



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

CLARISSA PESSOA FERNANDES

**DETECÇÃO DE *STREPTOCOCCUS MUTANS* E AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE
MARCADORES TECIDUAIS EM PLACAS ATÉROSCLERÓTIAS DE PACIENTES
COM DOENÇA VASCULAR E VASOS SADIOS**

FORTALEZA

2017

CLARISSA PESSOA FERNANDES

**DETECÇÃO DE *STREPTOCOCCUS MUTANS* E AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE
MARCADORES TECIDUAIS EM PLACAS ATROSCLERÓTIAS DE PACIENTES
COM DOENÇA VASCULAR E VASOS SADIOS**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Odontologia da Faculdade de
Farmácia, Odontologia e Enfermagem da
Universidade Federal do Ceará, como parte
dos requisitos para a obtenção do título de
Doutor em Odontologia.**

Área de Concentração: Clínica Odontológica

Orientador: Prof. Dr. Fabrício Bitu Sousa

FORTALEZA

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- F399d Fernandes, Clarissa Pessoa.
DETECÇÃO DE STREPTOCOCCUS MUTANS E AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE MARCADORES
TECIDUAIS EM PLACAS ATÉROSCLERÓTIAS DE PACIENTES COM DOENÇA VASCULAR E
VASOS SADIOS / Clarissa Pessoa Fernandes. – 2017.
87 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e
Enfermagem, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Fortaleza, 2017.
Orientação: Prof. Dr. Fabrício Bitu Sousa.
1. Aterosclerose. 2. Streptococcus mutans. 3. Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real. 4.
Imuno-histoquímica. 5. Inflamação. I. Título.

CDD 617.6

CLARISSA PESSOA FERNANDES

**DETECÇÃO DE *STREPTOCOCCUS MUTANS* E AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE
MARCADORES TECIDUAIS EM PLACAS ATEROSCLERÓTICAS DE
PACIENTES COM DOENÇA VASCULAR E VASOS SADIOS**

Tese submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Odontologia; Área de Concentração: Clínica Odontológica.

Aprovada em: ____ / ____ / ____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Fabrício Bitu Sousa (Orientador)
Universidade Federal do Ceará – UFC

Profª. Dra. Ana Paula Negreiros Nunes Alves
Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof. Dr. Carlos Roberto Martins Rodrigues Sobrinho
Universidade Federal do Ceará – UFC

Profª. Dra. Juliana Paiva Marques Lima
Centro Universitário Christus – Unichristus

Profª. Dra. Ramilye Araújo Lima
Centro Universitário Christus – Unichristus

Aos meus amados pais, Rosa e Luiz,
pelo amor a mim dedicado, pelo
apoio incondicional a todos os meus
projetos, pela vibração com todas as
minhas conquistas, dedico, com
carinho, este trabalho.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por estar sempre presente em minha vida. Sem Ele nada disso seria possível.

Aos amados pais, **Rosa e Luiz**, meus queridos irmãos, **Luiz Eduardo e Gabriela**, e à minha cunhada, **Lilianne**, pelo apoio, incentivo, paciência e colaboração durante toda essa caminhada.

Ao meu marido, **Artur**, por todo o apoio, companheirismo, paciência, e por tudo que conquistamos juntos, e à minha amada filha **Ana Clara**, que mesmo antes de nascer, participou dessa conquista na reta final, trazendo novo gás e incentivo para a conclusão de mais essa etapa nas nossas vidas.

À minha sogra, **Sônia**, ao meu sogro, **Willian**, aos meus cunhados, **Willian Filho, Emanuela**, e seu marido, **Haroldo**, pelos ótimos momentos de convivência, e por terem vivenciado todo esse processo.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Fabrício Bitu Sousa**, a quem muito admiro, pela sua orientação e incentivo desde a graduação, pela maravilhosa convivência ao longo desses anos, por sempre ter acreditado no meu potencial. Muitíssimo obrigada pelo apoio e pelas oportunidades.

À minha coorientadora, **Profa. Dra. Ana Paula Negreiros Nunes Alves**, pela sua orientação e pelos muitos ensinamentos ao longo dessa jornada, pela sua dedicação a todos os seus alunos e à Universidade. Obrigada pela amizade e pelos momentos de aprendizado e descontração.

Ao meu coorientador, **Prof. Dr. Mário Rogério Lima Mota**, pela sua amizade, orientação, disponibilidade, apoio e incentivo, sempre.

À **Profa. Dra. Raquel Carvalho Montenegro**, por toda a sua ajuda e contribuição para este trabalho.

A todos os colegas da Universidade Federal do Pará, especialmente a **Camile** pelo auxílio com as análises moleculares da pesquisa.

Aos serviços de Cardiologia do Hospital Universitário Wálter Cantídio e Hospital de Messejana Dr. Carlos Alberto Studart Gomes, especialmente ao **Dr. Carlos Roberto Martins Rodrigues Sobrinho** e **Dr. José Glauco Lobo Filho**, por terem aberto as portas dos serviços para a nossa pesquisa, pela ajuda com a coleta da amostra vascular e por todo o apoio durante o trabalho.

Aos colegas do laboratório de Patologia Bucal, especialmente, **Paulo, Carolina, Malena, Thales, Ernando e Camila**, pela amizade, pelos anos de convivência e pelas oportunidades de realizarmos trabalhos juntos.

Ao **Programa de Pós-graduação em Odontologia da UFC**, por ter sido o berço da minha formação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**CAPES**), pela concessão da bolsa de estudos.

RESUMO

Nos últimos anos, a relação entre bactérias orais e aterosclerose tem sido investigada, e estudos têm sugerido que bactérias cariogênicas participam direta e indiretamente da etiopatogênese e progressão dessa doença. *Streptococcus mutans* (SM) tem demonstrado a capacidade de invadir e causar dano às células endoteliais, favorecer a aderência de leucócitos no endotélio vascular e promover a transformação de macrófagos em células espumosas, eventos diretamente relacionados ao desenvolvimento da aterosclerose. Essa bactéria tem sido detectada em placas ateroscleróticas com variável frequência, e estudos laboratoriais têm pesquisado sua relação com a ativação de marcadores inflamatórios e trombogênicos, que são indiretamente associados à patogênese dessa doença. Porém, o mecanismo patogênico da aterosclerose ainda não está completamente elucidado, e o papel de bactérias orais precisa ser amplamente investigado. O presente estudo teve por objetivo avaliar a relação entre a presença de SM e alterações teciduais e inflamatórias em vasos com acometimento de aterosclerose. Um total de 13 placas ateroscleróticas, coletadas de pacientes com estenose de carótida ou aneurisma de aorta, e dez amostras-controle de vasos saudáveis (artérias carótida e aorta), coletadas durante procedimento de necropsia, foram submetidas a Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (qPCR), análise histopatológica, análise histoquímica por coloração de Giemsa (CG) e análise imuno-histoquímica para SM, IL-1 β , TNF- α , PCR, osteopontina, fibrinogênio e CD61 (método da estreptavidina-biotina-peroxidase). Todas as amostras-controle, microscopicamente saudáveis, foram positivas para SM apenas através de qPCR, enquanto que as amostras de placa aterosclerótica apresentaram positividade para SM através de qPCR e imuno-histoquímica, além de exibirem características histopatológicas de aterosclerose severa (100%). Presença de tecido fibroso (100,0%) e calcificação (92,3%) foram as características mais frequentes, seguidas de formação de trombo (84,6%), células inflamatórias mononucleares dispersas (76,9%) e presença de core lipídico (61,5%). A CG mostrou que os *Streptococcus* colonizaram áreas de core lipídico, tecido fibroso e calcificação, não sendo positiva nos vasos do grupo controle. Todas as 13 amostras de placa aterosclerótica, imunopositivas para SM, foram positivas para os anticorpos fibrinogênio, IL-1 β , osteopontina e CD61, enquanto que imunoexpressão para PCR e TNF- α foi evidenciada em 12 amostras (92,3%). A reatividade para IL-1 β , TNF- α , osteopontina e CD61 não foi encontrada nas amostras-controle, imunonegativas para SM, porém, em algumas, observou-se imunomarcagem para fibrinogênio (60,0%) e PCR (50,0%). A detecção de SM em placas ateroscleróticas, além da visualização de *Streptococcus* em áreas de alteração tecidual,

sugere que nessas amostras, os micro-organismos encontraram ambiente favorável para sua proliferação. Além disso, imunoexpressão positiva de TNF- α , IL-1 β , fibrinogênio, PCR, osteopontina e CD61 em amostras de placa aterosclerótica imunopositivas para SM pode sugerir uma possível relação com a aterosclerose.

Palavras-chave: Aterosclerose. *Streptococcus mutans*. Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real. Imuno-histoquímica. Inflamação.

ABSTRACT

Over the past few years, the association between oral bacteria and atherosclerosis has been investigated, and studies have suggested that cariogenic bacteria are directly and indirectly involved in the etiopathogenesis and progression of this disease. *Streptococcus mutans* (SM) has demonstrated the ability to invade and cause damage to endothelial cells, favor the adhesion of leukocytes in vascular endothelium and promote the transformation of macrophages into foam cells, events directly related to the development of atherosclerosis. This microorganism has been detected in atherosclerotic plaques with variable frequency, and laboratory studies have investigated its role in the activation of inflammatory and thrombogenic markers, which are indirectly associated with the pathogenesis of this disease. However, the pathogenic mechanism of atherosclerosis is not yet fully elucidated, and the role of oral bacteria needs to be extensively investigated. The present study aimed to evaluate the association between the presence of SM and tissue and inflammatory alterations in vessels with atherosclerosis. A total of 13 atherosclerotic plaques, collected from patients with carotid stenosis or aortic aneurysm, and 10 control samples of healthy blood vessels (aortic and carotid arteries) collected during necropsy procedure, were submitted to Real-time Polymerase Chain Reaction (qPCR), histopathological analysis, histochemical analysis by Giemsa staining (GS) and immunohistochemical analysis for SM, IL-1 β , TNF- α , CRP, osteopontin, fibrinogen and CD61 (Streptavidin-biotin-peroxidase method). All microscopically healthy control specimens were positive for SM only through qPCR, whereas atherosclerotic plaque specimens were positive for SM through qPCR and immunohistochemistry, and showed histopathological characteristics of severe atherosclerosis (100%). Presence of fibrous tissue (100.0%) and calcification (92.3%) were the most frequent features, followed by thrombus formation (84.6%), mononuclear inflammatory cells (76.9%) and presence of core lipid (61.5%). GC showed that streptococcus colonized areas of core lipid, fibrous tissue and calcification, and was not positive in vessels of the control group. All 13 atherosclerotic plaques, immunopositive for SM, were positive for the fibrinogen, IL-1 β , osteopontin and CD61 antibodies, whereas immunoexpression for CRP and TNF- α was evidenced in 12 samples (92.3%). The reactivity to IL-1 β , TNF- α , osteopontin and CD61 was not found in the control samples, immunonegative to SM, but in some cases, immunoexpression of fibrinogen (60.0%) and PCR (50.0%) was observed. The detection of SM in atherosclerotic plaques, in addition to the visualization of Streptococcus in areas of tissue alteration, suggests that in these samples, microorganisms found a favorable

environment for their proliferation. In addition, positive immunoexpression of TNF- α , IL-1 β , fibrinogen, CRP, osteopontin and CD61 in atherosclerotic plaque samples immunopositive to SM may suggest a possible association with atherosclerosis.

Keywords: Atherosclerosis. *Streptococcus mutans*. Real-time Polymerase chain reaction. Immunohistochemistry. Inflammation.

LISTA DE ABREVIATURAS

CG	Coloração de Giemsa
CPO-D	Dentes Cariados, Perdidos e Obturados
CTAB	Brometo de Cetiltrimetilamônio
DCV	Doença Cardiovascular
DCVs	Doenças Cardiovasculares
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DP	Desvio-Padrão
FIB	Fibrinogênio
HAS	Hipertensão Arterial Sistêmica
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
IPC	<i>Internal PCR Control</i>
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
MCP-1	Proteína Quimioatrativa de Monócitos
MHC-II	Complexo de Histocompatibilidade Principal II
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPN	Osteopontina
<i>P. gingivalis</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
<i>P. intermedia</i>	<i>Prevotella intermedia</i>
PBS	Tampão Fosfato Salino
PCR	Proteína C Reativa
PEFOCE	Perícia Forense do Estado do Ceará
PSR	Registro Periodontal Simplificado
qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real
RNA	Ácido Ribonucleico
RPM	Rotações por minuto
<i>S. mutans</i>	<i>Streptococcus mutans</i>
SM	<i>Streptococcus mutans</i>
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
<i>T. denticola</i>	<i>Treponema denticola</i>
TLR	Receptor <i>toll-like</i>

TLR 2	Receptor <i>toll-like 2</i>
TLR 4	Receptor <i>toll-like 4</i>
TNF	Fator de Necrose Tumoral
VCAM -1	Molécula de Adesão Intercelular 1
X ²	Teste Qui-quadrado

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	14
2. PROPOSIÇÃO.....	18
2.1 Objetivo Geral.....	18
2.2 Objetivos Específicos.....	18
3. CAPÍTULOS.....	19
3.1 Capítulo 1.....	20
3.2 Capítulo 2.....	47
4. DISCUSSÃO GERAL.....	70
5. CONCLUSÃO GERAL.....	72
REFERÊNCIAS.....	73
ANEXOS.....	78

1 INTRODUÇÃO GERAL

Aterosclerose é uma doença cardiovascular (DCV) progressiva crônica de origem multifatorial que acomete artérias musculares e elásticas de médio a grande calibres. É tradicionalmente caracterizada por retenção de colesterol na parede da artéria, com consequente espessamento focal, remodelação vascular e subsequente estreitamento do lúmen arterial, diminuindo o fluxo sanguíneo. Essas lesões podem sofrer defeitos de superfície com ruptura da placa aterosclerótica, originando hematoma, hemorragia e formação de trombos, que podem levar a consequências como infarto agudo do miocárdio, acidente vascular cerebral, aneurisma de aorta e doença vascular periférica (HARASZTHY et al., 2000; PUCAR et al., 2007; RENKO et al., 2008).

Nem todos os casos de aterosclerose podem ser associados a fatores de risco tradicionais, como hipertensão, hipercolesterolemia, diabetes *mellitus*, obesidade, fumo e sedentarismo, sugerindo que outros fatores, como status socioeconômico, por exemplo, podem estar associados a essa doença (BATAGINI et al., 2016; BITTNER et al., 2017; PSALTOPOULOU et al., 2017).

Ao longo dos anos, surgiram, então, evidências indicando que a inflamação desempenha papel importante na aterosclerose, podendo operar em todos os estágios dessa patologia (RINCÓN et al., 2015). Disfunção endotelial está relacionada a lesão aterosclerótica incipiente. Sabe-se que o endotélio normal não é aderente a leucócitos circulantes, porém, uma vez expostas a estímulos inflamatórios, células endoteliais são estimuladas a produzir molécula de adesão intercelular 1 (VCAM-1) e quimiocinas, como proteína quimioatrativa de monócitos-1 (MCP-1). VCAM-1 e MCP-1, por sua vez, favorecem a adesão de monócitos e sua diapedese para a camada íntima do vaso, onde são estimulados a se transformar em macrófagos e fagocitar lipídios de baixa densidade oxidados (LDL), tornando-se macrófagos espumosos que, ao sofrerem apoptose, resultam na liberação e acúmulo de lipídios na camada íntima. Ao mesmo tempo, macrófagos liberam interleucina-1 β (IL-1 β) e fator de necrose tumoral- α (TNF α) amplificando a resposta inflamatória local e os eventos que levam a estágios iniciais da aterosclerose (PACKARD; LIBBY, 2008).

As infecções bacterianas podem estar bastante associadas a esse processo, contribuindo com a formação de ateromas através de mecanismos diretos e indiretos. Sabe-se que, *in vitro*, algumas bactérias podem provocar agregação plaquetária, invadir células endoteliais e causar dano endotelial (mecanismos diretos), além de induzir produção de moléculas de adesão intracelular, produção de citocinas e de anticorpos contra

lipopolissacarídeos, e provocar disfunção do sistema imune (mecanismos indiretos) (PUCAR et al., 2007).

Dessa maneira, infecções bacterianas crônicas, como gastrite por *Helicobacter pylori*, pneumonia por *Chlamydomphila pneumoniae* e *Mycoplasma pneumoniae*, além de infecções orais, estão sendo cada vez mais associadas ao aumento do risco para aterosclerose (LIBBY, 2002; MUSSA et al., 2006; PIERRI et al., 2006; PUCAR et al., 2007).

Cárie dentária e doença periodontal crônica são as doenças infecciosas bucais mais frequentes (MARCENES et al., 2013). Estudo realizado em 2010 sobre avaliação global de doenças (The Global Burden of Diseases 2010 study) aponta a cárie de dentes permanentes como a doença mais frequente mundialmente, dentre todas as doenças estudadas, e não só as infecções orais, ficando a doença periodontal em sexto lugar (MARCENES et al., 2013).

A cárie é uma doença biofilme sacarose dependente (FEJERSKOV, 2004; LEME et al., 2006), que ocorre a partir da interação entre bactérias específicas, como *Streptococcus mutans* (*S. mutans*), constituintes da dieta e biofilme (placa dentária), resultando em cavitação dentária (LEME et al., 2006). A periodontite é uma doença crônica inflamatória, também induzida por biofilme, caracterizada por perda de estruturas de suporte dentário. É causada por uma microbiota heterogênea formada por bactérias como *Prevotella intermedia* (*P. intermedia*), *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) e *Tannerella forsythensis* (*T. forsythensis*), tendo um mecanismo inflamatório fortemente relacionado com a doença (SHAY, 2002; FIGUERO et al., 2011; HAJISHENGALLIS, 2014).

A associação entre doença periodontal e alterações vasculares não é recente. Estudos como os de Mattila e colaboradores, e Syrjanen e colaboradores, publicados em 1989, já posicionavam a infecção oral como tendo papel etiológico nas DCVs. Posteriormente, resultados de grandes estudos epidemiológicos e trabalhos de metanálise fortaleceram essa hipótese, indicando associação positiva moderada entre essas doenças (JANKET et al., 2003; MEURMAN; SANZ; JANKET, 2004; BEHLE; PAPAPANOU, 2006; DEMMER; DESVARIEUX, 2006; MUSTAPHA et al., 2007; HUMPHREY et al., 2008; XU et al., 2017).

Mecanismos mediados por micro-organismos orais e a inflamação desencadeada por eles têm sido propostos para explicar o seu envolvimento na aterogênese. Bactérias associadas com doença periodontal podem, supostamente, colonizar as placas ateromatosas e causar danos a essas placas induzindo inflamação local, resultando na propagação de eventos inflamatórios que levariam a formação, desenvolvimento e eventual ruptura de ateromas (TELES; WANG, 2011).

Por outro lado, estudos *in vitro* têm investigado o papel de bactérias cariogênicas na aterogênese. Alguns autores verificaram que *S. mutans* possui a capacidade de se aderir a proteínas de matriz extracelular (colágeno tipo 1) (NOMURA et al., 2012), induzir agregação plaquetária (NAKANO et al., 2005; MATSUMOTO-NAKANO et al., 2009), invadir células endoteliais humanas (ABRANCHES et al., 2009; NAGATA; DE TOLEDO; OHO, 2011), e induzir o aumento de produção de citocinas fortemente associadas à patogênese da aterosclerose, como IL-1, IL-6 e MCP-1 (NAGATA; DE TOLEDO; OHO, 2011). Além disso, essas bactérias podem induzir a formação de macrófagos espumosos, que, como visto anteriormente, estão relacionados diretamente ao desenvolvimento dessa doença (KURAMITSU et al., 2001; NAKANO et al., 2006; JUNG et al., 2009).

Corroborando esses achados, várias bactérias orais, como *S. mutans*, *P. intermedia*, *P. gingivalis* e *Treponema denticola* (*T. denticola*) têm sido encontradas em amostras de placas ateroscleróticas, por meio de exames moleculares mais sensíveis, o que é fator importante para determinar relação entre doença aterosclerótica e doenças bucais, como cárie e periodontite (HARASZTHY et al., 2000; CAIRO et al., 2004; SANZ et al., 2004; LEHTINIEMI et al., 2005; RATH et al., 2014; MAHENDRA et al., 2015; SZULC et al., 2015).

A identificação desses micro-organismos orais tanto em amostras cardíacas como em placa bacteriana dentária pode ser realizada através de biologia molecular. O desenvolvimento de novas técnicas, objetivando a análise de DNA, RNA ou proteínas, tem permitido não apenas a aquisição de conhecimento no campo da genética microbiana, mas também a criação de bases para o desenvolvimento e aperfeiçoamento de técnicas diagnósticas. A Reação em Cadeia de Polimerase é um exemplo, e tem emergido como a mais poderosa ferramenta de amplificação de genes e permitido rápida identificação de determinadas espécies bacterianas com especificidade e sensibilidade significativamente melhoradas (SANZ et al., 2004).

Nesses testes, é imprescindível a extração do material genético e a posterior amplificação de regiões do genoma específicas, através da utilização de *primers* e/ou sondas desenhados para cada espécie, e utilizados, sob condições altamente rigorosas, para detecção de micro-organismos-alvo em diferentes amostras (SANZ et al., 2004; BAHRANI-MOUGEOT et al., 2008).

Evidências de que infecções orais contribuem ou são fatores decisivos para o desenvolvimento de placas ateroscleróticas ainda são conflitantes, e estudos de identificação de bactérias periodontais através de Reação em Cadeia da Polimerase em tecido vascular têm

obtido resultados bastante variados, o que dificulta a comprovação da participação dessas bactérias na aterogênese (HARASZTHY et al., 2000; CAIRO et al., 2004; SANZ et al., 2004; LEHTINIEMI et al., 2005; RATH et al., 2014; MAHENDRA et al., 2015; SZULC et al., 2015).

Por outro lado, poucos estudos têm investigado a presença de micro-organismos cariogênicos, como *S. mutans*, em tecidos vasculares (NAKANO et al., 2006, 2009; NOMURA et al., 2006; NEMOTO et al., 2008), apesar de esses micro-organismos serem capazes de invadir células endoteliais e estimular a produção de marcadores inflamatórios, como citado anteriormente (FRIEDEWALD et al., 2009).

Outros métodos, como microscopia eletrônica (DA SILVA et al., 2003), cultura bacteriana (FIEHN et al., 2005; PADILLA et al., 2006) e imuno-histoquímica (CHIU, 1999) têm sido utilizados para identificação de bactérias em placas ateroscleróticas, com resultados inconclusivos.

Em busca de resultados mais consistentes, estudos de modelo animal para investigar a patogênese de uma infecção sistêmica crônica por *S. mutans* e subsequente aterosclerose têm sido realizados (ZHANG et al., 2010; KESAVALU et al., 2012). Apesar de alguns autores não encontrarem relação entre infecção sistêmica por *S. mutans* e aumento do crescimento da placa aterosclerótica (ZHANG et al., 2010), o estudo de Kesavalu e colaboradores (2012) verificou que infecção com a cepa invasiva de *S. mutans* OMZ175 acelera o desenvolvimento de placa aterosclerótica e aumento da resposta inflamatória em modelo animal de ratos ApoE nulos, quando comparados com controle, sem infecção por *S. mutans*.

Diante desses resultados divergentes, ainda não está claro se bactérias orais presentes em placas ateroscleróticas estão envolvidas na etiopatogênese da doença, já que Reação em Cadeia da Polimerase detectaria fragmentos de bactéria, bactérias mortas que teriam sido aprisionadas em uma placa aterosclerótica já existente, ou até mesmo contaminação da amostra (FIEHN et al., 2005).

A avaliação da expressão de diferentes biomarcadores (inflamatórios, trombóticos e osteogênicos) em placas ateroscleróticas e sua correlação com a presença de *S. mutans* nessas amostras pode trazer uma associação positiva da infecção com a intensidade do processo inflamatório local, sendo esse um achado importante para verificação do possível papel de bactérias orais na progressão das doenças ateroscleróticas.

2 PROPOSIÇÃO

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a relação entre a presença de *Streptococcus mutans* e alterações teciduais e inflamatórias em vasos com acometimento de aterosclerose.

2.2 Objetivos Específicos

1. Avaliar presença de *Streptococcus mutans* em placa aterosclerótica de pacientes com e sem doença vascular.
2. Avaliar a expressão de osteopontina, CD61, fibrinogênio, Proteína C-Reativa (PCR), IL1- β e TNF- α em amostras de placa aterosclerótica e vasos saudáveis.

3 CAPÍTULOS

Esta tese está baseada no Artigo 46 do Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Ceará, que regulamenta o formato alternativo para dissertações de Mestrado e teses de Doutorado, e permite a inserção de artigos científicos de autoria ou coautoria do candidato (Anexo A). Por se tratarem de pesquisas envolvendo seres humanos, ou partes deles, o projeto de pesquisa deste trabalho foi submetido à apreciação Comitê de Ética em Pesquisas do Hospital Universitário Wálter Cantídio, tendo sido aprovado sob o protocolo 118.11.11 (Anexo B) e do Comitê de Ética em Pesquisa de seres humanos da Universidade Federal do Ceará sob CAAE Nº 25663514.4.0000.5054 e CAAE Nº 45319615.9.0000.5054 (Anexos C e D). Assim sendo, esta tese é composta de dois capítulos contendo artigos científicos que serão submetido para publicação nos periódicos “**Caries Research**” (Anexo E) e “**Internacional Journal of Cardiology**” (Anexo F) conforme descrito abaixo:

Capítulo 1: Pesquisa de *Streptococcus mutans* em placas ateroscleróticas: avaliação molecular, histomorfológica e imuno-histoquímica

Forte CPF, Sousa FB

Capítulo 2: Expressão imuno-histoquímica de *Streptococcus mutans*, osteopontina, CD61 e marcadores inflamatórios em placas ateroscleróticas de pacientes com doença vascular

Forte CPF, Sousa FB

3.1 CAPÍTULO 1

Pesquisa de *Streptococcus mutans* em placas ateroscleróticas: avaliação molecular, histomorfológica e imuno-histoquímica

Autores:

Clarissa Pessoa Fernandes Forte

Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Curso de Odontologia, Departamento de Clínica Odontológica, Fortaleza, Ceará, Brasil.
Centro Universitário Christus (Unichristus), Curso de Odontologia.

Fabício Bitu Sousa

Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Curso de Odontologia, Departamento de Clínica Odontológica, Fortaleza, Ceará, Brasil.
Centro Universitário Christus (Unichristus), Curso de Odontologia.

Título corrido: **S. mutans e colonização de placas ateroscleróticas**

Palavras-chave: Aterosclerose; Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real; *Streptococcus mutans*; imuno-histoquímica.

Autor de correspondência:

Clarissa Pessoa Fernandes Forte

Endereço: Rua: João Adolfo Gurgel, 133, 12 andar. Fortaleza-CE, Brasil. CEP: 60190060.

E-mail: clarissa_pf@hotmail.com

Declaração de Interesses

Não existem conflitos de interesse por parte de nenhum dos autores do presente artigo.

Resumo

A relação entre bactérias orais e aterosclerose tem sido objeto de investigação, e estudos têm sugerido que bactérias cariogênicas participam da etiopatogênese e progressão dessa doença. *Streptococcus mutans* (SM) tem sido detectado em placas ateroscleróticas com variável frequência, porém a relação entre a presença dessas bactérias e alterações teciduais ainda não foi estudada. O presente estudo teve por objetivo verificar presença de SM em placas ateroscleróticas, através de técnicas com diferentes sensibilidades, correlacionando com alterações histológicas das placas. Um total de 13 placas ateroscleróticas, coletadas de pacientes com doença vascular, foram submetidas a qPCR e análises histopatológica (hematoxilina/eosina – HE), histoquímica por coloração de Giemsa (CG) e imuno-histoquímica para SM (estreptavidina-biotina-peroxidase). Dez amostras de vasos saudáveis, coletadas durante procedimento de necropsia, foram utilizadas como controle. Avaliação qualitativa das características microscópicas foi realizada por um patologista. Todas as amostras-controle, microscopicamente saudáveis, foram positivas para SM apenas através de qPCR. Placas ateroscleróticas apresentaram positividade para SM (100,0%) através de qPCR e imuno-histoquímica, além de exibirem características histopatológicas de aterosclerose severa (100%). Presença de tecido fibroso (100,0%) e calcificação (92,3%) foram as características mais frequentes, seguidas de formação de trombo (84,6%), células inflamatórias mononucleares dispersas (76,9%) e presença de core lipídico (61,5%). A CG mostrou que os *Streptococcus* colonizaram áreas de core lipídico, tecido fibroso e calcificação, não sendo positiva nos vasos do grupo controle. A detecção de SM em placas ateroscleróticas, além da visualização de *Streptococcus* em áreas de alteração tecidual, sugere que nessas amostras, os micro-organismos encontraram ambiente favorável para sua proliferação.

Introdução

Aterosclerose é uma doença progressiva crônica de origem multifatorial que acomete artérias musculares e elásticas de médio a grande calibres. É caracterizada por retenção de colesterol na parede da artéria, com consequente espessamento focal, formação de placa aterosclerótica, remodelação vascular e subsequente estreitamento do lúmen arterial, diminuindo o fluxo sanguíneo [Haraszthy et al., 2000; Pucar et al., 2007; Renko et al., 2008].

Além de fatores de risco tradicionais, a inflamação tem sido identificada na etiopatogênese dessa doença. Além disso, acredita-se que outros fatores, como patógenos orais, podem estar associados à aterosclerose [Haraszthy et al., 2000; Demmer e Desvarieux, 2006; Humphrey et al., 2008].

Pesquisa anterior reportou a presença de DNA de bactérias orais em amostras de placas ateroscleróticas, principalmente o *S. mutans*, uma bactéria cariogênica gram-positiva e importante componente de biofilmes orais cariogênicos. O estudo incluiu avaliação da condição de saúde bucal dos pacientes, através dos índices: Dentes Cariados, Perdidos e Obturados (CPOD) e Registro Periodontal Simplificado (PSR), observando alta frequência de bactérias cariogênicas em placa dental e saliva de pacientes desdentados, em sua maioria, com elevada experiência prévia de cárie. Esse achado foi associado à alta frequência de *S. mutans* (100%) em tecido vascular [Fernandes et al., 2014].

Outros autores têm detectado bactérias periodontais, como *P. intermedia*, *P. gingivalis* e *T. denticola*, em amostras de placas ateroscleróticas, através de exames moleculares sensíveis, como a Reação em Cadeia da Polimerase [Haraszthy et al., 2000; Cairo et al., 2004; Sanz et al., 2004; Fiehn et al., 2005; Lehtiniemi et al., 2005; Rath et al., 2014; Mahendra et al., 2015; Szulc et al., 2015]. Porém, poucos estudos têm investigado a presença de *S. mutans* nessas amostras, apesar de essa bactéria ser capaz de invadir células endoteliais e induzir eventos iniciadores de aterosclerose [Nakano et al., 2006a; Nemoto et al., 2008; Nomura et al., 2012; Nomura et al., 2014].

Acredita-se que a detecção de bactérias orais em tecido vascular com alteração histológica seja fator importante para determinar relação entre doença aterosclerótica e doenças bucais [Haraszthy et al., 2000; Cairo et al., 2004; Sanz et al., 2004; Fiehn et al., 2005; Lehtiniemi et al., 2005; Nakano et al., 2006a; Nakano et al., 2009; Rath et al., 2014; Szulc et al., 2015]. Apesar disso, a viabilidade das bactérias encontradas em tecidos vasculares tem sido questionada, com alegações de que a Reação em Cadeia da Polimerase detectaria fragmentos de bactéria, bactérias mortas que estariam aprisionadas em uma placa

aterosclerótica já existente, ou até mesmo contaminação da amostra [Fiehn et al., 2005].

A visualização microscópica de bactérias em placas ateroscleróticas e sua associação com alterações histomorfológicas da aterosclerose podem fornecer mais evidências da participação de bactérias na etiopatogênese e/ou progressão dessa doença. A identificação de bactérias em amostras teciduais pode ser realizada através da técnica de histoquímica, com utilização de coloração de Giemsa [Barcia, 2007], ou através de imunohistoquímica, por exemplo [Chiu, 1999; Johnston et al., 2005]. Porém, essa relação tem sido pouco estudada [Lastas et al., 2004].

Dessa maneira, o presente estudo teve por objetivo investigar a presença/ausência de *S. mutans* em placas ateroscleróticas associando com as alterações histomorfológicas da aterosclerose.

Materiais e Métodos

Caracterização da amostra

Participaram do estudo pacientes diagnosticados com estenose de carótida ou aneurisma de aorta e agendados, consecutivamente, para cirurgia vascular em dois centros cirúrgicos de referência em Cardiologia, durante o período de março de 2012 a setembro de 2013. Para controle do experimento, dez vasos sanguíneos (artérias carótida e aorta), obtidos de indivíduos sadios submetidos a procedimento de necropsia, na Perícia Forense do Estado do Ceará (PEFOCE), foram coletados de dezembro de 2014 a setembro de 2015. Como critérios de inclusão, foram considerados aqueles com até 25 anos de idade e que morreram por morte violenta. Foram excluídos indivíduos que morreram por causas cardíacas, como infarto agudo do miocárdio, enforcados, afogados ou por asfixia, que apresentaram perfuração cardíaca por arma de fogo, que morreram por septicemia e muito tempo após o início da causa básica.

O protocolo do estudo foi aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Walter Cantídio, sob o protocolo 118.11.11, e da Universidade Federal do Ceará, sob números CAAE 45254215.3.0000.5054 e 25663514.4.0000.5054. Além disso, a pesquisa foi conduzida eticamente de acordo com a Declaração de Helsinki.

Informações sobre histórico de fumo, hipertensão, diabetes mellitus, dislipidemia, obesidade e histórico familiar foram obtidas através de prontuários, anamnese e ficha clínica.

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), foram considerados ex-fumantes aqueles pacientes que fumavam, pelo menos, uma vez por dia e pararam há, pelo menos, seis meses [Swart e Panday, 2003].

Coleta da amostra

Um total de 13 placas ateroscleróticas foram coletadas pelo pesquisador (C.P.F.F.), de maneira asséptica, com auxílio dos cirurgiões vasculares, durante as cirurgias de endarterectomia de carótida e aneurisma de aorta abdominal ou torácica. Duas amostras foram coletadas de um mesmo paciente em momentos cirúrgicos diferentes, pois este apresentava estenose de carótida direita e esquerda. Um fragmento de cada amostra foi armazenado em recipiente estéril, contendo PBS a -20°C , para posterior análise através de Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real. Fragmentos remanescentes foram fixados em formol a 10% tamponado e incluídos em parafina para posterior análises histomorfológica (hematoxilina/eosina – HE), histoquímica (coloração de Giemsa) e imuno-histoquímica (método da estreptavidina-biotina-peroxidase) [Fernandes et al., 2014].

Fragmentos de dez artérias carótida e aorta provenientes de indivíduos submetidos a necropsia foram coletados pelo pesquisador (C.P.F.F.), com auxílio dos médicos legistas, até dez horas após o óbito, na PEFOCE, e mantidos em formol a 10% tamponado para posterior análises histomorfológica (hematoxilina/eosina – HE), histoquímica (coloração de Giemsa) e imuno-histoquímica (método da estreptavidina-biotina-peroxidase). Um fragmento de cada amostra foi armazenado em recipiente estéril, contendo PBS a -20°C , para posterior análise através de Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real.

Extração de DNA e Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real

Para extração de DNA, aproximadamente 30 mg de tecido obtidos do centro das placas ateroscleróticas foram cortados em pequenos fragmentos e transferidos para tubos de plástico estéreis de 2 mL, mantendo manipulação asséptica. Todas as amostras (placas ateroscleróticas e vasos sadios) foram centrifugadas por cinco minutos a 10.000 RPM. A extração de DNA prosseguiu de acordo com protocolo baseado no método Brometo de Cetiltrimetilamônio (CTAB) [Wilson, 2001; Fernandes et al., 2014].

Um total de 13 amostras de DNA extraído de placas ateroscleróticas e dez amostras de DNA de vasos sadios foram submetidas à Reação em Cadeia da Polimerase em

tempo real para detecção de DNA bacteriano de *S. mutans*. *Primers* e sonda foram confeccionados comercialmente (Life Technologies®, Foster City, CA, USA), considerando a região 16S do DNA ribossomal bacteriano (Tabela 1) [Fernandes et al., 2014]. Os *Primers* foram testados através do programa BLASTN 2.5.1 obtido do servidor *National Center for Biotechnology Information* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). A similaridade da sequência obtida foi de 99% para a cepa de *S. mutans* do banco de dados GenBank, utilizada como referência.

Para realização da Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real, acrescentou-se 1 µL de DNA genômico a 8 µL de TaqMan® *Universal PCR Master Mix* (Life Technologies®, Foster City, CA, USA), 0,35 µL de *primer* e 3,15 µL de água. O volume final de 14 µL foi obtido com a adição de *Internal PCR Control* (IPC) (1 µL) e IPC DNA (0,5 µL) utilizado como controle interno da reação. Amplificação foi realizada em termociclador 7500 *Real-Time PCR System* (Life Technologies®, Foster City, CA, USA). DNA bacteriano foi substituído por água para controle negativo da reação. O protocolo da Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real consistiu o passo inicial de desnaturação a 95°C por dez minutos, seguido por 40 ciclos a 95°C por 15 segundos e 60°C por um minuto [Fernandes et al., 2014].

As análises moleculares foram realizadas no Laboratório de Pós-Graduação da Universidade Federal do Ceará (Fortaleza, Brasil), Laboratório de Citogenética Humana e Laboratório de Genética Humana e Médica da Universidade Federal do Pará (Belém, Brasil).

Análise histomorfológica

Inicialmente, foram confeccionados blocos parafinados com as amostras fixadas em formol tamponado. Os blocos foram cortados em espessura de 3 µm e corados pela hematoxilina/eosina conforme protocolo adaptado de Junqueira e Carneiro [2013] para análise histomorfológica. Um patologista (F.B.S.) avaliou as placas ateroscleróticas e os vasos saudáveis quanto às características próprias de aterosclerose severa, utilizando os parâmetros presente/ausente para cada uma das seguintes características: formação de trombo, core lipídico, tecido fibroso, calcificação, células inflamatórias [Lovett et al., 2004].

Análise histoquímica

Para coloração de Giemsa, os blocos parafinados foram cortados a 4 µm. Secções histológicas foram desparafinizadas com xilol e hidratadas com álcool. Os cortes foram lavados

em água corrente para retirar o excesso de álcool. Corante de Giemsa a 10% foi colocado sobre as lâminas, durante 30 minutos, em temperatura ambiente, e o excesso do corante, retirado em água corrente. As lâminas foram colocadas para secar em estufa a 60°C, durante cinco minutos. Por fim, as lâminas foram montadas em resina sintética.

Um patologista (F.B.S.) avaliou a presença de bactérias quanto à localização na amostra (bactérias presentes na periferia ou no centro das amostras) e quanto à relação com alterações teciduais previamente identificadas.

Análise Imuno-histoquímica

A reação de imuno-histoquímica foi realizada em cortes histológicos de 3 µm de espessura, dispostos em lâminas histológicas silanizadas, seguindo-se a técnica de estreptavidina-biotina-peroxidase padrão com modificação [Hsu e Raine, 1981]. O anticorpo primário utilizado foi o *S. mutans*, em uma diluição de 1:100 (ab 31181, Abcam Inc., Cambridge, MA, USA). As lâminas foram incubadas em estufa a 70°C, por três horas e, após este período, foram desparafinizadas em xilol e gradientes de álcool. Foi realizada a recuperação antigênica com ácido cítrico, em ambiente de micro-ondas (um ciclo de 12 minutos, contado a partir da ebulição, em potência máxima). Após bloqueio da atividade endógena da peroxidase (solução aquosa de H₂O₂ a 10V), o anticorpo primário foi incubado por 12 horas, a 4°C em câmara úmida. Foi adicionado o anticorpo secundário biotilado seguido do complexo estreptavidina-biotina-peroxidase, sendo revelado com o cromógeno diaminobenzidina (DAB) (Sigma Co., S. Louis, MO, EUA), tendo o peróxido de hidrogênio como substrato. Após a revelação, as lâminas foram contra-coradas com hematoxilina de Harrys. Como controle negativo da reação, foi omitido o anticorpo primário. Para controle positivo do anticorpo *S. mutans*, foi utilizado tecido gengival localizado próximo a cárie dentária de paciente atendido em serviço odontológico ambulatorial. Avaliou-se presença (P) e ausência (A) do *S. mutans* nas placas ateroscleróticas e amostras de controle.

Análise estatística

Análise estatística descritiva foi utilizada para caracterizar a amostra e analisar bactérias identificadas nas placas ateroscleróticas. As variáveis demográficas quantitativas foram expressas em forma de média±DP. As variáveis qualitativas nominais foram expressas em forma de frequência absoluta (frequência relativa).

Resultados

Um total de 12 pacientes, com média de idade de 68,9±10,5 anos (Média±DP) (variação 45-82 anos), foram incluídos no estudo. Destes, 58,3% apresentavam estenose de carótida e 41,7%, aneurisma de aorta. Variáveis demográficas, histórico médico e de fumo dos pacientes estão expressos na tabela 2.

As 13 placas ateroscleróticas foram positivas para DNA de *S. mutans* através de Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (100%) e apresentaram características histopatológicas de aterosclerose severa (Figuras 1 a 3). Presença de tecido fibroso (100,0%) e calcificação (92,3%) foram as características mais frequentes, seguidas de formação de trombo (84,6%), células inflamatórias mononucleares dispersas (76,9%) e presença de core lipídico (61,5%) (Tabela 3). As dez amostras de controle, que não tinham características microscópicas de aterosclerose, também apresentaram positividade para *S. mutans* através de Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (100%).

Coloração pelo método de Giemsa revelou a presença de bactérias do gênero *Streptococcus* em todas as amostras de placas ateroscleróticas, sempre localizados no centro destas. A presença de *Streptococcus* segundo as alterações teciduais próprias da aterosclerose está descrita na Tabela 3. As bactérias foram visualizadas, principalmente, em áreas de core lipídico (Figura 4), tecido fibroso (Figura 5) e calcificação (Figura 6). As amostras de controle foram negativas para *Streptococcus* através desse método.

S. mutans foi identificado por imuno-histoquímica em todas as amostras de placas ateroscleróticas (Figura 7), e todas as amostras-controle foram negativas para esse anticorpo. Marcação imuno-histoquímica para *S. mutans* também foi identificada em células fagocíticas, como macrófagos espumosos (Figura 8), podendo corresponder a antígeno degradado.

Discussão

No presente estudo, após caracterização da amostra, verificou-se que pacientes que não apresentavam comorbidades conhecidas para aterosclerose, faixa etária de risco, ou histórico de fumo também apresentaram doença vascular e formação de placas ateroscleróticas, o que corrobora as afirmações de alguns autores de que outros fatores, como infecção bacteriana, podem estar envolvidos na etiopatogênese dessa doença [Haraszthy et al., 2000; Demmer e Desvarieux, 2006; Humphrey et al., 2008].

Desde 1999, diversos estudos têm pesquisado a presença de bactérias orais em placas ateroscleróticas, encontrando resultados variados [Chiu, 1999; Haraszthy et al., 2000; Da Silva et al., 2003; Cairo et al., 2004; Kurihara et al., 2004; Fiehn et al., 2005; Lehtiniemi et al., 2005; Kozarov et al., 2006; Marques da Silva et al., 2006; Nakano et al., 2006a; Zaremba et al., 2006; Aimetti et al., 2007; Pucar et al., 2007; Zaremba et al., 2007; Renko et al., 2008; Zhang et al., 2008; Gaetti-Jardim et al., 2009; Nakano et al., 2009; Mahendra et al., 2010; Aquino et al., 2011; Figuero et al., 2011; Fernandes et al., 2014; Rath et al., 2014; Szulc et al., 2015; Mahendra et al., 2015; Eberhard et al., 2017]. Em estudos anteriores, as metodologias utilizadas variaram desde imuno-histoquímica [Chiu, 1999], cultura de bactérias [Da Silva et al., 2003; Padilla et al., 2006] e microscopia eletrônica [Da Silva et al., 2003; Armingohar et al., 2014], até análises moleculares como hibridização [Zaremba et al., 2006; Zaremba et al., 2007].

Com o passar dos anos, métodos moleculares mais sensíveis, como a Reação em Cadeia da Polimerase, começaram a ser amplamente utilizados. O método de Reação em Cadeia da Polimerase tem demonstrado alta sensibilidade e eficácia em detectar DNA bacteriano em tecido vascular, mesmo quando em pouca quantidade [Kozarov et al., 2006; Gaetti-Jardim et al., 2009; Mahendra et al., 2010], sendo a metodologia de escolha em muitos estudos. Apesar disso, alguns autores questionaram a viabilidade das bactérias encontradas em tecidos vasculares, alegando que a Reação em Cadeia da Polimerase detectaria fragmentos de bactéria, bactérias inviáveis que teriam sido aprisionadas em uma placa aterosclerótica já existente, ou, até mesmo, contaminação da amostra [Fiehn et al., 2005].

DNA de *S. mutans* foi identificado em 100% das amostras de tecido vascular (artérias carótida e aorta) sem alteração de aterosclerose, através de Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real, corroborando os questionamentos de Fiehn e colaboradores [2005]. De acordo com Rovey e colaboradores [2005], DNA bacteriano pode persistir em tecido cardíaco mesmo quando cultura bacteriana é negativa, podendo ser amplificado através de Reação em Cadeia da Polimerase por longos períodos após a bactéria tornar-se inviável. Os mesmos autores identificaram que o DNA de *Streptococcus* sp. persiste em amostras de válvulas cardíacas com histórico de endocardite infecciosa por mais tempo que outras bactérias. Portanto, acredita-se que o DNA de *S. mutans* identificado em amostras de vasos saudáveis, no presente trabalho, corresponda ao DNA de uma bactéria que alcançou essas amostras através de bacteremia prévia.

Estudo prévio pesquisou, através de Reação em Cadeia da Polimerase, a presença de DNA de bactérias orais em amostras de artérias carótidas obtidas através de necropsia

[Lehtiniemi et al., 2005]. Porém, os autores não limitaram idade ou causa da morte para coleta de amostras, que apresentaram características histológicas de lesões ateroscleróticas insipientes. Foram identificadas diversas bactérias orais, incluindo *Streptococcus salivarius*, *Lactobacillus sp.*, *Actinomyces odontolyticus* e *Micrococcus sp.*, sugerindo que as bactérias adentraram a corrente sanguínea através de bacteremia.

Apesar de a presença de bactérias em amostras de placas ateroscleróticas não descartar a possibilidade de aprisionamento destas em placas já formadas, alguns autores consideram improvável que essas bactérias sejam inofensivas. Sob condições favoráveis, micro-organismos invasores geralmente se multiplicam e causam danos aos tecidos [Da Silva et al., 2003]. Portanto, detecção de bactérias em placas ateroscleróticas sugere que as mesmas podem estar associadas à doença vascular.

Para esclarecer essa questão, tentativa de cultura de bactérias orais a partir de amostras de placas ateroscleróticas foi realizada, obtendo-se resultados negativos [Fiehn et al., 2005; Padilla et al., 2006]. Outros autores utilizaram microscopia eletrônica para identificação de bactérias em amostras de placas ateroscleróticas de aneurisma de aorta, visualizando bactérias com diferentes morfologias, incluindo coccus, bacilos e treponema, além de macrófagos fagocitando essas bactérias. Segundo os autores, esses achados sugerem que as bactérias presentes nos aneurismas estavam viáveis e podem ter contribuído para a resposta inflamatória do tecido, fator importante para a formação do aneurisma [Da Silva et al., 2003; Armingohar et al., 2014].

O presente estudo identificou o *S. mutans* através de Reação em Cadeia da Polimerase, em todas as placas ateroscleróticas (100,0%), uma frequência superior à detectada nos poucos estudos que investigaram a presença dessa bactéria na amostra pesquisada (62,8% a 74,0%) [Kozarov et al., 2006; Nakano et al., 2006a; Nakano et al., 2007; Nakano et al., 2009]. Essa grande variação pode ser explicada pela utilização de diferentes técnicas para detecção de patógenos, utilização de diferentes *primers* para uma mesma bactéria, em estudos com Reação em Cadeia da Polimerase, diferenças quanto a critérios de inclusão e de exclusão da amostra e número variável da amostra.

Diante dos questionamentos sobre a identificação de DNA bacteriano de *S. mutans* em amostras doentes e saudáveis, os autores do presente trabalho utilizaram outras metodologias para identificação dessas bactérias: coloração de Giemsa e Imuno-histoquímica.

Para nosso conhecimento, este é o primeiro estudo que pesquisa a presença de *S. mutans* em placas ateroscleróticas através de imuno-histoquímica, e essa bactéria foi imunolocalizada em todas as amostras. Além disso, células fagocitárias também se

apresentaram positivas para *S. mutans*. Os vasos sadios, por outro lado, apesar de positivos para *S. mutans* através de Reação em Cadeia da Polimerase, foram negativos para esse anticorpo, demonstrando a diferença de sensibilidade das técnicas. Esse achado reforça a hipótese de que, nas amostras sadias, existia pouca quantidade de DNA bacteriano ou fragmento de bactéria, detectável apenas pela técnica mais sensível.

A imuno-histoquímica foi um dos primeiros métodos utilizados para identificação de micro-organismos em placas ateroscleróticas, incluindo *C. pneumoniae*, cytomegalovirus, e HSV-1, além de bactérias orais como *P. gingivalis* e *Streptococcus sanguis* [Chiu, 1999]. Estudo de Chiu [1999] correlacionou a localização das bactérias com características histopatológicas da placa, mostrando que os micro-organismos encontravam-se em áreas de infiltrado inflamatório histiolinfocitário, úlcera e formação de trombo, sugerindo que a presença desses poderia influenciar a morfologia das placas, predispondo à sua ruptura.

No presente estudo, através da coloração de Giemsa, *Streptococcus* foram localizados, principalmente, em áreas de core lipídico, tecido fibroso e calcificação. Além disso, bactérias também foram visualizadas em áreas de infiltrado inflamatório e formação de trombo. Nenhuma bactéria foi visualizada em amostras de vasos sadios através desse método.

Utilização de histoquímica para detectar bactérias orais em tecidos vasculares tem sido pouco realizada. Thawait e colaboradores [2012] utilizaram coloração de gram para identificar bactérias em suspeita de aneurisma infeccioso. A coloração revelou infiltrado de coccus gram positivos e a cultura confirmou tratar-se de *Streptococcus* do grupo B. A utilização de método histoquímico com coloração de Giemsa, no presente estudo, demonstrou que bactérias estão localizadas em áreas de tecido doente. Além disso, as bactérias foram detectadas no centro das amostras, e não na periferia destas. Esses achados fornecem evidências de que esses micro-organismos estavam presentes na placa aterosclerótica intravascular, não podendo ser considerados contaminação da amostra.

Diversos estudos *in vitro* têm demonstrado que algumas cepas de *S. mutans* estão associadas a importantes mecanismos de virulência relacionados a doenças vasculares [Nakano et al., 2005; Nemoto et al., 2008; Kesavalu et al., 2012; Negrini et al., 2012]. A capacidade de *S. mutans* de se adaptar a estresses do ambiente, durante colonização do hospedeiro [Negrini et al., 2012], e sobreviver na corrente sanguínea durante até 72 horas (período maior que outras bactérias) [Nakano et al., 2005; Nemoto et al., 2008], associada à sua baixa susceptibilidade à fagocitose por polimorfonucleares [Tsuda et al., 2000; Nemoto et al., 2008; Jung et al., 2009] é fato crucial para essa aumentada virulência.

Outros estudos *in vitro* verificaram que *S. mutans* possui a capacidade de se aderir a proteínas de matriz extracelular (colágeno tipo 1) [Nomura et al., 2012], induzir agregação plaquetária [Nakano et al., 2005; Matsumoto-Nakano et al., 2009], invadir células endoteliais humanas [Abranches et al., 2009; Nagata et al., 2011], e induzir o aumento de produção de citocinas fortemente associadas à patogênese da aterosclerose, como IL-1, IL-6 e proteína quimioatrativa de monócitos 1 (MCP-1) [Nagata et al., 2011]. Além disso, essas bactérias podem induzir a formação de macrófagos espumosos, que estão relacionados diretamente ao desenvolvimento dessa doença [Kuramitsu et al., 2001; Nakano et al., 2006b; Jung et al., 2009].

No presente estudo, todas as amostras de placa aterosclerótica e vasos sadios foram positivas para *S. mutans* através de Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real. No entanto, apenas as placas ateroscleróticas apresentaram positividade para *S. mutans* através de imunohistoquímica. A colonização de *Streptococcus*, detectada através de coloração de Giemsa, se deu em áreas de core lipídico, tecido fibroso e calcificação. Diante dos resultados encontrados, sugere-se que, nas placas ateroscleróticas, os micro-organismos encontraram ambiente favorável para sua proliferação.

Agradecimentos

Os autores agradecem à equipe de profissionais do Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC), Hospital de Messejana Dr. Carlos Alberto Studart Gomes, Perícia Forense do Estado do Ceará (PEFOCE), Laboratórios de Citogenética Humana e Genética Humana e Médica da Universidade Federal do Pará (UFPA) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo auxílio na realização desta pesquisa e concessão de bolsa de estudo de pós-graduação.

F.B.S. foi responsável pela concepção do estudo, análise histomorfológica, imunohistoquímica e histoquímica das amostras, leitura crítica e aprovação da versão final do artigo. C.P.F.F. foi responsável pela concepção do estudo, coleta das amostras, análise molecular, redação do artigo e aprovação da versão final do artigo.

Referências

Abranches J, Zeng L, Belanger M, Rodrigues PH, Simpson-Haidaris PJ, Akin D, Dunn Jr. WA, Progulske-Fox A, Burne RA: Invasion of human coronary artery endothelial cells by *Streptococcus mutans* OMZ175. *Oral Microbiol Immunol* 2009;24:141–145.

Aimetti M, Romano F, Nesi F: Microbiologic analysis of periodontal pockets and carotid atheromatous plaques in advanced chronic periodontitis patients. *J Periodontol* 2007;78:1718–23.

Aquino ARL, Lima KC, Paiva MS, Rôças IN, Siqueira JF: Molecular survey of atheromatous plaques for the presence of DNA from periodontal bacterial pathogens, archaea and fungi. *J Periodontal Res* 2011;46:303–309.

Armingohar Z, Jørgensen JJ, Kristoffersen AK, Abesha-Belay E, Olsen I: Bacteria and bacterial DNA in atherosclerotic plaque and aneurysmal wall biopsies from patients with and without periodontitis. *J Oral Microbiol* 2014;6:1–13.

Barcia JJ: The Giemsa stain: its history and applications. *Int J Surg Pathol* 2007;15:292–6.

Cairo F, Gaeta C, Dorigo W, Oggioni MR, Pratesi C, Pini Prato GP, Pozzi G: Periodontal pathogens in atheromatous plaques. A controlled clinical and laboratory trial. *J Periodontal Res* 2004;39:442–446.

Chiu B: Multiple infections in carotid atherosclerotic plaques. *Am Hear J* 1999;138:S534-6.

Da Silva RM, Lingaas PS, Geiran O, Tronstad L, Olsen I: Multiple bacteria in aortic aneurysms. *J Vasc Surg* 2003;38:1384–1389.

Demmer RT, Desvarieux M: Periodontal infections and cardiovascular disease: the heart of the matter. *J Am Dent Assoc* 2006;137 Suppl:14S–20S; quiz 38S.

Eberhard J, Stump N, Winkel A, Schimpf C, Bisdas T, Orzak P, Teebken OE, Haverich A, Stiesch M: *Streptococcus mitis* and *Gemella haemolysans* were simultaneously found in

atherosclerotic and oral plaques of elderly without periodontitis - a pilot study. *Clin Oral Investig* 2017; 21: 447-452.

Fernandes CP, Oliveira FAF, Silva PGDB, Alves APNN, Mota MRL, Montenegro RC, Burbano RMR, Seabra AD, Lobo Filho JG, Lima DLF, Soares Filho AWE, Sousa FB: Molecular analysis of oral bacteria in dental biofilm and atherosclerotic plaques of patients with vascular disease. *Int J Cardiol* 2014;174:710–712.

Fiehn NE, Larsen T, Christiansen N, Holmstrup P, Schroeder T V: Identification of periodontal pathogens in atherosclerotic vessels. *J Periodontol* 2005;76:731–736.

Figuro E, Sánchez-Beltrán M, Cuesta-Frechoso S, Tejerina JM, del Castro JA, Gutiérrez JM, Herrera D, Sanz M: Detection of Periodontal Bacteria in Atheromatous Plaque by Nested Polymerase Chain Reaction. *J Periodontol* 2011;82:1469–1477.

Gaetti-Jardim E, Marcelino SL, Feitosa ACR, Romito GA, Avila-Campos MJ: Quantitative detection of periodontopathic bacteria in atherosclerotic plaques from coronary arteries. *J Med Microbiol* 2009;58:1568–1575.

Haraszthy VI, Zambon JJ, Trevisan M, Zeid M, Genco RJ: Identification of periodontal pathogens in atheromatous plaques. *J Periodontol* 2000;71:1554–1560.

Hsu SM, Raine L: Protein A, Avidin, and Biotin in Immunohistochemistry. *J Histochem citochemistry* 1981;29:1349–1353.

Humphrey LL, Fu R, Buckley DI, Freeman M, Helfand M: Periodontal disease and coronary heart disease incidence: A systematic review and meta-analysis. *J Gen Intern Med* 2008;23:2079–2086.

Johnston SC, Zhang H, Messina LM, Lawton MT, Dean D: Chlamydia pneumoniae burden in carotid arteries is associated with upregulation of plaque interleukin-6 and elevated C-reactive protein in serum. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:2648–2653.

Jung CJ, Zheng QH, Shieh YH, Lin CS, Chia JS: Streptococcus mutans autolysin AtIA is a fibronectin-binding protein and contributes to bacterial survival in the bloodstream and virulence for infective endocarditis. *Mol Microbiol* 2009;74:888–902.

Junqueira L, Carneiro J: *Histologia Básica*, 12th ed., Guanabara Koogan, 2013.

Kesavalu L, Lucas AR, Verma RK, Liu L, Dai E, Sampson E, Progulske-Fox A: Increased atherogenesis during *Streptococcus mutans* infection in ApoE-null mice. *J Dent Res* 2012;91:255–60.

Kozarov E, Sweier D, Shelburne C, Progulske-Fox A, Lopatin D: Detection of bacterial DNA in atheromatous plaques by quantitative PCR. *Microbes Infect* 2006;8:687–693.

Kuramitsu HK, Qi M, Kang IC, Chen W: Role for periodontal bacteria in cardiovascular diseases. *Ann Periodontol* 2001;6:41–7.

Kurihara N, Inoue Y, Iwai T, Umeda M, Huang Y, Ishikawa I: Detection and localization of periodontopathic bacteria in abdominal aortic aneurysms. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2004;28:553–558.

Lastas A, Graziene V, Barkauskas E, Salkus G, Rimkevicius A: Carotid artery atherosclerotic plaque: clinical and morphological-immunohistochemical correlation. *Med Sci Monit* 2004;10:CR606-14.

Lehtiniemi J, Karhunen PJ, Goebeler S, Nikkari S, Nikkari ST: Identification of different bacterial DNAs in human coronary arteries. *Eur J Clin Invest* 2005;35:13–16.

Lovett JK, Gallagher PJ, Hands LJ, Walton J, Rothwell PM: Histological correlates of carotid plaque surface morphology on lumen contrast imaging. *Circulation* 2004;110:2190–2197.

Mahendra J, Mahendra L, Kurian VM, Jaishankar K, Mythilli R: 16S rRNA-based detection of oral pathogens in coronary atherosclerotic plaque. *Indian J Dent Res* 2010;21:248–252.

Mahendra J, Mahendra L, Nagarajan A, Mathew K: Prevalence of eight putative periodontal pathogens in atherosclerotic plaque of coronary artery disease patients and comparing them with noncardiac subjects: A case-control study. *Indian J Dent Res* 2015;26:189–195.

Marques da Silva R, Caugant DA, Eribe ERK, Aas JA, Lingsaas PS, Geiran O, Tronstad L, Olsen I: Bacterial diversity in aortic aneurysms determined by 16S ribosomal RNA gene analysis. *J Vasc Surg* 2006;44:1055–1060.

Matsumoto-Nakano M, Tsuji M, Inagaki S, Fujita K, Nagayama K, Nomura R, Ooshima T: Contribution of cell surface protein antigen c of *Streptococcus mutans* to platelet aggregation. *Oral Microbiol Immunol* 2009;24:427–430.

Nagata E, De Toledo A, Oho T: Invasion of human aortic endothelial cells by oral viridans group streptococci and induction of inflammatory cytokine production. *Mol Oral Microbiol* 2011;26:78–88.

Nakano K, Fujita K, Nishimura K, Nomura R, Ooshima T: Contribution of biofilm regulatory protein a of *Streptococcus mutans*, to systemic virulence. *Microbes Infect* 2005;7:1246–1255.

Nakano K, Inaba H, Nomura R, Nemoto H, Takeda M, Yoshioka H, Matsue H, Takahashi T, Taniguchi K, Amano A, Ooshima T: Detection of cariogenic *Streptococcus mutans* in extirpated heart valve and atheromatous plaque specimens. *J Clin Microbiol* 2006a;44:3313–3317.

Nakano K, Tsuji M, Nishimura K, Nomura R, Ooshima T: Contribution of cell surface protein antigen PAc of *Streptococcus mutans* to bacteremia. *Microbes Infect* 2006b;8:114–121.

Nakano K, Nemoto H, Nomura R, Homma H, Yoshioka H, Shudo Y, Hata H, Toda K, Taniguchi K, Amano A, Ooshima T: Serotype distribution of *Streptococcus mutans* a pathogen of dental caries in cardiovascular specimens from Japanese patients. *J Med Microbiol* 2007;56:551–556.

Nakano K, Nemoto H, Nomura R, Inaba H, Yoshioka H, Taniguchi K, Amano A, Ooshima T: Detection of oral bacteria in cardiovascular specimens. *Oral Microbiol Immunol* 2009;24:64–68.

Negrini TC, Duque C, Vizoto NL, Stipp RN, Mariano FS, Höfling JF, Graner E, Mattos-Graner RO: Influence of VicRK and CovR on the interactions of *Streptococcus mutans* with phagocytes. *Oral Dis* 2012;18:485–493.

Nemoto H, Nakano K, Nomura R, Ooshima T: Molecular characterization of *Streptococcus mutans* strains isolated from the heart valve of an infective endocarditis patient. *J Med Microbiol* 2008;57:891–895.

Nomura R, Nakano K, Naka S, Nemoto H, Masuda K, Lapirattanakul J, Alaluusua S, Matsumoto M, Kawabata S, Ooshima T: Identification and characterization of a collagen-binding protein, Cbm, in *Streptococcus mutans*. *Mol Oral Microbiol* 2012;27:308–323.

Nomura R, Otsugu M, Naka S, Teramoto N, Kojima A, Muranaka Y, Matsumoto-Nakano M, Ooshima T, Nakano K: Contribution of the interaction of *Streptococcus mutans* serotype k strains with fibrinogen to the pathogenicity of infective endocarditis. *Infect Immun* 2014;82:5223–5234.

Padilla C, Lobos O, Hubert E, Gonza C, Matus S, Pereira M, Hasbun S, Descouvieres C: Periodontal pathogens in atheromatous plaques isolated from patients with chronic periodontitis 2006;350–353.

Pucar A, Milasin J, Lekovic V, Vukadinovic M, Ristic M, Putnik S, Kenney EB: Correlation between atherosclerosis and periodontal putative pathogenic bacterial infections in coronary and internal mammary arteries. *J Periodontol* 2007;78:677–82.

Rath SK, Mukherjee M, Kaushik R, Sen S, Kumar M: Periodontal pathogens in atheromatous plaque. *Indian J Pathol Microbiol* 2014;57:259–264.

Renko J, Lepp PW, Oksala N, Nikkari S, Nikkari ST: Bacterial signatures in atherosclerotic lesions represent human commensals and pathogens. *Atherosclerosis* 2008;201:192–197.

Rovery C, Greub G, Lepidi H, Casalta J, Habib G, Collart F, Raoult D: PCR Detection of Bacteria on Cardiac Valves of Patients with Treated Bacterial Endocarditis. *J Clin Microbiol* 2005;43:163–167.

Sanz M, Lau L, Herrera D, Morillo JM, Silva A: Methods of detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythensis* in periodontal microbiology, with special emphasis on advanced molecular techniques: A review. *J Clin Periodontol* 2004;31:1034–1047.

Swart D, Panday S: The surveillance and monitoring of tobacco control in South Africa. 2003;12.

Szulc M, Kustrzycki W, Janczak D, Michalowska D, Baczynska D, Radwan-oczko M: Presence of Periodontopathic Bacteria DNA in Atheromatous Plaques from Coronary and Carotid Arteries DOI: 10.1155/2015/825397.

Thawait SK, Akay A, Jhirad RH, El-Daher N: Group B streptococcus mycotic aneurysm of the abdominal aorta: report of a case and review of the literature. *Yale J Biol Med* 2012;85:97–104.

Tsuda H, Yamashita Y, Toyoshima K, Yamaguchi N, Oho T, Nakano Y: Role of Serotype-Specific Polysaccharide in the Resistance of *Streptococcus mutans* to Phagocytosis by Human Polymorphonuclear Leukocytes. *Society* 2000;68:644–650.

Wilson K: Preparation of genomic DNA from bacteria; in Ausubel FM (ed): *Current Protocols in Molecular Biology*. 2001, p 2.4.1-2.4.5.

Zaremba M, Górska R, Suwalski P, Kowalski J: Evaluation of the incidence of periodontitis-associated bacteria in the atherosclerotic plaque of coronary blood vessels. *J Periodontol* 2007;78:322–7.

Zaremba M, Górska R, Suwalski P, Kowalski J: Periodontitis as a Risk Factor of Coronary Heart Diseases? *Adv Med Sci* 2006;51:34–39.

Zhang YM, Zhong LJ, Liang P, Liu H, Mu LT, Ai SKE: Relationship between microorganisms in coronary atheromatous plaques and periodontal pathogenic bacteria. *Chin Med J (Engl)* 2008;121:1595–1597.

Tabelas

Tabela 1: *Primers* e sonda confeccionados para identificação de *S. mutans* em placas ateroscleróticas e vasos sadios dos pacientes do presente estudo. Fortaleza-CE, Brasil, 2017.

Micro-organismo	Primer/Sonda TaqMan (sequencia 5'-3')
<i>S. mutans</i>	
Foward	GGCTCTCTGGTCTGTCCTGA
Reverse	TCGTTTACGGCGTGGACTAC
Sonda	FAM-CACGCTTTCGAGCCTC-NFQ

Tabela 2: Caracterização demográfica, histórico médico e de fumo dos pacientes do presente estudo. Fortaleza-CE, Brasil, 2017.

Variáveis	Amostras
Demográficas	12 pacientes
Idade	68,9± 10,5 (45-82)
Sexo	
Masculino	6 (50,0)
Feminino	6 (50,0)
Diagnóstico Clínico	13 placas ateroscleróticas
Estenose de carótida	8 (61,5)
Aneurisma de Aorta	5 (38,5)
Comorbidades Médicas	12 pacientes*
HAS	8 (66,7)
Dislipidemia	7 (58,3)
Diabetes	2 (16,7)
Eventos vasculares isquêmicos	5 (41,7)**
Outras	4 (33,3)
Nenhuma	3 (25,0)
Histórico de Fumo	12 pacientes
Fumante	1 (8,3)
Ex-fumante	5 (41,7)
Nunca fumou	6 (50,0)

HAS, hipertensão arterial sistêmica. Dados quantitativos expressos em forma de “Média±DP (mínima-máxima)”. Dados qualitativos expressos em forma de “n (%)”.

* Comorbidades podem estar associadas ($n_{\text{comorbidades}}=26$).

** Eventos vasculares Isquêmicos, Acidente Vascular Cerebral prévio, Infarto Agudo do Miocárdio prévio, angina e Doença Arterial Obstrutiva Periférica.

Tabela 3: Caracterização histológica de placas ateroscleróticas e presença de bactérias do gênero *Streptococcus* nas amostras. Fortaleza-CE, Brasil, 2017.

Variáveis	n	(%)
Amostra total	13	100,0
Análise histológica		
Formação de trombo	11	84,6
Core lipídico	8	61,5
Tecido fibroso	13	100,0
Calcificação	12	92,3
Células inflamatórias	10	76,9
Presença de <i>Streptococcus</i>*	13	100,0
Presença de <i>Streptococcus</i> segundo as alterações histológicas das placas ateroscleróticas.		
Formação de trombo (n=11)	7	63,6
Core lipídico (n=8)	8	100,0
Tecido fibroso (n=13)	13	100,0
Calcificação (n=12)	9	75,0
Células inflamatórias (n=10)	7	70,0

* Coloração de Giemsa.

Figuras

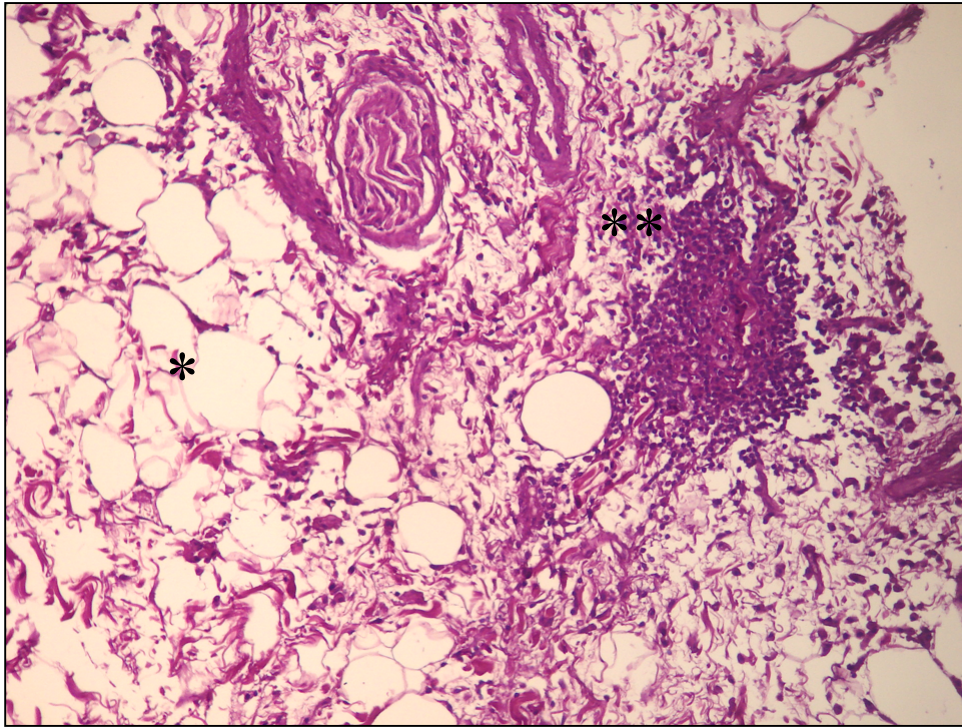


Figura 1 - Fotomicrografia de placa aterosclerótica exibindo core lipídico com adipócitos (*) e infiltrado inflamatório (**). HE, 200X.

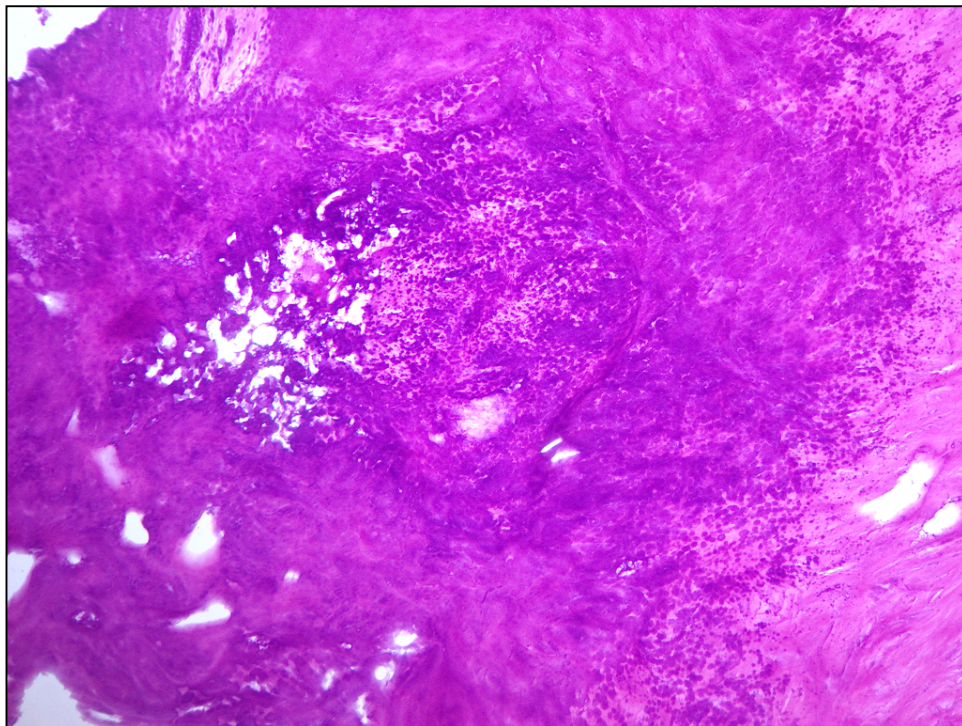


Figura 2 - Fotomicrografia de placa aterosclerótica exibindo extensa área de calcificação. HE, 200X.

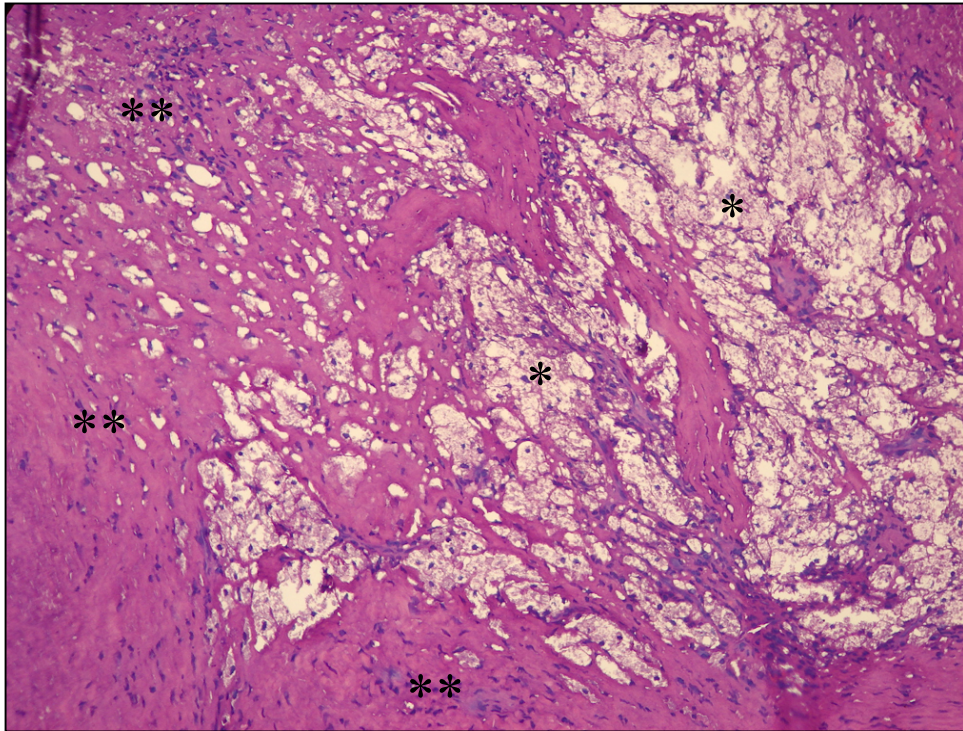


Figura 3 - Fotomicrografia de placa aterosclerótica exibindo core lipídico com macrófagos espumosos (*) e áreas de fibrose (**). HE, 400X.

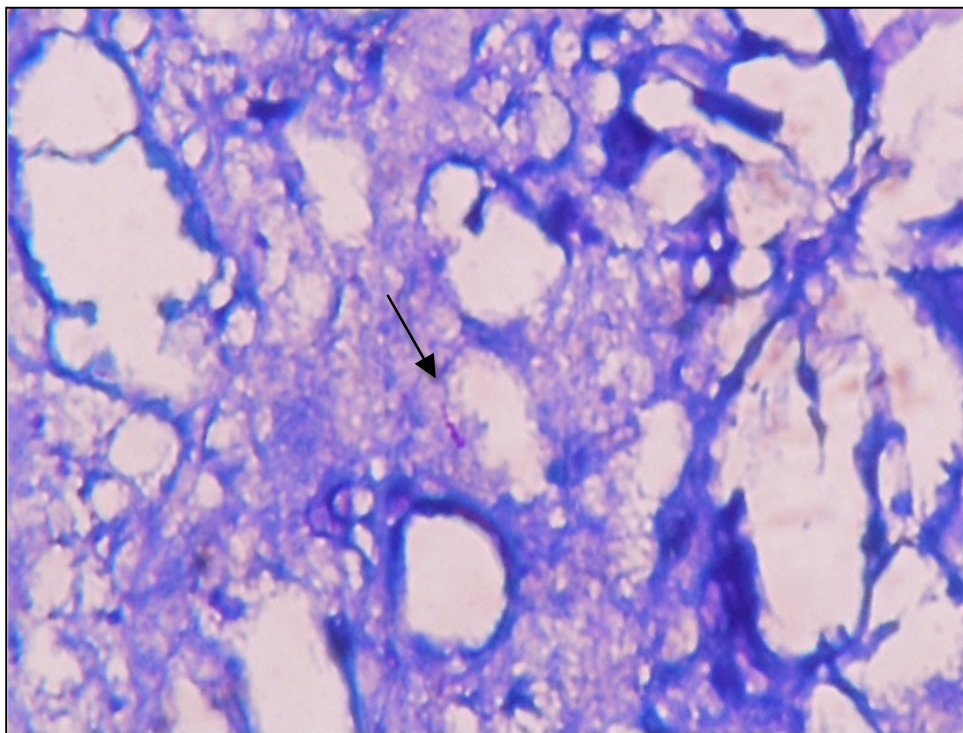


Figura 4 - Fotomicrografia de placa aterosclerótica exibindo *Streptococcus* (seta) em área de core lipídico. Coloração de Giemsa. 1000X, óleo de imersão.

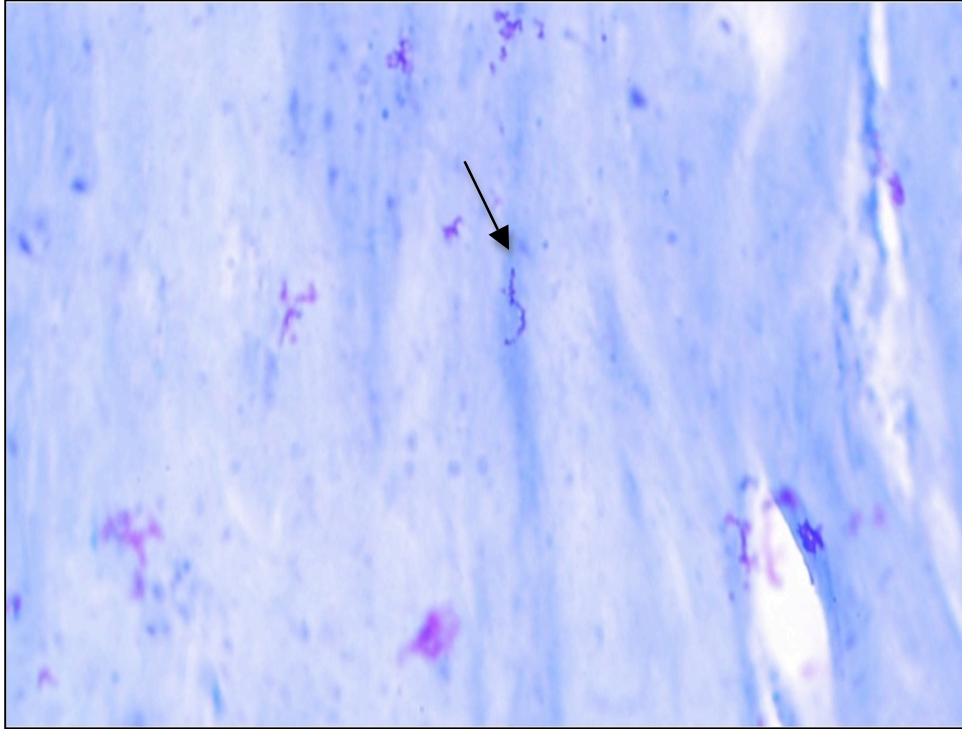


Figura 5 - Fotomicrografia de placa aterosclerótica exibindo *Streptococcus* (seta) em área de fibrose. Coloração de Giemsa. 1000X, óleo de imersão.

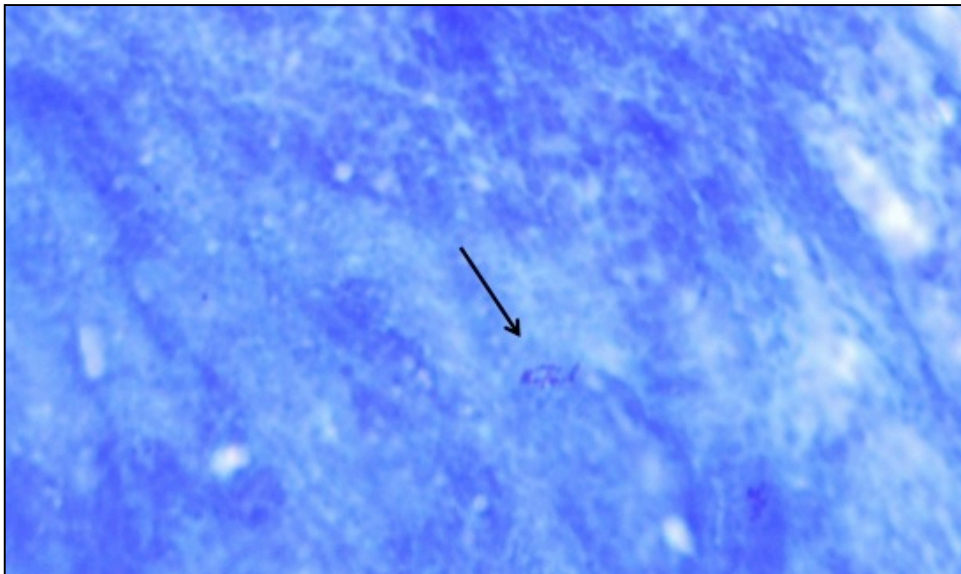


Figura 6 - Fotomicrografia de placa aterosclerótica exibindo *Streptococcus* (seta) em área de calcificação. Coloração de Giemsa. 1000X, óleo de imersão.

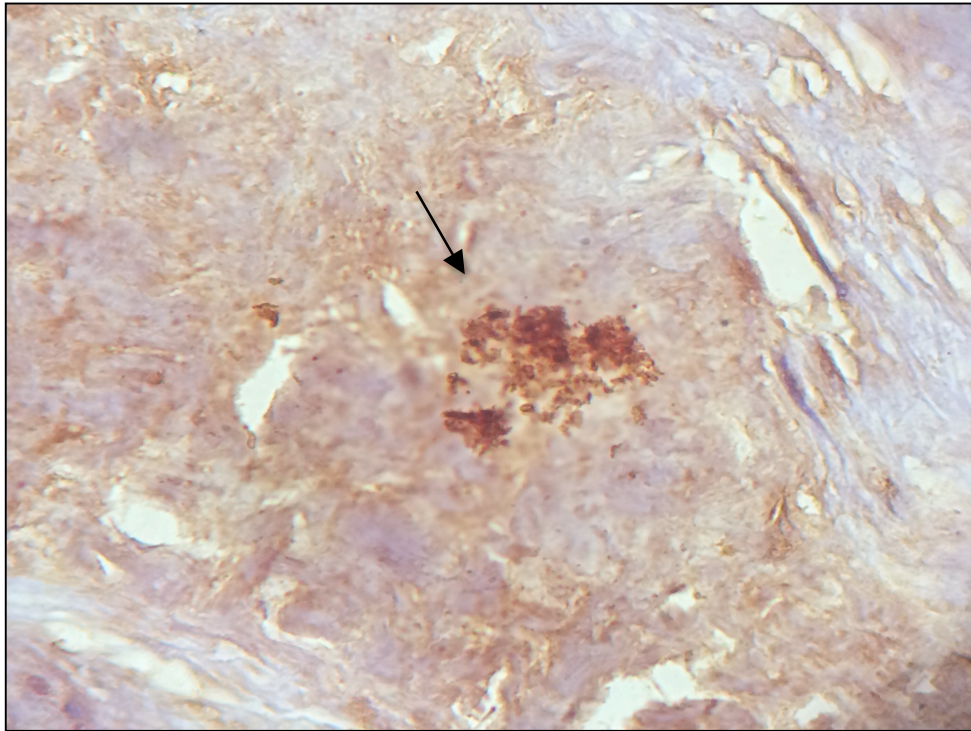


Figura 7 – Fotomicrografia de placa aterosclerótica exibindo *S. mutans* (seta). IHQ, 1000X, óleo de imersão.

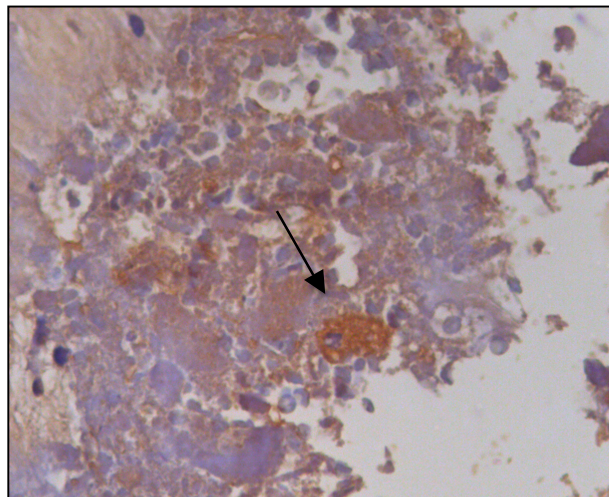


Figura 8 - Fotomicrografia de placa aterosclerótica exibindo macrófago positivo para *S. mutans*. IHQ, 400X.

3.2 CAPÍTULO 2

Expressão imuno-histoquímica de *Streptococcus mutans*, osteopontina, CD61 e marcadores inflamatórios em placas ateroscleróticas de pacientes com doença vascular

Autores

Clarissa Pessoa Fernandes Forte¹, Fabrício Bitu Sousa².

Autor de Correspondência: Clarissa Pessoa Fernandes Forte

Endereço: Rua Nunes Valente, 1817, ap. 1004, Aldeota – Fortaleza, Ceará, Brasil. CEP: 60125-035. Telefones: 55-85-996759825

e-mail: clarissa_pf@hotmail.com

Conflitos de Interesse

Os autores declaram que não existem conflitos de interesse.

Palavras-chave

Aterosclerose, bacteremia, *Streptococcus mutans*, Imuno-histoquímica, inflamação.

¹ Mestre em Odontologia. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem. Universidade Federal do Ceará. Esse autor se responsabiliza por todos os aspectos de confiabilidade e pela falta de viés dos dados apresentados e sua interpretação.

² Professor Associado das Disciplinas de Patologia Bucal e Estomatologia. Departamento de Clínica Odontológica. Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem. Universidade Federal do Ceará. Esse autor se responsabiliza por todos os aspectos de confiabilidade e pela falta de viés dos dados apresentados e sua interpretação.

Resumo

Introdução: O *Streptococcus mutans* (SM) tem sido identificado em placas ateroscleróticas em alta frequência. Estudos laboratoriais tem pesquisado a relação dessa bactéria com a ativação de marcadores inflamatórios e trombogênicos, que são indiretamente associados à patogênese da aterosclerose. Porém, o mecanismo patogênico dessa doença ainda não está completamente elucidado, e o papel de bactérias orais precisa ser amplamente investigado.

Objetivo: Realizar estudo da expressão imunohistoquímica de *S. mutans*, osteopontina, CD61 e marcadores inflamatórios em placas ateroscleróticas e tecido arterial sadio.

Metodologia: Estudo imunohistoquímico para SM, IL-1 β , TNF- α , PCR, osteopontina, fibrinogênio e CD61 (estreptavidina-biotina-peroxidase) foi realizado em 13 amostras de placa aterosclerótica coletadas de pacientes com doença vascular. Dez artérias sadias (controle) obtidas em procedimento de necropsia foram incluídas no estudo.

Resultados: Todas as 13 amostras de placa aterosclerótica, imunopositivas para SM, foram positivas para os anticorpos fibrinogênio, IL-1 β , osteopontina e CD61, enquanto que imunoeexpressão para PCR e TNF- α foi evidenciada em 12 amostras (92,3%). A reatividade para IL-1 β , TNF- α , Osteopontina e CD61 não foi encontrada nas amostras-controle, imunonegativas para SM, porém, em algumas, observou-se imunomarcção para fibrinogênio (60,0%) e PCR (50,0%).

Conclusão: Observou-se, no presente estudo, imunoeexpressão positiva de TNF- α , IL-1 β , fibrinogênio, PCR, osteopontina e CD61 em amostras de placa aterosclerótica imunopositivas para SM, o que sugere possível relação com a aterosclerose. Porém, estudos futuros são necessários para fornecer maiores informações sobre uma possível associação entre grau de inflamação das placas ateroscleróticas e colonização por essa bactéria.

Introdução

A aterosclerose, principal causa da doença arterial coronariana (DAC), é caracterizada pela formação de placas de ateromas no interior dos vasos sanguíneos, comprometendo a vascularização tecidual. É uma doença inflamatória associada a fatores de risco tradicionais como hiperlipidemia, fumo e hipertensão e, mais recentemente, tem sido investigada sua associação com agentes infecciosos, como *Chlamydomphila pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Helicobacter pylori*, e bactérias orais como *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*), *Treponema denticola* (*T. denticola*), *Prevotella intermedia* (*P. intermedia*) e *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) [1–7]. Além disso, está fortemente associada à calcificação das placas arteriais [8].

A condição de saúde bucal fornece múltiplas oportunidades para repetida disseminação de patógenos orais no sangue. É sabido que procedimentos odontológicos invasivos, como extração dentária e raspagem periodontal, são indutores de bacteremia. Além disso, doença gengival aguda tem importante papel na propagação hematogênica desses patógenos durante procedimentos odontológicos não invasivos, como profilaxia dentária e restaurações, e práticas diárias de higiene oral, como escovação, utilização do fio dental, e a própria mastigação [9–11].

Estudos investigando mecanismos diretos que ligam infecções orais a aterosclerose vêm sendo desenvolvidos, e patógenos cariogênicos e periodontais têm demonstrado, *in vitro*, a capacidade de invadir e destruir células endoteliais, favorecer a aderência de leucócitos no endotélio vascular e promover a transformação de macrófagos em células espumosas, eventos iniciadores dessas doenças [12–16].

O *S. mutans*, bactéria cariogênica gram-positiva e importante componente de biofilmes orais cariogênicos, tem sido identificado em placas ateroscleróticas em alta frequência (62,8% a 100,0%) [6,13,17–19]. Estudos laboratoriais têm pesquisado a relação de *S. mutans* com a ativação de alguns marcadores inflamatórios e trombogênicos, como IL-1 β , TNF- α e fibrinogênio [20,21], que são indiretamente associados à patogênese da aterosclerose [22,23]. Porém, o mecanismo patogênico do desenvolvimento de placas ateroscleróticas ainda não está elucidado, e o papel de bactérias orais precisa ser amplamente investigado.

Portanto, o presente estudo tem o propósito de avaliar imunomarcagem para *S. mutans* em amostras de placas ateroscleróticas, correlacionando com a expressão de marcadores inflamatórios, osteopontina e CD61.

Materiais e Métodos

Aspectos éticos

De acordo com a resolução CNS 466/12 que regulamenta pesquisas envolvendo seres humanos, o projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa de seres humanos do Hospital Universitário Walter Cantídio (protocolo 118.11.11)(Anexo B), da Universidade Federal do Ceará (CAAE: 45254215.3.0000.5054)(Anexo D) e Perícia Forense do Estado do Ceará (CAAE: 25663514.4.0000.5054)(Anexo C).

Caracterização da amostra

Participaram do estudo pacientes diagnosticados com estenose de carótida ou aneurisma de aorta e agendados, consecutivamente, para cirurgia vascular em dois centros cirúrgicos de referência em Cardiologia. Como grupo controle, dez vasos sanguíneos (artérias carótida e aorta) obtidos de indivíduos saudáveis submetidos a procedimento de necropsia, na Perícia Forense do Estado do Ceará (PEFOCE), foram coletados. Como critérios de inclusão, foram considerados indivíduos com até 25 anos de idade, saudáveis, que morreram por morte violenta. Foram excluídos aqueles que morreram por causas cardíacas, como infarto agudo do miocárdio, enforcados, afogados ou por asfixia, que apresentaram perfuração cardíaca por arma de fogo, que morreram por septicemia e muito tempo após o início da causa básica.

Coleta da amostra

Um total de 13 placas ateroscleróticas foram coletadas, de maneira asséptica, pelo pesquisador (C.P.F.F.), com auxílio do cirurgião vascular, durante as cirurgias de endarterectomia de carótida e aneurisma de aorta abdominal ou torácica. Fragmentos de cada amostra foram fixados em formol 10% tamponado e incluídos em parafina para posterior análises histomorfológica (hematoxilina/eosina – HE) e imuno-histoquímica (técnica da estreptavidina-biotina-peroxidase).

Fragmentos de dez artérias carótida e aorta provenientes de indivíduos submetidos a necropsia foram coletados pelo pesquisador (C.P.F.F.), com auxílio dos médicos legistas, até dez horas após o óbito, na PEFOCE, e mantidos em formol 10% tamponado para posterior

análises histomorfológica (hematoxilina/eosina – HE) e imuno-histoquímica (técnica da estreptavidina-biotina-peroxidase).

Análise histomorfológica

Inicialmente, os blocos foram cortados em espessura de 3 µm e corados pela técnica de hematoxilina/eosina conforme protocolo adaptado de Junqueira e Carneiro [24] para análise histomorfológica. Um patologista (F.B.S.), que não participou da coleta das amostras, avaliou as placas ateroscleróticas e vasos saudáveis quanto às características próprias de aterosclerose severa, utilizando os parâmetros presente (+) ou ausente (-) para cada uma das seguintes características: formação de trombo, core lipídico, tecido fibroso, calcificação e células inflamatórias [25].

Análise Imuno-histoquímica

As reações de imuno-histoquímica foram realizadas em cortes histológicos de 3 µm de espessura, dispostos em lâminas histológicas silanizadas, seguindo-se a técnica de estreptavidina-biotina-peroxidase modificada [26]. Anticorpos primários *S. mutans* (1:100, ab 31181, Abcam Inc., Cambridge, MA, USA), IL-1β (1:100, ab 9787, Abcam Inc., Cambridge, MA, USA), TNF-α (1:50, ab199013, Abcam Inc., Cambridge, MA, USA), fibrinogênio (1:200, ab34269; Abcam Inc., Cambridge, MA, USA), Proteína C-Reativa (1:50, ab65842, Abcam Inc., Cambridge, MA, USA), osteopontina (1:75, ab69498, Abcam Inc., Cambridge, MA, USA) e CD61 (1:50, 2F2, Cell Marque Co., Rocklin, CA, USA) foram utilizados. As lâminas foram incubadas em estufa a 70°C por três horas e, após este período, foram desparafinizadas em xilol e gradientes de álcool. Foi realizada a recuperação antigênica com ácido cítrico, em ambiente de micro-ondas (um ciclo de 12 minutos, contado a partir da ebulição, em potência máxima). Após bloqueio da atividade endógena da peroxidase (solução aquosa de H₂O₂ a 10 V), foi incubado o anticorpo primário, por 12 horas a 4°C em câmara úmida. Foi adicionado o anticorpo secundário biotilado seguido do complexo estreptavidina-biotina-peroxidase, sendo revelado com o cromógeno diaminobenzidina (DAB) (Sigma Co., S. Louis, MO, EUA), tendo o peróxido de hidrogênio como substrato. Após a revelação, as lâminas foram contra-coradas com hematoxilina de Harrys. Para o anticorpo CD61, o sistema automatizado foi utilizado. Foi realizada recuperação antigênica no equipamento com tampão ER1, protocolo ARGOS 1. Após bloqueio da atividade

endógena da peroxidase, foi incubado o anticorpo primário por 30 minutos. O polímero Bond Max Novolink foi o sistema de revelação utilizado.

Como controle negativo, foi omitido o anticorpo primário, não sendo evidenciada nenhuma marcação nos casos avaliados. Para controle positivo, foram utilizadas as seguintes amostras: para os marcadores IL-1 β e TNF- α , mucosa ulcerada de rato; para fibrinogênio e Proteína C-Reativa, fígado de rato; para CD61, medula óssea humana; e para osteopontina, fibroma ossificante periférico. Para controle positivo do anticorpo *S. mutans*, foi utilizado tecido gengival localizado próximo a cárie dentária de paciente atendido em serviço odontológico ambulatorial.

O estudo microscópico (Olympus CX 41, Olympus®, Shinjuku-ku, Tokyo, Japan) foi realizado por um patologista oral (F.B.S.). Imunomarcção tecidual foi avaliada para IL-1 β , TNF- α , Proteína C-Reativa, fibrinogênio e osteopontina; e celular/citoplasmática para CD61. Os resultados positivos foram expressos em graus de intensidade de marcação, considerando-se leve, moderado e intenso (+ a +++), e em extensão de expressão ao longo da amostra (Focal e Difuso). Avaliou-se P (presença) e A (ausência) de marcação celular apenas para os anticorpos CD61 e *S. mutans* [27]. Para amostras de vasos saudáveis, foi considerada marcação apenas da camada íntima, de acordo com metodologia previamente publicada [28].

Análise estatística

Análise estatística descritiva foi utilizada para caracterizar a amostra. As variáveis demográficas quantitativas foram expressas em forma de média \pm DP. Para tabulação dos dados, foram utilizados os *softwares Microsoft Word e Microsoft Excel para Mac OS X*. As variáveis qualitativas nominais foram expressas como frequência absoluta (frequência relativa).

Resultados

Um total de 12 pacientes, com média de idade de 68,9 \pm 10,5 anos (Média \pm DP) (variação 45-82 anos), foram incluídos no estudo. Destes, 58,3% apresentavam estenose de carótida e 41,7%, aneurisma de aorta. Duas amostras foram coletadas de um mesmo paciente em momentos cirúrgicos diferentes, pois este apresentava estenose de carótida direita e esquerda.

Todas as placas ateroscleróticas apresentaram presença de imunomarcção para *S. mutans* e características histopatológicas de aterosclerose severa. Tecido fibroso (100,0%) e calcificação (92,3%) foram as características mais frequentes, seguidas de formação de trombo (84,6%), células inflamatórias mononucleares dispersas (76,9%) e core lipídico (61,5%) (Tabela 1). Todas as amostras de controle, que não tinham características microscópicas de aterosclerose, apresentaram imunexpressão negativa para essa bactéria.

Análise descritiva dos resultados de imuno-histoquímica para os marcadores utilizados está expressa na tabela 2. Imunexpressão tecidual positiva para fibrinogênio, IL-1 β e osteopontina foi observada em todas as 13 amostras de placa aterosclerótica analisadas (100%), e os anticorpos TNF- α e PCR apresentaram positividade em 12 amostras (92,3%, ambos). Para o fibrinogênio e IL-1 β , a extensão da imunomarcção foi difusa (100%, ambos), sendo predominantemente intensa (84,6%, ambos) a marcação no tecido conjuntivo fibroso e em áreas de calcificação. Expressão tecidual para TNF- α , PCR e osteopontina apresentou-se tanto focal (33,3%, 25,0% e 23,0%, respectivamente) quanto difusa (66,6%, 75,0% e 76,9%, respectivamente) em diferentes espécimes e, quanto ao grau de intensidade de marcação, oscilou entre leve (8,3%, 8,3% e 30,7%, respectivamente), moderado (33,3%, 16,6% e 30,7%, respectivamente) e intenso (58,3%, 75,0% e 38,4%, respectivamente).

Imunomarcção positiva para CD61, indicando presença de agregados de plaqueta, foi observada em todas as amostras de placa aterosclerótica (100%).

Todas as amostras-controle (100%) foram negativas para os anticorpos CD61, TNF- α , osteopontina e IL-1 β ; e parte delas apresentou positividade para PCR (50,0%) e fibrinogênio (60,0%). Das amostras positivas, a expressão de imunomarcção variou entre focal (60,0% e 50,0%, respectivamente) e difusa (40,0% e 50,0%, respectivamente), e o grau de intensidade de marcação entre leve (20,0% e 16,6%, respectivamente), moderado (20,0% e 33,3% respectivamente) e intenso (60,0% e 50,0%, respectivamente). Figuras 1 a 4 apresentam painel imuno-histoquímico dos marcadores citados.

Discussão

A aterosclerose é uma doença multifatorial influenciada por eventos inflamatórios. Após lesão endotelial, células endoteliais expressam moléculas de adesão, e leucócitos (linfócitos T e monócitos) são recrutados para o local. Partículas de lipídio que se acumulam na lesão são fagocitadas por macrófagos, o que resulta no desenvolvimento de macrófagos espumosos e estrias gordurosas. Por fim, células musculares lisas proliferam e,

junto com componentes da matriz extracelular, formam uma cápsula fibrosa que contém a lesão. As células envolvidas na formação de placas ateroscleróticas liberam marcadores inflamatórios, fatores do complemento, quimiocinas e moléculas de adesão que podem contribuir para instabilidade e eventual ruptura da placa [29].

S. mutans tem sido associado a importantes mecanismos de virulência relacionados a doença aterosclerótica [30]. A capacidade de *S. mutans* de se adaptar a estresses do ambiente, durante colonização do hospedeiro [31], e sobreviver na corrente sanguínea durante até 72 horas (período maior que outras bactérias) [32,33], associada à sua baixa susceptibilidade à fagocitose por polimorfonucleares [33–35] é fato crucial para essa aumentada virulência.

No presente estudo, verificou-se a expressão de imunomarcção e o grau de intensidade de marcadores inflamatórios, trombóticos e osteogênicos em placas ateroscleróticas positivas para o anticorpo *S. mutans* e em vasos sanguíneos (aorta e carótida) microscopicamente saudáveis e negativos para essa bactéria através de imuno-histoquímica. As amostras de placa aterosclerótica apresentaram imunoexpressão positiva para todos os anticorpos estudados, enquanto que o grupo-controle foi positivo apenas para fibrinogênio e PCR.

Todas as amostras de placa aterosclerótica foram positivas para fibrinogênio, com marcação predominantemente intensa (84,6%) e difusa (100%). O fibrinogênio é um importante componente da cascata de coagulação, e estudos epidemiológicos têm sugerido que altos níveis de fibrinogênio plasmático estão associados com aumento de risco de doenças cardiovasculares, como doença cardíaca isquêmica e tromboembolismo [36].

O fibrinogênio está envolvido diretamente em diversos processos fisiopatológicos no organismo, como inflamação, aterogênese e trombogênese. Acredita-se que o fibrinogênio infiltra a parede vascular, causa efeitos hemorrágicos, aumenta a reatividade de plaquetas e a formação de trombo [36,37]. O aumento da concentração de fibrinogênio pode estar relacionado à inflamação ou infecção por bactérias como *C. pneumoniae* e *H. pylori* [36]. Recentemente, estudos verificaram que algumas cepas de *S. mutans* são capazes de aumentar a taxa de agregação dessa glicoproteína [21].

A relação entre *S. mutans* e fibrinogênio tem sido objeto de estudos laboratoriais, que verificaram que cepas dessa bactéria são capazes de se ligar a moléculas de matriz extracelular como fibronectina, laminina e colágeno tipo 1, além de fibrinogênio, o que pode ser importante para auxiliar na sua adesão ao tecido vascular e tecido cardíaco lesado [38,39]. Outros autores verificaram que o fibrinogênio é capaz de promover a formação de grande

quantidade de biofilme de *S. mutans* em meios de cultura celular, comparado com meios de cultura sem fibrinogênio, além de aumentar a adesão de *S. mutans* a células endoteliais, configurando uma via de mão dupla [40]. Estudos têm demonstrado que existe uma associação entre a patogenicidade de algumas espécies microbianas, como *S. mutans*, e sua habilidade de formar biofilmes em superfícies sólidas, como tecidos, cateteres ou implantes [41].

No presente estudo, algumas amostras de vasos saudáveis (controle) apresentaram positividade para fibrinogênio (60%), que variou entre marcação leve (16,6%), moderada (33,3%) e intensa (50,0%). Estudo de Smith e colaboradores [42] demonstrou que fibrinogênio e antígeno relacionado ao fibrinogênio estão presentes em placas ateroscleróticas, bem como na camada íntima de artérias normais. Os autores pesquisaram amostras obtidas a partir de cirurgia de reconstrução vascular e de necropsia, não encontrando diferenças na concentração de fibrinogênio entre as amostras, concluindo que existe formação contínua de fibrina e fibrinólise na camada íntima arterial [42].

Todas as amostras de placa aterosclerótica, na atual pesquisa, apresentaram imunopositividade difusa para IL-1 β (100%), com intensidade de marcação variando entre intensa (84,6%) e moderada (15,4%). Para TNF- α , a imunomarcação variou entre focal (33,3%) e difusa (66,6%), sendo, predominantemente, intensa (58,3%). Todas as amostras-controle foram negativas para esses marcadores.

IL-1 β é uma importante citocina do sistema imune e atua estimulando células fagocíticas mononucleares a aumentar a expressão de moléculas de MHC-II para apoiar a função de linfócitos T citotóxicos em ativar o processo de fagocitose de bactérias intracelulares. Contribuindo com a aterosclerose, estimula células endoteliais a expressar moléculas de adesão, ativa linfócitos Th1/CD4 para proliferar e multiplicar seus clones e induz apoptose de células inflamatórias, causando liberação abundante de radicais livres que formam muito LDL oxidado, armazenados nos tecidos subendoteliais [20,43].

TNF- α é uma potente citocina pró-inflamatória que inicia uma cascata de citocinas e aumenta a permeabilidade vascular, o que recruta macrófagos e neutrófilos ao sítio de infecção [20]. É expressa por células apresentadoras de antígeno e leucócitos e tem papel importante na fagocitose de bactérias gram-negativas. Além disso, estimula a secreção de IL-1 β por células mononucleares e, assim como IL-1 β , aumenta a expressão de moléculas de MHC-II em macrófagos, auxiliando na ativação do processo de fagocitose de bactérias intracelulares.

Estudo de Kim e colaboradores [20] examinou a produção de TNF- α e IL-1 β , assim como vias de sinalização através da estimulação de receptores *toll-like* (TLR), induzida por *S. mutans*, em macrófagos de ratos. Esse estudo verificou que *S. mutans* é capaz de induzir a produção de TNF- α e IL-1 β através da estimulação de Fator Nuclear κ B (NF κ B) dependente de TLR2 e TLR4. Outro estudo verificou correlação positiva entre *S. mutans* e concentração de IL-1 β em saliva [44]. Essa relação pode justificar a predominância de marcação intensa e difusa para esses anticorpos no presente estudo.

Apenas uma amostra de placa aterosclerótica apresentou negatividade para TNF- α . Observou-se, nessa amostra, ausência de células inflamatórias, o que pode justificar a imunoposição negativa desse anticorpo.

No presente estudo, todas as placas ateroscleróticas exibiram positividade para CD61, indicando presença de agregados de plaqueta nessas amostras. Porém, as amostras-controle não apresentaram imunoposição para esse anticorpo. CD61 é um anticorpo que marca a subunidade IIIa do complexo glicoproteico heterodimérico IIb/IIIa não covalentemente ligado, presente nas plaquetas humanas e seus precursores [37]. Alguns estudos já reportaram que plaquetas são necessárias para a formação do biofilme do *S. mutans* no plasma, além de aumentarem a aderência desse patógeno às células endoteliais, melhorando a capacidade de invadir essas células [40,45]. Matsumoto-Nakano e colaboradores [14] também investigaram a interação entre as plaquetas e o *S. mutans*, e reportaram que um antígeno proteico de superfície celular (PAC) contribui para a agregação de plaquetas, podendo representar um fator de virulência para doença aterosclerótica. Acredita-se que micro-organismos localizados na parede do vaso, como na atual pesquisa, podem aumentar a inflamação através da interação com plaquetas circulantes [46], e a imunomarcação positiva para CD61 pode reforçar essa teoria.

Sabe-se que marcadores teciduais, como osteopontina e PCR, estão diretamente relacionados à etiopatogênese da aterosclerose. A osteopontina é uma proteína não-colagenosa associada a formação de osso e mineralização que se liga fortemente ao cálcio e à hidroxiapatita. Estudo *in vitro* demonstrou que essa proteína pode ser expressa por células musculares lisas derivadas de artérias [47].

Fitzpatrick e colaboradores [8] demonstraram que placas ateroscleróticas com áreas de calcificação foram positivas para osteopontina através de imuno-histoquímica, enquanto que paredes de artérias normais, sem calcificação, foram negativas para esse marcador. Acredita-se que a osteopontina possa contribuir para o desenvolvimento da aterosclerose, sendo excretada por macrófagos espumosos e recrutando células de músculo

liso. Porém, ainda não se sabe ao certo como o processo de calcificação de placas ateroscleróticas ocorre nem porque apenas algumas placas ateroscleróticas calcificam [48].

A PCR é um marcador inflamatório preditivo de DCV, e a concentração sérica de PCR pode aumentar em até 1000 vezes diante de inflamação. É uma das substâncias presentes nas placas ateroscleróticas, especificamente na camada íntima dos vasos, junto com macrófagos e lipoproteínas, o que sugere uma contribuição direta desse marcador para a aterogênese. Acredita-se que a PCR está envolvida em todos os processos da aterosclerose, influenciando na ativação do complemento, apoptose, recrutamento de monócitos, acúmulo de lipídios e trombose [29]. Estudo de Libby e colaboradores [49] verificou que a expressão de PCR causou a aceleração de uma lesão aterosclerótica em aorta de ratos.

As 13 amostras de placa aterosclerótica, na atual pesquisa, positivas para *S. mutans*, foram positivas para osteopontina, apresentando intensidade de marcação variável. Considerando PCR, apenas uma amostra apresentou negatividade para esse anticorpo, e as amostras positivas exibiram imunomarcação predominantemente difusa e intensa. Não existem estudos correlacionando diretamente a expressão de osteopontina e PCR com *S. mutans*, porém estudo anterior demonstrou que *S. mutans* pode induzir a formação de macrófagos espumosos, e estes, por sua vez, podem secretar osteopontina e PCR [29]. Dessa maneira, a presença de *S. mutans* nas placas ateroscleróticas pode ter contribuído para a positividade de ambos os marcadores nas mesmas amostras.

A PCR foi identificada por meio de imuno-histoquímica também em amostras-controle de artérias sadias. Diehl e colaboradores [50], em estudo imuno-histoquímico, também verificaram a presença de PCR nas paredes de artérias sem doença aterosclerótica, o que, segundo os autores, pode ser explicado por um transporte ativo de PCR através do endotélio arterial.

O presente estudo evidencia a expressão de marcadores inflamatórios, trombóticos e osteogênicos em amostras de placa aterosclerótica positivas para *S. mutans*. Acredita-se, ainda, que as alterações inflamatórias presentes no tecido possam favorecer a formação de biofilme por essa bactéria.

Conclusões

Observou-se, no presente estudo, imunoexpressão positiva de TNF- α , IL-1 β , fibrinogênio, PCR, osteopontina e CD61 em amostras de placa aterosclerótica positivas para *S. mutans*, o que sugere possível relação com a aterosclerose. Porém estudos futuros são

necessários para fornecer maiores informações sobre uma possível associação entre grau de inflamação das placas ateroscleróticas e colonização por essa bactéria.

Agradecimentos

Os autores agradecem à equipe de profissionais do Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC), Hospital de Messejana Dr. Carlos Alberto Studart Gomes, Perícia Forense do Estado do Ceará (PEFOCE), Laboratórios de Citogenética Humana e Genética Humana e Médica da Universidade Federal do Pará (UFPA) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo auxílio na realização desta pesquisa e concessão de bolsa de estudo de pós-graduação.

Referências

- [1] V.I. Haraszthy, J.J. Zambon, M. Trevisan, M. Zeid, R.J. Genco, Identification of periodontal pathogens in atheromatous plaques, *J. Periodontol.* 71 (2000) 1554–1560. doi:10.1902/jop.2000.71.10.1554.
- [2] F. Cairo, C. Gaeta, W. Dorigo, M.R. Oggioni, C. Pratesi, G.P. Pini Prato, G. Pozzi, Periodontal pathogens in atheromatous plaques. A controlled clinical and laboratory trial, *J. Periodontal Res.* 39 (2004) 442–446. doi:10.1111/j.1600-0765.2004.00761.x.
- [3] M. Sanz, L. Lau, D. Herrera, J.M. Morillo, A. Silva, Methods of detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythensis* in periodontal microbiology, with special emphasis on advanced molecular techniques: A review, *J. Clin. Periodontol.* 31 (2004) 1034–1047. doi:10.1111/j.1600-051X.2004.00609.x.
- [4] N.E. Fiehn, T. Larsen, N. Christiansen, P. Holmstrup, T. V Schroeder, Identification of periodontal pathogens in atherosclerotic vessels, *J. Periodontol.* 76 (2005) 731–736. doi:10.1902/jop.2005.76.5.731.
- [5] J. Lehtiniemi, P.J. Karhunen, S. Goebeler, S. Nikkari, S.T. Nikkari, Identification of different bacterial DNAs in human coronary arteries, *Eur. J. Clin. Invest.* 35 (2005) 13–16. doi:10.1111/j.1365-2362.2005.01440.x.
- [6] C.P. Fernandes, F.A.F. Oliveira, P.G.D.B. Silva, A.P.N.N. Alves, M.R.L. Mota, R.C. Montenegro, R.M.R. Burbano, A.D. Seabra, J.G. Lobo Filho, D.L.F. Lima, A.W.E. Soares Filho, F.B. Sousa, Molecular analysis of oral bacteria in dental biofilm and atherosclerotic plaques of patients with vascular disease, *Int. J. Cardiol.* 174 (2014) 710–712. doi:10.1016/j.ijcard.2014.04.201.
- [7] M. Szulc, W. Kustrzycki, D. Janczak, D. Michalowska, D. Baczynska, M. Radwan-oczko, Presence of Periodontopathic Bacteria DNA in Atheromatous Plaques from Coronary and Carotid Arteries, 2015 (2015). doi:10.1155/2015/825397.
- [8] L.A. Fitzpatrick, A. Severson, W.D. Edwards, R.T. Ingram, Diffuse calcification in human coronary arteries: Association of osteopontin with atherosclerosis, *J. Clin. Invest.* 94 (1994) 1597–1604. doi:10.1172/JCI117501.
- [9] M.T. Brennan, M.L. Kent, P.C. Fox, H.J. Norton, P.B. Lockhart, The impact of oral disease and nonsurgical treatment on bacteremia in children, *J. Am. Dent. Assoc.* 138 (2007) 80–85. doi:138/1/80 [pii].

- [10] F.K. Bahrani-Mougeot, B.J. Paster, S. Coleman, J. Ashar, S. Barbuto, P.B. Lockhart, Diverse and novel oral bacterial species in blood following dental procedures, *J. Clin. Microbiol.* 46 (2008) 2129–2132. doi:10.1128/JCM.02004-07.
- [11] N.B. Parahitiyawa, L.J. Jin, W.K. Leung, W.C. Yam, L.P. Samaranayake, Microbiology of odontogenic bacteremia: Beyond endocarditis (*Clinical Microbiology Reviews* (2009) 22, 1, (46-64)), *Clin. Microbiol. Rev.* 22 (2009) 386. doi:10.1128/CMR.00011-09.
- [12] I.W. Fong, Infections and their role in atherosclerotic vascular disease, *J. Am. Dent. Assoc.* 133 (2002) 7S–13S. doi:10.14219/jada.archive.2002.0376.
- [13] K. Nakano, H. Inaba, R. Nomura, H. Nemoto, M. Takeda, H. Yoshioka, H. Matsue, T. Takahashi, K. Taniguchi, A. Amano, T. Ooshima, Detection of cariogenic *Streptococcus mutans* in extirpated heart valve and atheromatous plaque specimens, *J. Clin. Microbiol.* 44 (2006) 3313–3317. doi:10.1128/JCM.00377-06.
- [14] M. Matsumoto-Nakano, M. Tsuji, S. Inagaki, K. Fujita, K. Nagayama, R. Nomura, T. Ooshima, Contribution of cell surface protein antigen c of *Streptococcus mutans* to platelet aggregation, *Oral Microbiol Immunol.* 24 (2009) 427–430. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19702959.
- [15] E. Nagata, A. De Toledo, T. Oho, Invasion of human aortic endothelial cells by oral viridans group streptococci and induction of inflammatory cytokine production, *Mol. Oral Microbiol.* 26 (2011) 78–88. doi:10.1111/j.2041-1014.2010.00597.x.
- [16] Z. Armingohar, J.J. Jørgensen, A.K. Kristoffersen, E. Abesha-Belay, I. Olsen, Bacteria and bacterial DNA in atherosclerotic plaque and aneurysmal wall biopsies from patients with and without periodontitis, *J. Oral Microbiol.* 6 (2014) 1–13. doi:10.3402/jom.v6.23408.
- [17] K. Nakano, H. Nemoto, R. Nomura, H. Homma, H. Yoshioka, Y. Shudo, H. Hata, K. Toda, K. Taniguchi, A. Amano, T. Ooshima, Serotype distribution of *Streptococcus mutans* a pathogen of dental caries in cardiovascular specimens from Japanese patients, *J. Med. Microbiol.* 56 (2007) 551–556. doi:10.1099/jmm.0.47051-0.
- [18] K. Nakano, H. Nemoto, R. Nomura, H. Inaba, H. Yoshioka, K. Taniguchi, A. Amano, T. Ooshima, Detection of oral bacteria in cardiovascular specimens, *Oral Microbiol. Immunol.* 24 (2009) 64–68. doi:10.1111/j.1399-302X.2008.00479.x.
- [19] E. Kozarov, D. Sweier, C. Shelburne, A. Progulske-Fox, D. Lopatin, Detection of bacterial DNA in atheromatous plaques by quantitative PCR, *Microbes Infect.* 8 (2006)

- 687–693. doi:10.1016/j.micinf.2005.09.004.
- [20] J.S. Kim, K.D. Kim, H.S. Na, S.Y. Jeong, H.R. Park, S. Kim, J. Chung, Tumor necrosis factor- α and interleukin-1 β expression pathway induced by *Streptococcus mutans* in macrophage cell line RAW 264.7., *Mol. Oral Microbiol.* 27 (2012) 149–59. doi:10.1111/j.2041-1014.2012.00639.x.
- [21] R. Nomura, M. Otsugu, S. Naka, N. Teramoto, A. Kojima, Y. Muranaka, M. Matsumoto-Nakano, T. Ooshima, K. Nakano, Contribution of the interaction of *Streptococcus mutans* serotype k strains with fibrinogen to the pathogenicity of infective endocarditis, *Infect. Immun.* 82 (2014) 5223–5234. doi:10.1128/IAI.02164-14.
- [22] J. Danesh, J. Wheeler, G. Hirschfield, S. Eda, G. Eiriksdottir, A. Rumley, G. Lowe, M. Pepys, V. Gudnason, C-Reactive Protein and Other Circulating Markers of Inflammation in the Prediction of Coronary Heart Disease, (2004) 1045–1057. doi:10.1056/NEJMoa0810625).
- [23] J.L. Ebersole, Humoral immune responses in gingival crevice fluid: local and systemic implications., *Periodontol.* 2000. 31 (2003) 135–166. doi:10.1034/j.1600-0757.2003.03109.x.
- [24] L. Junqueira, J. Carneiro, *Histologia Básica*, 12th ed., Guanabara Koogan, 2013.
- [25] A. Lastas, V. Graziene, E. Barkauskas, G. Salkus, A. Rimkevicius, Carotid artery atherosclerotic plaque: clinical and morphological-immunohistochemical correlation., *Med. Sci. Monit.* 10 (2004) CR606-R614.
- [26] S.-M. HSU, L. RAINE, Protein A, Avidin, and Biotin in Immunohistochemistry, *J. Histochem. Cytochemistry.* 29 (1981) 1349–1353.
- [27] F.A.F. Oliveira, C.P. Fernandes, M.R.L. Mota, F.B. Sousa, M.R. de F. e Silva, C.R. Teófilo, R.M. do S. V. Patrocínio, F.W.G. Costa, A.P.N.N. Alves, Expression of S-100, EMA, CD34 and presence of mast cells in eight oral neurofibromas, and a review of 127 cases of the literature, *J. Bras. Patol. E Med. Lab.* 49 (2013) 347–354. doi:10.1590/S1676-24442013000500008.
- [28] M.L. Higuchi, J.M. Góis, M.M. Reis, M.H. Higuchi-Dos-Santos, J. Diament, J.M. Sousa, J.A.F. Ramires, S.A. Oliveira, Co-infection ratios versus inflammation, growth factors and progression of early atheromas, *Apmis.* 114 (2006) 338–344. doi:10.1111/j.1600-0463.2006.apm_351.x.
- [29] E. Paffen, M.P.M. deMaat, C-reactive protein in atherosclerosis: A causal factor?, *Cardiovasc. Res.* 71 (2006) 30–39. doi:10.1016/j.cardiores.2006.03.004.

- [30] L. Kesavalu, A.R. Lucas, R.K. Verma, L. Liu, E. Dai, E. Sampson, A. Progulske-Fox, Increased atherogenesis during *Streptococcus mutans* infection in ApoE-null mice., *J. Dent. Res.* 91 (2012) 255–60. doi:10.1177/0022034511435101.
- [31] T.C. Negrini, C. Duque, N.L. Vizoto, R.N. Stipp, F.S. Mariano, J.F. Höfling, E. Graner, R.O. Mattos-Graner, Influence of VicRK and CovR on the interactions of *Streptococcus mutans* with phagocytes, *Oral Dis.* 18 (2012) 485–493. doi:10.1111/j.1601-0825.2011.01896.x.
- [32] K. Nakano, K. Fujita, K. Nishimura, R. Nomura, T. Ooshima, Contribution of biofilm regulatory protein a of *Streptococcus mutans*, to systemic virulence, *Microbes Infect.* 7 (2005) 1246–1255. doi:10.1016/j.micinf.2005.04.012.
- [33] H. Nemoto, K. Nakano, R. Nomura, T. Ooshima, Molecular characterization of *Streptococcus mutans* strains isolated from the heart valve of an infective endocarditis patient, *J. Med. Microbiol.* 57 (2008) 891–895. doi:10.1099/jmm.0.47836-0.
- [34] C.J. Jung, Q.H. Zheng, Y.H. Shieh, C.S. Lin, J.S. Chia, *Streptococcus mutans* autolysin AtlA is a fibronectin-binding protein and contributes to bacterial survival in the bloodstream and virulence for infective endocarditis, *Mol. Microbiol.* 74 (2009) 888–902. doi:10.1111/j.1365-2958.2009.06903.x.
- [35] H. Tsuda, Y. Yamashita, K. Toyoshima, N. Yamaguchi, T. Oho, Y. Nakano, Role of Serotype-Specific Polysaccharide in the Resistance of *Streptococcus mutans* to Phagocytosis by Human Polymorphonuclear Leukocytes Role of Serotype-Specific Polysaccharide in the Resistance of *Streptococcus mutans* to Phagocytosis by Human Polymorpho, *Society.* 68 (2000) 644–650. doi:10.1128/IAI.68.2.644-650.2000.Updated.
- [36] S. Kamath, G.Y.H. Lip, Fibrinogen: Biochemistry, epidemiology and determinants, *QJM - Mon. J. Assoc. Physicians.* 96 (2003) 711–729. doi:10.1093/qjmed/hcg129.
- [37] D.J. Schneider, D.J. Taatjes, D.B. Howard, B.E. Sobel, Increased reactivity of platelets induced by fibrinogen independent of its binding to the IIb-IIIa surface glycoprotein: A potential contributor to cardiovascular risk, *J. Am. Coll. Cardiol.* 33 (1999) 261–266. doi:10.1016/S0735-1097(98)00515-4.
- [38] A.M. Beg, M.N. Jones, T. Miller-Torbert, R.G. Holt, Binding of *Streptococcus mutans* to extracellular matrix molecules and fibrinogen, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 298 (2002) 75–79. doi:10.1016/S0006-291X(02)02390-2.
- [39] R.M.A. Sullan, J.K. Li, P.J. Crowley, L.J. Brady, F. Yves, Binding Forces of *Streptococcus mutans* P1 Adhesin Ruby, 9 (2015) 1448–1460.

- doi:10.1021/nn5058886.Binding.
- [40] T.B. Lombardo Bedran, J. Azelmat, D. Palomari Spolidorio, D. Grenier, Fibrinogen-induced *Streptococcus mutans* biofilm formation and adherence to endothelial cells, *Biomed Res. Int.* 2013 (2013). doi:10.1155/2013/431465.
- [41] W. Krzyściak, A. Jurczak, D. Kościelniak, B. Bystrowska, A. Skalniak, The virulence of *Streptococcus mutans* and the ability to form biofilms, *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 33 (2014) 499–515. doi:10.1007/s10096-013-1993-7.
- [42] E.B. Smith, G. a. Keen, a. Grant, C. Stirk, Fate of fibrinogen in human arterial intima, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 10 (1990) 263–275. doi:10.1161/01.ATV.10.2.263.
- [43] A. Aziz, A Study on Immunopathogenetic Mechanism of Atherosclerotic Process Caused by Chronic Infection of *Chlamydia pneumoniae* in Rats (*Ratus norvegicus*)., *Acta Med. Indones.* 38 (2006) 206–212.
- [44] D. Cogulu, H. Onay, Y. Ozdemir, G.I. Aslan, F. Ozkinay, N. Kutukculer, C. Eronat, Associations of interleukin (IL) -1 β , IL-1 receptor antagonist , and IL-10 with dental caries, *J. Oral Sci.* 57 (2015) 31–36.
- [45] C.J. Jung, C.Y. Yeh, C.T. Shun, R. Bin Hsu, H.W. Cheng, C.S. Lin, J.S. Chia, Platelets enhance biofilm formation and resistance of endocarditis-inducing streptococci on the injured heart valve, *J. Infect. Dis.* 205 (2012) 1066–1075. doi:10.1093/infdis/jis021.
- [46] E. De Nardin, The role of inflammatory and immunological mediators in periodontitis and cardiovascular disease., *Ann. Periodontol.* 6 (2001) 30–40. doi:10.1902/annals.2001.6.1.30.
- [47] A.R. Severson, R.T. Ingram, L.A. Fitzpatrick, Matrix Proteins Associated with Bone Calcification Are Present in Human Vascular Smooth Muscle Cells Grown in vitro., *Vitr. Cell. Dev. Biol. Anim.* 31 (1995) 853–857.
- [48] T.M. Doherty, K. Asotra, L.A. Fitzpatrick, J. Qiao, D.J. Wilkin, R.C. Detrano, C.R. Dunstan, P.K. Shah, T.B. Rajavashisth, Calcification in atherosclerosis: Bone biology and chronic inflammation at the arterial crossroads, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100 (2003) 11201–11206.
- [49] P. Libby, Inflammation in atherosclerosis, *Nature.* 420 (2002) 868–874.
- [50] E.E. Diehl, G.K. Haines, J.A. Radosevich, L.A. Potempa, Immunohistochemical localization of modified C-reactive protein antigen in normal vascular tissue, *Am. J. Med. Sci.* 319 (2000) 79–83. ISI:000085376700002.

Tabelas

Tabela 1: Caracterização histológica de placas ateroscleróticas e vasos sadios do presente estudo. Fortaleza-CE, Brasil, 2017.

	Origem da amostra	Formação de trombo	Core Lipídico	Tecido fibroso	Calcificação	Células inflamatórias
Amostra						
1	Carótida	+	-	+	+	-
2	Aorta	+	+	+	+	+
3	Carótida	+	+	+	+	-
4	Carótida	+	+	+	+	+
5	Aorta	+	-	+	+	+
6	Carótida	+	+	+	+	-
7	Aorta	+	-	+	-	+
8	Carótida	+	+	+	+	+
9	Carótida	+	+	+	+	+
10	Aorta	-	-	+	+	+
11	Carótida	-	+	+	+	+
12	Carótida	+	-	+	+	+
13	Aorta	+	+	+	+	+
TOTAL		11(84,6%)	8(61,5%)	13(100,0%)	12(92,3%)	10(76,9%)
Controle						
C1	Aorta	-	-	-	-	-
C2	Aorta	-	-	-	-	-
C3	Aorta	-	-	-	-	-
C4	Aorta	-	-	-	-	-
C5	Aorta	-	-	-	-	-
C6	Carótida	-	-	-	-	-
C7	Carótida	-	-	-	-	-
C8	Carótida	-	-	-	-	-
C9	Carótida	-	-	-	-	-
C10	Carótida	-	-	-	-	-
TOTAL		0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)

-, ausente; +, presente

Tabela 2. Análise descritiva de imuno-histoquímica em amostras de placas ateroscleróticas e controle (vasos saudáveis). Fortaleza-CE, Brasil, 2017.

	<i>S. mutans</i>	IL-1 β Escore(padrão)	TNF- α Escore(padrão)	CD61 Escore(padrão)	PCR Escore(padrão)	OPN Escore(padrão)	FIB Escore(padrão)
Amostra							
1	P	+++ _D	A	P	+++ _F	+++ _F	++ _D
2	P	+++ _D	+++ _D	P	++ _F	++ _D	+++ _D
3	P	+++ _D	++ _F	P	+++ _D	++ _D	+++ _D
4	P	+++ _D	+ _F	P	+++ _D	+ _D	+ _D
5	P	+++ _D	+++ _D	P	+ _D	+++ _D	+++ _D
6	P	+++ _D	+++ _D	P	+++ _D	+++ _D	+++ _D
7	P	+++ _D	+++ _D	P	++ _D	+ _D	+++ _D
8	P	++ _D	++ _D	P	+++ _F	+ _D	+++ _D
9	P	+++ _D	+++ _D	P	+++ _D	++ _F	+++ _D
10	P	+++ _D	++ _F	P	A	+ _D	+++ _D
11	P	+++ _D	+++ _D	P	+++ _D	+++ _D	+++ _D
12	P	+++ _D	+++ _D	P	+++ _D	++ _F	+++ _D
13	P	++ _D	++ _F	P	+++ _D	+++ _D	+++ _D
Controle							
C1	A	A	A	A	+ _F	A	A
C2	A	A	A	A	A	A	A
C3	A	A	A	A	+++ _D	A	+++ _D
C4	A	A	A	A	A	A	++ _D
C5	A	A	A	A	A	A	+ _F
C6	A	A	A	A	A	A	+++ _D
C7	A	A	A	A	+++ _F	A	++ _F
C8	A	A	A	A	++ _D	A	+++ _F
C9	A	A	A	A	+++ _F	A	A
C10	A	A	A	A	A	A	A

+++ : imunoexpressão intensa; ++ : imunoexpressão moderada; + : imunoexpressão leve; D : extensão de marcação difusa; F : extensão de marcação focal; A : ausência de expressão; P : presença de expressão; PCR, Proteína C Reativa; OPN, osteopontina; FIB, fibrinogênio.

Figuras

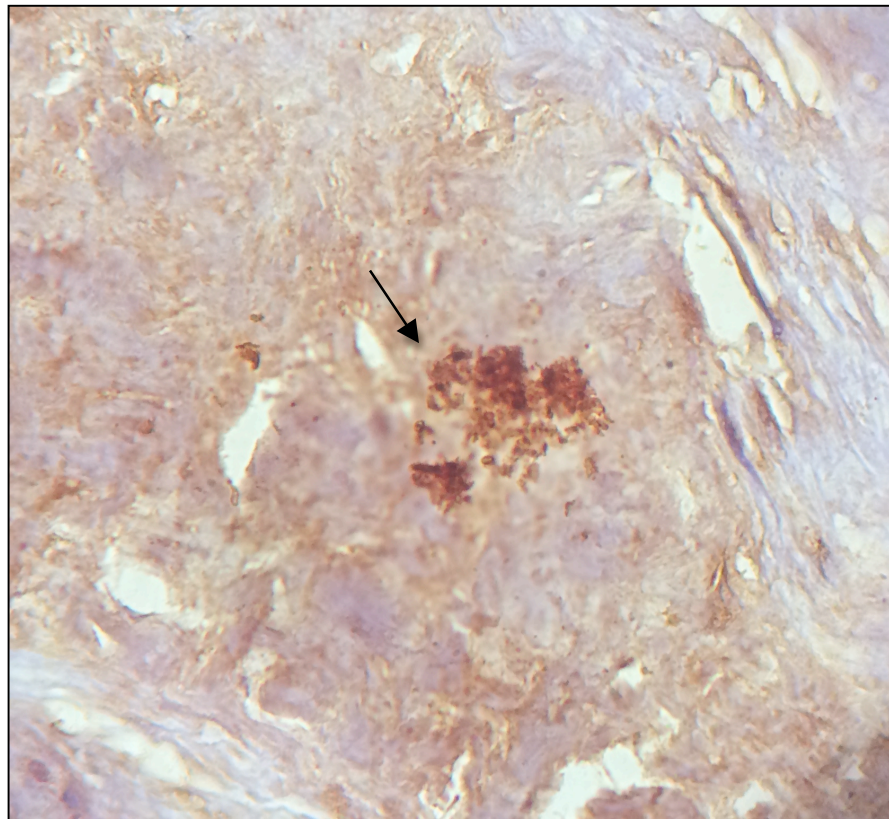


Figura 1 - Fotomicrografia de placa aterosclerótica exibindo *S. mutans* (seta) agregados. IHQ, 1000X, óleo de imersão.

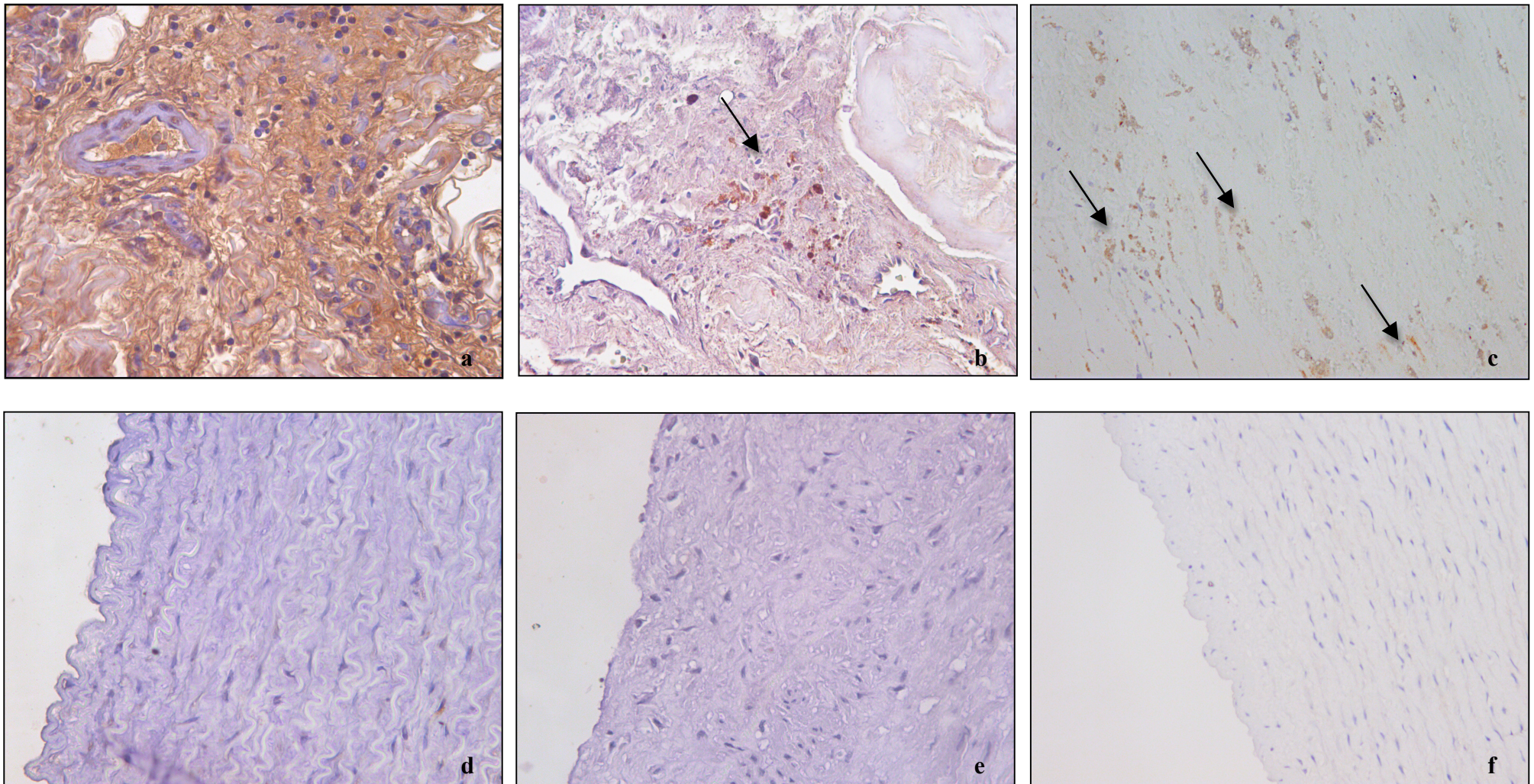


Figura 2 – Fotomicrografias de placas ateroscleróticas (a, b, c) e vasos saudáveis (d, e, f) mostrando imunomarcagem intensa em diversas áreas (fibrose, inflamação e calcificação) e ausência de imunomarcagem para Fibrinogênio (a, d), Osteopontina (b,e) e CD61 (c,f) (setas), IHQ, LSAB, 400X, 200X.

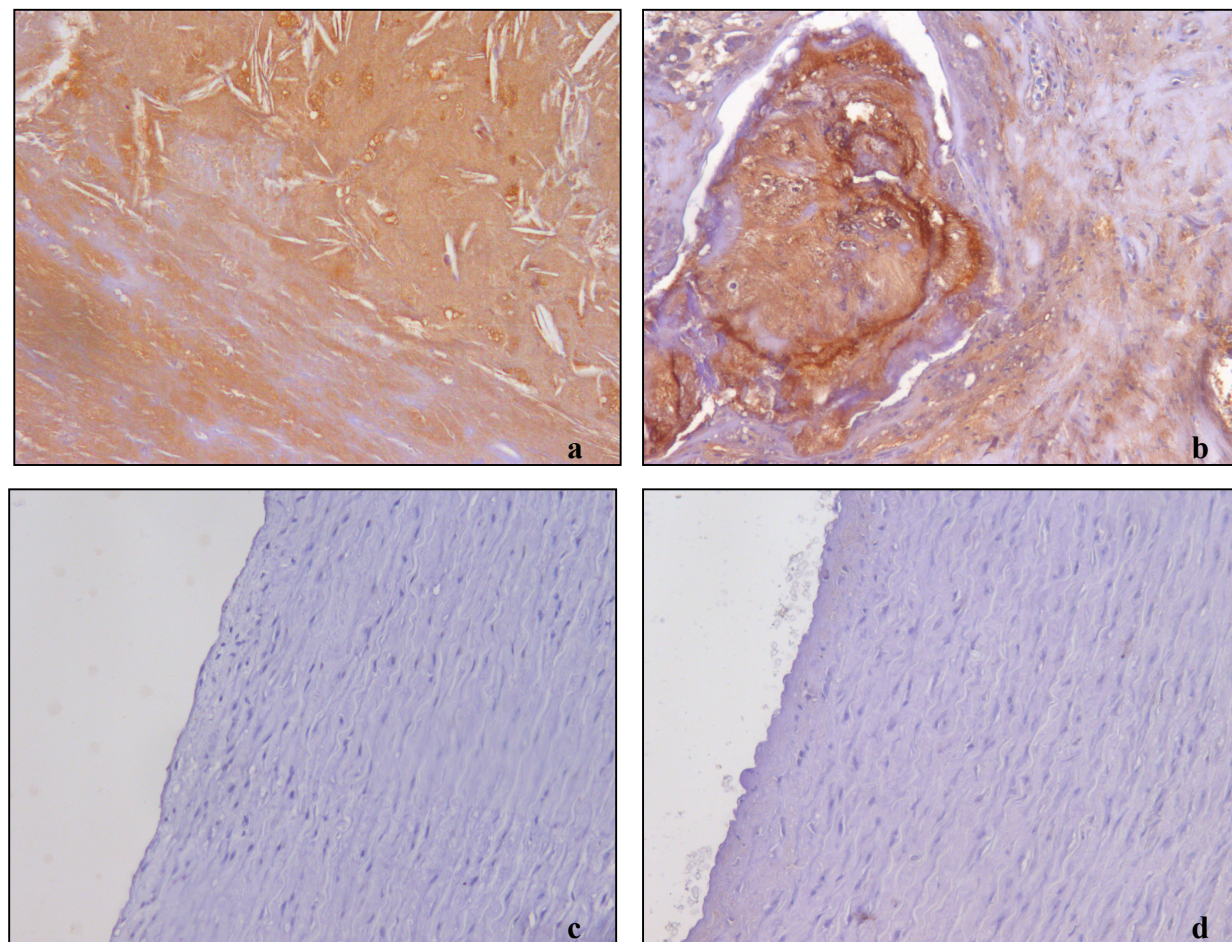


Figura 3 – Fotomicrografias de placas ateroscleróticas (a, b) e vasos saudáveis (c, d) mostrando imunomarcagem intensa em áreas de fibrose, fendas de cristais de colesterol e calcificação, e ausência de imunomarcagem para TNF- α (a, c) e PCR (b,d), IHQ, LSAB, 400X, 200X.

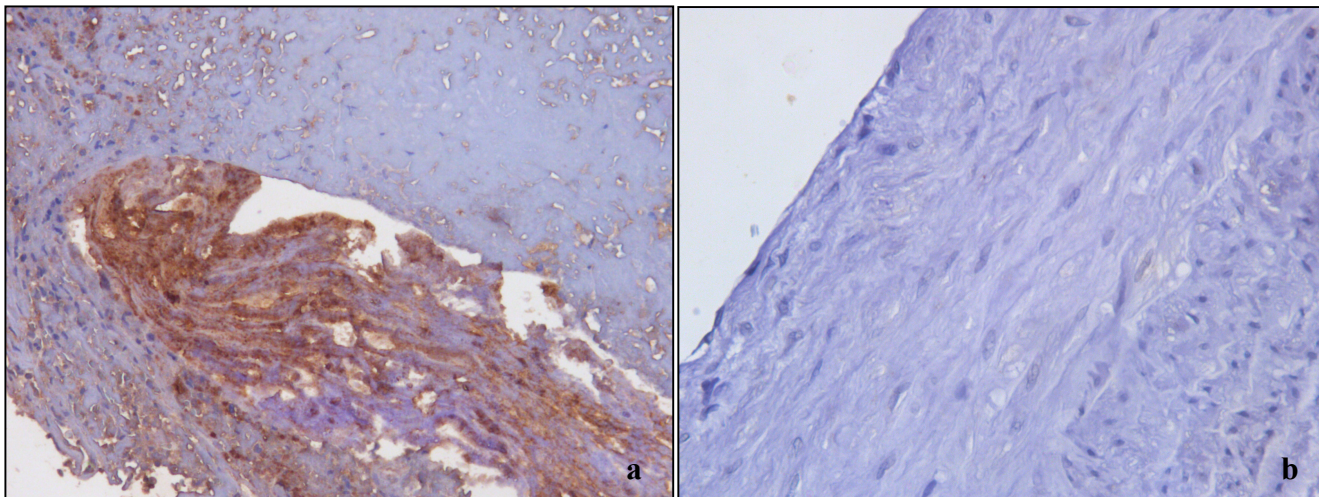


Figura 4 – Fotomicrografia de placas aterosclerótica (a) e vaso sadio (b) mostrando imunomarcção intensa tissular (a), e ausência de imunomarcção (b) para IL-1 β , IHQ, LSAB, 400X, 200X.

4 DISCUSSÃO GERAL

A aterosclerose é uma doença multifatorial influenciada por eventos inflamatórios. As infecções bacterianas podem estar bastante associadas a esse processo, contribuindo com a formação de ateromas por meio de mecanismos diretos e indiretos (PUCAR et al., 2007), e o papel de bactérias orais na formação de placas ateroscleróticas, incluindo bactérias cariogênicas como *S. mutans*, tem sido investigado (NAKANO et al., 2005; ABRANCHES et al., 2009; MATSUMOTO-NAKANO et al., 2009; NAGATA; DE TOLEDO; OHO, 2011; NOMURA et al., 2012).

A detecção de bactérias orais em placas ateroscleróticas reforça a teoria do envolvimento dessas bactérias na patogênese da aterosclerose, e a metodologia utilizada, na maioria dos estudos, tem sido a PCR, pela alta sensibilidade da técnica (HARASZTHY et al., 2000; CAIRO et al., 2004; SANZ et al., 2004; FIEHN et al., 2005; LEHTINIEMI et al., 2005; FERNANDES et al., 2014). Porém, alguns autores têm questionado a viabilidade de bactérias identificadas através de PCR nessas amostras, já que essa metodologia pode identificar fragmentos de bactéria, bactérias mortas que teriam sido aprisionadas em uma placa aterosclerótica já existente, ou até mesmo contaminação da amostra (FIEHN et al., 2005).

Diante do exposto, o presente estudo teve por objetivo avaliar a relação entre a presença de *Streptococcus mutans* e alterações teciduais e inflamatórias em vasos com acometimento de aterosclerose. Para tanto, variadas metodologias para identificação de bactérias no tecido vascular, com diferentes sensibilidades (PCR, imuno-histoquímica e coloração de Giemsa), foram utilizadas, além de amostras de vasos sanguíneos sadios (artérias carótida e aorta) para controle.

Todas as placas ateroscleróticas apresentaram características histopatológicas de aterosclerose severa, sendo tecido fibroso (100,0%) e calcificação (92,3%) as características mais frequentes, seguidas de formação de trombo (84,6%), presença de células inflamatórias mononucleares dispersas (76,9%) e core lipídico (61,5%). Porém, as amostras-controle não apresentaram nenhuma dessas características.

Considerando as amostras-controle, encontrou-se positividade para *S. mutans* (100,0%) apenas através de PCR, evidenciando a diferença de sensibilidade das técnicas. Rovey e colaboradores (2005) verificaram que DNA bacteriano pode persistir em tecido cardíaco mesmo quando cultura bacteriana é negativa, podendo ser amplificado através de PCR por longos períodos após a bactéria tornar-se inviável. Portanto, acredita-se que o DNA de *S. mutans* identificado em amostras de vasos sadios corresponda a fragmentos de bactérias

ou pouca quantidade de DNA bacteriano, detectável apenas pela técnica mais sensível, e que alcançou essas amostras através de bacteremia prévia.

Amostras de placa aterosclerótica (100,0%) foram positivas para *S. mutans* através de PCR, imuno-histoquímica (método da estreptavidina-biotina-peroxidase) e coloração de Giemsa. Além disso, estudo imuno-histoquímico de marcadores inflamatórios, osteopontina e CD61 apresentou imunomarcação positiva para essas amostras. A identificação dessa bactéria em placas ateroscleróticas com características histológicas de aterosclerose severa sugere que, nessas amostras, as bactérias encontraram ambiente favorável para sua proliferação. Acredita-se, ainda, que as alterações inflamatórias presentes no tecido possam favorecer a formação de biofilme pelo *S. mutans*. Porém estudos futuros são necessários para fornecer maiores informações sobre a capacidade que essa bactéria possui de induzir resposta inflamatória local.

5 CONCLUSÃO GERAL

- Estreptococos foram identificados em áreas de fibrose, calcificação, formação de trombo, presença de células inflamatórias e core lipídico nas amostras de placa aterosclerótica. *Streptococcus mutans* foram encontrados em placas ateroscleróticas e vasos saudáveis, porém, apenas nas placas ateroscleróticas observou-se imunomarcagem para essa bactéria, sugerindo que, nessas amostras, havia maior densidade do patógeno e ambiente favorável para sua proliferação.
- Foi observada imunopositividade de TNF- α , IL-1 β , PCR, fibrinogênio, CD61 e osteopontina nas amostras de placa aterosclerótica, positivas também para *S. mutans*, destacando o papel da inflamação e de biomarcadores trombogênicos e osteogênicos na doença. Esse resultado sugere uma possível contribuição das alterações inflamatórias para a formação de biofilme por essa bactéria. No entanto, mais estudos investigando a capacidade do *S. mutans* em induzir resposta inflamatória local são necessários.

REFERÊNCIAS

- ABRANCHES, J.; ZENG, L.; BELANGER, M.; RODRIGUES, P. H.; SIMPSON-HAIDARIS, P. J.; AKIN, D.; DUNN JR., W. A.; PROGULSKE-FOX, A.; BURNE, R. A. Invasion of Human Coronary Artery Endothelial Cells by *Streptococcus Mutans* OMZ175. **Oral Microbiol Immunol**, v. 24, n. 2, p. 141–145, 2009.
- BAHRANI-MOUGEOT, F. K.; PASTER, B. J.; COLEMAN, S.; ASHAR, J.; BARBUTO, S.; LOCKHART, P. B. Diverse and Novel Oral Bacterial Species in Blood Following Dental Procedures. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 6, p. 2129–2132, 2008.
- BATAGINI, N. C.; DA SILVA, E. S.; PINTO, C. A.; PUECH-LEAO, P.; DE LUCCIA, N. Analysis of Risk Factors and Diseases Associated with Atherosclerosis in the Progression of Carotid Artery Stenosis. **Vascular**, v. 24, n. 1, p. 59–63, 2016.
- BEHLE, J. H.; PAPAPANOU, P. N. Periodontal Infections and Atherosclerotic Vascular Disease: An Update. **International Dental Journal**, v. 56, n. 4 Suppl 1, p. 256–62, 2006.
- BITTNER, D. O.; KLINGHAMMER, L.; MARWAN, M.; SCHMID, J.; LAYRITZ, C.; HOFFMANN, U.; ACHENBACH, S.; PFLEDERER, T. Influence of Cardiovascular Risk Factors on the Prevalence of Coronary Atherosclerosis in Patients with Angiographically Normal Coronary Arteries. **Academic Radiology**, n. 13, 2017.
- CAIRO, F.; GAETA, C.; DORIGO, W.; OGGIONI, M. R.; PRATESI, C.; PINI PRATO, G. P.; POZZI, G. Periodontal Pathogens in Atheromatous Plaques. A Controlled Clinical and Laboratory Trial. **Journal of Periodontal Research**, v. 39, n. 6, p. 442–446, 2004.
- CHIU, B. Multiple Infections in Carotid Atherosclerotic Plaques. **Am Heart J**, v. 138, n. 5 Pt 2, p. S534-6, 1999.
- DA SILVA, R. M.; LINGAAS, P. S.; GEIRAN, O.; TRONSTAD, L.; OLSEN, I. Multiple Bacteria in Aortic Aneurysms. **Journal of Vascular Surgery**, v. 38, n. 6, p. 1384–1389, 2003.
- DEMME, R. T.; DESVARIEUX, M. Periodontal Infections and Cardiovascular Disease: The Heart of the Matter. **Journal of the American Dental Association**, v. 137 Suppl, n. October, p. 14S–20S; quiz 38S, 2006.
- FEJERSKOV, O. Changing Paradigms in Concepts on Dental Caries: Consequences for Oral Health Care. **Caries Research**, v. 38, n. 3, p. 182–191, 2004.
- FERNANDES, C. P.; OLIVEIRA, F. A. F.; SILVA, P. G. D. B.; ALVES, A. P. N. N.; MOTA, M. R. L.; MONTENEGRO, R. C.; BURBANO, R. M. R.; SEABRA, A. D.; LOBO FILHO, J. G.; LIMA, D. L. F.; SOARES FILHO, A. W. E.; SOUSA, F. B. Molecular Analysis of Oral Bacteria in Dental Biofilm and Atherosclerotic Plaques of Patients with Vascular Disease. **International Journal of Cardiology**, v. 174, n. 3, p. 710–712, 2014.
- FIEHN, N. E.; LARSEN, T.; CHRISTIANSEN, N.; HOLMSTRUP, P.; SCHROEDER, T. V. Identification of Periodontal Pathogens in Atherosclerotic Vessels. **J. Periodontol.**, v. 76, n. 5, p. 731–736, 2005.

- FIGUERO, E.; SÁNCHEZ-BELTRÁN, M.; CUESTA-FRECHOSO, S.; TEJERINA, J. M.; DEL CASTRO, J. A.; GUTIÉRREZ, J. M.; HERRERA, D.; SANZ, M. Detection of Periodontal Bacteria in Atheromatous Plaque by Nested Polymerase Chain Reaction. **Journal of Periodontology**, v. 82, n. 10, p. 1469–1477, 2011.
- FRIEDEWALD, V. E.; KORNMANN, K. S.; BECK, J. D.; GENCO, R.; GOLDFINE, A.; LIBBY, P.; OFFENBACHER, S.; RIDKER, P. M.; VAN DYKE, T. E.; ROBERTS, W. C. The American Journal of Cardiology and Journal of Periodontology Editors' Consensus: Periodontitis and Atherosclerotic Cardiovascular Disease. **American Journal of Cardiology**, v. 104, n. 1, p. 59–68, 2009.
- HAJISHENGALLIS, G. The Inflammophilic Character of the Periodontitis-Associated Microbiota. **Mol Oral Microbiol.**, v. 29, n. 6, p. 248–257, 2014.
- HARASZTHY, V. I.; ZAMBON, J. J.; TREVISAN, M.; ZEID, M.; GENCO, R. J. Identification of Periodontal Pathogens in Atheromatous Plaques. **Journal of Periodontology**, v. 71, n. 10, p. 1554–1560, 2000.
- HUMPHREY, L. L.; FU, R.; BUCKLEY, D. I.; FREEMAN, M.; HELFAND, M. Periodontal Disease and Coronary Heart Disease Incidence: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Journal of General Internal Medicine**, v. 23, n. 12, p. 2079–2086, 2008.
- JANKET, S.-J.; BAIRD, A. E.; CHUANG, S.-K.; JONES, J. A. Meta-Analysis of Periodontal Disease and Risk of Coronary Heart Disease and Stroke. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology & Endodontics**, v. 95, n. 5, p. 559–569, 2003.
- JUNG, C. J.; ZHENG, Q. H.; SHIEH, Y. H.; LIN, C. S.; CHIA, J. S. Streptococcus Mutans Autolysin Atla Is a Fibronectin-Binding Protein and Contributes to Bacterial Survival in the Bloodstream and Virulence for Infective Endocarditis. **Molecular Microbiology**, v. 74, n. 4, p. 888–902, 2009.
- KESAVALU, L.; LUCAS, A. R.; VERMA, R. K.; LIU, L.; DAI, E.; SAMPSON, E.; PROGULSKE-FOX, A. Increased Atherogenesis during Streptococcus Mutans Infection in ApoE-Null Mice. **Journal of dental research**, v. 91, n. 3, p. 255–60, 2012.
- KURAMITSU, H. K.; QI, M.; KANG, I. C.; CHEN, W. Role for Periodontal Bacteria in Cardiovascular Diseases. **Annals of periodontology / the American Academy of Periodontology**, v. 6, n. 1, p. 41–7, 2001.
- LEHTINIEMI, J.; KARHUNEN, P. J.; GOEBELER, S.; NIKKARI, S.; NIKKARI, S. T. Identification of Different Bacterial DNAs in Human Coronary Arteries. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 35, n. 1, p. 13–16, 2005.
- LEME, A. F. P.; KOO, H.; BELLATO, C. M.; BEDI, G.; CURY, J. A. The Role of Sucrose in Cariogenic Dental Biofilm Formation—New Insight. **Journal of Dental Research**, v. 85, n. 10, p. 878–887, 2006.
- LIBBY, P. Inflammation in Atherosclerosis. **Nature**, v. 420, p. 868–874, 2002.
- MAHENDRA, J.; MAHENDRA, L.; NAGARAJAN, A.; MATHEW, K. Prevalence of Eight

Putative Periodontal Pathogens in Atherosclerotic Plaque of Coronary Artery Disease Patients and Comparing Them with Noncardiac Subjects: A Case-Control Study. **Indian journal of dental research : official publication of Indian Society for Dental Research**, v. 26, n. 2, p. 189–195, 2015.

MARCENES, W.; KASSEBAUM, N. J.; BERNABÉ, E.; FLAXMAN, A.; NAGHAVI, M.; LOPEZ, A.; MURRAY, C. J. L. Global Burden of Oral Conditions in 1990-2010: A Systematic Analysis. **Journal of dental research**, v. 92, n. 7, p. 592–7, 2013.

MATSUMOTO-NAKANO, M.; TSUJI, M.; INAGAKI, S.; FUJITA, K.; NAGAYAMA, K.; NOMURA, R.; OOSHIMA, T. Contribution of Cell Surface Protein Antigen c of *Streptococcus Mutans* to Platelet Aggregation. **Oral Microbiol Immunol**, v. 24, n. 5, p. 427–430, 2009.

MEURMAN, J. H.; SANZ, M.; JANKET, S.-J. ORAL HEALTH, ATHEROSCLEROSIS, AND CARDIOVASCULAR DISEASE. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**, v. 15, n. 6, p. 403–413, 2004.

MUSSA, F. F.; CHAI, H.; WANG, X.; YAO, Q.; LUMSDEN, A. B.; CHEN, C. Chlamydia Pneumoniae and Vascular Disease: An Update. **Journal of Vascular Surgery**, v. 43, n. 6, p. 1301–1307, 2006.

MUSTAPHA, I. Z.; DEBREY, S.; OLADUBU, M.; UGARTE, R. Markers of Systemic Bacterial Exposure in Periodontal Disease and Cardiovascular Disease Risk: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Journal Of Periodontology**, v. 78, n. 12, p. 2289–302, 2007.

NAGATA, E.; DE TOLEDO, A.; OHO, T. Invasion of Human Aortic Endothelial Cells by Oral Viridans Group Streptococci and Induction of Inflammatory Cytokine Production. **Molecular Oral Microbiology**, v. 26, n. 1, p. 78–88, 2011.

NAKANO, K.; FUJITA, K.; NISHIMURA, K.; NOMURA, R.; OOSHIMA, T. Contribution of Biofilm Regulatory Protein a of *Streptococcus Mutans*, to Systemic Virulence. **Microbes and Infection**, v. 7, n. 11–12, p. 1246–1255, 2005.

NAKANO, K.; INABA, H.; NOMURA, R.; NEMOTO, H.; TAKEDA, M.; YOSHIOKA, H.; MATSUE, H.; TAKAHASHI, T.; TANIGUCHI, K.; AMANO, A.; OOSHIMA, T. Detection of Cariogenic *Streptococcus Mutans* in Extirpated Heart Valve and Atheromatous Plaque Specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 9, p. 3313–3317, 2006.

NAKANO, K.; NEMOTO, H.; NOMURA, R.; INABA, H.; YOSHIOKA, H.; TANIGUCHI, K.; AMANO, A.; OOSHIMA, T. Detection of Oral Bacteria in Cardiovascular Specimens. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 24, n. 1, p. 64–68, 2009.

NEMOTO, H.; NAKANO, K.; NOMURA, R.; OOSHIMA, T. Molecular Characterization of *Streptococcus Mutans* Strains Isolated from the Heart Valve of an Infective Endocarditis Patient. **Journal of Medical Microbiology**, v. 57, n. 7, p. 891–895, 2008.

NOMURA, R.; NAKANO, K.; NAKA, S.; NEMOTO, H.; MASUDA, K.; LAPIRATTANAKUL, J.; ALALUUSUA, S.; MATSUMOTO, M.; KAWABATA, S.; OOSHIMA, T. Identification and Characterization of a Collagen-Binding Protein, Cbm, in

Streptococcus Mutans. **Molecular Oral Microbiology**, v. 27, n. 4, p. 308–323, 2012.

NOMURA, R.; NAKANO, K.; NEMOTO, H.; FUJITA, K.; INAGAKI, S.; TAKAHASHI, T.; TANIGUCHI, K.; TAKEDA, M.; YOSHIOKA, H.; AMANO, A.; OOSHIMA, T. Isolation and Characterization of Streptococcus Mutans in Heart Valve and Dental Plaque Specimens from a Patient with Infective Endocarditis. **Journal of Medical Microbiology**, v. 55, n. 8, p. 1135–1140, 2006.

PACKARD, R. R. S.; LIBBY, P. Inflammation in Atherosclerosis: From Vascular Biology to Biomarker Discovery and Risk Prediction. **Clinical Chemistry**, v. 54, n. 1, p. 24–38, 2008.

PADILLA, C.; LOBOS, O.; HUBERT, E.; GONZA, C.; MATUS, S.; PEREIRA, M.; HASBUN, S. Periodontal Pathogens in Atheromatous Plaques Isolated from Patients with Chronic Periodontitis. p. 350–353, 2006.

PIERRI, H.; HIGUCHI-DOS-SANTOS, M. H.; HIGUCHI, M. D. L.; PALOMINO, S.; SAMBIASE, N. V.; DEMARCHI, L. M. M.; RODRIGUES, G. H. D. P.; NUSSBACHER, A.; RAMIRES, J. A. F.; WAJNGARTEN, M. Density of Chlamydia Pneumoniae Is Increased in Fibrotic and Calcified Areas of Degenerative Aortic Stenosis. **International Journal of Cardiology**, v. 108, n. 1, p. 43–47, 2006.

PSALTOPOULOU, T.; HATZIS, G.; PAPAGEORGIOU, N.; ANDROULAKIS, E.; BRIASOULIS, A.; TOUSOULIS, D. Socioeconomic Status and Risk Factors for Cardiovascular Disease: Impact of Dietary Mediators. **Hellenic Journal of Cardiology**, p. 1–11, 2017.

PUCAR, A.; MILASIN, J.; LEKOVIC, V.; VUKADINOVIC, M.; RISTIC, M.; PUTNIK, S.; KENNEY, E. B. Correlation between Atherosclerosis and Periodontal Putative Pathogenic Bacterial Infections in Coronary and Internal Mammary Arteries. **Journal of periodontology**, v. 78, n. 4, p. 677–82, 2007.

RATH, S. K.; MUKHERJEE, M.; KAUSHIK, R.; SEN, S.; KUMAR, M. Periodontal Pathogens in Atheromatous Plaque. **Indian journal of pathology & microbiology**, v. 57, n. 2, p. 259–264, 2014.

RENKO, J.; LEPP, P. W.; OKSALA, N.; NIKKARI, S.; NIKKARI, S. T. Bacterial Signatures in Atherosclerotic Lesions Represent Human Commensals and Pathogens. **Atherosclerosis**, v. 201, n. 1, p. 192–197, 2008.

RINCÓN, del I.; POLAK, J. F.; O'LEARY, D. H.; BATTAFARANO, D. F.; ERIKSON, J. M.; RESTREPO, J. F.; MOLINA, E.; ESCALANTE, A. Systemic Inflammation and Cardiovascular Risk Factors Predict Rapid Progression of Atherosclerosis in Rheumatoid Arthritis. **Ann Rheum Dis**, v. 74, n. 6, p. 1118–1123, 2015.

SANZ, M.; LAU, L.; HERRERA, D.; MORILLO, J. M.; SILVA, A. Methods of Detection of Actinobacillus Actinomycetemcomitans, Porphyromonas Gingivalis and Tannerella Forsythensis in Periodontal Microbiology, with Special Emphasis on Advanced Molecular Techniques: A Review. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 31, n. 12, p. 1034–1047, 2004.

SHAY, K. Infectious Complications of Dental and Periodontal Diseases in the Elderly Population. **Clinical Infectious Diseases**, v. 34, n. 9, p. 1215–1223, 2002.

SZULC, M.; KUSTRZYCKI, W.; JANCZAK, D.; MICHALOWSKA, D.; BACZYNSKA, D.; RADWAN-OCZKO, M. Presence of Periodontopathic Bacteria DNA in Atheromatous Plaques from Coronary and Carotid Arteries. v. 2015, n. Cmv, 2015.

TELES, R.; WANG, C. Y. Mechanisms Involved in the Association between Periodontal Diseases and Cardiovascular Disease. **Oral Diseases**, v. 17, n. 5, p. 450–461, 2011.

XU, S.; SONG, M.; XIONG, Y.; LIU, X.; HE, Y.; QIN, Z. The Association between Periodontal Disease and the Risk of Myocardial Infarction: A Pooled Analysis of Observational Studies. **BMC Cardiovascular Disorders**, v. 17, n. 1, p. 50, 2017.

ZHANG, T.; KURITA-OCHIAI, T.; HASHIZUME, T.; DU, Y.; OGUCHI, S.; YAMAMOTO, M. Aggregatibacter Actinomycetemcomitans Accelerates Atherosclerosis with an Increase in Atherogenic Factors in Spontaneously Hyperlipidemic Mice. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 59, n. 2, p. 143–151, 2010.

ANEXOS**ANEXO A – SEGUIMENTO DO REGIMENTO INTERNO**

Art. 46 – As dissertações e as teses apresentadas ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Ceará poderão ser produzidas em formato alternativo ou tradicional. O formato alternativo estabelece: a critério do orientador e com a aprovação da Coordenação do Programa, que os capítulos e os apêndices poderão conter cópias de artigos de autoria ou co-autoria do candidato, publicados ou submetidos para

11

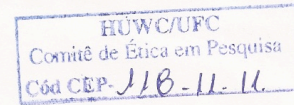
UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM

publicação em revistas científicas, escritos no idioma exigido pelo veículo de divulgação.

§1º - O orientador e o candidato deverão verificar junto às editoras a possibilidade de inclusão dos artigos na dissertação ou tese, em atendimento à legislação que rege o direito autoral, obtendo, se necessária, a competente autorização, deverão assinar declaração de que não estão infringindo o direito autoral transferido à editora.

§2º - A dissertação e a tese em formatos tradicionais ou formatos alternativos deverão seguir as normas preconizadas pelo Guia para Normalização de Trabalhos Acadêmicos da Biblioteca Universitária disponível no sítio <http://www.biblioteca.ufc.br>. As partes específicas do formato alternativo deverão ser feitas em concordância com o *Manual de Normalização para Defesa de dissertação de Mestrado e tese de Doutorado no formato Alternativo do PPGO*, disponível no sítio <http://www.ppggo.ufc.br>.

ANEXO B - PROTOCOLO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO WALTER CANTÍDIO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Rua Capitão Francisco Pedro, 1290 – Rodolfo Teófilo – 60.430-370 – Fortaleza-CE
FONE: (85) 3366-8589 / 3366.8613 E-MAIL: cephuwc@huwc.ufc.br

Protocolo nº: 118.11.11

Pesquisador(a) Responsável: Clarissa Pessoa Fernandes

Departamento / Serviço: Serviço de Cardiologia – HUWC/UFC

Título do Projeto: “Análise molecular de bactérias orais em biofilme dental e placas ateroscleróticas de pacientes com doença cardiovascular”.

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Walter Cantídio analisou o projeto de pesquisa supracitado e, em tendo sido atendidas as pendências, baseando-se nas normas que regulamentam a pesquisa em seres humanos, do Conselho Nacional de Saúde (Resoluções CNS 196/96, 251/97, 292/99, 303/00, 304/00, 347/05, 346/05), resolveu classificá-lo como: **APROVADO**.

Salientamos a necessidade de apresentação de relatório ao CEP-HUWC da pesquisa dentro de 12 meses (data prevista: 20/12/2012).

Fortaleza, 20 de dezembro de 2011.

Maria de Fátima de Souza
Dra. Maria de Fátima de Souza
Coordenadora do CEP - HUWC

ANEXO C - PROTOCOLO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
CEARÁ/ PROPESQ



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudo de marcadores biológicos e bactérias orais em válvulas cardíacas e vasos sanguíneos de pacientes sem doença cardiovascular

Pesquisador: Clarissa Pessoa Fernandes

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 25663514.4.0000.5054

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 543.952

Data da Relatoria: 27/02/2014

Apresentação do Projeto:

Estudo observacional, analítico e transversal. Amostra será constituída de 25 vasos sanguíneos sadios e 25 válvulas aórticas sem estenose obtidos a partir de procedimento de autópsia na Perícia Forense do Estado do Ceará (PEFOCE). Como critérios de inclusão, serão considerados indivíduos com até 25 anos de idade, que morrerem por morte violenta. Serão excluídos indivíduos com óbito por causas cardíacas, como infarto agudo do miocárdio, enforcados, afogados ou por asfixia, que apresentarem perfuração cardíaca por arma de fogo ou lesões de arma branca que comprometam a coleta, pacientes que morreram por septicemia e muito tempo após o início da causa básica.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Geral: Realizar análise molecular de bactérias orais (cariogênicas e periodontopatogênicas) e estudo imunohistoquímico de marcadores inflamatórios, trombóticos e osteogênicos em vasos sanguíneos e válvulas cardíacas sadios.

Objetivos Específicos: Avaliar presença/ausência de *Streptococcus mutans*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis* e *Treponema Denticola* em vasos sanguíneos e válvulas cardíacas sadios;

Avaliar expressão ou ausência de expressão de marcadores inflamatórios (IL-1, IL-10, Proteína C-

Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1127
Bairro: Rodolfo Teófilo **CEP:** 60.430-270
UF: CE **Município:** FORTALEZA
Telefone: (85)3366-8344 **Fax:** (85)3223-2903 **E-mail:** comepe@ufc.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
CEARÁ/ PROPESQ



Continuação do Parecer: 543.952

reativa), trombóticos (Fibrinogênio, Trombina, Fator Tecidual) e osteogênicos (Osteopontina) em amostras de vasos sanguíneos e válvulas cardíacas sadios;

Realizar uma análise comparativa do estudo molecular e imunohistoquímico em vasos sanguíneos e válvulas cardíacas sadios.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Por se tratar de pesquisa com cadáver, os riscos associados a essa pesquisa são mínimos, e constam de eventual risco de dano intelectual, cultural e/ou espiritual ao responsável pelo cadáver.

Benefícios: O presente projeto contribuirá para obtenção de dados mais consistentes acerca da possível participação de bactérias orais na patogênese das doenças cardiovasculares.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Será realizado estudo observacional, analítico e transversal. Amostra será constituída de 25 vasos sanguíneos sadios e 25 válvulas aórticas sem estenose obtidos a partir de procedimento de autópsia na Perícia Forense do Estado do Ceará (PEFOCE). Como critérios de inclusão, serão considerados indivíduos com até 25 anos de idade, que morrerem por morte violenta.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os documentos foram apresentados.

Recomendações:

Sem recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não se aplica.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1127
 Bairro: Rodolfo Teófilo CEP: 60.430-270
 UF: CE Município: FORTALEZA
 Telefone: (85)3366-8344 Fax: (85)3223-2903 E-mail: comepe@ufc.br

ANEXO D - PROTOCOLO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
CEARÁ/ PROPESQ



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudo Imunohistoquímico de marcadores teciduais em placas ateroscleróticas

Pesquisador: Clarissa Pessoa Fernandes

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 45254215.3.0000.5054

Instituição Proponente: Departamento de Clínica Odontológica

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.123.582

Data da Relatoria: 18/06/2015

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um projeto de tese que visa realizar estudo imunohistoquímico de marcadores inflamatórios, trombóticos e osteogênicos em placas ateroscleróticas positivas e negativas para bactérias orais, visando contribuir para a reprodução de dados mais consistentes no que se refere ao possível papel das bactérias orais na patogênese de doenças cardíacas (valvares e trombóticas), levando em consideração a gravidade dessas doenças e a importância desses achados.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Geral: Realizar estudo imunohistoquímico de marcadores inflamatórios, trombóticos e osteogênicos em placas ateroscleróticas positivas e negativas para bactérias orais.

Objetivos específicos:

- Correlacionar a presença de bactérias cariogênicas (*Streptococcus mutans*) e periodontopatogênicas (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis* e *Treponema Denticola*) em placa aterosclerótica com a expressão imunohistoquímica de marcadores inflamatórios (IL-10, Proteína C-reativa, TNF alfa), trombóticos (Fibrinogênio, Trombina, Fator Tecidual) e Osteopontina no mesmo tecido.
- Realizar uma análise comparativa do estudo molecular e imunohistoquímico entre vasos com

Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1000

Bairro: Rodolfo Teófilo

CEP: 60.430-275

UF: CE

Município: FORTALEZA

Telefone: (85)3366-8344

Fax: (85)3223-2903

E-mail: comepe@ufc.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
CEARÁ/ PROPESQ



Continuação do Parecer: 1.123.582

placas ateroscleróticas e vasos saudáveis.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: trata-se de estudo imunohistoquímico com amostras de placas ateroscleróticas previamente coletadas, o estudo não trará nenhum risco para nenhum paciente.

Benefícios: contribuirá para obtenção de dados mais consistentes acerca da possível participação de bactérias orais na patogênese das doenças cardiovasculares.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Estudo observacional, analítico e transversal, com abordagem quantitativa. Serão incluídos no estudo 17 blocos parafinados de placas ateroscleróticas obtidas a partir de cirurgia de endarterectomia de carótida, aneurisma de aorta e cirurgia de revascularização, e previamente avaliadas através de PCR em Tempo Real para bactérias orais (*Streptococcus mutans*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis* e *Treponema Denticola*). Os ensaios imunohistoquímicos serão realizados em cortes histológicos de 5m de espessura, dispostos em lâminas histológicas silanizadas, seguindo-se a técnica de estreptavidina-biotina-peroxidase padrão com modificação. Os anticorpos primários utilizados e suas respectivas diluições serão: Anti-IL10 (1:400), Anti-TNF alfa (1:50), Anti-Proteína C-Reativa (1:100), Anti-Fibrinogênio (1:1600), Anti-trombina (1:50), Anti-Fator Tecidual (1:50) e Anti-Osteopontina (1:100). Um total de 10 amostras de artérias coronária, carótida e aorta macroscopicamente saudáveis obtidas durante procedimento de autópsia na Perícia Forense do Estado do Ceará (PEFOCE) será utilizado como controle para reações de imunohistoquímica, metodologia previamente aprovada pelo CEP sob número CAAE 25663514.4.0000.5054.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados de forma adequada: folha de rosto, cronograma, orçamento, currículo vitae do pesquisador, carta de encaminhamento ao CEP, termo de concordância dos pesquisadores, solicitação de dispensa do TCLE, termo do fiel depositário.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências

Situação do Parecer:

Aprovado

Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1000
Bairro: Rodolfo Teófilo **CEP:** 60.430-275
UF: CE **Município:** FORTALEZA
Telefone: (85)3366-8344 **Fax:** (85)3223-2903 **E-mail:** comepe@ufc.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
CEARÁ/ PROPESQ

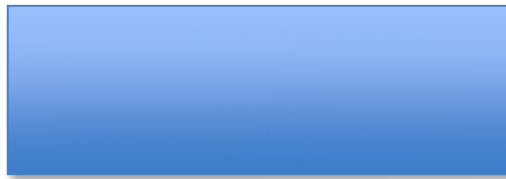


Continuação do Parecer: 1.123.582

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:



Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1000

Bairro: Rodolfo Teófilo

CEP: 60.430-275

UF: CE

Município: FORTALEZA

Telefone: (85)3366-8344

Fax: (85)3223-2903

E-mail: comepe@ufc.br

ANEXO E – CARIES RESEARCH

The screenshot shows the Karger website interface for the journal Caries Research. At the top, the Karger logo is displayed with the tagline "Connecting the World of Biomedical Science". Below the logo, there are navigation links for Journals, Books, Collections, and Subject Guide. A secondary navigation bar includes Journal Home, About this Journal, Authors & Reviewers, and Subscription Rates. The main content area features a cover image of the journal, the title "Caries Research", the editor's name "Beighton D. (London)", and a link to the "Editorial Board". A button labeled "Contents: all years" is also present. To the right, there is a section for "Online Submission" with links for "Download PDF leaflet", "Congress Announcements", "Online Sample Issue", "Alerts and RSS", and "Library Recommendation". Below this, a yellow box highlights the "Current Impact Factor: 2.278". A "Bibliographic Details" section provides the journal abbreviation "Caries Res", ISSN (0008-6568), e-ISSN (1421-976X), DOI (10.1159/issn.0008-6568), and the website URL (www.karger.com/CRE). At the bottom, the ORCA OBCV logo is shown, identifying it as the "Official Journal of the European Organisation for Caries Research".

Link para instruções aos autores:

www.karger.com/cre_guidelines

ANEXO F – INTERNATIONAL JOURNAL OF CARDIOLOGY

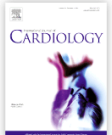
Home > Journals > International Journal of Cardiology

International Journal of Cardiology

Affiliated with the International Society for Adult Congenital Heart Disease

Editor-in-Chief: Paolo G. Camici
View Editorial Board

Supports Open Access



ISSN: 0167-5273

- Guide for Authors
- Submit Your Paper
- Track Your Paper
- Order Journal
- Sample Issue
- View Articles

Prof. Paolo Camici has now become new Editor-in-Chief of this journal (click [here](#) for more information).
Manuscripts submitted before 5 September will be finalized by Prof. Andrew Coats, former Editor-in-Chief.

The *International Journal of Cardiology* is devoted to **cardiology** in the broadest sense. Both basic research and clinical papers can be submitted. The journal serves the interest of both practicing clinicians and researchers.

In addition to original papers, we are launching a range of new manuscript types, including Consensus and Position Papers, Systematic Reviews, Meta-analyses, and Short communications. Case reports are no longer acceptable. Controversial techniques, issues on health policy and social medicine are discussed and serve as useful tools for encouraging debate.

International Journal of Cardiology has no page charges.

Journal Metrics

Source Normalized Impact per Paper (SNIP): **1.098** ⓘ

SCImago Journal Rank (SJR): **1.513** ⓘ

Impact Factor: **4.638** ⓘ

5-Year Impact Factor: **4.468** ⓘ

Stay up-to-date

Register your interests and receive email alerts tailored to your needs
[Click here to sign up](#)

Related Publications

[IJC Metabolic & Endocrine](#)

Link para instruções aos autores:

https://www.elsevier.com/wps/find/journaldescription.cws_home/506041?generatepdf=true