresco e obtidos pela PCR foi avaliada por meio do cálculo do coeficiente Kappa.

Para todas as análises foram considerados significativos os resultados que apresentaram nível de significância menor que 0,05 ($p < 0,05$). Além disso, para uma correta interpretação do Odds Ratio, eles só foram considerados válidos quando o intervalo de confiança (IC95%) não continha o valor 1,00.

6.Resultados

4.1 Padronização e manutenção das culturas de *Entamoeba gingivalis*

Para a manutenção *in vitro* de *E.gingivalis* foram avaliados 20 meios de cultura sendo selecionado o meio BDM-Boeck y Drbohlav modificado, por apresentar melhor crescimento e desenvolvimento do parasito. Esse meio já havia sido previamente avaliado por outros autores (MELVIN & BROOKE, 1969), contudo, neste trabalho foram realizadas algumas alterações em sua composição e no seu preparo, assim como na temperatura de incubação. Este meio foi denominado BDM Tamponado (anexo D) com as seguintes modificações:

a) A estratégia que utilizamos para a manutenção do pH do meio em 6,7, que é ideal para o crescimento de *E. gingivalis* (CHEN et al., 1999; 2000) , foi tamponar a fase líquida constituída por solução de Lockes com 25mM de HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid- Gibco BRL- Life Technologies ®);

b) O amido de arroz em pó na concentração de 0,03mg/ mL foi utilizado na mesma concentração, porém, a partir de uma solução a 0,6% (GANNON & LINKE, 1990);

c) O controle do crescimento bacteriano e de leveduras foi realizado com diferentes antibióticos sem alterar o desenvolvimento de *E. gingivalis*. Foram testadas a penicilina G (250, 500 e 1.000UI/ mL); gentamicina (100mg/ mL), estreptomicina (500 µg/ mL), norfloxacin (100µg/ mL) e o antifúngico nistatina (12 UI/ mL), sendo selecionada a associação de penicilina G (1.000UI/ mL) com estreptomicina (500µg/ mL) e a nistatina (12 UI/ mL). Esses antimicrobianos foram adicionados ao meio de cultura após 48 horas de cultivo de acordo com recomendação de WANTLAND et al., (1963) para adaptação do parasito ao meio artificial, associado às bactérias de origem, ou seja da cavidade bucal.

d) As culturas foram mantidas em diferentes temperaturas (35°; 36° e 37°C), sendo constatado melhor crescimento de *E. gingivalis* a 35°C.

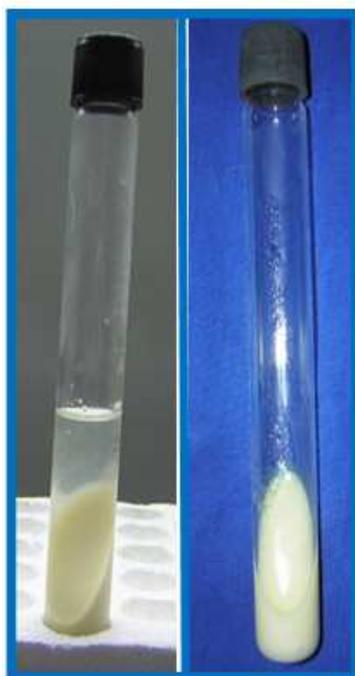


Figura 2: Meio bifásico BDM tamponado modificado neste estudo: **A)** Base sólida de ovo: observar a base lisa, sem rugosidades e/ou rachaduras. **B)** Base sólida de ovo e solução de Locke's.
Foto: S.B.S.Cembranelli

Neste estudo foi realizada a tentativa de avaliar o comportamento *in vitro*, em meio BDM tamponado de 26 isolados da *E. gingivalis* (oito amostras de pacientes HIV/SIDA 11 do grupo clínico e sete de indivíduos do grupo não clínico). Contudo, só foi possível manter em cultivo 15,4% (4/26) dos isolados devido ao intenso crescimento bacteriano e/ou fúngico que conseqüentemente levava ao processo fermentativo do amido e degradação da base sólida de ovo nas primeiras 48 horas e impediam o acompanhamento das culturas (Quadro 4).

Os quatro isolados de *E. gingivalis* foram acompanhados com leitura a cada 48 horas e repiques sucessivos durante um período médio de $70,2 \pm 11,6$ dias, correspondente a aproximadamente $29,2 \pm 10,2$ repiques. Estes isolados apresentaram comportamento biológico diferenciado com pico inicial de crescimento variável entre 96 e 168 horas e média de $138,0 \pm 31,2$ horas. Os trofozoítos se mantiveram viáveis em cultura por um período médio de $42,7 \pm 38,3$ dias, sendo visualizados em aproximadamente $6,5 \pm 3,3$ dias de leitura. Contudo, o pico máximo foi $1,0 \times 10^6 \pm 3,0$ trofozoítos/ mL e o médio $3,1 \times 10^4 \pm 1,1$ para os isolados U-301, U-E e U-M, porém o isolado U-C obteve uma média de $32,0 \times 10^5 \pm 1,1$ trofozoítos/ mL e apresentou o comportamento biológico mais diferenciado em relação aos demais isolados. Durante o acompanhamento das culturas foram observados períodos nos quais não foi possível visualizar e quantificar os parasitos os quais poderiam estar presentes na cultura com valores inferiores à sensibilidade da câmara de Neubauer ($<1,0 \times 10^4$ trofozoítos/ mL). Estes foram denominados períodos subpatentes e ocorreram em torno de $2,5 \pm 1,1$ vezes e com duração média de $7,0 \pm 6,3$ dias.

O isolado U-C foi procedente de uma paciente do gênero feminino, 26 anos, com boa higiene bucal e não fumante. Este foi acompanhado por um período de 79 dias e apresentou trofozoítos viáveis durante 77 dias e correspondeu às populações de *E. gingivalis* que permaneceram o maior período de tempo em cultura e apresentaram maior quantidade de parasitos. O comportamento biológico *in vitro* deste isolado foi diferenciado com crescimento acentuado desde o início do cultivo com $42,0 \times 10^4$ trofozoítos/ mL em 168 horas, sendo estes visualizados em 12 leituras correspondentes aos repiques: 3º- 6º, 8º- 9º, 49º- 59º e 79º. O pico máximo deste isolado, equivalentes ao valor máximo de trofozoítos observado neste estudo, ocorreu no 52º dia ($4,0 \times 10^6$ trofozoítos/mL), sendo visualizados parasitos com muita mobilidade e material

fagocitado em seu endoplasma. Foram detectados três períodos subpatentes (21°; do 28°- 45° e 63° - 74° dias de cultivo) não sendo mais observada a presença do parasito no 27° repique (79° dias) de avaliação (Gráfico 1; Quadro 4).

O isolado denominado U-301 foi obtido de uma paciente do gênero feminino, 30 anos de idade, não fumante, portadora de periodontite e foi acompanhado durante 72 dias correspondentes a 34 repiques. Este isolado apresentou o menor período de adaptação em meio de cultura sendo os trofozoítos de *E. gingivalis* detectados após 96 horas de incubação, porém permaneceram viáveis e com movimento por 40 dias. O crescimento inicial foi lento ($1,0-2,0 \times 10^4$ trofozoítos/mL) e o maior número de parasitos deste isolado foi detectado no 31° dia ($6,0 \times 10^4$ trofozoítos/ mL) sendo visualizados quatro períodos subpatentes (5°, 8° - 10°, 13° - 30° e 34° - 38° dias de cultivo). O período de negatividade, no qual os trofozoítos característicos de *E. gingivalis* não foram mais visualizados, ocorreu a partir do 22° repique (43° dia), e em seu lugar foram observadas estruturas arredondadas não características, sem movimento e semelhantes a formas quiescentes (Figura 3), as quais permaneceram visíveis até o final da avaliação (Gráfico 2; Quadro 4).

O isolado U-E proveniente de uma paciente do gênero feminino, 52 anos de idade, portadora de boa higiene bucal, porém com periodontite recorrente (CIC) foi avaliado por 63 dias com um total de 21 repiques. Os parasitos foram visualizados, inicialmente com 168 horas ($8,0 \times 10^4$ trofozoítos/ mL) permanecendo viáveis em cultura por 28 dias. Foi detectado um período subpatente entre 9°-21° dias de cultivo após o qual os trofozoítos passaram a ser novamente visualizados no 22°, 25° e 28° dia, correspondentes a $8,0 \times 10^4$, $2,0 \times 10^4$ e $1,0 \times 10^4$ trofozoítos/mL e aos repiques 8, 9 e 10. A partir do 11° repique (32 dias) os trofozoítos não foram mais visualizados, sendo esta negatividade acompanhada por crescimento bacteriano exacerbado não controlado pelos antibióticos com escurecimento e decomposição da base sólida de ovo (Gráfico 3; Quadro 4).

O isolado denominado U-M, oriundo de uma paciente do sexo feminino, 38 anos com higiene bucal ruim foi acompanhado durante 67 dias correspondendo a 35 repiques. O período de adaptação foi de 120 horas e com quantidade inicial de $4,0 \times 10^4$ trofozoítos/mL os quais permaneceram em cultura por apenas 26 dias. Estes foram observados nos 5°, 8°, 16° e 26° dias equivalentes a $4,0 \times 10^4$; $2,0 \times 10^4$; $2,0 \times 10^4$ e

$1,0 \times 10^4$ trofozóitos/mL, respectivamente. Foram observados dois períodos subpatentes no 15º, 19º - 22º dias de cultivo e o período de negatividade ocorreu a partir do 10º repique (28 dias). Este isolado apresentou o menor período em cultivo, sendo considerado com menor adaptação nestas condições quando comparado aos outros três isolados analisados neste estudo (Gráfico 4; Quadro 4).

4.2 Análise da frequência de *E. gingivalis*

A frequência de *E. gingivalis* foi avaliada em 177 indivíduos (51 HIV/SIDA, 31 do grupo clínico e 95 do não clínicos). A análise da positividade dentro de cada grupo de indivíduos analisados mostrou que 58,8% (30/51) dos pacientes HIV/SIDA, 35,5% (11/31) do grupo clínico e 19,0% (18/95) do grupo não clínico apresentaram o parasito na cavidade bucal com diferença significativa entre o primeiro e terceiro grupo ($p < 0,01$); e entre o grupo HIV/SIDA e clínico essa diferença não foi significativa ($p < 0,062$) (Gráfico 5).

A frequência de *E. gingivalis* foi analisada em relação a diferentes variáveis associadas com dados epidemiológicos e clínicos (gênero, idade, número de escovação diária, condição de higiene bucal ou tipo de doença periodontal, tabagismo, pH salivar, nível de linfócitos T CD4⁺ e carga viral), com métodos de coleta do material (raspado supra, subgingival e lavado bucal) e com métodos de diagnóstico do parasito (exame a fresco e PCR específica).

A amostragem foi constituída por 43,5% (77/177) de indivíduos do gênero masculino e 56,5% (100/177) do feminino. Entre os casos positivos para *E. gingivalis* 44,0% (26/59) e 56,0% (33/59) corresponderam respectivamente aos gêneros masculino e feminino. Nos grupos HIV/SIDA, clínico e não clínico a positividade de *E. gingivalis* nos indivíduos do gênero masculino corresponderam respectivamente a 66,8% (20/30), 33,3% (3/9) e 7,9% (3/38) e do gênero feminino 47,2% (10/21), 36,4 (8/22) e 26,3% (15/57). Contudo, houve diferença significativa ($p = 0,048$) no gênero feminino dos indivíduos do grupo não clínico (OR=4,17; IC95%=11-15,57) (Gráfico 6).

Quadro 4: Comportamento *in vitro* dos isolados de *Entamoeba gingivalis*

Isolado	Período de avaliação (dias)	Número de repiques	Presença trofozoitos (dias)	Período de adaptação (horas)	Período de visualização De trofozoitos (dias)	Nº médio trofozoitos/mL	Pico máximo trofozoitos/mL	Períodos subpatentes e intermitentes			Período de negatização (repique/dias)
								Nº	Dias de cultivo	Intervalo (dias)	
U-C	79	27	77	168	12	1,2x10 ⁶	4,0x10 ⁶	3	21 28 - 45 63 - 74	1 17 11	27/79
U-301	72	34	40	96	6	2,5 x10 ⁴ *	6,0x10 ⁴	4	5 8 - 10 13 - 30 34 - 38	1 2 17 4	22/43
U-E	63	21	28	168	4	4,7x10 ⁴ *	8,0x10 ⁴	1	9 - 21	12	11/32
U-M	67	35	26	120	4	2,2x10 ⁴ *	4,0x10 ⁴	2	15 19 - 22	1 3	10/28
Média	70,2 ±11,6	29,2 ±10,2	42,7 ±38,3	138,0 ±31,2	6,5 ±3,3	32,0x10 ⁵ ±29,5 3,1x10 ⁴ ±1,1*	1,0x10 ⁶ ±3,0	2,5 ±1,1	NR	7,0 ±6,3	17,5 ±15,3 45,5 ±40,2

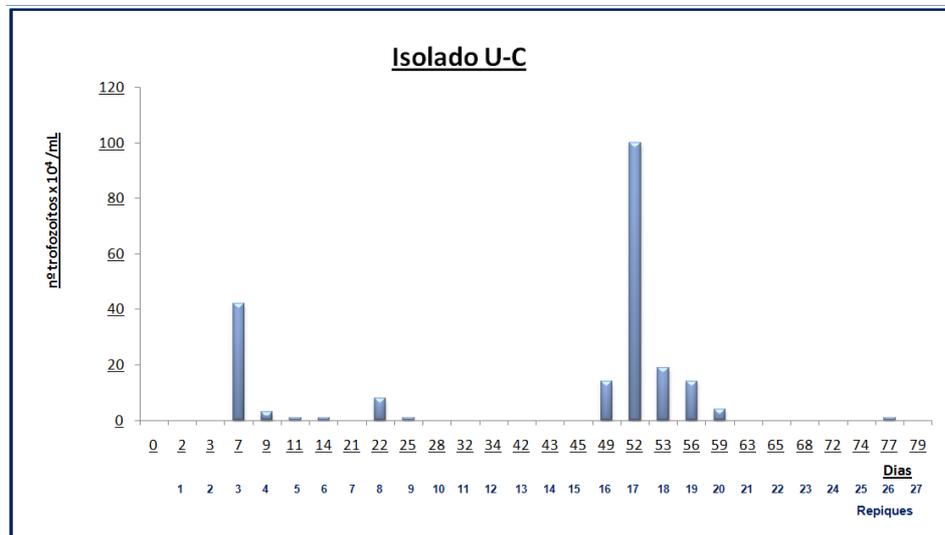


Gráfico 1: Quantificação de trofozoítos de *Entamoeba gingivalis* do isolado U-C de acordo com em meio BDM modificado de acordo com os dias em cultivo e repiques realizados.

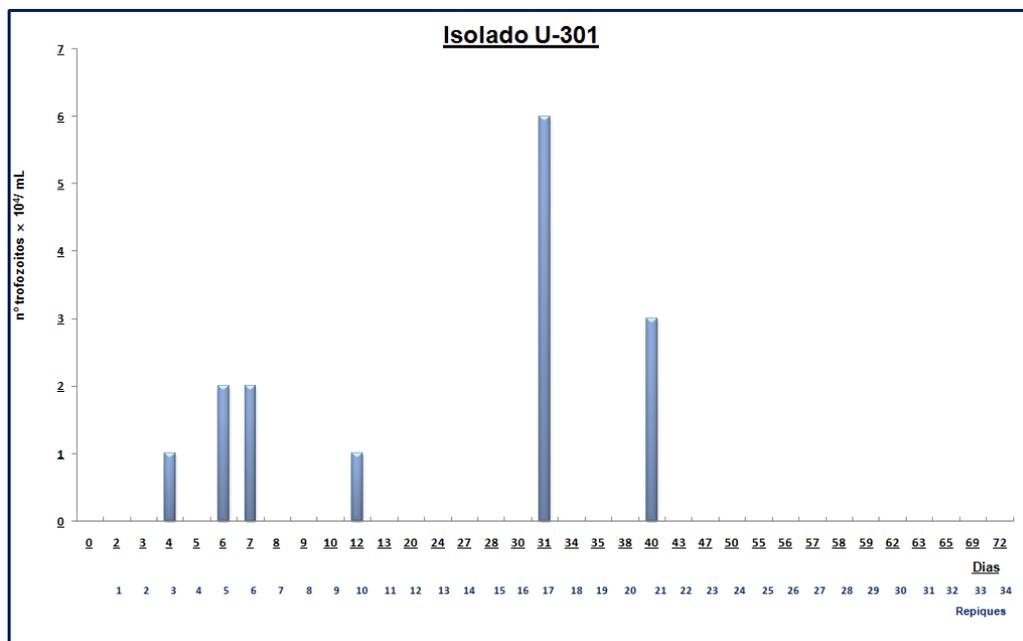
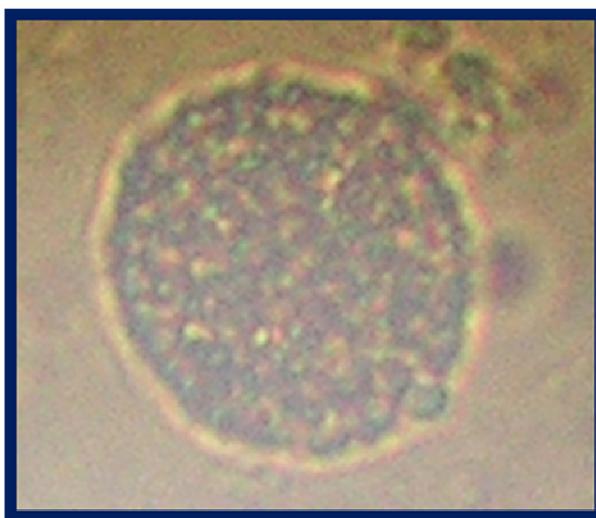


Gráfico 2: Quantificação de trofozoítos de *Entamoeba gingivalis* do isolado U-301 em meio BDM modificado de acordo com os dias em cultivo e número de repiques realizados.



Formas não características

Figura 3: Morfologia não característica de *Entamoeba gingivalis* encontrada em cultura do isolado U-301.

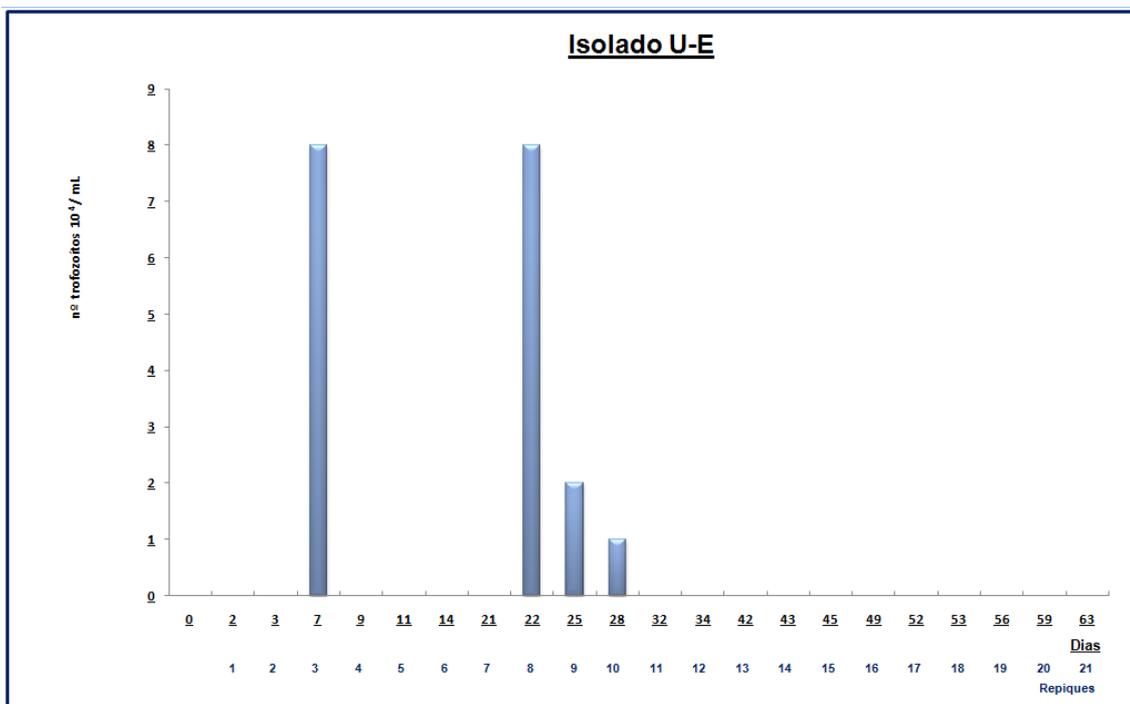


Gráfico 3: Quantificação de trofozoítos de *Entamoeba gingivalis* do isolado U-E em meio BDM modificado de acordo com os dias em cultivo e repiques realizados.

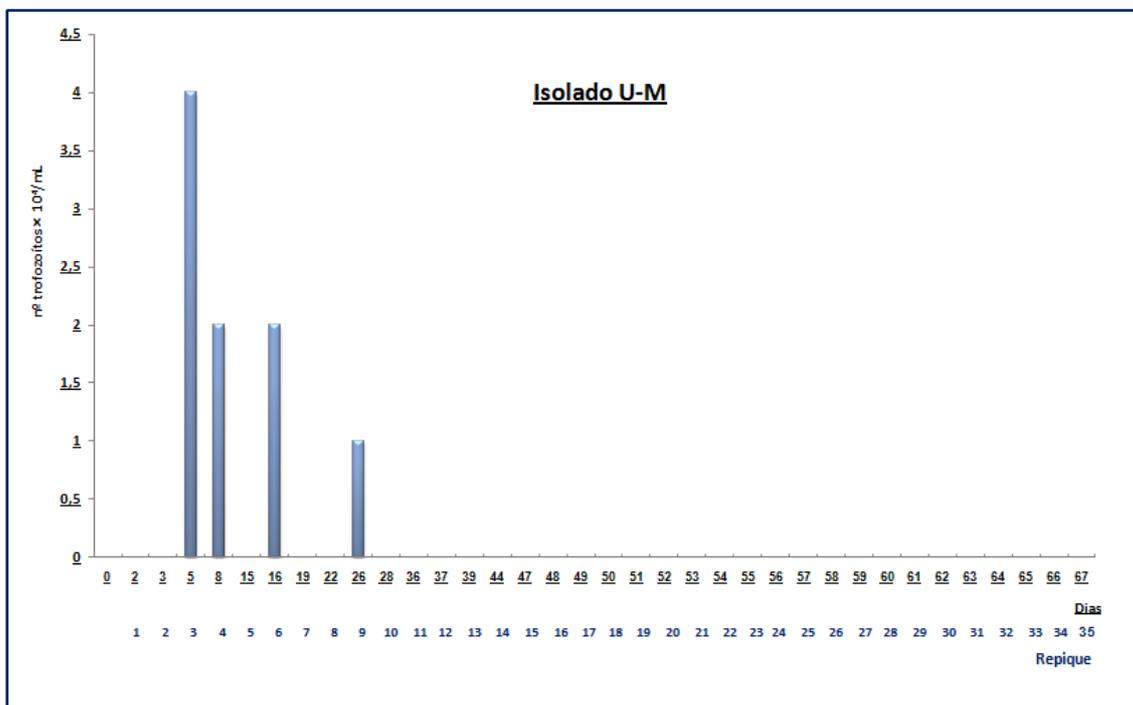
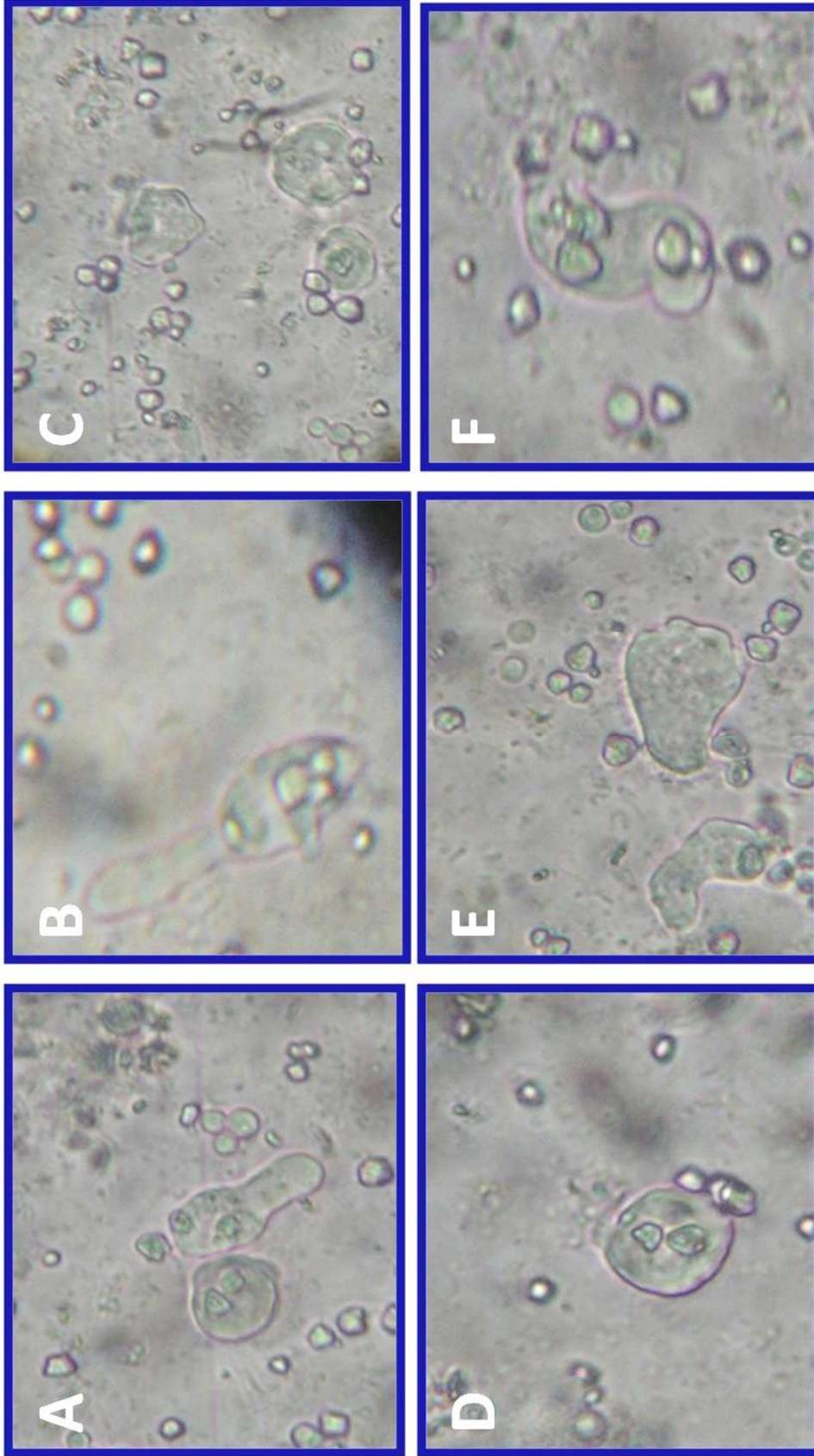


Gráfico 4: Quantificação de *Entamoeba gingivalis* do isolado U-M em meio BDM modificado de acordo com os dias em cultivo e repiques realizados.



Fraucha 01- Trofozoitos de *Entamoeba gingivalis* em meio de cultura BDM tamponado. 400 X.
Foto: S.B. S. Cembranelli.

A média de idade nos indivíduos estudados foi de $34,2 \pm 13,1$ anos, distribuídos nas faixas etárias entre 15 - 25; 26 - 35 e mais de 35 anos de idade. Estas corresponderam, respectivamente, a 13,5% (7/52), 39,5% (17/43) e 42,7% (35/82) aos indivíduos com *E. gingivalis*, evidenciando uma associação significativa ($p=0,001$) entre o aumento da idade e a frequência do parasito. A análise das faixas etárias dentro de cada grupo de indivíduos analisados não mostrou diferença significativa dentro de cada um deles (Gráfico 7).

A influência do hábito de higienização bucal avaliado de acordo com a frequência de escovação diária, demonstrou uma relação inversa e significativa ($p=0,025$) entre o número de escovações e a frequência de *E. gingivalis* a qual correspondeu a 100% (2/2); 52,2% (12/23); 30,5% (25/82) e 26,0% (14/54) respectivamente para uma, duas, três e quatro escovações diárias (Gráfico 8).

Contudo, quando foi avaliada a distribuição da frequência de escovação dentro de cada grupo analisado ou mesmo quando relacionamos os casos positivos com o hábito de escovação, não foi detectada nenhuma diferença dentro de um mesmo grupo de indivíduos e nem mesmo entre eles. Esse fato pode ser decorrente da maior positividade do parasito no grupo HIV/SIDA ou relacionada com a pequena amostragem associada ao hábito de realizar uma ou duas escovações diárias, a qual por sua vez também foi maior no grupo HIV/SIDA (Tabela 1).

A *E.gingivalis* foi detectada em 64,3% (27/42) dos indivíduos dos grupos HIV/SIDA que apresentavam condição de higiene bucal ruim e em 33,3% (3/9) daqueles com condição boa ($p=0,181$); OR=3,60 ; IC95% = 0,78-16,51). No grupo não clínico o parasito esteve associado com 42,9% (9/21) dos indivíduos que apresentavam condição ruim e em apenas 12,2 (9/74) dos que apresentaram condição boa (Gráfico 9; Gráfico 10). Nos pacientes do grupo clínico a avaliação da condição bucal foi realizada por um cirurgião dentista e classificada em gengivite ou periodontite, sendo *E. gingivalis* detectada respectivamente em 16,7% (2/12) e 47,4% (9/19) dos casos ($p=0,175$); OR= 4,50; IC95% = 0,77-26,29) (Gráfico 11).

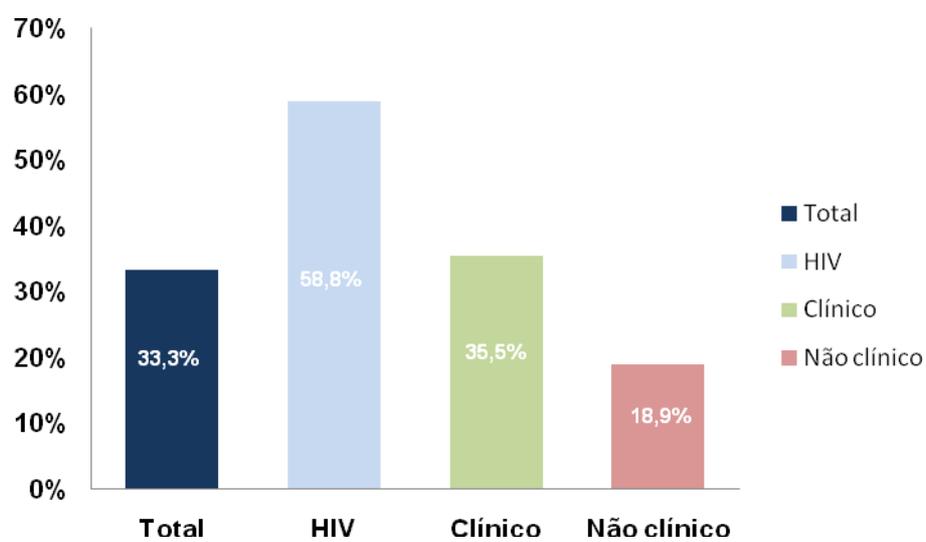


Gráfico 5: Frequência geral de *Entamoeba gingivalis* na população estudada e nos grupos HIV/SIDA, clínico e não clínico, com significância estatística entre os grupo HIV/SIDA e grupo não clínico ($p < 0,01$)

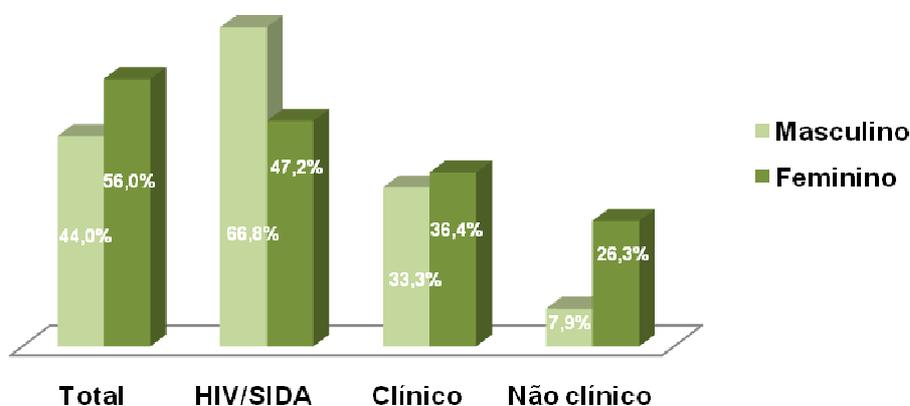


Gráfico 6: Distribuição da porcentagem de indivíduos parasitados com *Entamoeba gingivalis* nos grupos HIV/SIDA, clínico e não clínico em relação ao gênero com diferença significativa ($p= 0,048$) nos indivíduos do gênero feminino do grupo não clínico.

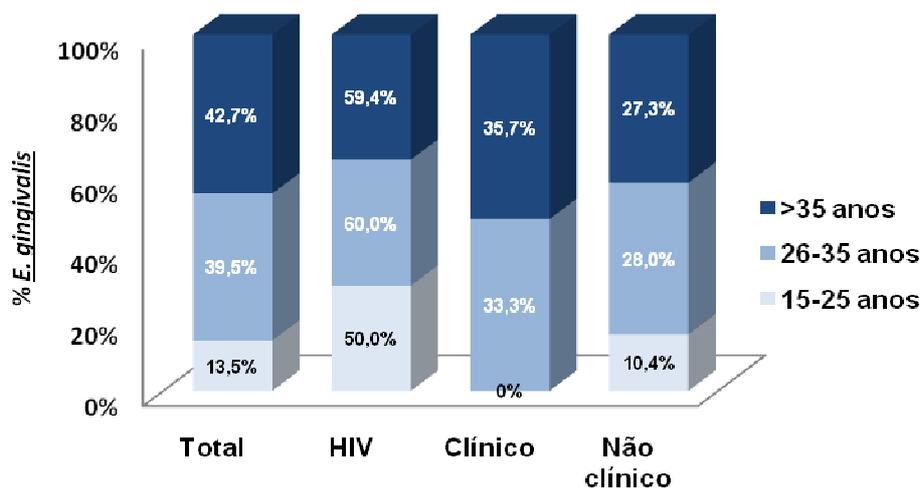


Gráfico 7: Distribuição da porcentagem de indivíduos parasitados com *Entamoeba gingivalis* nos grupos HIV/SIDA, clínico e não clínico em relação a idade, evidenciando uma associação significativa ($p=0,001$) entre o aumento da idade e a frequência do parasito.

A avaliação do tabagismo e sua relação com a positividade da *E. gingivalis* foi avaliada em 160 indivíduos e mostrou diferença significativa ($p < 0,001$) sendo o parasito foi detectado em 65,6% (21/32) dos fumantes e em 25% (32/128) dos não fumantes (OR= 5,73; IC95%= 2,49-13,16). A estratificação dentro de cada grupo de indivíduos mostrou associação significativa do tabagismo com a presença de *E.gingivalis* apenas no grupo de indivíduos não clínicos ($p=0,025$) (Tabela 2; Gráfico12).

A relação entre a presença de *E.gingivalis* e a quantidade de linfócitos TCD4⁺ e carga viral foi avaliada exclusivamente em 49 pacientes do grupo HIV/SIDA. Para analisar a correlação entre nível de linfócitos TCD4⁺ e a presença do parasito, os pacientes foram divididos em dois grupos associados com a quantificação menor ou maior que 200 cópias/ mm³. Deste modo, o parasito foi detectado em 56,2% (9/16) dos casos com LTCD4⁺ menor que 200 células/ mm³ e em 60,6% (20/33) acima de 200 células/mm³, sem diferença significativa entre os mesmos ($p=0,771$); OR=1,20 IC95%= 0,36-4,01 (Gráfico 13).

A relação entre o parasitismo pela *E. gingivalis* e a influência da carga viral foi avaliada em cinco escalas de acordo com a quantidade de cópias do vírus, sendo detectada em: 78,3% (18/23) daqueles indivíduos que possuíam menos de 50 cópias do vírus; em 37,5% (3/8) com 51 à 5.000 cópias; 50,0% (1/2) entre 5.000 e 30.000; 50,0% (1/2) entre 30.000 e 100.000 e 37,5% (3/8) maior que 100.000 cópias ($p=0,139$). Desse modo não foi demonstrada associação entre o nível de linfócitos TCD4⁺, carga viral e o parasitismo pela *E.gingivalis* no grupo de pacientes HIV/SIDA (Gráfico 14).

A verificação do pH salivar foi realizada em 93 indivíduos, correspondentes a 45 (48,4%) do grupo HIV/SIDA e 48 (51,6%) do grupo não clínico e oscilou entre 5,5 e 8,0. No grupo HIV/SIDA, 44,4% (20/45) dos pacientes apresentaram o pH na escala de 5,5-6,0 e 55,5% (25/45) entre 6,5-7,0. No grupo não clínico, 77,1% (37/48) e 23,0% (11/48) dos indivíduos apresentaram o pH na escala de 6,5-7,0 e 7,5-8,0 respectivamente. No grupo HIV/SIDA não houve diferença significativa ($p=0,075$) na distribuição entre as escalas de 5,5-6,0 e 6,5-7,0, porém, 44,4% (20/45) destes pacientes possuíam o pH salivar mais ácido, fato não observado no grupo não clínico, no qual

Tabela 1: Frequência de escovação diária em relação à positividade de *Entamoeba gingivalis* nos grupos HIV/SIDA, clínico e não clínico

Escovações	1x	2x	3x	4x	Valor p
HIV/SIDA	100% (2/2)	69,2% (9/13)	58,8% (10/17)	80,0% (4/5)	0,588
Clínico	0	50,0 % (1/2)	35,0% (7/20)	37,5% (3/8)	0,914
Não clínico	0	25,0% (2/8)	17,8% (8/45)	17,1% (7/41)	0,865
Total	100% (2/2)	52,2% (12/23)	30,5% (25/82)	25,9% (14/54)	0,025

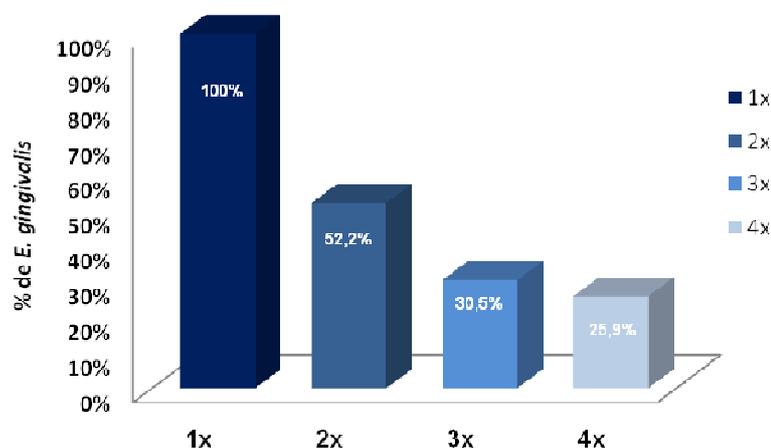


Gráfico 8: Frequência de *Entamoeba gingivalis* nos grupos HIV/SIDA, clínico e não clínico em relação ao número de escovações diárias.

Tabela 2: Tabagismo em relação à frequência de *Entamoeba gingivalis* nos grupos HIV/SIDA, clínico e não clínico

Tabagismo	Fumante	Não fumante	Total	Valor p
HIV	85,7% (12/14)	59,1% (13/22)	36	0,187
Clínico	75,0% (3/4)	30,8% (8/26)	30	0,249
Não clínico	42,9% (6/14)	13,7% (11/80)	94	0,025
Total	65,6% (21/32)	25,0% (32/128)	160	<0,001

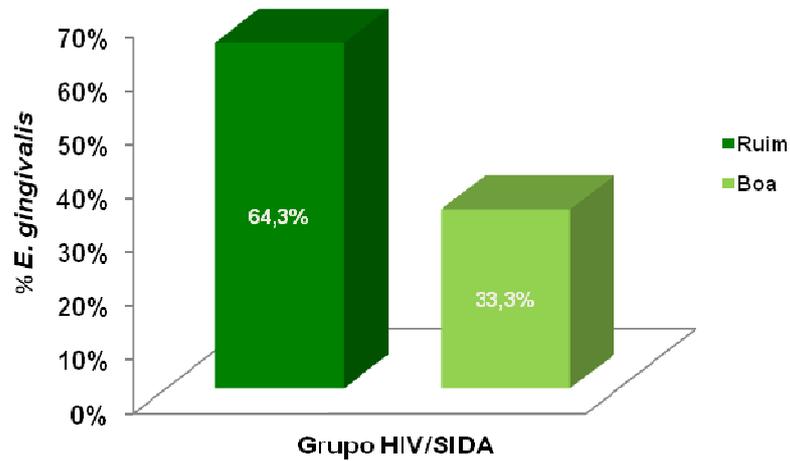


Gráfico 9: Frequência de *Entamoeba gingivalis* no grupo HIV/SIDA em relação à condição de higiene bucal sem diferença significativa ($p=0,181$).

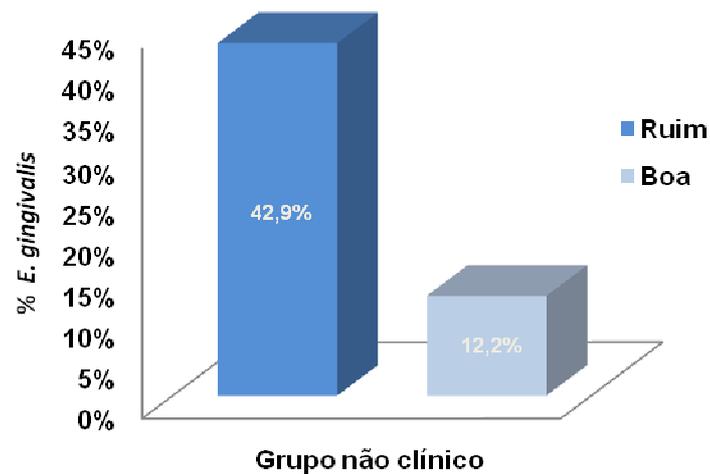


Gráfico 10: Frequência de *Entamoeba gingivalis* no grupo não clínico em relação à higiene bucal apresentando diferença estatística ($p= 0,04$).

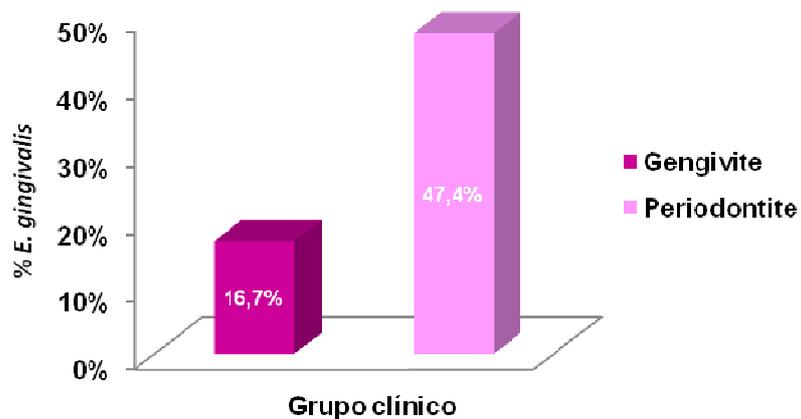


Gráfico 11: Frequência de *Entamoeba gingivalis* no grupo clínico em relação ao tipo de doença periodontal não apresentando significância estatística ($p=0,175$).

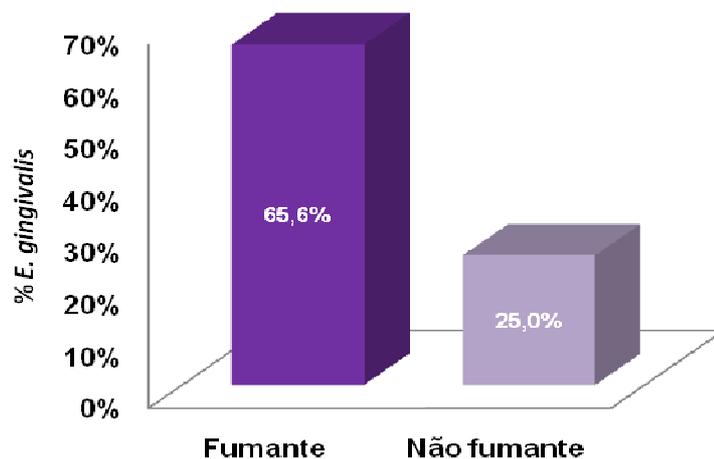


Gráfico 12: Distribuição da porcentagem de *Entamoeba gingivalis* em relação ao tabagismo em toda população estudada apresentando diferença significativa ($p<0,001$) nos indivíduos fumantes. .

a maioria dos indivíduos, ou seja, 77,1% (37/48) apresentou o pH na escala de 6,5-7,0 valor este mais próximo do pH fisiológico da cavidade bucal.

A frequência de *E. gingivalis* no total de indivíduos avaliados pelo pH salivar foi de 38,7% (36/93) e sua distribuição de acordo com as escalas 5,5-6,0; 6,5-7,0; e 7,5-8,0 foi de 12,9% (12/93), 23,6% (22/93) e 2,1% (2/93) respectivamente. Não houve diferença significativa na positividade de *E. gingivalis* em relação ao pH salivar nos pacientes HIV/SIDA ($p=0,075$) com 60,0% (12/20) dos casos na escala de 5,5-6,0 e 68,0% (17/25) de positividade entre 6,5-7,0. O mesmo ocorreu no grupo não clínico ($p=0,434$) onde 13,5% (5/37) e 18,2% (2/11) se localizaram respectivamente na escala de pH 6,5-7,0 e 7,5-8,0 (Quadro 5).

4.3 Comparação dos métodos utilizados no diagnóstico de *Entamoeba gingivalis*

A detecção de *E. gingivalis* na cavidade bucal pelos métodos do exame direto a fresco (EF) e pela PCR específica direcionada para a SSU do gene 18S do rRNA foi realizada concomitantemente em 43,7% (91/208) do total de amostras coletadas dos 177 pacientes e corresponderam a raspados gengivais dos grupos HIV/SIDA e amostras supra e subgengivais do grupo clínico. Os dois métodos permitiram identificar o parasito em 76,9% (70/91) das amostras avaliadas, o EF e a PCR separadamente detectaram respectivamente 57,1% (52/91) e 65,9% (60/91) dos casos.

A análise comparativa entre a positividade da amostra detectada pelo EF e PCR mostrou que 46,1% (42/91) apresentaram EF e PCR positivas e 23,1% (21/91) EF e PCR negativas, totalizando um percentual de 69,2% (63/91) de amostras concordantes. Entretanto, 11,0% (10/91) foram EF positivas e PCR negativas e 19,8% (18/91) foram EF negativas e PCR positivas. A análise pelo coeficiente Kappa demonstrou uma concordância fraca ($k=0,355$) onde 30,8% (28/91) das amostras foram discordantes quanto à positividade pelos dois métodos de diagnóstico avaliados (Gráfico 15). A distribuição das 70 amostras positivas para *E.gingivalis* de acordo com o método de diagnóstico mostrou que 60,0% (42/70) foram identificadas tanto pelo EF e PCR, 14,3% (10/70) pelo EF e 25,7% (18/70) pela PCR (Gráfico 16).

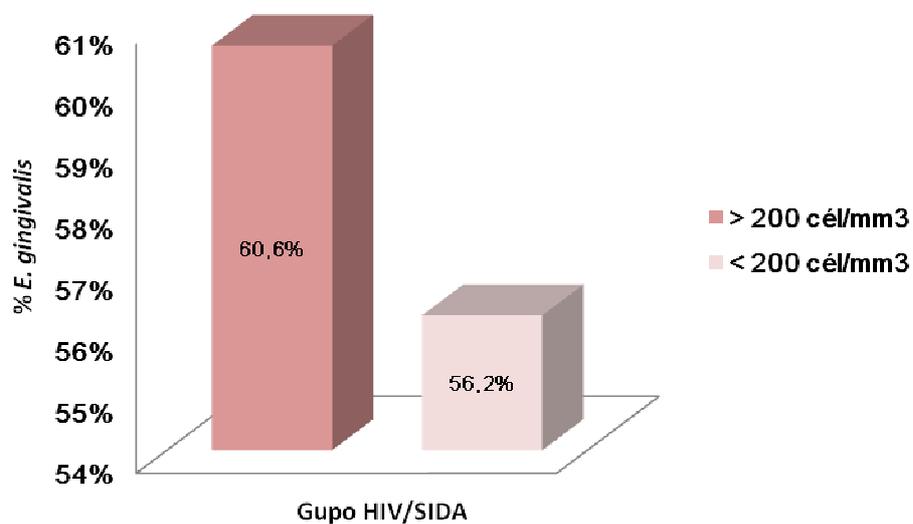


Gráfico 13: Frequência de *Entamoeba gingivalis* em relação ao nível de linfócitos TCD4⁺ nos pacientes do grupo HIV/SIDA sem diferença significativa ($p=0,771$).

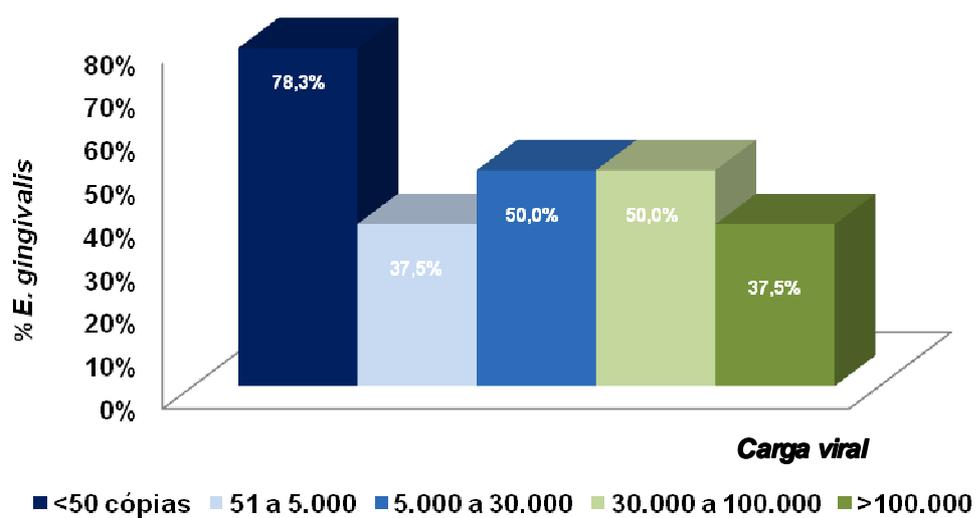


Gráfico 14: Frequência de *Entamoeba gingivalis* em relação à carga viral nos pacientes do grupo HIV/SIDA. Não houve diferença significativa ($p=0,139$) entre as escalas analisadas.

Quadro 5: Avaliação do pH salivar em amostras bucais dos pacientes HIV/SIDA e grupo não clínico e sua associação com a presença de *Entamoeba gingivalis*.

pH		≤ 5,0	5,5-6,0	6,5-7,0	7,5-8,0	Total	p=
HIV/SIDA	n	0	44,4% (20/45)	55,5% (25/45)	0%	48,4% (45/93)	
	% <i>E. gingivalis</i>	0	60,0% (12/20)	68,0% (17/25)	0%	64,4% (29/45)	0,075
Não clínico	n	0	0	77,1% (37/48)	23,0% (11/48)	51,6% (48/93)	
	% <i>E. gingivalis</i>	0	0	13,5% (5/37)	18,2% (2/11)	14,6% (7/48)	0,434
Total	n	0	21,5% (20/93)	66,7% (62/93)	11,8% (11/93)	100% (93/93)	
	% <i>E. gingivalis</i>	0	12,9% (12/93)	23,6% (22/93)	2,1% (2/93)	38,7% (36/93)	

4.4 Comparação do tipo de coleta da amostra bucal no diagnóstico da *Entamoeba gingivalis* pelo exame a fresco e PCR

A influência do tipo de coleta do material da cavidade bucal no diagnóstico da *E. gingivalis* pelo exame a fresco foi realizado nas amostras obtidas pelo método do raspado e lavado dos grupos HIV/SIDA (n=51) e não clínico (n=95), e nas regiões sub e supra gengivais do grupo clínico (n=31), sendo esta última incluída como raspado na amostra total. O parasito foi detectado pelo raspado em 31,6% (56 /177) e pelo lavado em 6,5% (9/139) conforme demonstrado no gráfico 17.

A presença de *E. gingivalis* foi evidenciada no grupo de pacientes HIV/SIDA, respectivamente pelo raspado e lavado em 52,9% (27/51) e 20,0% (9/45) destes, com diferença significativa ($p<0,001$) entre ambos (OR=4,50; IC95%= 1,80-11,23) No grupo não clínico em 18,9% (18/95) dos pacientes, o parasito foi detectado pelo EF exclusivamente no raspado sendo que o exame do lavado bucal não detectou nenhum indivíduo infectado pela *E. gingivalis*. No grupo clínico as amostras obtidas das regiões supra e subgengivais foram positivas em 35,5% (11/31) e 12,9% (4/31), dos casos respectivamente, evidenciando a superioridade do raspado na detecção do parasito em amostras bucais (Gráfico 17).

O diagnóstico de *E. gingivalis* pela técnica da PCR detectou o parasito em 59,2% (29/49) dos raspados dos pacientes HIV/SIDA e em 61,3% (19/31) e 38,7% (12/31) das amostras supra e subgengivais respectivamente no grupo clínico. A positividade da PCR foi comparada com a do exame a fresco mostrando diferença significativa no grupo clínico tanto nas amostras supragengivais ($p=0,042$); OR= 2,88; IC95%=1,03-8,07) como nas subgengivais ($p=0,020$) OR= 4,46 ; IC95%=1,19-15,25) e sem diferença no grupo HIV/SIDA ($p=0,529$) OR=1,29; IC95%=0,58-2,84) mostrando novamente a eficácia do raspado como método ideal de coleta de amostras bucais (Gráfico 18).

Esse mesmo comportamento foi observado quando analisamos exclusivamente as amostras positivas. Do total das 36 amostras positivas dos pacientes HIV/SIDA, 75,0% (27/36) foram detectadas nos raspados e 25,0% (9/36) nos lavados bucais e em 100% dos raspados no grupo não clínico (18/18) e das amostras supragengivais do grupo

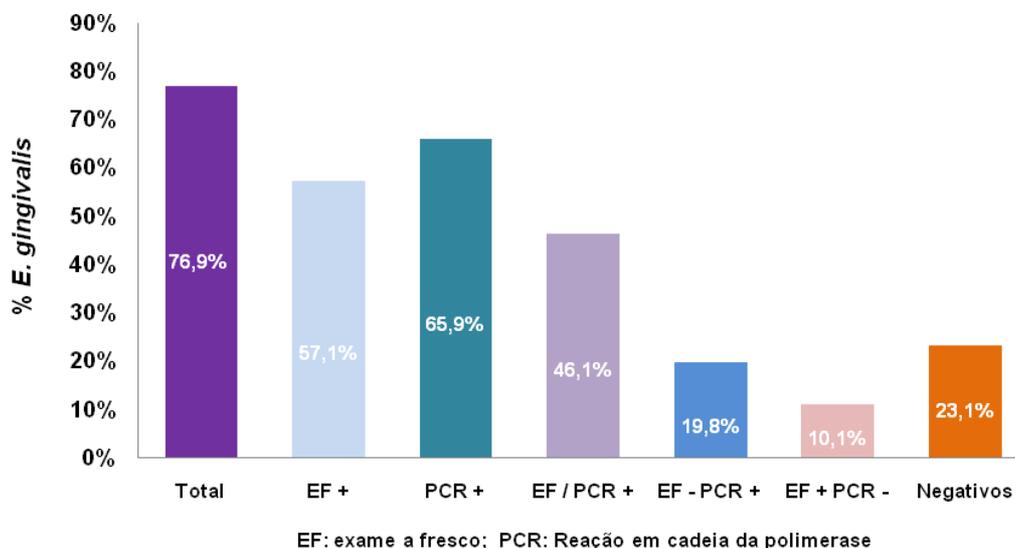


Gráfico 15: Frequência de *Entamoeba gingivalis* em relação aos métodos de diagnóstico: exame a fresco e PCR nos grupos HIV/SIDA, clínico e não clínico, demonstrando uma concordância fraca ($k=0,355$) pelo coeficiente Kappa.

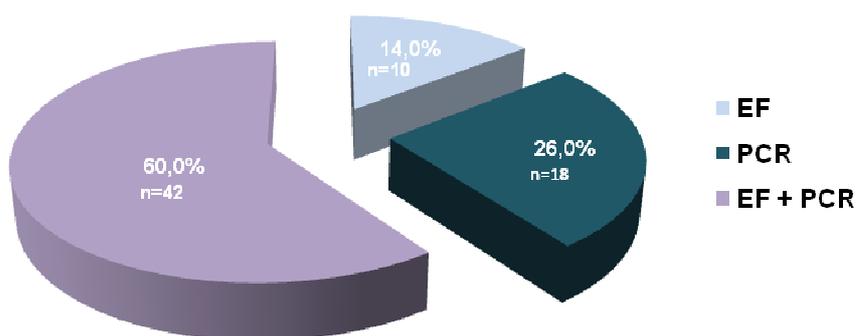


Gráfico 16: Positividade de *Entamoeba gingivalis* através da realização do exame a fresco e PCR nos grupos HIV/SIDA e clínico.

clínico (11/11) as quais foram consideradas equivalentes às do raspado. Nas amostras subgingivais do grupo clínico a positividade foi de 36,4% (4/11).

Considerando a baixa eficiência do lavado bucal na detecção da *E. gingivalis* pelo EF podemos inferir que a sua positividade no lavado exclusivamente nos pacientes HIV/SIDA demonstra o maior intensidade de parasitos nesse grupo. Tanto pelo exame a fresco como por meio da PCR foi possível evidenciar uma maior frequência de *E.gingivalis* nas amostras coletadas na região supragengival que são obtidas por raspado com curetas odontológicas em relação às subgingivais realizada com auxílio de cones de papel absorvente. Contudo apenas no grupo clínico foi realizado este tipo de coleta por depender da capacidade de profissional especializado e ambiente odontológico.

4.5 Experimentação animal

A infecção experimental dos animais foi realizada com cinco isolados (U-E; U-C; U-M; T10 e U-301), obtidos de cultura em sua fase exponencial. Entretanto, a presença de trofozoítos de *E. gingivalis*, de infecção causada pelo mesmo e processo inflamatório foi avaliada através de exames macro e microscópicos.

4.5.1 Observação macroscópica

A análise macroscópica demonstrou que em média os cinco isolados *E. gingivalis* avaliados induziram eritema gengival em 50,0% (5/10) dos animais não sendo observada nenhuma alteração clínica aparente.

Os isolados U-301 e U-C de *E. gingivalis* induziram eritema gengival tanto nos animais imunossuprimidos como imunocompetentes e o U-E em 50,0% (1/2) dos animais sendo este imunossuprimido. Nos animais infectados com isolados U-M e T-10 não foram detectadas alterações macroscópicas e o aspecto do tecido gengival foi normal. Estes resultados não apresentaram diferença significativa ($p=0,091$) (Tabela 3).

A avaliação dos diferentes tipos de inóculo, ameba + bactérias, bactérias e solução siológica estéril na infecção experimental demonstrou que 50,0% (5/10) dos animais inoculados com amebas + bactérias apresentaram eritema gengival. Contudo,

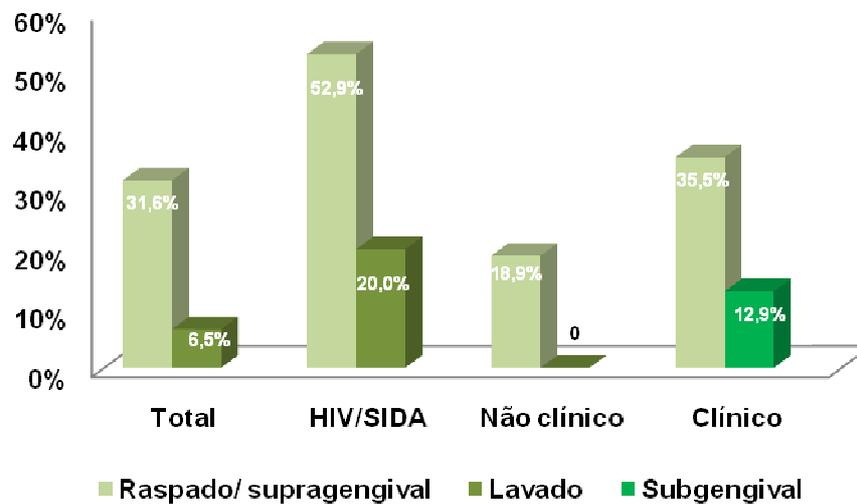


Gráfico 17: Comparação do tipo de coleta da amostra bucal no diagnóstico da *E. gingivalis* em relação ao exame a fresco e PCR nos grupos HIV/SIDA, clínico e não clínico.

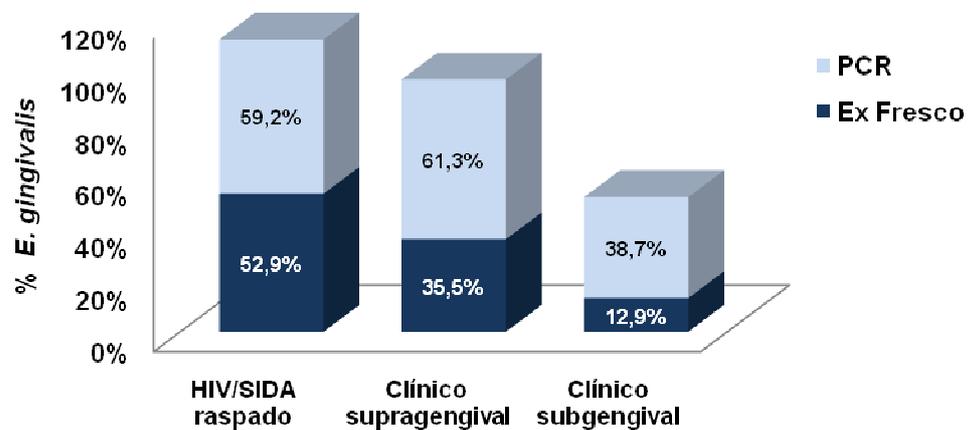


Gráfico 18: Sensibilidade da PCR e exame direto a fresco na detecção de *Entamoeba gingivalis* por meio da técnica do raspado bucal no grupo HIV/SIDA e grupo clínico. A positividade da PCR foi comparada com a do exame a fresco mostrando diferença significativa no grupo clínico tanto nas amostras supragengivais ($p=0,042$) como nas subgengivais ($p=0,020$).

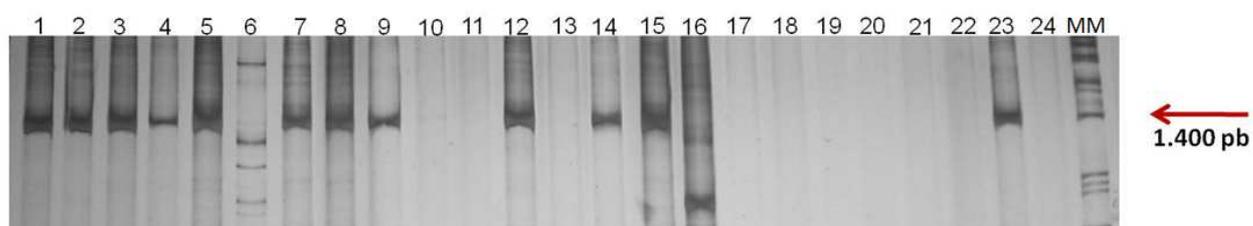


Figura 4: Gel de poliacrilamida 7,5% representativo da PCR específica da amplificação do gene 18S da SSU-rRNA de *Entamoeba gingivalis* e controles negativos de bactérias bucais e outras espécies de amebas. **1-6**= pacientes do grupo HIV/SIDA; **7**= pacientes do grupo clínico; **8**= pacientes do grupo não clínico; **9, 11 e 13**= amostras subgingivais (clínico); **10,12,14,15 e 16**= amostras supragingivais (clínico); **17**= *Entamoeba histolytica*, **18**= *E. moshkovskii*; **19**= amebas de vida livre; **20**= bactérias do isolado U-M; **21**= bactérias do isolado T10; **22**= bactérias do isolado U-C; **23**= controle positivo; **24**= controle negativo e **MM**= Marcador molecular.

a presença de eritema foi evidenciada em 40,0% (4/10) dos controles inoculados com solução fisiológica 0,9% e em 10% (1/10) dos inoculados com bactérias. A análise estatística dessas variáveis não apresentou diferença significativa ($p=0,142$) (Tabela 4).

O estado imunológico dos ratos na infecção experimental por *E. gingivalis*, não apresentou influência na condição macroscópica do tecido gengival ($p=0,698$) sendo o eritema gengival detectado em 40,0% (6/15) dos animais imunossuprimidos e em 26,6% (4/15) dos imunocompetentes enquanto os demais apresentaram gengiva com aspecto normal (Tabela 5).

No presente estudo também foram realizados inóculos com *T.tenax*, onde este parasito foi responsável pela formação de grandes abscessos, eritema, edema ao nível macroscópico e uma grande desorganização e destruição tecidual ao nível microscópico. Estes parasitos também foram recuperados de tais lesões e re-inoculados em meio de cultura.

4.5.2 Observação microscópica

A partir das observações das lâminas de histopatologia processadas e coradas com HE, na foi possível observar nenhuma alteração do tecido gengival de ratos ao nível inflamatório e/ou infeccioso.

4.6 PCR específica no tecido gengival de ratos

Através da PCR específica utilizando o par de iniciadores EGO-1 e EGO-2, não foi possível a amplificação do gene 18S da região SSU do rRNA de *E. gingivalis* em nenhuma das amostras analisada.

4.7 Caracterização genética pela LSSP-PCR (*Low stringency single specific primer-PCR*)

A técnica de LSSP-PCR constitui-se de condições de baixa estringência onde usualmente apenas um iniciador específico é utilizado para amplificação do fragmento

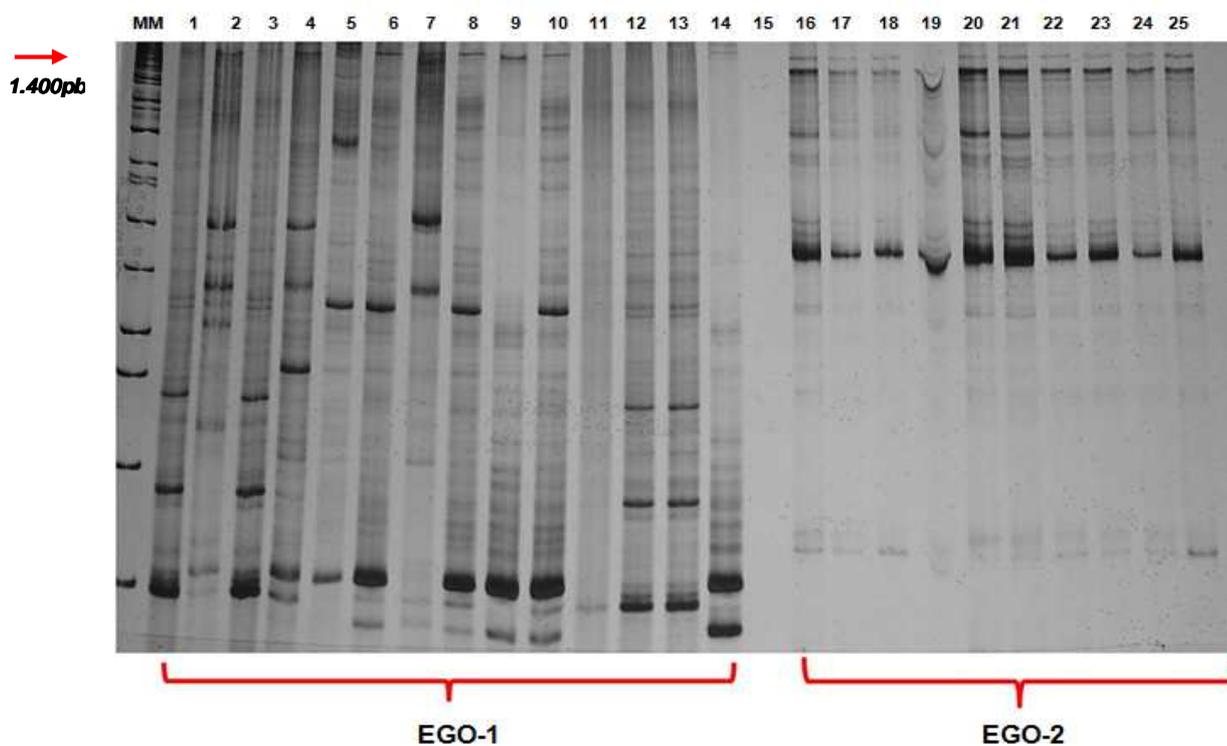


Figura 5: Análise comparativa dos perfis de LSSP-PCR em gel de poliacrilamida 7,5% corado pela prata, realizado com os iniciadores EGO-1 e EGO-2. MM= marcador molecular; **1-14** amostras amplificadas com o iniciador EGO-1; **15**= controle negativo; **16-25**= amostras amplificadas com o iniciador EGO-2.

Tabela 3: Análise do tecido gengival de ratos infectados com diferentes isolados de *Entamoeba gingivalis*

Isolado	Exame macroscópico		Total
	Eritema gengival	Gengiva normal	
U-E	1 (50,0%) *	1 (50,0%)	2 (20,0%)
U-C	2 (100%)	0 (0%)	2 (20,0%)
U-M	0 (0%)	2 (100%)	2 (20,0%)
T10	0 (0%)	2 (100%)	2 (20,0%)
U-301	2 (100%)	0 (0%)	2 (20,0%)
Total	5 (50,0%)	5 (50,0%)	10 (100%)

Qui-quadrado: $p = 0,091$

* Animal imunossuprimido

Tabela 4: Análise macroscópica do tecido gengival de ratos infectados com cada um dos três diferentes tipos de inóculo

Inóculo	Exame macroscópico		
	Eritema gengival	Gengiva normal	Total
Ameba + Bactéria	5 (50,0%)	5 (50,0%)	10(3,3%)
Bactéria	1 (10,0%)	9 (90,0%)	10(33,3%)
Solução fisiológica	4 (40,0%)	6 (60,0%)	10(33,3%)
Total	10 (33,3%)	20 (66,7%)	30 (100%)

Qui-quadrado: $p = 0,14$

Tabela 5: Análise do tecido gengival de ratos infectados em relação a sua condição imunológica

Estado imunológico do animal	Exame macroscópico		
	Eritema gengival	Gengiva normal	Total
Imunocompetente	4 (26,7%)	11 (73,3%)	15 (50,0%)
Imunossuprimido	6 (40,0%)	9 (60,0%)	15 (50,0%)
Total	10 (33,3%)	20 (66,7%)	30 (100%)

Qui-quadrado: $p = 0,698$

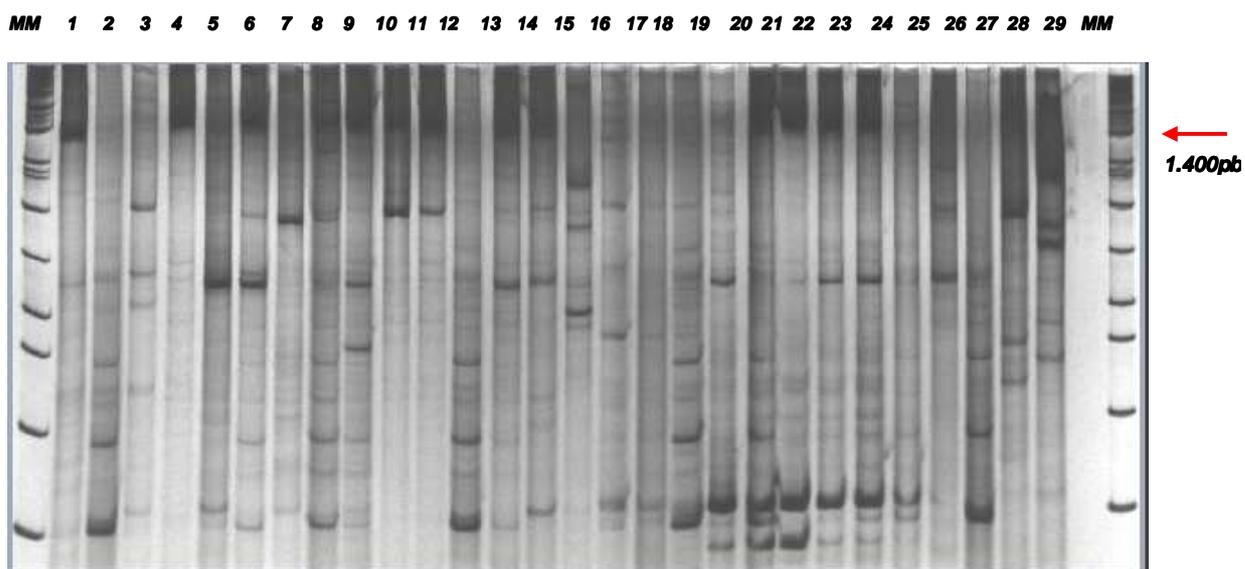


Figura 6: Comparação dos perfis de LSSP-PCR em gel de poliacrilamida 7,5% corado pela prata representativo das populações de *Entamoeba gingivalis* presente nas amostras bucais dos pacientes HIV/SIDA, grupo clínico e não clínico. **MM** = marcador molecular; **1 - 11**= amostras de HIV/SIDA; **12 - 20**= amostras supragengivais do grupo clínico: Taubaté/SP; **21 - 23**= amostras subgengivais do grupo clínico: Taubaté/SP; **24**= amostras do grupo não clínico: Uberaba/MG; **25**= amostra do grupo clínico: Uberaba/MG; **26 - 28** = amostras do grupo não-clínico de Uberaba/MG; **29**= controle negativo.

específico do DNA do parasito (GOMES et al., 1997). Neste trabalho foram testado os dois iniciadores EGO-1 e EGO-2, onde o EGO-1 foi selecionado por demonstrar uma melhor diferenciação entre as cepas. Contudo, a reação de amplificação com o iniciador EGO-2 apresentou um padrão comum de bandas para a diferenciação das cepas de *E. gingivalis* como observado na figura 5.

4.7.1 Amostras do grupo HIV/SIDA, clínico e não clínico

O fenograma representativo da variabilidade da menor subunidade ribossomal da região 18S do rRNA da *E. gingivalis* detectada pela LSSP-PCR foi realizada em 25 amostras, das quais 12 correspondentes ao grupo clínico dos pacientes de Taubaté/ SP e 13 dos pacientes da região de Uberaba/ MG, incluindo 4 amostras do grupo não clínico e 9 amostras de pacientes HIV/SIDA.

A amplificação da subunidade menor do gene 18S do rRNA esta representada na figura 7 e de acordo com o fenograma observa-se a distribuição das amostras em dois grupos distintos altamente polimórficos entre si compartilhando 28,2% de bandas. Os perfis genéticos de LSSP-PCR demonstraram elevada heterogeneidade das populações de *E. gingivalis* com porcentagem de similaridade variando de 28,2% a 92,0%. A análise conjunta das amostras detectou maior semelhança entre os pares T21 e T24 subgingival (92,0%), H19 e H33 (76,9%) e T21 e T24 supragingival (75,7%).

O grupo I foi constituído por dois grandes subgrupos altamente heterogêneos (30,9% de similaridade) e correspondentes a 80,0% (20/25) das amostras estudadas, na qual ficaram distribuídas a totalidade das amostras do grupo clínico de Taubaté/ SP e 77,8% (7/9) dos pacientes HIV/SIDA. O subgrupo IA-1 foi dividido em dois braços com 31,7% de identidade sendo um deles associado a 66,7% (6/9) das amostras dos pacientes HIV/SIDA, das quais 83,3% (5/6) com condição de higiene bucal ruim. O subgrupo IA-2 foi associado a 58,3% (7/12) das amostras de pacientes do grupo clínico de Taubaté/ SP e uma amostra do grupo não clínico de Uberaba/ MG, correspondendo 60% (6/10) dos casos de periodontite. No subgrupo IB ficaram distribuídas as demais amostras do grupo clínico de Taubaté/ SP, 41,7% (5/12), e uma amostra de paciente HIV/SIDA (H3) com 35,6% de compartilhamento de bandas entre as mesmas. Das cinco amostras de Taubaté/ SP analisadas neste grupo, 40,0% (2/5) eram de pacientes

com gengivite e 60,0% (3/5) de pacientes portadores de periodontite, e o paciente H3 que apresentava condição de higiene bucal ruim.

No grupo II evidenciamos 36,1% de similaridade entre as amostras, agrupando 60,0% (3/5) destas dos pacientes de Uberaba/ MG e 40,0% (2/5) dos pacientes HIV/SIDA, também desta região. A análise de condição de higiene bucal desse grupo demonstrou apenas um paciente apresentava boa condição (U-C) enquanto 60,0% (3/5) possuíam uma qualidade ruim e um caso de periodontite (U-301).

4.7.2 Amostras do grupo clínico - Taubaté/ SP

Foram analisadas 12 amostras correspondentes a nove pacientes dos quais T5; T6; T11 apresentavam gengivite e T3; T14; T18; T20; T21; T24, periodontite. Dos pacientes T14; T21 e T24 foram possíveis realizar a análise comparativa dos perfis de LSSP-PCR das amostras coletadas das regiões supra e subgengival e dos demais apenas amostras supragengivais.

De acordo com a figura 8 podemos observar que as amostras foram distribuídas em dois grupos polimórficos e divergentes apresentando apenas 36,5% de similaridade. O grupo I foi constituído por 75,0% (9/12) das amostras analisadas com 38,1% de semelhança entre elas e representativas em 83,3% (5/6) dos pacientes com periodontite e um caso de gengivite. O grupo II também heterogêneo (41,3% de similaridade) incluiu as demais amostras onde 66,7% (2/3) eram casos de gengivite e um de periodontite.

O grupo I foi subdividido nos subgrupos Ia e Ib, os quais foram geneticamente correlacionados e apresentaram respectivamente 43,9% e 48,3% de bandas compartilhadas. O subgrupo Ib foi constituído por dois braços (Ib1 e Ib2) que separaram as amostras obtidas da região supragengival daquelas obtidas da região subgengival dos pacientes T14, T21 e T24 e supragengival do T11. Essas constituíram dois grupos geneticamente divergentes, porém, com elevada semelhança entre os pacientes T21 e T24 que apresentaram 75,6 e 82,4% de identidade, respectivamente, para as amostras da região supragengival e subgengival. As amostras correspondentes ao paciente T14 compartilharam respectivamente 59,7 e 58,6% de bandas com as amostras supragengival e subgengival dos pacientes T21 e T24.

4.7.3 Amostras do grupo HIV/SIDA

O fenograma representativo dos perfis genéticos de LSSP-PCR das nove amostras obtidas dos pacientes HIV/SIDA (figura 9) mostrou que estas ficaram distribuídas em dois grupos, sendo 77,8% (7/9) localizadas no grupo I o qual foi constituído pelos subgrupos Ia, Ib e Ic . No primeiro (Ia) ficaram distribuídas 71,1% (5/7) das amostras em dois braços divergentes que apesar de apresentarem apenas 38,9% de identidade, abrigaram similaridades entre 62,5% (H33 e H40) e 83,3% (H46 e H50). Os subgrupos Ib e Ic foram constituídos por amostras únicas (H19 e H14) altamente heterogêneas. No grupo II distribuíram-se as amostras H3 e H4 que apresentaram entre si 46,2% de bandas compartilhadas.

Neste grupo de pacientes imunodeprimidos e em uso de HAART, observamos que não houve correlação entre o nível de linfócitos TCD4⁺ e as características genéticas de *E. gingivalis*, onde no grupo I esses valores variaram de 15 a 1617 células/ mm³ e no grupo II entre 404 e 470 células/ mm³. Apesar da elevada similaridade entre H46 e H50 ambas com níveis de linfócitos TCD4⁺ mais baixos, 207 e 131 respectivamente, verificamos que estas foram geneticamente relacionadas com H57 que apresentou 1617 células/ mm³. Outra ausência de correlação com os níveis de linfócitos TCD4⁺ foi evidenciada entre amostras H33 e H40 com 62,5% de identidade e localizadas em um mesmo braço e associadas com 644 e 15 células/mm³ respectivamente. Apesar destes terem sido geneticamente correlacionadas não foi possível estabelecer associação com a positividade do exame a fresco e condição de higiene bucal, uma vez que a maioria dos pacientes, 88,9% (8/9), apresentaram positividade ao exame a fresco e condição bucal ruim.

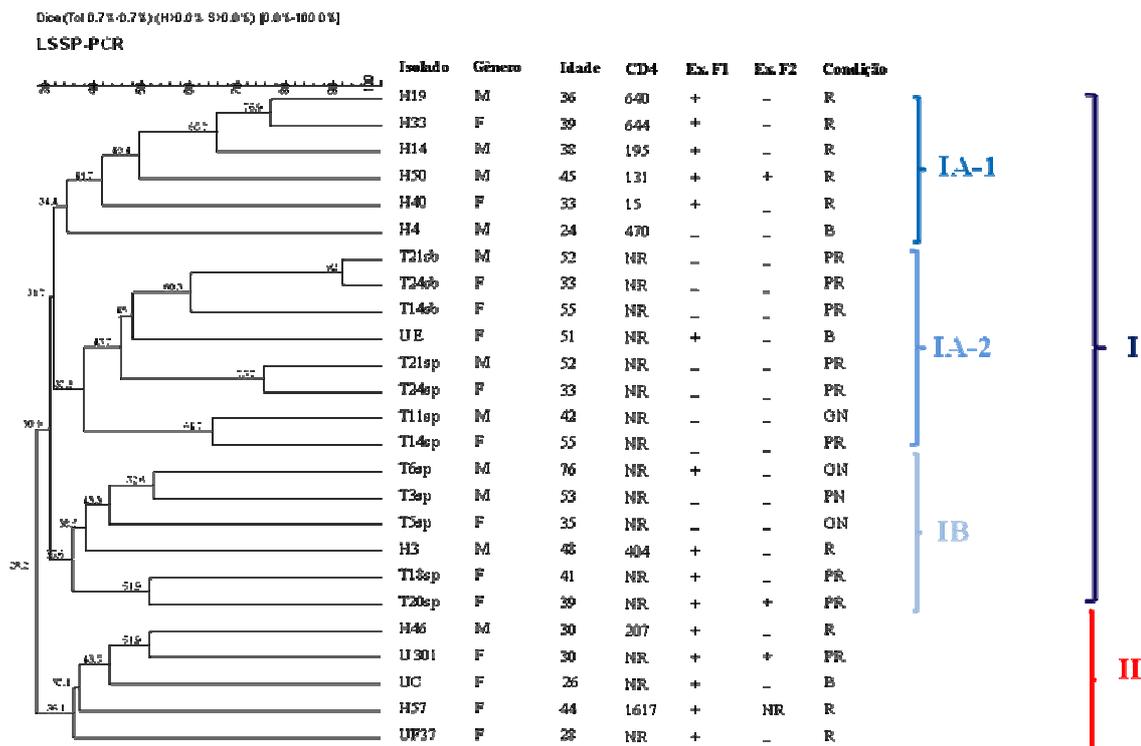


Figura 7: Fenograma total correspondente aos perfis de LSSP-PCR das populações de *E. gingivalis* presentes nas amostras bucais e sua associação com dados clínicos e epidemiológicos. **H**= pacientes HIV/SIDA; **T**= pacientes do grupo clínico: Taubaté/SP; **sp**= amostras supragengivais; **sb**= amostras subgengivais; **U**= pacientes do grupo clínico e não-clínico de Uberaba/MG; **M**= masculino; **F**=feminino; **CD4**= contagem de linfócitos T CD4⁺/mm³; **Ex.F1**= exame direto a fresco das amostras supragengivais ou raspado gengival; **Ex.F2**=exame direto a fresco das amostras subgengivais ou lavado bucal; **NR**= não realizado; + =positivo; - = negativo; **R**=ruim; **B**=boa; **PR**= periodontite; **GN**= gengivite.

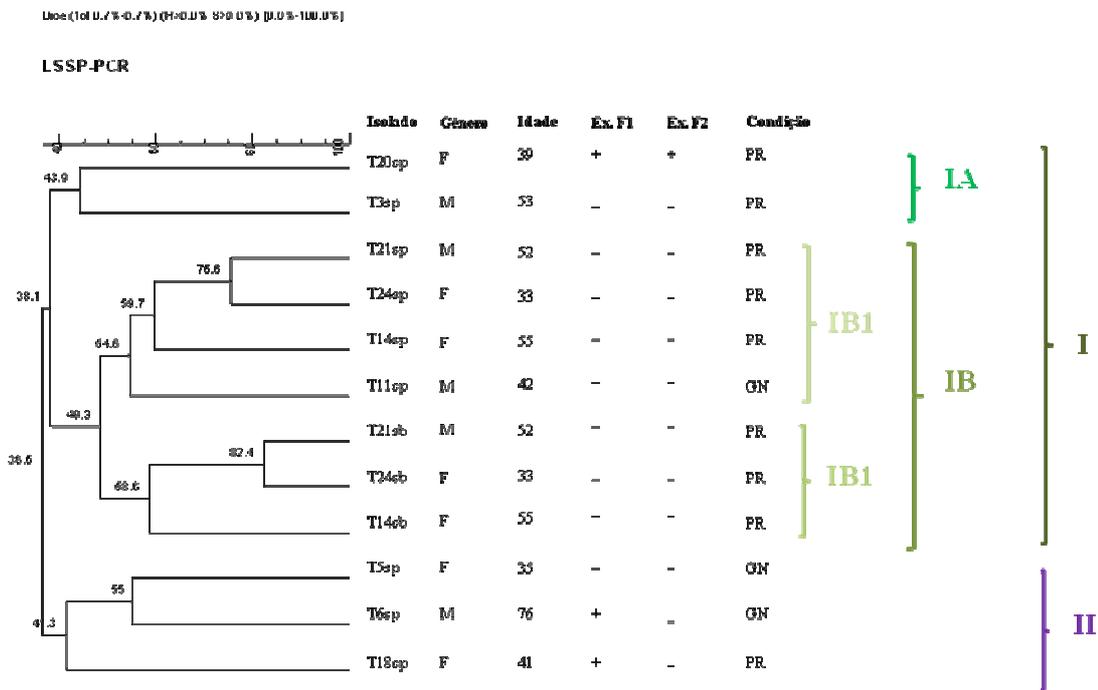


Figura 8: Análise da variabilidade genética da região 18S da SSU-rRNA de *E. gingivalis* de amostras clínicas de Taubaté/SP detectada pela LSSP-PCR com o iniciador EGO-1 e sua associação com dados clínicos e epidemiológicos. **T**= pacientes do grupo clínico: Taubaté/SP; **sp**= amostras supragengivais; **sb**= amostras subgengivais; **M**= masculino; **F**=feminino; **Ex.F1**= exame direto a fresco das amostras supragengivais; **Ex.F2**=exame direto a fresco das amostras subgengivais; + =positivo; - = negativo; **PR**= periodontite; **GN**= gengivite.

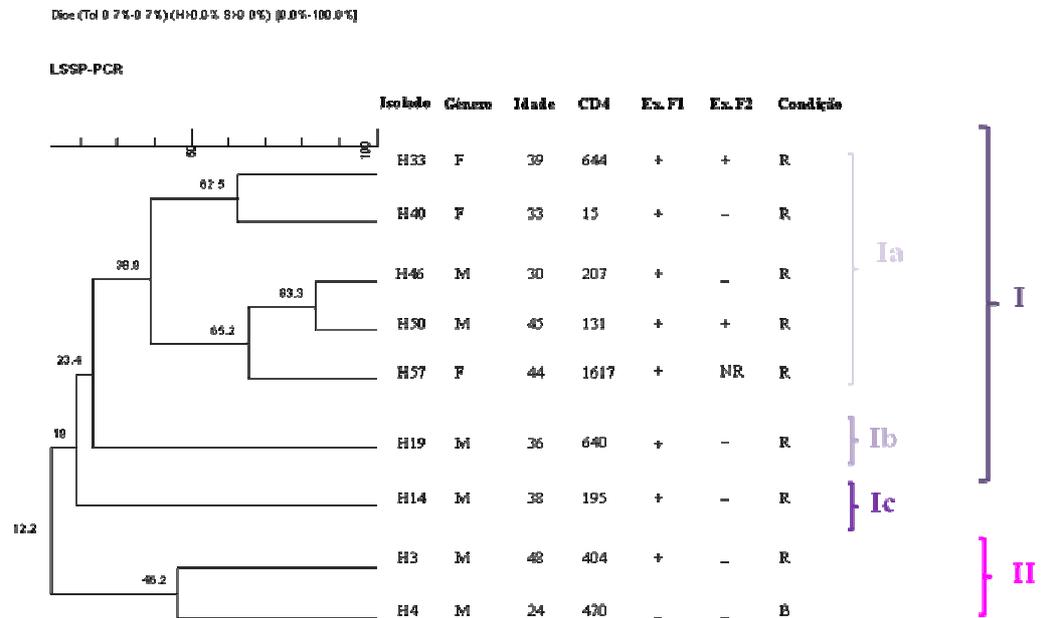


Figura 9: Análise da variabilidade genética da região 18S da SSU-rRNA de *E. gingivalis* de amostras de pacientes HIV/SIDA detectada pela LSSP-PCR com o iniciador EGO-1 e sua associação com dados clínicos e epidemiológicos. **M**= masculino; **F**=feminino; **CD4**= contagem de linfócitos T CD4⁺/mm³; **Ex.F1**= exame direto a fresco das amostras do raspado gengival; **Ex.F2**=exame direto a fresco das amostras do lavado bucal; **NR**= não realizado; + =positivo; - = negativo; **R**=ruim; **B**=boa.

7. Discussão

5.1 Análise da frequência de *E. gingivalis* em relação aos fatores clínicos e epidemiológicos

Neste estudo, a frequência de *E. gingivalis* foi avaliada em uma amostragem de 177 indivíduos distribuídos em três grupos heterogêneos detectando-se a presença do parasito na cavidade bucal dos mesmos em 33,3% (59/177) dos casos. Houve uma significativa variabilidade na frequência de acordo com a população avaliada, sendo evidenciada uma maior positividade nos grupos HIV/SIDA seguido pelo de portadores de doença periodontal (grupo clínico) e por último nos indivíduos controles (grupo não clínico). Esses dados explicam os diferentes números mencionados na literatura onde a frequência do parasito pode variar de 6,9 a 86,4% e são dependentes de variáveis epidemiológicas, como a idade, gênero e localização geográfica (CAMBON, 1979; CHEN et al., 2000; GHARAVI et al., 2006; CUEVAS et al., 2006).

A presença de *E. gingivalis* é idade-dependente (WANTLAND et al., 1958; WANTLAND & LAUER, 1968; GHABANCCHI et al., 2010). A maioria dos dados na literatura aponta que indivíduos acima de 30-40 anos apresentam um índice mais elevado desta ameba que dificilmente é encontrada em crianças e adolescentes, o qual ocorre um aumento significativo da sua positividade após 15 anos de idade (CHECOVÁ et al., 1987; VRABLIC et al., 1992). Em um dos poucos relatos existentes na literatura, CUEVAS et al., (2006) diz não ter encontrado *E. gingivalis* em crianças de 3 a 8 anos de idade. Em nosso estudo observamos que a presença do parasito foi mais evidente na faixa etária acima de 35 anos, corroborando com a maioria dos autores (KOFOID, 1929; WANTLAND & LAUER, 1968; GHARAVI et al., 2006; HERNÁNDEZ et al., (dados não publicados).

Os dados são controversos no que se diz respeito à predileção de *E. gingivalis* quanto ao gênero dos indivíduos. Alguns autores (VRABLIC et al., 1991; HUANG et al., 2009) relatam que esta espécie de ameba é mais freqüente em indivíduos do gênero masculino, outros (el HAYAWAN & BAYOUMY, 1992; WANTLAND & LAUER, 1968; GHABANCCHI et al., 2010) destacam uma frequência mais acentuada em mulheres, e ainda os que descrevem proporções semelhantes entre os gêneros feminino e masculino (CHECOVÁ et al., 1987; JÚNIOR & MACHADO, 1995; CUEVAS et al., 2006). Portanto, em nosso estudo revelamos um maior pronunciamento do parasito no

gênero feminino dos indivíduos do grupo não clínico, porém, na população total essa diferença não foi significativa.

É consenso na literatura de que *E. gingivalis* pode comumente ser encontrada em indivíduos com cavidade bucal saudável (DAO et al., 1983; CHEN et al., 2000), porém, existe uma forte associação entre a presença desse parasito com condições de deficiência de higiene bucal e/ou doença periodontal, não sendo estabelecida causa para este achado (WANTLAND et al., 1963; WANTLAND & LAUER, 1968; GOTTLIEB et al., 1968; GOTTLIEB & MILLER, 1971; ANNAN et al., 1993; CHEN et al., 1999; LIU et al., 2001; CUEVAS et al., 2000; 2006; NOCITO-MENDONZA et al., 2003; GHARAVI et al., 2006; HUANG et al., 2009; GHABANCCHI et al., 2010).

A frequência de *E. gingivalis* foi menor em indivíduos do grupo não clínico quando comparados com os do grupo clínico, ou seja, de pacientes com doença periodontal que estavam sob tratamento odontológico. Estes dados corroboram com alguns estudos que afirmam que nos pacientes com doença periodontal, a presença do parasito é mais acentuada (ANNAN et al., 1993; CHEN et al., 1999; 2000; LIU et al., 2001; NOCITO-MENDOZA et al., 2003; GHARAVI et al., 2006; HUANG et al., 2009; GHABANCCHI et al., 2010). Quanto ao grupo não clínico, este foi composto em sua maioria por estudantes universitários da UFTM com faixa etária entre 15 e 25 anos. Segundo a literatura, em um dos estudos realizados com universitários na China, a prevalência do parasito foi bem menor quando comparada com a população geral. (HUANG et al., 2009). Desse modo, no Brasil não foi observada a prevalência de nenhum protozoário bucal na classe de estudantes universitários na cidade de Araraquara, Estado de São Paulo (GIAZZI, 1992). Estes dados corroboram com nossos achados sugerindo que, estes indivíduos tenham uma posição superior quanto ao nível cultural, levando a crer na sua influência aliada a uma melhor condição de higiene bucal, fatores estes importantes para a redução deste parasito nesta classe social (GIAZZI, 1992; HUANG et al., 2009).

Contudo, nos pacientes com doença periodontal (grupo clínico), a frequência do parasito foi maior quando comparada com o grupo controle. Alguns autores sugerem que a alta prevalência de *E. gingivalis* pode estar relacionada com alguns fatores como a qualidade da higiene bucal, hábito de fumar, as condições do tecido periodontal, grau de sangramento da gengiva, presença de lesões cariosas, formação de cálculos,

mobilidade dentária, bolsa periodontal, microbiota associada, coloração da gengiva, etc (ANNAN et al., 1993 ; NOCITO-MENDOZA et al., 2003; GHARAVI et al., 2006) .

Dados na literatura indicam que *E. gingivalis* é mais encontrada em cavidade bucal com pH em torno 6,0 a 8,5 (GIAZZI, 1992; ZDERO et al., 1996; SANTOS, 2001; PONCE de LEÓN et al., 2001), sendo também notificada sua presença em pH 4,9 (GIAZZI, 1992). Em nosso estudo verificamos que *E. gingivalis* foi mais freqüente em pH 7,5 a 8,0 no grupo clínico e 6,5 a 7,0 no grupo HIV/SIDA, corroborando com os trabalhos acima citados. Dessa maneira, podemos correlacionar o pH da boca, habitat natural dessa ameba, com o dos meios de cultura (6,7), onde *E. gingivalis* se manteve viável, ressaltando mais uma vez a importância do pH para o crescimento e desenvolvimento deste parasito.

No grupo HIV/SIDA encontramos a maior freqüência deste protozoário, 58,8% (30/51) na cavidade bucal, corroborando com o único dado encontrado na literatura no qual a presença deste parasito foi detectada em 22,0% dos pacientes HIV positivo e em 7,0% dos controles (LUCHT et al., 1998). Estes autores também relacionaram a presença de *E. gingivalis* com o vírus da SIDA tipo 1, onde todos os pacientes soro positivos infectados com o parasito eram portadores de periodontite (LUCHT et al., 1998).

Os efeitos adversos indesejáveis da HAART nos pacientes imunodeprimidos, são rapidamente detectados e muitos deles associados com a cavidade bucal, destacando-se na maioria dos casos a xerostomia. Essa terapia induz a redução do fluxo salivar, altera a composição da saliva fato este que contribui para a instalação da doença periodontal. (FILHO & GIOVANI, 2009).

Alguns autores relatam que a imunodepressão por doenças sistêmicas como o diabetes (NOCITO-MENDOZA et al., 2003), pacientes irradiados na região de cabeça e pescoço devido ao câncer (PEREZ-JAFFE et al., 1997) e SIDA (LUCHT et al., 1998) favorece a presença de *E. gingivalis*. Outros demonstraram que ratos imunossuprimidos com corticóides apresentaram a imunidade comprometida e também maior possibilidade de infecções por *E. gingivalis*, *T. tenax* e bactérias causarem gengivite (CHEN et al., 2000; LIU et al., 2001; HUANG et al., 2009; GHABANCCHI et al., 2010).

Em nosso estudo avaliamos o possível caráter oportunista da *E. gingivalis* correlacionando sua freqüência com os níveis linfócitos T CD4⁺, contudo, a presença do parasito não teve relação com níveis menores de 200 células por mm³, apesar da

maioria desses indivíduos (64,29%) terem apresentado condição de saúde bucal ruim. O único dado disponível na literatura não quantifica os linfócitos T CD4⁺ dos indivíduos HIV positivo infectados com a *E. gingivalis*, apenas citam que o nível destas células foi menor nos pacientes com doença periodontal quando comparados com indivíduos sem a mesma (LUCHT et al.,1998).

Em relação aos valores da carga viral, apesar da maioria dos indivíduos parasitados com *E. gingivalis* possuírem menos de 50 cópias do vírus, esse valor não foi significativo. A este fato sugere-se que a HAART proporciona uma melhor qualidade de vida aos pacientes, mantém equilibrado os níveis de linfócitos T CD4⁺ e controla a replicação viral.

A maior presença do parasito nos pacientes HIV/SIDA pode estar correlacionada com o caráter oportunista de *E. gingivalis* mas não diretamente pela imunodepressão através dos baixos níveis de linfócitos T CD4⁺. O fato dos pacientes aqui avaliados estarem em uso de HAART pode ter mascarado este possível comportamento do parasito. O parasitismo elevado pode estar relacionado a outros fatores como o tipo de microbiota presente na boca e alteração do pH salivar, hipercolesterolemia (causada pelo uso da HAART) assim como ocorre com *E. histolytica* (MITRA & SHIPSTONE, 1985), onde este último pode estar relacionado com a virulência da ameba.

Fatores como o número de escovação diária, condição de higiene bucal e doença periodontal podem influir diretamente nos índices de infecção por *E. gingivalis*. HUANG et al., (2009), curiosamente relataram que os indivíduos que possuíam o hábito de escovar os dentes mais vezes ao dia, apresentam uma maior positividade de *E. gingivalis*. Nosso trabalho demonstra o contrário, onde os indivíduos que realizavam o hábito de escovação mais vezes ao dia foram os que menos apresentaram o parasito na boca, sugerindo uma correlação inversa entre a presença do parasito e o número de escovações diárias. Assim como em outros estudos, *E. gingivalis* foi mais freqüente nos indivíduos com deficiência na qualidade de higiene bucal e nos portadores de periodontite, achado discordante com os de CHEN et al., (1999); (2000); LIU et al., (2001) e HUANG et al., (2009), que relatam uma estreita associação desta ameba com a gengivite. Um fato interessante aqui observado tanto no grupo clínico quanto no grupo não clínico, foi a ausência do parasito em indivíduos que escovavam os dentes apenas uma vez ao dia. Deve-se considerar que além da pequena amostragem desse grupo a avaliação foi baseada na informação pessoal fornecida pelo indivíduo durante a

anamnese (CIC), não existindo modo de comprovar se os mesmos praticavam ou não a escovação apenas uma vez ao dia.

No grupo HIV/SIDA, também avaliamos a condição de higiene bucal e verificamos que a maioria destes indivíduos apresentou a mesma ruim, seguidos de focos de infecção e inflamação, raízes dentárias residuais, candidose eritematosa e pseudomembranosa, xerostomia, ausência de elementos dentários e uso de próteses dentárias (dados não apresentados). Esses fatores contribuem para a transição da microbiota normal em periodontopatogênica, contribuindo para a instalação da doença periodontal (LUCHT et al., 1998). PONCE DE LEÓN et al., (2001), observaram uma maior prevalência de *E. gingivalis* nos usuários de próteses dentárias e sugerem que a mesma assim como aparelhos ortodônticos podem favorecer a presença do parasito. Nestes casos, a placa bacteriana adere sobre os mesmos que se comportam como uma excelente matriz para sustentar os protozoários bucais.

Alguns estudos demonstram que não há relação entre a presença de *E. gingivalis* e o tabagismo (CECHOVÁ et al., 1987). No entanto, no presente estudo, *E. gingivalis* foi significativamente mais freqüente nos indivíduos fumantes em todos os grupos estudados. Isso pode estar relacionado com a doença periodontal já que é sabido que o consumo de cigarros pode contribuir significativamente para o aumento do risco da instalação e progressão desta doença associada a algumas espécies de bactérias periodontopatogênicas (SCHLEGEL-BREGENZER et al., 1998).

5.2 Avaliação da frequência de *E. gingivalis* e métodos de coleta

A frequência de *E. gingivalis* pode chegar até a 86,4% segundo alguns pesquisadores (CAMBON et al., 1979). Este fato pode ser atribuído aos diferentes métodos de coleta, de diagnóstico e da diversidade da população estudada.

Alguns pesquisadores (JÚNIOR & MACHADO, 1995), mencionam a técnica de coleta pelo lavado bucal como excelente para visualização de *E. gingivalis* em exame direto a fresco e que esta técnica é rápida e simples de ser realizada, específica e de alta sensibilidade. Dessa maneira, CORRÊA et al., (1998) relatam que o material obtido da saliva, através de bochechos (lavado), parece ser mais eficiente do que quando obtido por meio de *swabs* embebidos em solução fisiológica a 0,9%, ou mesmo aquele

coletado por meio de curetas na região periodontal, sendo esta última raramente utilizada por provocar sangramento, comprometendo a qualidade das amostras. Contrariamente, outros autores propõem que na saliva não se encontra o parasito (MAHDI & AL SAEED, 1993) e ainda aqueles que afirmam que na cavidade bucal não há um sítio específico para a localização do mesmo (JÚNIOR & MACHADO, 1995).

Em nosso estudo, além das técnicas do lavado e do raspado bucal foi introduzida a técnica de absorção do fluido crevicular através de cones de papel (GHABANCHI, et al., 2010). No entanto, o método do raspado (equivalente a coleta na região supragengival) foi o mais eficiente em todos os grupos estudados. É válido ressaltar que o sangramento, assim como a quantidade excessiva de placa bacteriana e/ou cálculo dentário não dificultaram a observação microscópica dessas amostras, dado este discordante com o de CORRÊA et al., (1998). Assim como GHABANCHI, et al., (2010), a coleta por meio do cone de papel absorvente introduzido no sulco gengival, também detectou *E. gingivalis*, porém, em menor proporção demonstrando que a placa bacteriana supragengival ainda assume o papel de habitat principal desta ameba (KIKUTA et al., 1996).

Os resultados aqui obtidos demonstraram que a técnica do lavado bucal foi ineficiente para o diagnóstico de *E. gingivalis* corroborando com os de MAHDI & AL SAEED, (1993) e contradizendo os de JÚNIOR & MACHADO, (1995), que relataram uma positividade de 100% de *E. gingivalis* nas amostras coletadas por esta técnica. Os índices de positividade pelo lavado bucal foram baixos detectando apenas os casos associados com pacientes HIV/SIDA e foram nulos no grupo não clínico. Apesar de não ser uma técnica indicada para avaliar a frequência de *E. gingivalis*, a sua positividade no grupo HIV/SIDA demonstrou o intenso parasitismo na cavidade bucal sugerindo que nestes, o parasito encontra condições adequadas para sua multiplicação, fato este que merece melhor investigação.

O fato dos pacientes HIV/SIDA apresentarem uma maior quantidade de trofozoítos de *E. gingivalis* na cavidade bucal pode ter implicações epidemiológicas relacionadas com a possível transmissão bucal do vírus do HIV, devido à sua capacidade de fagocitar leucócitos e até mesmo partículas virais. Dados na literatura mostram que *E. histolytica* pode fagocitar células infectadas com vírus do HIV e este permanecer viável dentro da mesma. Este fato porém, ainda não foi comprovado na co-infecção humana. Outros relatos evidenciam também um comportamento similar com

Trichomonas vaginalis, contudo, hoje a importância desse protozoário na transmissão do HIV tem sido reavaliada (PINDAK, et al., 1989; BROWN et al., 1991; RENDÓN-MALDONADO et al., 2003;).

5.3 Comportamento biológico de *E. gingivalis in vitro e in vivo*

5.3.1. Padronização da cultura e manutenção *in vitro*

Dados na literatura apresentam grau variado de sucesso no cultivo de *E. gingivalis* em meios bifásicos contendo base sólida de ovo como o padronizado por Boeck and Drbohlav em 1924 (HOWITT, 1925; KOFOID et al., 1929; WANTLAND et al., 1963; CHEN et al., 1999; 2000; LIU et al., 2001). Um desses meios, o L.E.A (*Locke's Egg-Albumen*), foi modificado por HOWITT, (1925) que comprovou sua eficácia no cultivo de *E. gingivalis* isoladas da cavidade bucal humana e de macacos. No entanto, alguns pesquisadores relatam que estes meios não são ideais para o cultivo desta ameba, pois induzem densa proliferação bacteriana (GANNON & LINKE, 1989). No Brasil, GIAZZI, (1992) e SANTOS, (2001) utilizaram vários meios, incluindo o meio com base sólida de ovo, e não obtiveram êxito no cultivo de *E. gingivalis*. No presente estudo foram testados 20 tipos diferentes de meios de cultura, sendo que os quatro isolados que melhor se adaptaram *in vitro* e se mantiveram viáveis por aproximadamente 42,7 dias foi no meio BDM tamponado, com base sólida de ovo.

Após exaustiva revisão da literatura verificamos que as várias tentativas para se obter sucesso no cultivo da *E. gingivalis* geraram uma série de recomendações as quais foram utilizadas em conjunto neste trabalho. Contudo, o tamponamento da fase líquida do meio BDM com base sólida de ovo foi uma estratégia inédita aqui padronizada e que foi fundamental para o sucesso do cultivo do parasito.

O preparo adequado dos meios de cultura bifásicos (base sólida de ovo e solução de Locke's) e suas modificações são fatores importantes para o crescimento *in vitro* de *E. gingivalis*. Nestes, o parasito se localiza na base sólida no ângulo correspondente ao bisel formado pela base de ovo e a parede do tubo. A presença de rugosidades e/ou rachaduras neste meio podem dificultar a visualização do parasito que pode penetrar nas

fendas buscando condições de anaerobiose (KOFOID et al.,1929; GANNON & LINKE, 1989; CHEN et al., 2000).

A microbiota bucal parece ser importante para a sobrevivência de *E. gingivalis* no hospedeiro vertebrado, sendo a cepa de referência de *E. gingivalis* ATCC 30927 (American Type Culture Collection - Rockille, Md) uma cultura mista, associada a *Citrobacter diversus*, *Yersinia enterocolitica*, *Acinetobacter anitratus* e *Pseudomonas maltophilia*, (GANNON & LINKE, 1990; 1991; 1992). Um fato interessante é a associação de amebas semelhantes à *E. gingivalis* com *Actinomyces*, como evidenciado no útero de usuárias de dispositivo intra-uterino (CLARK & DIAMOND, 1992) e em aspirado de nódulo pulmonar (JIAN et al., 2008). Pesquisadores chineses cultivaram três isolados de *E. gingivalis* e identificaram diferentes espécies bacterianas associadas com o parasito: no isolado FJ-2: *Branhamella catarrhalis*, *Proteus vulgaris* e *Acinetobacter calcoaceticus*; em FJ-3: *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes* e em FJ-4, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* e *Streptococcus* α -hemolítico (CHEN et al., 1999). Outros relatos sugerem que *in vivo* (CLAYTON JR & BALL, 1953) as espiroquetas favorecem a multiplicação do parasito e em nosso estudo, observamos uma maior positividade de *E. gingivalis* em amostras que apresentavam tais bactérias no exame a fresco (dados não apresentados). *In vitro* a presença de bactérias no momento inicial da cultura, ou seja, nas primeiras 48 horas é necessária para o desenvolvimento do trofozoíto (CLAYTON JR & BALL, 1953). Contudo, a presença exacerbada das mesmas torna o meio impróprio para o desenvolvimento do protozoário, ocorrendo pouco ou nenhum crescimento do parasito nesta circunstância (GANNON & LINKE, 1990).

A utilização de antibióticos nos meios de cultura visa combater a proliferação bacteriana exacerbada e não deve interferir no desenvolvimento do protozoário. O tipo de antibiótico e a concentração ideal para se utilizar em uma cultura de *E. gingivalis* não tem sido determinada e os resultados na literatura são controversos e variam com a resistência adquirida pelas bactérias (KOFOID et al.,1929; CLAYTON JR & BALL, 1953; GANNON & LINKE, 1990). A penicilina e estreptomicina geralmente mostram-se eficientes no controle bacteriano e não alteram o desenvolvimento de *E. gingivalis* (CHEN et al., 1999). No entanto, a acriflavina, um corante derivado da acridina e que atua como bacteriostático, é letal para a ameba e inadequado na eliminação de bactérias

(KOFOID et al.,1929). O uso da penicilina na concentração de 1.000 UI/ mL adicionada ao meio desde o início da cultura induz um efeito bacteriostático, contudo, interfere no crescimento do parasito que sobrevive por um período máximo 36 horas. Quando não se adiciona antibiótico no início do cultivo, ocorre um aumento evidente no número dos trofozoítos desde as primeiras 24 até 72 horas, porém, a multiplicação da ameba e o controle da proliferação bacteriana são observados quando a penicilina é adicionada após 48 horas de cultivo (CLAYTON JR & BALL, 1953). Em nosso estudo, uma suspensão de 1.000 UI/ mL de penicilina G e 500µg/ mL de estreptomicina (CHEN et al., 1999), foi adicionada ao meio de cultura após 48 horas de cultivo (CLAYTON JR & BALL, 1953) e promoveram um efeito bacteriostático sem alterar o desenvolvimento de *E. gingivalis*, corroborando com dados citados na literatura (CHEN et al., 1999).

Visando transformar o meio bifásico com base sólida de ovo em um meio ideal para o crescimento de *E. gingivalis*, foram introduzidas modificações no seu preparo como o seu enriquecimento com diferentes nutrientes e a avaliação de um pH adequado. A suplementação do meio de cultura com amido de arroz é importante tanto para o desenvolvimento de *E. gingivalis* como para outras espécies de amebas que metabolizam o carboidrato transformando-o em glicose, que é sua principal fonte de energia, semelhante ao que ocorre com *E.histolytica*. (JÚNIOR & MACHADO, 1995). A granulação adequada do amido facilita a fagocitose e neste sentido tem sido sugerido que, para o melhor desenvolvimento do parasito, a suspensão de amido de arroz na concentração entre 0,05 e 0,50mL/ 8mL da fase líquida (solução de Locke's) seja mais eficiente do que o amido em pó (GANNON &LINKE, 1990). Em nosso estudo, as culturas de *E. gingivalis* foram suplementadas após 48 horas de cultivo com a suspensão de amido de arroz na concentração de 0,3 mg/ mL. A adição de glicose à solução de Locke's foi utilizada por KOFOID et al., (1929), porém em nosso trabalho optamos por não adicionar esse carboidrato visando a diminuição da proliferação bacteriana.

A utilização de soro de animais como coelho, cavalo, bovinos e ovinos estimula o crescimento de amebas em cultivos *in vitro*. No caso de *E. gingivalis* o uso de soro de coelho e de ovinos induziu aumento no número de parasitos, porém uma diminuição abrupta após o 6º repique da cultura (KOFOID et al.,1929). Em nosso estudo, o uso de qualquer tipo de soro nas culturas foi abolido, pois apenas com a suspensão de amido de

arroz, como fonte adicional de nutriente, as amebas conseguiram se desenvolver de maneira satisfatória.

A temperatura de incubação das culturas é outro fator determinante na multiplicação da *E. gingivalis*, e alguns autores demonstram que o cultivo desta ameba deve ser realizado entre 33° e 37°C (GANNON & LINKE, 1990). Nossos isolados se desenvolveram melhor na temperatura de 35°C, sendo esta considerada ótima para as nossas condições, corroborando com os achados de CHEN et al., (1999; 2000) que obtiveram sucesso entre 34,5° e 35°C.

Destacamos o pH do meio de cultura como fator fundamental para o crescimento e manutenção das culturas de *E. gingivalis*. Alguns relatos na literatura citam que o pH ideal é entre 7 e 7,5 (CLAYTON JR & BALL, 1953). Contudo, CHEN et al., (1999) ao aumentar a quantidade de clara de ovo na emulsão do meio com o objetivo de obter um pH mais básico e força tampão mais forte, demonstraram que o parasito não cresce em pH 5,8 e nem mesmo acima de 7,0 sendo o pH 6,7 ótimo para o cultivo de *E. gingivalis* (CHEN et al., 1999). O tamponamento do meio de cultura BDM com tampão HEPES 25mM constituiu uma estratégia simples e inédita aqui utilizada e possibilitou a manutenção do pH ideal do meio (6,7). Nossos dados corroboram com dados da literatura (CHEN et al., 1999; 2000) evidenciando que em pH abaixo de 6,2 há inibição do crescimento de *E. gingivalis* e aumento da proliferação bacteriana.

A adaptação e multiplicação *in vitro* de *E. gingivalis* parece estar relacionada com as características intrínsecas do parasito e/ou com a microbiota bacteriana associada ao mesmo. O pico inicial de crescimento de *E. gingivalis* ou período de adaptação em meio de cultura, pode variar de acordo com o isolado ocorrendo após 48 horas de cultivo nos experimentos de CLAYTON JR & BALL, (1953) e com 96 horas, seguido de diminuição abrupta após 192 horas, nas condições de CHEN et al. (1999). Os isolados avaliados em nosso estudo apresentaram capacidade de adaptação e multiplicação variável e isolado-dependente: o período de adaptação oscilou entre 96 e 168 horas de cultivo e os parasitos foram visualizados nas culturas por um período médio de 6,50 dias \pm 3,3 dias. O isolado U-C foi o que melhor se adaptou e cresceu no meio BDM tamponado mantendo-se viável por 77 dias e apresentando o pico máximo

detectado ($4,0 \times 10^6$ de trofozoítos / mL), enquanto os demais, U-E; U-301 e U-M, apresentaram respectivamente, $8,0 \times 10^4$; $6,0 \times 10^4$ e $4,0 \times 10^4$ trofozoítos/ mL.

A adaptação das amebas em cultura também foi variável de acordo com o isolado avaliado. A análise do comportamento biológico dos isolados aqui avaliados permitiu agrupar os pares U-C/U-301 e o U-E/U-M de acordo com período de tempo que foram visualizados em cultura, número de repiques e quantidade de períodos subpatentes. O primeiro par (U-C/U-301) se caracterizou por maiores períodos, intensidade no número de parasitos e curiosamente, apresentaram uma estreita correlação genética localizando-se no mesmo grupo do fenograma e também induzindo eritema gengival em todos os ratos infectados na experimentação animal. Contudo, os isolados U-E/U-M também apresentaram analogia entre si, e apresentaram comportamento polar em relação aos anteriores com o menor período nas variáveis analisadas. Na análise da caracterização genética, U-E se localizou em um subgrupo que está intimamente relacionado com a patogenicidade, fato este que pode sugerir sua limitada permanência e maior dificuldade de manutenção *in vitro*.

A manutenção das culturas de *E. gingivalis in vitro* foi realizada por meio de repiques sucessivos a cada 48 horas de acordo com recomendações citadas na literatura (KOFOID et al., 1929; GANNON & LINKE, 1990), removendo a fase líquida do meio. Este procedimento fez com que diminuísse a quantidade de bactérias favorecendo o crescimento de *E. gingivalis*, dados estes corroborados com WANTLAND et al., (1963), GANNON & LINKE, (1989); e com CHEN et al., (1999) onde estes conseguiram manter sucessivamente esta ameba por períodos contínuos que variou entre 3 a 8 meses.

Diante dos resultados encontrados, assim como o de outros pesquisadores, (CHEN et al., 1999), este estudo revelou que o movimento de *E. gingivalis* é mais evidenciado a partir do 4º dia de cultivo e que geralmente estas amebas se apresentam em forma de fita, ou seja, forma alongada. Quando exerce tal movimento de pseudopoidia, consegue-se observar os vacúolos em seu citoplasma, bactérias e até mesmo partículas de amido fagocitadas. Também foi observado que a morfologia da ameba se modifica a cada quatro dias, tornando-a altamente polimórfica.

De acordo com as sugestões propostas por KOFOID et al., (1929) as condições ideais de um meio de cultura para proporcionar um melhor desenvolvimento, adaptação e manutenção de *E. gingivalis* deveriam preencher os seguintes requisitos: proporcionar o crescimento de amebas por mais de 48 horas sem repiques; eliminar espécies bacterianas e de protozoários (*Trichomonas tenax*) prejudiciais ao seu crescimento e meio de fácil preparo e fórmula simplificada. O meio de cultura BDM tamponado idealizado neste trabalho, apesar de preencher a maioria dos requisitos acima propostos, permitiu o crescimento da *T. tenax*, o qual desenvolve mais facilmente que as amebas competindo e causando a morte de *E. gingivalis*.

O diagnóstico de *E. gingivalis* realizado pelo exame direto a fresco deve ser analisado com muita cautela e mesmo negativo, não se deve considerá-lo conclusivo. *E. gingivalis* pode estar presente em pequena quantidade, e não ser visualizada por meio da microscopia óptica. O exame direto a fresco também pode apresentar resultado falso negativo quando a amostra ultrapassar o período de duas horas para seu processamento a partir do momento da coleta. No entanto, podem se positivar em cultura (WANTLAND et al., 1963), dado este contraditório ao encontrado em nosso estudo, onde nenhuma amostra negativa no exame a fresco se positivou em cultura, provavelmente pela análise criteriosa e pela experiência do observador.

As técnicas moleculares apresentam uma maior sensibilidade para o diagnóstico de diferentes microrganismos incluindo *E. gingivalis*, sobretudo quando comparadas com o exame a fresco (YAMAMOTO et al., 1995; KIKUTA et al., 1996). A PCR específica realizada com iniciadores (EGO-1 e EGO-2) direcionados para a SSU-rRNA de *E. gingivalis* mostrou-se eficiente no diagnóstico das amostras positivas no exame a fresco e também naquelas que foram negativas no exame a fresco e positivou-se com o uso dessa técnica, ou seja, em 19,8% (18/91) das amostras. Uma pequena quantidade de amostras, 11,0% (10/91), apresentou resultados discordantes com a PCR onde amostras positivas ao exame a fresco, foram negativas diante da mesma, fato que pode ter ocorrido devido à presença de inibidores, quantidade excessiva de DNA, etc. Contudo, além de *E. gingivalis* ser um parasito muito polimórfico pode ser confundido com outras estruturas celulares (KIKUTA et al., 1996) como por exemplo macrófagos que também realizam fagocitose, fato que pode ter induzido um diagnóstico falso positivo no exame a fresco por parte do observador (DAO et al., 1983).

5.3.2 Comportamento em modelos experimentais

Poucos estudos têm sido realizados no sentido de tentar reproduzir a infecção experimental deste parasito *in vivo*, e as evidências demonstram que a *E. gingivalis* é detectada com maior frequência em amostras de placa bacteriana do que no tecido gengival (GOTTLIEB & MILLER, 1971).

Em toda literatura pesquisada encontramos apenas três relatos associados com experimentação animal (CHEN et al., 2000; LIU et al., 2001; AL- SAEED, 2003) e nestes, os autores sugerem que ratos machos *Albinus Wistar* são o modelo adequado para estudos ao nível de cavidade bucal e demonstram que a imunossupressão destes pode acelerar o processo patológico das lesões. Desse modo, *E. gingivalis* foi inoculada no tecido gengival de ratos os quais previamente foram submetidos a um processo de imunossupressão. Como sinal direto que comprovasse a eficácia desta imunossupressão, estes animais apresentaram-se com os pêlos arrepiados, dificuldade em se alimentar e perda de massa corporal (CHEN et al., 2000; LIU et al., 2001).

As amostras foram processadas antes de serem inoculadas em animais, sendo filtradas, centrifugadas e introduzidas na gengiva dos mesmos. Também foi inoculada cultura de bactérias associadas ao mesmo isolado e apenas solução fisiológica como controle negativo (CHEN et al., 2000; LIU et al., 2001; AL- SAEED, 2003). No grupo dos animais inoculados com solução fisiológica observou-se um leve edema somente no 2º dia e nos outros nada aconteceu (LIU et al., 2001). Após o segundo dia, o tecido gengival dos animais começava a se apresentar edemaciado, com sangramento abundante e hiperemiado. CHEN et al., (2000), notaram que *E. gingivalis* causou lesões em 78,9% dos casos e que esta ameba, juntamente com bactérias foram responsáveis por 93,3% dos abscessos formados nestes animais induzindo a formação de abscessos com superfície bem maior nos animais inoculados com a *E. gingivalis* (41,4mm) do que aqueles formados por bactérias (9,26mm). Histologicamente, os tecidos demonstraram pontos necróticos e presença de células inflamatórias, tanto no grupo de *E. gingivalis* quanto no grupo de bactérias. No grupo controle, não foi evidenciado qualquer alteração histopatológica (LIU et al., 2001).

Em geral as lesões do tipo abscessos foram evidenciadas cinco dias após o inóculo de *E. gingivalis* cultivadas durante 72 horas, sendo observado mortalidade dos animais em torno de sete dias a qual também foi maior no grupo de animais inoculados

com *E. gingivalis* (AL- SAEED , 2003). No grupo controle com solução fisiológica estéril não houve a formação de abscessos, portanto, eles concluíram ser mesmo *E. gingivalis* a causadora das lesões.

Geralmente as bactérias Gram negativas são consideradas agentes patogênicos da doença periodontal. No experimento de LIU et al., (2001), foi utilizado um baixo teor de oxigênio para cultivar *E. gingivalis* o que pôde levar a morte de algumas bactérias e estas no entanto não participaram do processo da instalação da doença, não interferindo na patogênese de *E. gingivalis* no tecido gengival dos animais. Após o aparecimento de lesão, realizavam-se esfregaços, esse material era examinado e os animais eutanasiados.

Em nosso estudo a análise macroscópica para avaliar a capacidade infectante e patogênica de cinco isolados obtidos de cultura de *E. gingivalis* em ratos, não evidenciou a formação de abscessos sendo observado apenas eritema em alguns animais, possivelmente, decorrente da introdução da agulha na bolsa periodontal. Não foi possível amplificar o DNA da *E. gingivalis* no tecido gengival pela PCR específica com os iniciadores EGO-1 e EGO-2, o que sugere a destruição do parasito pelo hospedeiro e/ou a degradação do seu DNA no tecido. A análise microscópica do tecido gengival não revelou nenhuma alteração ao nível de inflamação e também não evidenciou a presença do parasito.

Ao contrário de outros estudos (CHEN et al., 2000; LIU et al., 2001; AL- SAEED , 2003), não observamos óbito durante a realização do experimento, porém dois animais foram eutanasiados por se encontrarem em processo de septicemia, detectada pela punção aspirativa cardíaca no exame a fresco e hemocultura.

Tendo como exemplo o que ocorre com a *E. histolytica*, é provável que a *E. gingivalis* mantida em cultura sofra mudanças em seus perfis enzimáticos e na sua virulência comprometendo a sua patogenicidade, (MIRELMAN et al., 1986; 1990; ANDREWS et al., 1990; VARGAS & OROZCO, 1993). Esse dado pode explicar em parte os nossos resultados negativos uma vez que os inóculos foram realizados com trofozoítos obtidos de cultura. Contudo, os dados na literatura nos quais foi demonstrada a patogenicidade experimental da *E. gingivalis* os animais foram inoculados com amostras de cultura (CHEN et al., 2000; LIU et al., 2001; AL- SAEED , 2003).

Um fato que pode ter favorecido os estudos citados na literatura pode ser a microbiota bacteriana associada com os isolados de *E. gingivalis* testados. A presença

de espécies bacterianas reflete diretamente na condição periodontal e favorece a instalação e progressão da doença (ETO et al., 2003) . Portanto, destacamos a necessidade de estudos mais específicos avaliando mecanismos de lesão e destruição celular de diferentes populações da *E. gingivalis* os quais poderiam explicar melhor os dados aqui apresentados.

5.4 Caracterização genética das populações de *E. gingivalis*

O único relato na literatura referente à variação intra-específica das populações de *E. gingivalis* é o de CLARK & DIAMOND, (1997). Neste estudo foi realizada a análise do polimorfismo dos genes da SSU-rRNA das cepas de referência HU-304:NIH; HU-305:NHI (ambas da cavidade bucal) e HS-0880:NHI (útero) por meio de 12 enzimas de restrição que agruparam as amostras estudadas em dois ribodemas, ou seja, populações das amebas que compartilharam o mesmo padrão de bandas gerados por uma determinada enzima de restrição. Estes autores também observaram que *E. gingivalis* foi agrupada com *Entamoeba barreti* que é uma espécie parasita de tartaruga, na qual não tem sido observada a formação de cistos (TALIAFERRO & HOLMES, 1924).

Estudos prévios envolvendo algumas espécies de *Entamoeba* (SILBERMAN et al., 1999) sugerem que as características morfológicas refletidas na relação filogenética entre organismos que produzem cistos com diferentes números de núcleos, formam clades diferentes. Para CLARK et al., (2006), *Entamoeba suis* espécie a qual apresenta cistos uninucleados está notavelmente relacionada com *E. gingivalis*, espécie conhecida como não formadora de cistos. A este fato, relacionam-se duas implicações: a primeira seria que *E. gingivalis* foi evolucionariamente perdendo a capacidade de formar cistos e que seja provavelmente derivada de uma espécie uninucleada. A segunda possibilidade seria que as espécies que produzem cistos tetranucleados seriam descendentes de um ancestral uninucleado.

A técnica de LSSP-PCR tem sido utilizada para estudos de variabilidade genética de diferentes protozoários tais como *Trypanosoma cruzi* (VAGO et al., 1996; VAGO et al., 2000), *Trypanosoma rangeli* (VALLEJO, 1994) e *E. histolytica* (GOMES et al., 1997). Neste último, as cepas de *E. histolytica* foram separadas em dois zimodemas, um deles considerado patogênico que apresentou padrões de bandas

idênticos e o outro não patogênico os quais suas assinaturas gênicas foram diferentes quando comparadas com o primeiro grupo (GOMES et al., 1997). Contudo, este é o primeiro relato do emprego desta técnica para avaliar a variação intra-específica das populações de *E. gingivalis*. A análise da SSU-rRNA pela LSSP-PCR demonstrou variabilidade genética entre as populações de *E. gingivalis*, as quais foram distribuídas em dois grandes grupos, corroborando com o único dado da literatura (CLARK & DIAMOND, 1997). Consideramos esse dado bastante representativo uma vez que a análise foi realizada com 25 isolados de *E. gingivalis* provenientes de duas regiões geográficas distintas e correspondentes às amostras clínicas, não clínicas e de pacientes HIV/SIDA, enquanto o da literatura correspondeu à análise de apenas três amostras.

Uma possível associação entre patogenicidade e os perfis genéticos de LSSP-PCR da *E. gingivalis* foi sugerida pela associação da maioria das amostras clínicas de pacientes com periodontite /gingivite e as de pacientes HIV/SIDA com condição de higiene bucal ruim em um mesmo grupo. Outro dado que reforça essa possível associação foi o fato de que o paciente U-E apesar de no momento da coleta apresentar boa condição de higiene bucal, relatou ter sido submetido a vários procedimentos periodontais conservadores (RAR), apresentando quadros de recidivas da doença.

YAMAMOTO et al.,1995 seqüenciaram e compararam a região do gene da SSU-rRNA da *E. gingivalis* com nove outras espécies de protozoários incluindo ameba de vida livre e *E. histolytica*. Verificaram que *E. gingivalis* foi fortemente relacionada com *E. histolytica* apresentando apenas 0,079% de dissimilaridade entre as sequências analisadas. Desse modo, destacamos a necessidade de estudos mais específicos avaliando mecanismos de lesão e destruição celular de diferentes populações da *E. gingivalis* os quais poderiam explicar os dados aqui apresentados.

Outro comportamento interessante foi a correlação genética detectada entre 66,7% (6/9) das amostras de pacientes HIV/SIDA as quais se localizaram em um mesmo braço. Considerando que a análise da variabilidade genética pela LSSP-PCR foi realizada diretamente nas amostras de raspados ou da região supra gengival, podemos sugerir que esse dado esteja relacionado com as características do parasito ou com a existência de uma possível microbiota periodontopatogênica nesses indivíduos a qual facilitaria a instalação da doença periodontal (ETO et al., 2003).

Outro fato importantíssimo foi associado com a maior similaridade de perfis genéticos entre populações obtidas de um mesmo sítio bucal em diferentes pacientes do

que entre as amostras de um mesmo paciente como foi detectado entre as amostras subgingivais e supragingivais dos pacientes T21 e T24. Apesar da pequena amostragem, as amostras subgingivais T14, T21 e T24 (60,3%) e as supragingivais T21 e T24 (75,7%) e T11 e T14 (64,7%) foram geneticamente correlacionadas e ficaram agrupadas no fenograma. Esse dado sugere a associação de populações específicas do parasito por sítios distintos na cavidade bucal, possivelmente relacionadas com a microbiota local ou mesmo com condições ambientais como a anaerobiose, assim como ocorre no intestino humano ambiente este considerado propício para o crescimento de *E. histolytica* (LEIPPE, M; 1997).

8. Conclusões

- ❖ O meio BDM tamponado com HEPES, adição de antibióticos após 48 horas de cultivo e uso do amido de arroz em solução foram modificações eficientes e permitiram cultivo dos isolados de *E. gingivalis*.
- ❖ A manutenção das culturas de *E. gingivalis* foi realizada em temperatura de incubação a 35°C, leitura a cada 48 horas e repiques entre 24 e 192 horas, realizados de acordo com a necessidade individual de cada isolado, ou seja, dependente do crescimento bacteriano, quantidade de amido disponível e presença de trofozoítos.
- ❖ O comportamento biológico *in vitro* de *E. gingivalis* foi isolado-dependente e de acordo com suas semelhanças foram divididos em dois grupos U-C/U-301 e U-E/U-M.
- ❖ O isolado U-C apresentou a melhor adaptação em meio BDM tamponado e com a maior quantidade de trofozoítos/ mL. O isolado U-M por sua vez, apresentou comportamento inverso, sendo este o que se manteve por menor período de tempo em cultura.
- ❖ *E. gingivalis* foi mais freqüente no grupo de pacientes HIV/SIDA (58,9%), seguido pelo grupo clínico (35,5%) e grupo não clínico (19,0%).
- ❖ A freqüência de *E. gingivalis* apresentou associação significativa de acordo com o aumento da idade, condição bucal ruim, presença de periodontite e tabagismo.
- ❖ O gênero dos indivíduos avaliados e o pH salivar não teve relação com a freqüência do parasito.
- ❖ Nos pacientes HIV/SIDA os níveis de linfócitos TCD4⁺ e carga viral não influenciaram na freqüência do parasito nem evidenciaram caráter oportunista do parasito.
- ❖ O método de coleta pelo raspado ou supra gengival mostrou-se ser mais eficiente que o lavado bucal e que a coleta subgengival.

- ❖ A detecção da positividade do parasito pelo método do lavado bucal apenas no grupo HIV/SIDA demonstrou uma maior multiplicação do parasito na cavidade bucal deste grupo.
- ❖ A técnica da PCR foi mais sensível na detecção de *E. gingivalis* do que o exame direto a fresco.
- ❖ A infecção experimental realizada com trofozoítos de cultura em ratos não induziu nenhuma alteração macro e/ou microscópica característica e não foi possível a detecção do parasito pelo exame a fresco e PCR específica nos tecidos gengivais avaliados.
- ❖ A análise da SSU rRNA do gene 18S pela LSSP-PCR diretamente em raspados bucais mostrou variabilidade intra-específica das populações da *E. gingivalis* evidenciando dois grandes grupos e demonstrando pela primeira vez na literatura perfis genéticos associados com patogenicidade em amostras de indivíduos HIV/SIDA e portadores de doença periodontal.
- ❖ A análise comparativa das populações do parasito obtidas nas regiões supra e subgengivais de um mesmo paciente mostrou maior similaridade em relação ao mesmo sítio bucal em diferentes pacientes do que entre as amostras de um mesmo paciente sugerindo a presença de populações específicas do parasito à micro *habitat* distintos da cavidade bucal.

9.Perspectivas

- ❖ A elevada frequência de *E. gingivalis* nos diferentes grupos de indivíduos avaliados e a possível existência de populações associadas com patogenicidade demonstram a necessidade de novas investigações envolvendo este parasito.

- ❖ A falta de conhecimento por parte dos cirurgiões dentistas quanto à existência e importância dos protozoários bucais e sua possível associação com a doença periodontal criam a necessidade de maior divulgação e alerta para o controle da mesma, especialmente nos casos resistentes ao tratamento periodontal convencional.

9.Referências

AAS, J.A., PASTER, B.J., STOKES, L.N., OLSEN, I., DEWHIRST, F.E. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. **Journal of Clinical Microbiology** 43(11), 5721-32 2005.

AL-SAEED, W.M. Pathogenic effect of *Entamoeba gingivalis* on gingival tissue of rats. **Al-Rafidain Dental Journal** 3 (1), 70-3 2003.

ANNAN, G., SUSANA, E., DE NADAL, T., MERCEDES, M., DE VALLADARES, R., ELISA, R. Presencia de protozoos en la enfermedad periodontal, su relación con la profundidad de bolsa, sangrado al sondeo y microflora presente. **Revista Asociación Odontológica Argentina** 81 (4), 230-2 1993.

ANDREWS, B., MENTZONI, J.L., BIORVATN, B. Zymodeme conversion of isolates of *Entamoeba histolytica*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene** 84 63-5 1990.

BARRETO, G., VAGO A.R., GINTHER, C., SIMPSON, A.J, PENA, S.D.J. Mitochondrial D-loop “signatures” produced by low-stringency single specific primer PCR constitute a simple comparative human identity test. **American Journal Human Genetics** 58 716-24 1996.

BASS, C.C., JOHNS, F.M. Pyorrhea dentalis and alveolaris, specific cause and treatment. **Jama** 64 553-58 1915.

BAXT, L.A., SLINGH U. New insight into *Entamoeba histolytica* pathogenesis. **Curr Opin Infect Dis** 21, (5) 489-94 2008.

BRAND, V.T., REES, C.V., REARDON, L.V., SIMPSON, W.F Chemical studies on egg white medium for the cultivation of *E. histolytica*. **Journal Parasitology** 32 190-6 1946.

BERMEJO-FENOLL, A., SÁNCHEZ-PEREZ, A. Enfermedades periodontales necrosantes. **Medicine Oral Patology Cirurgy Bucal** 9 108-19 2004.

BOECK, W. C., J. DRBOHLAV. The cultivation of *Entamoeba histolytica*. **American Journal of Hygiene** 5 371-407 1925.

BROWN, J. H. The use of blood agar for the study of streptococci. NY Monograph. **The Rockefeller Institute for Medical Research** 9 1919.

BROWN, M., REED, S., LEVY, J.A., BUSCH, M., McKERROW, J.H. Detection of HIV-1 *Entamoeba histolytica* without evidence of transmission to human cells. **Aids** 5 (1), 93-6 1991.

CAMBON, M., PATVY, A.F., GUILLOT, J., GLANDER, Y., DEGUILLAUME, J., COULET, M. Protozoaires buccaux et diabete: Etude chez 117 sujets. **Journal of Biology Bucal** 7 27-30 1979.

CHECOVÁ, L; LEIFERTO VÁ, I; LISA, M. The incidence of *Entamoeba gingivalis* in the oral cavity. **Medical Acta of Caroline University** 33 549-559 1987.

CHEN, J., LIU, G., WEN, W. Studies on the continuous culture and the growth of *Entamoeba gingivalis*. **Chinese Journal of Parasitology and Parasitic Diseases** 14 (4), 209-11 1999.

CHEN, J. F., LIU, G. Y., WEN, W. R., CHEN, C. Studies on the continuous culture and pathogenicity of *Entamoeba gingivalis*. **Chinese Journal of Parasitology and Parasitic Diseases** 18 (2), 84-6 2000.

CHILD, H.A. Studies on the ingestion of leucocytes and on mitosis in *Entamoeba gingivalis*. **University California Publication- Zoology** 28 1122- 35 1926.

CLARK, C.G., KAFFASHIAN, F., TAWARI, B., WINDSOR, J.J., TWIGG-FLESNER, A., DAVIES-MOREL, M.C.G., BLESSMANN, J., EBERT, F., PESCHEL, B., VSN, A.L., JACKSON, C.J., MACFARLANE, L., TANNICH, E. New insights into the phylogeny of *Entamoeba* species provided by analysis of four new small-subunit rRNA gene. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** 56 2235-39 2006.

- CLARK, G.C., DIAMOND, L.S. Colonization of the uterus by the oral protozoan *Entamoeba gingivalis*. **American Journal Tropical Medicine** 46 (2), 158-60 1992.
- CLARK, G.C., DIAMOND, L.S. Intraspecific variation and phylogenetic relationship in the genus *Entamoeba* as revealed by riboprinting. **Journal Eukariotic Microbiology** 44 (2), 142-54 1997.
- CLARK, G.C., FARROKH, K., BLESSING, T., JEFFREY, J.W., ANKE T., MINA C. G.D.M., JOERG, B., FRANK, E., BABETT, P., AN, L.V., COLIN, J.J., LORNA, M., EGBERT, T. New insights into the phylogeny of *Entamoeba* species provided by analysis of four new small-subunit rRNA genes. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** 56 2235-30 2006.
- CLAYTON, J.P., BALL, G.H. Effects of penicillin on *Entamoeba gingivalis* in with cultures bacteria from the human mouth. **Journal of Parasitology** 40 (3), 347-52 1954.
- CORRÊA, D.P., GIAZZI, J.F., MARTINEZ, I. Proposta de uma nova técnica de detecção de *E. gingivalis* e *Trichomonas tenax*. **Revista de Ciências. Farmacêuticas de São Paulo** 19 (2), 245-49 1998.
- CUEVAS, R.F., RAMOS, A.S.B., CONTRERAS, C.C., HERNÁNDEZ-SIERRA, F. Prevalencia y asociación epidemiológica de los protozoarios orales *Entamoeba gingivalis* y *Trichomonas tenax* en niños mexicanos. **Revista ADM LXV** (5), 259-62 2006.
- DAO, A. H., ROBINSON, D.P., WONG, S.W. Frequency of *Entamoeba gingivalis* in human gingival scrapings. **American Journal. Clinical Pathology** (80), 380-383 1983.
- DIAMOND, L.S., HARLOW, D.R., CUNNICK, C.C. A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. **Trans R Soc. Trop Med Hyg** 72 431-9 1978.
- DOBELL, C. The amoebae living in man. **The Journal of Parasitology** 6 (4), 83-91 1920.

el HAYAWAN, I.A., BAYOUMY, M.M. The prevalence of *Entamoeba gingivalis* and *Trichomonas tenax* in periodontal disease. **Journal Egypty of Society Parasitology** 22 101-05 1992.

ETO, F.S., RASLAN, S.A., CORTELLI, J.R. Características microbianas na saúde e doença periodontal. **Revista Biociências de Taubaté** 9 (2), 45-51 2003.

FILHO, J.C.C., GOIVANI, E.M. Xerostomy, caries and periodontal disease in HIV+ patients. **Brazilian Journal of Infective Disease** 13 (1), 13-17 2009.

FORONDA, A. S. Observações sobre amebas de vida livre potencialmente patogênicas. **Tese de doutorado. Inst. Ciênc. Biom. Univ. São Paulo** 1979.

GHABANCHI, J., ZIBAEI, M., DAGHIGH AFKAR, M., SARBAZIE, A.H. Prevalence of oral *Entamoeba gingivalis* and *Trichomonas tenax* in patients with periodontal disease and healthy population in Shiraz, southern Iran. **Original Research** 21 (1), 89-91 2010.

GANNON, J.T., LINKE, H.A.B. A new medium containing antibiotics for the xenic cultivation of *Entamoeba gingivalis*. **Parasitology Research** 76 643-47 1990.

GANNON, J. T., LINKE, H. A. B. Growth studies on xenic cultures of *Entamoeba gingivalis* using established media. **International Journal Parasitology** 19 (8), 835-38 1989.

GANNON, J.T., LINKE, H.A.B. Synergistic growth studies of *Entamoeba gingivalis* using an ecologen. **Journal of Parasitology** 22 (7), 927-31 1992.

GANNON, J.T., LINKE, H.A.B. Studies on the microflora associated with xenic cultures of *Entamoeba gingivalis*. **Microbios** 58 95-100 1989.

GHARAVI, M.J., HEKMAT, S., EBRAHIMI, A., JAHANI, M.R. Buccal cavity protozoa in patients referred to the faculty of dentistry in Tehran, Iran. **Iranian Journal Parasitology** 1 (1), 43-6 2006.

GIAZZI, J. F. Contribuição para o estudo dos protozoários bucais em 700 indivíduos da população de Araraquara, Estado de São Paulo. **Tese de doutorado, Universidade de São Paulo** 1992.

GOMES, M.A., SILVA, E.F., MACEDO, A.M., VAGO, A.R., MELLO, M.N. LSSP-PCR for characterization of strains of *Entamoeba histolytica* isolated in Brazil. **Parasitology** 114 517-20 1997.

GOTTLIEB, D.S., MILLER, L.H. *Entamoeba gingivalis* in periodontal disease. **Journal of Periodontics** 42 (7), 412-15 1971.

HERNÁNDEZ, L.A.R., RAMOS, E.B.J., RODRÍGUEZ, A.C. Identificación morfológica de bacterias observadas en 10 casos de periodontitis crónica agresiva (PCA) en presencia de *Entamoeba gingivalis*. **Dados não publicados**.

HOWITT, B.F. The cultivation of *Entamoeba gingivalis* (Gros). **Univ Calif. Publ.Zool** 28 65-126 1925.

HUANG, W., SHI, JIAN-LING., LI, CHUN-LEI., CHEN B., SHAO LI-JIA., CHEN, LI., HAO, F., DING, LEI., TIAN, XI-FENG. *Entamoeba gingivalis* infection among college students in Tangshan. **Chinese Journal Parasitology Disease** 27 (1), 51-3 2009.

JASKOSKI, B.J. Incidence of oral protozoa. **Transactions of the American Microscopical Society** 82 (4), 418-20 1963.

JIAN, B., KOLANSKY, A.S., BALOACH, Z. W., GUPTA, P. K. *Entamoeba gingivalis* pulmonary abscess- diagnosed by fine needle aspiration. **Cyto Journal** 5 (12), 1-3 2008.

JUNIOR, S.F., MACHADO, M.I. Estudos de frequência, morfologia e diagnóstico de *Entamoeba gingivalis*, Gros, 1849. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 28 (4), 379-87 1995.

KELLER, O., ORLAND, F.J., BAIRD, G. Ultrastructure of *Entamoeba gingivalis*.

Journal Dental Research 46 (5), 1010-18 1967.

KIKUTA, N., YAMAMOTO, A., GOTO, N. Detection and identification of *Entamoeba gingivalis* by specific amplification of rRNA gene. **Canadian Journal Microbiology** 42 1248-51 1996.

KOFOID, C.A., FELLOW, A.P.H.A., JOHNSTONE, H.G. The cultivation of *Endameba gingivalis* (Gros) from the human mouth. **American Journal Public Health** 19 (5), 549-52 1929.

KOFOID, C.A. The protozoa of the human mounth. **Journal of Parasitology** 15, 151-74 1929.

LEIPPE, M. Amoebaporos. **Parasitology Today** 13 (5), 170-83 1997.

LIU, G.Y., CHEN, J.F., WEN, W.R., CHEN, W.L, LIN, L.Q., HONG, H. Experimental study on the pathogenesis of *Entamoeba gingivalis*. **Chinese Journal of Parasitology and Parasitic Diseases** 19 (4), 229-32 2001.

LUCHT, E., EVENGARD, B., SKOTT, J., PEHRSON, P., NORD, C.E. *Entamoeba gingivalis* in human immunodeficiency virus tipe 1- infected patients with periodontal disease. **Clinical Infectious Diseases** 27 471-3 1998.

LYONS, T. The case for the pathogenicity of the oral protozoa. **Dados não publicados.**

MAHDI, N.K., AL SAEED, A.T. *Trichomonas tenax* in Basrah, Iraq. **Journal Pakistan Medicine Association** 43 261-2 1993.

MARTÍNEZ, A.B., RUÍZ, E.F. Las enfermedades periodontales como infecciones bacterianas. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal** 9 92-107 2004.

- MELWIN, D.M., BROOKE, M.M. Métodos de laboratorio para diagnóstico de parasitosis intestinales. **Interamericana SA de CV** 512 1971.
- MIRELMAN, D., BRACHA, R., CHAYEN, A., AUST-KETTIS, A., DIAMOND, L.S. *Entamoeba histolytica*: effect of growth conditions and bacterial associates on isoenzymes patterns and virulence. **Experimental Parasitology** 62 142-48 1986.
- MIRELMAN, D., BRACHA, R., ROZEMBLATT, S., GARFINKEL, L. Repetitive DNA elements characteristics of pathogenic *Entamoeba histolytica* strains can also be detected after polymerase chain reaction of a cloned nonpathogenic strain. **Infection and Immunity** 58 1660-63 1990.
- MITRA, S.C., SHIPSTONE, A.C. Scanning and transmission electron microscopic studies on cholesterol passaged axenic *Entamoeba histolytica*. **Indian Journal of Experimental Biology** 23 103-6 1985.
- MORALES, A.J. R. Manifestaciones bucales de las enfermedades parasitarias tropicales presentes en Venezuela. Revisión de la Literatura. Segunda Parte: Amebiasis. **Boletín Odontología Online**. Marzo-Abril 2005.
<http://www.odontologia-online.com/casos/part/ARM/ARM02/arm02.html>
- NEVES, D.P. **Parasitologia dinâmica**. Editora Ateneu 2003.
- NOCITO-MENDOZA, I., VASCONI-CORREAS, M.D., PONCE de LEÓN-HORIANSKI, ZDERO-PANDZICH, M. *Entamoeba gingivalis* y *Trichomonas tenax* en pacientes diabéticos. **RCOE** 8 (1), 27-38 2003.
- PASTER, B.J., BOCHES, S.K., GALVIN, J.L., ERICSON, R.E., LAU, C.N., LEVANOS, V.A., SAHASRABUDHE, A., DEWHIRST, F. E. Bacterial diversity in human subgingival plaque. **Journal of bacteriology** 183 (12), 3770-83 2001.

PENA, S.D.J., BARRETO, G., VAGO, A.R., FUZIKAWA, A., SIMPSON, A.J.G. LSSP-PCR: a novel approach to the recognition of DNA sequences and detection of point mutations. In: **Proceedings of the 1994 Miami Bio/technology winter symposium, USA** 27 1994.

PEREZ-JAFFE, L., KATZ, R., GUPTA, P. K. *Entamoeba gingivalis* identified in a left upper neck nodule by fine-needle aspiration: a case report. **Diagnostic Cytopathology** 18 (6), 458-61 1997.

PINDAK, F. F., MORA DE PINDAK, M., HYDE, B. M., GARDNER, W. A. Acquisition and retention of viruses by *Trichomonas vaginalis*. **Genitourin. Med.** 65 366–371 1989.

POMES, C.E., BRETZ, W.A., de LEON, A., AGUIRRE, R., MILIAN, E., CHAVES, E.S. Risk indicators for periodontal diseases in guatemalan adolescents. **Brazilian Dental Journal** 11 (1), 49-57 2000.

PONCE de LEÓN, P., ZDERO, M., VASCONI, M.D., NOCITO, I., LUCCA, A., PEREZ, B. Relation between buccal protozoa and pH and salivary IgA in patients with dental prosthesis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São.Paulo** 43 (4), 241-2 2001.

PRIETO, J.P., CALVO, A. Bases microbiológicas en las infecciones bucales y sensibilidad en los antibióticos. **Med Oral Patol Oral CirBucal** 9, 11-8 2004.

RACHMAN, R., ROSEMBERG, M. Distinction between *Entamoeba gingivalis* and *Entamoeba histolytica*, revisited. **Acta Cytologica** 30 (1), 82-82 1986.

RENDÓN-MALDONADO, J., ESPINOSA-CANTELLANO, M., SOLER, C., TORRES, J.V., MARTÍNEZ-PALOMO, A. *Trichomonas vaginalis*: In Vitro Attachment and Internalization of HIV-1 and HIV-1-Infected Lymphocytes. **Journal of Eukaryotic Microbiology** 50 (1), 43-48 2003.

SANTOS, F.S. Efeito amebicida de uma solução hidroalcoólica de própolis sobre a *Entamoeba gingivalis* presente na cavidade orla humana. **Dissertação de mestrado, Universidade de Franca** 2001.

SCHLEGEL-BREGENZER, B., PERSSON, R.E., LUKEHART, S., BRAHAM P., OSWALD T., PERSSON, G.R. Clinical and microbiological findings in edlerly subjects with gingivitis or periodontitis. **Journal Clinical Periodontology** 25 (11), 897-907 1998.

SILBERMAN, J.D., CLARK, C.G., DIAMOND, L.S., SOGIN, M.L. Phylogeny of the genera *Entamoeba* and *Endolimax* as deduced from small subunit ribosomal RNA gene sequence analyses. **Molecular Biology Evolution** 16 1740- 51 1999.

SMITH, A.J., BARRET, M.T. The parasite of oral endamebiasis *Endameba gingivalis* (Gros). **The Journal of Parasitology** 1 (4), 1915.

SOSA, L.M., GONZÁLEZ, M., NARANJO, B., NAVAS, I., QUINTANA, B. Levantamiento epidemiológico bucal en escolares de 1º y 2º etapa. Síntesis: **Tesis de grado presentado en hospital Victorino Santaella Ruíz** 2003.

TALIAFERRO, W.H., HOLMES, F.O. *Entamoeba barreti*, n.sp., from the turtle, *Chelydra serpentina*; a description of the amoeba from the vertebrate host and Barret and Smith's cultures. **American Journal Hygiene** 4 160-8 1924.

VALLEJO, G.A. *Trypanosoma rangeli*: caracterização intra e interespecífica pela análise dos polimorfismos de DNA nuclear. **Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, Tese de doutorado** 1994.

VAGO, A.R., ANDRADE, L.O., LEITE, A.A., REIS, D.A., MACEDO, A.M., ADAD, S.J., TOSTES, J.R., MOREIRA, M.C.V., FILHO, G.B., PENA, S.D.J. Genetic characterization of *Trypanosoma cruzi* directly from tissue of patients with chronic Chagas disease. **American Journal Pathology** 156 1805-09 2000.

VAGO, A.R., MACEDO, A.M., OLIVEIRA, R.P., ANDRADE, L.O., CHIARIE., GALVÃO, L.M.C., SIMPSON, A.J.G., TOSTES, S., PENA, S.D.J. Kinetoplast DNA signatures of *Trypanosoma cruzi* strains obtained directly from infected tissues. **American Journal Pathology** 149 2153-59 1996.

VERWEIJ, J.J., POLDERMAN, A.M., CLARK, G. Genetic variation among human isolates of uninucleated cyst-producing *Entamoeba* species. **Journal Clinical Microbiology** 39 (4), 1644-46 2001.

VRABLIC, J., TOMOVA, S., CATAR, G., RANDOVA, L., SUTTOVA, S. Morphology and diagnosis of *Entamoeba gingivalis* and *Trichomonas tenax* and their occurrence in children and adolescents. **Bratisl Lek Listy** 92 241-46 1991.

VRABLIC, J., TOMOVA, S., CATAR, G. Occurrence of the protozoa, *Entamoeba gingivalis* and *Trichomona tenax* in the mouth of children and adolescent with hyperplastic gingivitis caused by phenytoin. **Bratisl Lek Listy** 93 136-40 1992.

WANTLAND, W.W., WANTLAND E. M., REMO, J.W., WINQUIST, D. L. Studies of human mouth protozoa. **Journal Dental Research** 37 (5), 949-0 1958.

WANTLAND, W.W., WANTLAND. E.M., REMO, J.W. Cytology and morphogenesis of *Entamoeba gingivalis*. **Journal Dental Research** 40 (624), 624-624 1960.

WANTLAND, W.W., WANTLAND, E.M., WINQUIST, D.L. Collection, Identification, and cultivation of oral protozoa. **Journal Dental Research** 42 (5), 1231-41 1963.

WANTLAND, W.W., LAUER, D. Correlation of some oral hygiene variables with age, sex and incidence of oral protozoa. **Journal Dental Research** 49 (2), 293-97 1968.

VARGAS, M.A., OROZCO, E. *Entamoeba histolytica*: changes in the zymodeme of cloned nonpathogenic trophozoites cultured under different conditions. **Parasitology Research** 79 353-57 1993.

YAMAMOTO, A., KIKUTA, N., HASHIMOTO, T., OYAIZU, H., GOTO, N.
Nucleotide Sequence of the SrRNA gene of *Entamoeba gingivalis*: applications for
construction of a species-specific DNA probe and phylogenetic analysis. **Microbiol.**
Immunol 39 (30), 185-92 1995.

ZDERO, M., PONCE de LEON, P., VASCONI, M. D., NOCITO, I. Parasitos bucales:
hallazgos de *Entamoeba gingivalis* y *Trichomonas tenax*. **Acta bioquímica. Clínica.**
Latin American 3 245-50 1996.

11. Apêndice

APÊNDICE A

8.1 Termo de consentimento livre e esclarecido

Eu, Sibeli Bonafé Santos Cembranelli, cirurgiã-dentista, portadora do CPF 287 349 228-78, RG 30 7080598-3, CRO-SP: 83 711, CRO-MG:34749, estabelecida na Avenida Santos Dumont, 1789 apartamento 703, Cep 38050-400, na cidade de Uberaba-MG, cujo telefone de contato: (34) 3314 9812, sob a orientação da Prof. Dra. Eliane Lages-Silva, irei desenvolver uma pesquisa, cujo título é “Caracterização genética e experimental do potencial patogênico da *Entamoeba gingivalis* na doença periodontal humana”.

Consentimento Livre e Esclarecido

Você está convidado (a) a participar do estudo “Caracterização genética e experimental do potencial patogênico da *Entamoeba gingivalis* na doença periodontal humana”. O objetivo deste estudo será avaliar a frequência da *Entamoeba gingivalis* na doença periodontal, caracterizando os perfis genéticos das populações isoladas em diferentes meios de cultivos, e determinar seu potencial patogênico em estudos experimentais *in vivo*.

O Sr (a) tem a garantia de acesso, em qualquer etapa do estudo, sobre qualquer esclarecimento de eventuais dúvidas e sobre o andamento do trabalho. Se tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal do Triângulo Mineiro - UFTM, situado na Avenida Frei Paulino, nº 30, Bairro Abadia, CEP 38025-180 em Uberaba / MG, telefone: 3318-5854. Informo que será garantida a liberdade de retirada do consentimento a qualquer momento e assim deixar de participar do estudo. Também não haverá custo nem pagamento pela colaboração.

Termo de consentimento livre e esclarecido

Acredito ter sido esclarecido (a) a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim descrevendo o estudo “Caracterização genética e experimental do potencial patogênico da *Entamoeba gingivalis* na doença periodontal humana”, e concordo em participar sabendo quais os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes, e que a minha participação não implicará em nenhuma despesa. Concordo em participar voluntariamente deste estudo e com a publicação anônima dos dados gerados por ele. Poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidade, prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido.

Data : ___/___/___

Nome do paciente : _____

RG : _____

Endereço completo : _____

Assinatura do paciente

12. Anexos

9.1 ANEXO A

Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Triângulo Mineiro: envolvendo animais - protocolos nº 74

9.2 ANEXO B

Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Triângulo Mineiro: envolvendo seres humanos - protocolos nº 1377

9.3 ANEXO C

Prontuário elaborado para o estudo

PRONTUÁRIO Nº _____

PACIENTE HIV/SIDA () ----- () Ambulatório () Leito
 PACIENTE CLÍNICO () ----- () Uberaba/MG () Taubaté/ SP
 PACIENTE NÃO CLÍNICO () ----- () Aluno UFTM () Funcionário UFTM

1. Dados do Paciente

Nome: _____

Nascimento: ___/___/___ Idade: _____ Gênero: _____

Cor: _____ Nacionalidade: _____

Endereço: _____ CEP: _____

Telefone: () _____ Cidade: _____

Estado civil: _____ Profissão: _____

Data Coleta: ___/___/___

Espécimes:

() lavado bucal: bochecho () Positivo () Negativo

() raspado bucal () Positivo () Negativo

() amostras clínicas: () Supragengival ----- () Positivo () Negativo

() Subgengival ----- () Positivo () Negativo

Ph da saliva: _____

Nível de Células T CD4 + : _____

Carga viral: _____

2. Anamnese

No momento está fazendo uso de algum medicamento? SIM () NÃO ()

- Nome: _____ Dosagem: _____ Tempo Uso: _____

- Nome: _____ Dosagem: _____ Tempo Uso: _____

Fuma? SIM () NÃO ()

Está grávida? _____ Quantos meses? _____ Toma anticoncepcional? _____

Sua gengiva sangra com facilidade? _____

Quando ocorre esse sangramento com maior frequência? _____

Seus dentes estão com mobilidade? _____

Usa fio dental? SIM () NÃO ()

Quantas vezes escova os dentes por dia? _____ Qual creme dental utiliza? _____

Condição saúde bucal: boa () ruim ()

Diagnóstico de doença periodontal (pacientes clínicos) _____

Você já passou por algum tratamento periodontal? SIM () NÃO ()

Há quanto tempo? _____

Você usa colutórios bucais SIM () NÃO ()

Qual marca _____

Quantas vezes ao dia _____

- Outras doenças infecto-contagiosas? Sim () Não ()

- Diabetes? Sim () Não ()

- Depressão? Sim () Não ()

- Câncer? Sim () Não ()

- Outras doenças? Sim () Não ()

Há quanto tempo foi diagnosticado a SIDA? _____

9.4 ANEXO D

Fórmula do meio BDM (Boeck & Drbohlav modificado) tamponado

Este meio é baseado em uma base sólida de ovo e uma capa superficial de solução de Locke (BOECK & DRBOHLAV, 1925; REARDON & REES, 1939). Permite o desenvolvimento de quase todos protozoários intestinais, mantendo-os adequadamente. Como não necessita de soro fresco, e é composto apenas por substâncias de fácil acesso e baratas, é recomendado pela maioria dos laboratórios (MELVIN & BROOKE, 1969).

1. Solução de Locke' s modificada (fase líquida)

(CLARK & DIAMOND, 2002)

- Cloreto de sódio 8,0g
- Cloreto de cálcio (CaCl₂. 2H₂O) 0,2g
- Cloreto de potássio 0,2g
- Cloreto de magnésio (MgCl₂. 6H₂O) 0,01g
- Fosfato de sódio dibásico 2,0g
- Bicabornato de sódio 0,4g
- Fosfato de potássio monobásico 0,6g
- Água destilada 1.000mL

Preparo:

Acrescentar em 1.000mL de água destilada, impreterivelmente na mesma ordem todas as substâncias acima citadas em agitador magnético. Colocar para ferver durante 10 minutos e filtrar em papel de filtro para eliminação de resíduos.

Após seu resfriamento, autoclavar a 121°C durante 15 minutos.

2. Base sólida de ovo modificada

(MELVIN & BROOKE, 1969)

- 1- Lavar quatro ovos frescos;
- 2- Flambá-los depois de imersão em álcool 70%;
- 3- Quebrá-los em um Erlenmeyer de 500 mL contendo algumas pérolas de vidro esterilizadas;
- 4- Agitar manualmente;
- 5- Acrescentar 50 mL de Solução de Locke□ s modificada agitando até formar uma emulsão;
- 6- Filtrar essa emulsão duas vezes em gaze esterilizada;
- 7- Pipetar em tubos de ensaio de vidro, com tampa de rosca tamanho 1,6 x 160 mm mantendo-os inclinados, formando um bixel com angulação de 45° e com aproximadamente 4,5cm;
- 8- Colocar as tampas não totalmente rosqueadas e solidificá-la em autoclave da seguinte maneira:
 - a. Colocar os tubos inclinados;
 - b. Ligá-la e fechar a válvula até pegar pressão;
 - c. Abrir a válvula e esperar chegar em 15 libras de pressão;
 - d. Aguardar 4 minutos;
 - e. Fechar novamente a válvula, desligar a autoclave e aguardar a despressurização.

Após a base solidificada, acrescentar 8 mL de Solução de Locke□ s modificada sobre a mesma e autoclavá-la à 121° durante 15 minutos.

3. Solução de Locke' s tamponada com HEPES

- Cloreto de sódio 8,0g
- Cloreto de cálcio ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 0,2g
- Cloreto de potássio 0,2g
- Cloreto de magnésio ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 2,0g
- Fosfato de sódio (Na_2HPO_4) 0,01g
- Bicarbonato de sódio 0,4g
- Fosfato de potássio (KH_2PO_4) 0,3g
- Tampão HEPES 25mM 5,94g
- Água destilada1.000mL

Preparo:

Acrescentar em 1.000mL de água destilada, impreterivelmente na mesma ordem todas as substâncias acima citadas em agitador magnético, com exceção do tampão HEPES. Colocar para ferver durante 10 minutos e filtrar em papel de filtro para eliminação de resíduos.

Após esfriar, misturar o tampão HEPES e filtrar em filtro a vácuo com membrana 60S. Armazenar a 4°C por até seis meses.

Depois do meio BDM (fase líquida e sólida) autoclavado, o mesmo deve ser mantido sob refrigeração a 4°C. No momento do uso, a solução de Locke' s modificada deve ser substituída pela solução de Locke' s tamponada com HEPES e, acrescentado a solução de amido de arroz apenas no momento do uso.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)