



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

**CLARISSA PESSOA FERNANDES**

**ANÁLISE MOLECULAR DE BACTÉRIAS ORAIS EM BIOFILME DENTAL E  
PLACAS ATROSCLERÓTIAS DE PACIENTES COM DOENÇA VASCULAR**

**FORTALEZA**

**2013**

**CLARISSA PESSOA FERNANDES**

**ANÁLISE MOLECULAR DE BACTÉRIAS ORAIS EM BIOFILME DENTAL E  
PLACAS ATEROSCLERÓTIICAS DE PACIENTES COM DOENÇA VASCULAR**

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

**Área de Concentração: Clínica Odontológica**

**Orientador: Prof. Dr. Fabrício Bitu Sousa**

**FORTALEZA**

**2013**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca de Ciências da Saúde

- 
- F399a      Fernandes, Clarissa Pessoa.  
            Análise molecular de bactérias orais em biofilme dental e placas ateroscleróticas de pacientes com doença vascular / Clarissa Pessoa Fernandes. – 2013.  
            54 f.
- Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem. Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Fortaleza, 2013.  
            Área de Concentração: Clínica odontológica.  
            Orientação: Prof. Dr. Fabrício Bitu Sousa.
1. Placa Aterosclerótica. 2. Doenças Vasculares. 3. Bacteremia. 4. Placa Dentária. 5. Saliva. 6. Streptococcus mutans. 7. Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real. I. Título.
- 
- CDD 617.6

**CLARISSA PESSOA FERNANDES**

**ANÁLISE MOLECULAR DE BACTÉRIAS ORAIS EM BIOFILME DENTAL E  
PLACAS ATEROSCLERÓTIICAS DE PACIENTES COM DOENÇA VASCULAR**

Dissertação a ser apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará, como um dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Odontologia. Área de Concentração: Clínica Odontológica

Aprovada em \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

**Banca Examinadora**

---

**Prof. Dr. Fabrício Bitu Sousa (Orientador)**

**Universidade Federal do Ceará – UFC**

---

**Prof. Dr. José Glauco Lobo Filho**

**Universidade Federal do Ceará – UFC**

---

**Profa. Dra. Raquel Carvalho Montenegro**

**Universidade Federal do Pará - UFPA**

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 meus queridos irmãos, **Luiz Eduardo e Gabriela**, e à minha cunhada, **Lilianne**, pelo apoio, incentivo, paciência e colaboração durante toda essa caminhada. Amo vocês.

Ao meu noivo, **Artur**, que esteve comigo durante toda essa maravilhosa experiência, que me ajudou diretamente na construção deste trabalho, por todo o apoio, companheirismo, paciência, e por tudo que conquistamos juntos. Essa vitória também é sua. Te amo.

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

Ao meu querido padrinho, em memória, **Vicente Ferrer de Oliveira**, por ter me ajudado diretamente durante a graduação, pelo seu apoio e incentivo à minha profissão. Também dedico essa conquista à você, padrinho. Obrigada por tudo. Te amo.

Às minhas madrinhas, **Geralda e Glória**, meus tios, **Ozanan, Mary e Aldro**, e a todos os meus tios e primos, pelo apoio e vibração com todas as minhas conquistas. Obrigada por sempre estarem presentes em minha vida.

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

À minha coorientadora, **Profa. Dra. Ana Paula Negreiros Nunes Alves**, pela sua orientação, pelos muitos ensinamentos ao longo dessa jornada, pela sua dedicação a todos os seus alunos e à Universidade, que me faz admirá-la cada vez mais. Sem sua ajuda, todo esse processo teria sido muito mais árduo. 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 ter nos acolhido tão bem, em Belém, por toda a sua ajuda e contribuição para este trabalho.

A todos os amigos da Universidade Federal do Pará, especialmente aos professores **Raquel, Rommel e André**, e às alunas **Aline, Michelle, Camile, Carol e Taíssa**, pelo auxílio com a biologia molecular e pelos ótimos momentos vividos em Belém.

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, Dr. José Glauco Lobo Filho, Dr. Antonio Wilson Evelin Soares Filho e Dr. Carmelo Silveira Carneiro Leão 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.

À equipe médica, de enfermagem e de secretárias, especialmente **Socorro e Fátima**, do Hospital de Messejana, pelo acolhimento, respeito e ajuda na realização da pesquisa.

A todos os colegas de mestrado, especialmente **Nicolly, Jorgiana, Beatriz, Renato, Bruna, Phelype, Jandenilson, Adriana e Artur**, por terem vivenciado todo esse processo de aprendizado comigo, pelos ótimos momentos juntos.

Aos colegas do laboratório de Patologia Bucal, **Carolina, Malena, Thales, Paulo, Filipe, Galyléia, Dennys e Renata**, pelos anos de convivência e pelas oportunidades de realizarmos trabalhos juntos.

Aos integrantes do **Núcleo de Estudos em Pacientes Especiais (NEPE)**, **monitores de Patologia Bucal e Estomatologia e alunos de iniciação científica**, pela confiança, oportunidade de orientar, pelo carinho e aprendizado.

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

## RESUMO

Nos últimos anos, a relação entre patógenos orais e doença vascular tem sido investigada, com crescente atenção para a etiopatogênese e progressão da aterosclerose. Bactérias orais têm sido detectadas em placas ateroscleróticas, com variável frequência, porém, a relação entre saúde bucal e perfis bacterianos vasculares e orais dos pacientes não está claramente estabelecida. Foi objetivo deste estudo avaliar a presença de DNA de bactérias orais na boca e placas ateroscleróticas, além de avaliar histórico de cárie e doença periodontal dos pacientes. Trinta amostras de placa dental supragengival, subgengival, saliva, e placas ateroscleróticas de 13 pacientes com estenose de carótida ou aneurisma de aorta foram avaliadas, através de Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real, para presença/ausência de *Streptococcus mutans*, *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis* e *Treponema denticola*. Para pacientes desdentados totais, não foram consideradas as variáveis de placa supragengival e subgengival. Todos os pacientes foram submetidos a exames de CPO-D (dentes permanentes cariados, perdidos e obturados) e PSR (registro periodontal simplificado) para avaliação dentária e periodontal, respectivamente, bem como análise histopatológica das placas ateroscleróticas. A maioria dos pacientes eram edêntulos (76,9%). *Streptococcus mutans*, *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis* e *Treponema denticola* foram detectados em 100,0%, 92,0%, 15,3% e 30,7% das amostras orais, respectivamente. O micro-organismo mais prevalente em placas ateroscleróticas foi o *Streptococcus mutans* ( $p < 0,05$ ), presente em 100,0% das amostras, seguido de *Prevotella intermedia* (7,1%), e as amostras vasculares foram negativas para *Porphyromonas gingivalis* e *Treponema denticola*. Observou-se diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) com relação à presença de *Porphyromonas gingivalis* e *Treponema denticola* em cavidade oral e amostra vascular. Em conclusão, *Streptococcus mutans* foi encontrado em alta frequência em amostras orais e vasculares, mesmo de pacientes desdentados, e sua presença em placas ateroscleróticas sugere o possível envolvimento desse patógeno na progressão da doença.

Palavras-chave: Placa Aterosclerótica. Doenças Vasculares. Bacteremia. Placa Dental. Saliva. *Streptococcus mutans*. Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real.

## ABSTRACT

Over the past few years, the involvement between oral pathogens and vascular disease has been investigated, with growing attention to the pathogenesis and progression of atherosclerosis. Oral bacteria have been detected in atherosclerotic plaques at a variable frequency; however, the connection between oral health and vascular and oral bacterial profiles of these patients is not clearly established. The aim of this study was to evaluate the presence of oral bacteria DNA in the mouth and atherosclerotic plaques, in addition to assess the patient's caries and periodontal disease history. Thirty samples of supragingival and subgingival plaque, saliva and atherosclerotic plaques of 13 patients with carotid stenosis or aortic aneurysm were evaluated, through Real Time Polymerase Chain Reaction, for the presence/absence of *Streptococcus mutans*, *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis* and *Treponema denticola*. For edentulous patients, the variables of supragingival and subgingival plaques were not considered. All patients were submitted to oral exams using the DMTF (decayed, missing and filled teeth) and PSR (Periodontal Screening and Recording) indexes for dental and periodontal evaluation, respectively, and histopathological analysis of the atherosclerotic plaques was performed. Most of the patients were edentulous (76.9%). *Streptococcus mutans*, *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis* and *Treponema denticola* were detected in 100.0%, 92.0%, 15.3% and 30.7% of the oral samples, respectively. *Streptococcus mutans* was the most prevalent targeted bacteria in atherosclerotic plaques ( $p < 0,05$ ), detected in 100% of the samples, followed by *Prevotella intermedia* (7.1%), and the vascular samples were negative for *Porphyromonas gingivalis* and *Treponema denticola*. There was a statistically significant difference ( $p < 0,05$ ) between the presence of *Porphyromonas gingivalis* and *Treponema denticola* in the oral cavity and vascular samples. In conclusion, *Streptococcus mutans* was found at a high frequency in oral and vascular samples, even in edentulous patients, and its presence in atherosclerotic plaques suggests the possible involvement of this bacteria with the disease progression.

Keywords: Atherosclerotic Plaque. Vascular Diseases. Bacteremia. Dental Plaque. Saliva. *Streptococcus mutans*. Real-time Polymerase Chain Reaction.

## LISTA DE ABREVIATURAS

CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CPO-D	Dentes Cariados, Perdidos e Obturados
CTAB	Brometo de Cetiltrimetilamônio
DCV	Doença Cardiovascular
DCVs	Doenças Cardiovasculares
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DP	Desvio-Padrão
HAS	Hipertensão Arterial Sistêmica
HUWC	Hospital Universitário Walter Cantídeo
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
IPC	Controle Interno da PCR
MCP-1	Proteína Quimioatrativa de Monócitos
<i>P. gingivalis</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
<i>P. intermedia</i>	<i>Prevotella intermedia</i>
PBS	Tampão Fosfato Salino
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
Pg	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
Ph	Potencial hidrogeniônico
Pi	<i>Prevotella intermedia</i>
PSR	Registro Periodontal Simplificado
RNA	Ácido Ribonucleico
RPM	Rotações por minuto
<i>S. mutans</i>	<i>Streptococcus mutans</i>
Sm	<i>Streptococcus mutans</i>
<i>T. denticola</i>	<i>Treponema denticola</i>
Td	<i>Treponema denticola</i>
TNF	Fator de Necrose Tumoral
X <sup>2</sup>	Teste Qui-quadrado

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>10</b>
<b>2</b>	<b>PROPOSIÇÃO.....</b>	<b>14</b>
<b>2.1</b>	<b>Objetivo geral.....</b>	<b>14</b>
<b>2.2</b>	<b>Objetivos específicos.....</b>	<b>14</b>
<b>3</b>	<b>CAPITULO.....</b>	<b>15</b>
<b>3.1</b>	<b>Capítulo 1.....</b>	<b>15</b>
<b>4</b>	<b>CONCLUSÃO GERAL.....</b>	<b>43</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>44</b>
	<b>APÊNDICES.....</b>	<b>48</b>
	<b>ANEXOS.....</b>	<b>53</b>

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

Atualmente, cada vez mais se tem evidências do efeito da condição oral na saúde geral dos indivíduos, através de uma série de estudos epidemiológicos e biológicos que mostram uma relação entre a boca e diversas doenças sistêmicas. Doenças Cardiovasculares (DCVs) são uma delas e, sem dúvida, estão entre as mais estudadas (CULLINAN; FORD; SEYMOUR, 2009; VIDAL et al., 2009).

DCVs são a causa mais comum de óbitos no mundo todo. Em estimativa, 17,3 milhões de pessoas morreram de DCVs em 2008, representando 31% de todas as mortes mundiais (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2011). No Brasil, em 2008, DCVs foram responsáveis por 28% do total de óbitos por causas conhecidas, sendo a principal causa de morte no país (BRASIL, 2010).

Aterosclerose é um tipo de DCV e se dá pela formação de placas ateroscleróticas no interior de vasos sanguíneos. Tem como principais consequências o infarto agudo do miocárdio, acidente vascular cerebral, aneurisma de aorta e doença vascular periférica. Fatores de riscos tradicionais como hipertensão, hipercolesterolemia, diabetes *mellitus* e fumo não estão relacionados a todos os casos dessa doença, sugerindo que outros fatores podem estar envolvidos no seu desenvolvimento (HARASZTHY et al., 2000; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2011).

Ao longo dos anos, surgiram, então, evidências indicando que a inflamação desempenha papel importante na aterosclerose, podendo operar em todos os estágios dessa doença. 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 algumas bactérias podem provocar agregação plaquetária, invasão de células endoteliais e dano endotelial (mecanismos diretos), além de induzirem produção de moléculas de adesão intracelular, produção de citocinas e de anticorpos contra lipopolissacarídeos, e provocarem disfunção do sistema imune (mecanismos indiretos) (PUCAR et al., 2007).

Infecções bacterianas crônicas, como gastrite por *Helicobacter pylori*, pneumonia por *Chlamydomphila pneumoniae* e *Mycoplasma pneumoniae*, além de algumas doenças orais, como periodontite, estão sendo cada vez mais associadas ao aumento do risco para aterosclerose (LIBBY; RIDKER; MASERI, 2002; MUSSA et al., 2006; PIERRE et al., 2006; PUCAR et al., 2007).

Cárie dentária e doença periodontal crônica são as doenças infecciosas bucais mais comuns. A primeira ocorre quando metabólitos ácidos de estreptococos orais, como o

*Streptococcus mutans* (*S. mutans*), reduzem o pH bucal e dissolvem os minerais das estruturas esmalte e dentina dos dentes, resultando em cavitação e, se não tratada, comprometimento da polpa dentária. Já a periodontite, doença inflamatória multifatorial, implica em perda de estruturas de suporte dentário, e tem como principal fator etiológico a presença de bactérias específicas no biofilme subgingival, como *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) e *Tannerella forsythensis* (SHAY, 2002; FIGUERO et al., 2011).

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; DEMMER; DESVARIEUX, 2006; BEHLE; PAPAPANOU, 2006; MUSTAPHA et al., 2007; HUMPHREY et al., 2008).

Periodontite crônica está associada à resposta imune e inflamatória sistêmica moderada com elevação da concentração sérica de múltiplas citocinas e marcadores inflamatórios, como proteína C-reativa, interleucina (IL) 1, IL-6, fator de necrose tumoral (TNF) e fibrinogênio, abundantemente produzidos em tecidos periodontais patológicos e fortemente associados à patogênese da aterosclerose (DE NARDIN, 2001; EBERSOLE, 2003; DANESH et al., 2004). Ensaio clínico com tratamento periodontal não cirúrgico, em pacientes com doença periodontal ativa, têm reportado redução significativa nos níveis sistêmicos de alguns desses marcadores, como fibrinogênio, proteína C-reativa e IL-6 (D'AIUTO et al., 2004; VIDAL et al., 2009).

A condição de saúde bucal fornece múltiplas oportunidades para repetida disseminação de patógenos orais no sangue, através de infecções pulpares, modificações vasculares por doença periodontal, traumatismos dentários, além de ulcerações em tecidos moles. É sabido que procedimentos odontológicos invasivos, como extração dentária e raspagem periodontal, também 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 (BRENNAM et al., 2007; BAHRANI-MOUGEOT et al., 2008; PARAHITIYAWA et al., 2009).

A ocorrência de bacteremia levanta a hipótese de colonização bacteriana em sítios distantes, e estudos laboratoriais têm demonstrado que alguns micro-organismos possuem a capacidade de afetar integridade endotelial, metabolismo de lipoproteínas do plasma, coagulação sanguínea e função plaquetária. Patógenos cariogênicos e periodontais estão entre eles, e tem sido identificada a capacidade dos mesmos de invadir e matar células endoteliais, favorecer a aderência de leucócitos no endotélio vascular, através de aumento da expressão das moléculas de adesão celular vascular, e promover a transformação de macrófagos em células espumosas (FONG, 2002; STINSON; ALDER; KUMAR, 2003; NAKANO et al., 2006; ROTH et al., 2007; MILLER-TORBERT et al., 2008; MATSUMOTO-NAKANO et al., 2009; NAGATA; DE TOLEDO; OHO, 2011).

Confirmando esses achados, várias bactérias orais, como *S. mutans*, *Prevotella intermedia* (*P. intermedia*), *P. gingivalis* e *Treponema denticola* (*T. denticola*) têm sido encontradas em amostras de placas ateroscleróticas, através de exames moleculares mais sensíveis, o que é fator importante para determinar relação causal entre doença aterosclerótica e doenças bucais, como cárie e periodontite (HARASZTHY et al., 2000; COLOMBO et al., 2002; CAIRO et al., 2004; SANZ et al., 2004; FIEHN et al., 2005; LEHTINIEMI et al., 2005).

A identificação desses micro-organismos orais tanto em amostras cardíacas como em placa bacteriana dentária pode ser realizada de maneira prática e rápida, 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 PCR, 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).

Nesse testes, é imprescindível a extração do material genético e a posterior amplificação de regiões do genoma específicas, através da utilização de *primers* 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; PASTER; DEWHIRST, 2009).

Evidências de que infecções periodontais contribuem ou são fatores decisivos para o desenvolvimento de placas ateroscleróticas ainda são conflitantes, e estudos de identificação de bactérias orais em tecido vascular têm obtido resultados bastante variados. Razões para a

discrepância de resultados desses estudos incluem: diferentes metodologias para identificação das bactérias, variações nas populações estudadas, com diferentes faixas etárias, etnicidades e variações geográficas, além de diferentes medidas de definição de periodontite, com alguns estudos que se utilizam apenas medidas clínicas, e outros baseados em medidas não clínicas, como resposta sistêmica a anticorpos ou evidências radiográficas de perda de osso alveolar (FREIDEWALD et al., 2009).

Por outro lado, poucos estudos têm investigado a presença de micro-organismos cariogênicos, como *S. mutans*, em tecidos vasculares, apesar de esses micro-organismos serem capazes de invadir células endoteliais e estimular a produção de marcadores inflamatórios. Além disso, a avaliação oral tem sido realizada apenas em uma pequena parcela dos pacientes, ou não realizada, o que representa limitação desses estudos.

A avaliação detalhada da condição dental e periodontal, através de exame intraoral e registro do número de dentes cariados, perdidos e obturados, através do CPO-D, e da condição periodontal quanto à higidez, sangramento, presença de cálculo dental ou bolsa periodontal, através do Registro Periodontal Simplificado (PSR), entre os pesquisados, é de grande importância para estabelecer relações entre esses valores e a frequência dos micro-organismos nas amostras cardíacas (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1997; GAETTI-JARDIM JÚNIOR; ZANOLI; PEDRINI, 1998; BRASIL, 2001).

Portanto, visando contribuir para a reprodução de dados mais consistentes com relação à possível associação entre bactérias orais, condição bucal e aterosclerose, este estudo tem o propósito de identificar micro-organismos cariogênicos e periodontopatogênicos em placas ateroscleróticas e cavidade bucal dos mesmos pacientes utilizando técnica de PCR em tempo real, além de avaliar a condição oral desses pacientes, considerando histórico de cárie e doença periodontal.

## **2 PROPOSIÇÃO**

### **2.1 Objetivo Geral**

Avaliar a presença/ausência de DNA de bactérias cariogênicas e periodontopatogênicas na cavidade oral e amostras de placas ateroscleróticas de pacientes submetidos à cirurgia cvascular correlacionando com as condições bucais desses pacientes.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Avaliar a presença/ausência de bactérias orais *Streptococcus mutans*, *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis* e *Treponema denticola* em amostras de placa aterosclerótica e amostras orais (placa bacteriana supragengival, placa bacteriana subgengival e saliva) de pacientes submetidos à cirurgia de endarterectomia ou aneurisma de aorta, através de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em tempo real.
- Avaliar condição oral dos pacientes do estudo, utilizando os índices CPO-D e PSR.
- Correlacionar perfil bacteriano vascular, perfil bacteriano oral e saúde bucal dos pacientes do estudo.

### 3 CAPÍTULO

Esta dissertação 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 do Comitê de Ética em Pesquisas do Hospital Universitário Walter Cantídio da Universidade Federal do Ceará, tendo sido aprovado sob o protocolo 118.11.11 (Anexo B). Assim sendo, esta dissertação é composta de um capítulo contendo um artigo científico que será submetido ao periódico **International Journal of Cardiology**, conforme descrito abaixo:

#### 3.1 Capítulo 1

*Análise molecular de bactérias orais em biofilme dental e placas ateroscleróticas de pacientes com doença vascular*

Clarissa Pessoa Fernandes, Fabrício Bitu Sousa.

## **Análise molecular de bactérias orais em biofilme dental e placas ateroscleróticas de pacientes com doença vascular**

### **Autores**

Clarissa Pessoa Fernandes<sup>1</sup>, Fabrício Bitu Sousa<sup>2</sup>.

**Autor de Correspondência:** Clarissa Pessoa Fernandes

Endereço: Rua Tomás Acioli, 1100, ap. 603 – Joaquim Távora – Fortaleza, Ceará, Brasil.

CEP: 60135180. Telefones: 55-85-96759825; 55-85-32462950

e-mail: [clarissa\\_pf@hotmail.com](mailto:clarissa_pf@hotmail.com)

### **Conflitos de Interesse**

Os autores declaram que não existem conflitos de interesse.

### **Palavras-chave**

Placa aterosclerótica, bacteremia, placa dental, saliva, *Streptococcus mutans*, Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real.

---

<sup>1</sup> Mestranda 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.

<sup>2</sup> Professor Adjunto 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:** Bactérias orais têm sido detectadas em placas ateroscleróticas, com variável frequência, porém, a relação entre saúde bucal e perfis bacterianos vasculares e orais dos pacientes não está claramente estabelecida. Foi objetivo deste estudo avaliar a presença de DNA de bactérias orais na boca e placas ateroscleróticas, além de avaliar histórico de cárie e doença periodontal dos pacientes.

**Métodos:** Foram avaliadas 30 amostras de placa dental supragengival, subgengival, saliva e placas ateroscleróticas de 13 pacientes com estenose de carótida ou aneurisma de aorta, para presença de DNA de *Streptococcus mutans*, *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis* e *Treponema Denticola*, através de PCR em tempo real. Para pacientes edêntulos, não foram consideradas as variáveis de placa supragengival e subgengival. Todos os pacientes foram submetidos à avaliação dentária (CPO-D) e periodontal (PSR), e análise histopatológica das placas ateroscleróticas foi realizada.

**Resultados:** A maioria dos pacientes eram edêntulos (76,9%). *Streptococcus mutans*, *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis* e *Treponema denticola* foram detectados em 100,0%, 92,0%, 15,3% e 30,7% das amostras orais, respectivamente. O micro-organismo mais prevalente em placas ateroscleróticas foi o *Streptococcus mutans* (100,0%) ( $p < 0,05$ ), seguido de *Prevotella intermedia* (7,1%), e as amostras vasculares foram negativas para *Porphyromonas gingivalis* e *Treponema denticola*. Observou-se diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) com relação à presença de *Porphyromonas gingivalis* e *Treponema denticola* em cavidade oral e amostra vascular.

**Conclusão:** *Streptococcus mutans* foi encontrado em alta frequência em amostras orais e vasculares, mesmo de pacientes edêntulos, e sua presença em placas ateroscleróticas sugere o possível envolvimento desse patógeno na progressão da doença.

## 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 conseqüente espessamento focal, remodelação vascular e subsequente estreitamento do lúmen arterial, tendo como principais conseqüências o infarto agudo do miocárdio, acidente vascular cerebral, aneurisma de aorta e doença vascular periférica [1-3].

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 infecção crônica, podem estar relacionados à etiopatogênese dessa doença [3]. A identificação direta de agentes infecciosos em amostras de placas ateroscleróticas através de análise molecular, como reação em cadeia da polimerase (PCR), apoia o conceito de infecção crônica como importante fator na aterogênese [1].

Cárie dentária e doença periodontal crônica são duas das maiores doenças infecciosas clinicamente encontradas no campo da Odontologia. A relação entre doença periodontal e vascular tem sido bastante estudada, e micro-organismos periodontais como *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*), *Treponema denticola* (*T. denticola*), e *Prevotella intermedia* (*P. intermedia*), têm sido identificados em amostras de placas ateroscleróticas, com frequência variável entre 0% a 85,0% [1-24]. Por outro lado, poucos estudos têm investigado a presença de micro-organismos cariogênicos, como *Streptococcus mutans* (*S. mutans*), em tecidos vasculares, apesar de esses micro-organismos serem capazes de invadir células endoteliais e estimular a produção de marcadores inflamatórios, além de aparecerem em alta frequência nessas lesões [8,23-25].

A relação entre saúde bucal e perfis bacterianos vasculares e orais de pacientes com doença aterosclerótica tem sido pouco estudada, geralmente considerando apenas pacientes com periodontite crônica avançada [7,10-14]. Além disso, a avaliação oral tem sido realizada apenas em uma pequena parcela dos pacientes [6,8,22,24,25], ou não realizada [1,3,15,17,18,21].

A avaliação detalhada da condição bucal dos pacientes, considerando histórico de cárie e doença periodontal, através de exame odontológico, poderia sinalizar a relação entre doenças orais e a frequência dos micro-organismos nas amostras cardíacas.

O objetivo deste estudo foi avaliar a presença/ausência de DNA de bactérias cariogênicas e periodontopatogênicas na cavidade oral e amostras de placas ateroscleróticas

dos mesmos pacientes, utilizando PCR em tempo real, além de avaliar a condição oral desses pacientes, considerando histórico de cárie e doença periodontal.

## **Métodos**

### *Pacientes e caracterização das amostras*

Participaram do estudo pacientes agendados, consecutivamente, para cirurgia de endarterectomia ou aneurisma de aorta, no Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC) ou no Hospital de Messejana Dr. Carlos Alberto Studart Gomes (Fortaleza, Ceará, Brasil), durante o período de março a setembro de 2012. O protocolo do estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Walter Cantídio da Universidade Federal do Ceará (Anexo B), e todos os participantes assinaram termo de consentimento livre e esclarecido (Apêndice A).

Dois avaliadores previamente calibrados (variação de Kappa 0.80 a 0.97) realizaram exame oral, no leito, até um dia antes da cirurgia, para avaliação de número de dentes cariados, perdidos e obturados, através do índice CPO-D, e da condição periodontal quanto à higidez, sangramento, presença de cálculo dental ou bolsa periodontal, através do Registro Periodontal Simplificado (PSR) (Apêndice B). De acordo com o PSR, todos os elementos dentários presentes na boca foram sondados em seis sítios, utilizando a sonda periodontal OMS-621, e escores de 0 a 4 foram atribuídos para cada sextante, considerando o maior escore daquele sextante. Sextantes com menos de dois elementos dentários foram excluídos.

Como critérios de inclusão, foram considerados pacientes diagnosticados com estenose de carótida ou aneurisma de aorta e agendados para cirurgia de endarterectomia ou correção de aneurisma de aorta. Pacientes muito debilitados, que não puderam ser submetidos a exame oral, foram excluídos da pesquisa.

Informações sobre histórico de fumo, hipertensão, diabetes mellitus, dislipidemia, obesidade e histórico familiar foram obtidas através de prontuários, anamnese e ficha clínica (Apêndice C). 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 [26].

No momento do exame oral, amostras de placa supragengival e subgengival foram coletadas para pacientes dentados, de acordo com protocolo de Cairo e colaboradores (2004) [19]. Para pacientes desdentados, amostras de saliva foram coletadas, friccionando-se cones de papel estéreis em mucosa jugal, rebordo alveolar, palato e língua. As amostras orais foram

armazenadas em recipiente estéril, contendo tampão fosfato salino (PBS) a  $-20^{\circ}\text{C}$ , para posterior análise molecular.

Um total de 14 placas ateroscleróticas foram coletadas, de maneira asséptica, durante as cirurgias de endarterectomia de carótida ou aneurisma de aorta abdominal ou torácica. Um fragmento de cada amostra foi armazenado em recipiente estéril, contendo PBS a  $-20^{\circ}\text{C}$ , para posterior análise através de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em tempo real. Fragmentos remanescente foram fixados em formol 10%, incluídos em parafina, cortados e corados com Hematoxilina/Eosina, para análise histopatológica.

#### *Extração de DNA e PCR em tempo real*

Para extração de DNA, aproximadamente 30mg de tecido obtidos do centro das placas ateroscleróticas foram cortados em pequenos fragmentos e transferidos para tubos de plástico estéreis de 2ml, mantendo manipulação asséptica. Tanto amostras orais como amostras de placas ateroscleróticas foram centrifugadas por 5 minutos a 10.000 RPM. Extração de DNA prosseguiu de acordo com protocolo baseado no método Brometo de Cetiltrimetilamônio (CTAB) [27].

Um total de 30 amostras de DNA extraído de saliva, placa bacteriana supragengival, subgengival, e placa aterosclerótica foram submetidas à PCR em tempo real, para detecção de DNA bacteriano de 4 diferentes espécies: *S. mutans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia* e *T. denticola*. Para pacientes edêntulos, as variáveis placa bacteriana supragengival e subgengival não foram consideradas. Sondas TaqMan foram confeccionados comercialmente (Life Technologies) para este estudo, considerando a região 16S do DNA ribossomal bacteriano (Tabela 1). Para realização da PCR em tempo real, acrescentou-se 1uL de DNA genômico com concentração de 5ng a 8uL de TaqMan® *Universal PCR Master Mix* (Applied Biosystems®), 0,35uL de sonda e 3,15uL de água. O volume final de 14uL foi obtido com a adição de IPC (1uL) e IPC DNA (0,5uL) utilizado como controle interno da reação. Amplificação foi realizada em termociclador 7500 *Real-Time PCR System* (Applied Biosystems®). DNA bacteriano foi substituído por água para controle negativo da reação. O protocolo da PCR em tempo real consistiu o passo inicial de desnaturação a  $95^{\circ}\text{C}$  por 10 min, seguido por 40 ciclos a  $95^{\circ}\text{C}$  por 15s e  $60^{\circ}\text{C}$  por 1 min.

#### *Preparação das lâminas para diagnóstico histopatológico*

Parte da placa aterosclerótica coletada foi emblocada em parafina para a confecção de lâminas para o diagnóstico histopatológico. Os blocos incluídos em parafina foram cortados em espessura de 5 (cinco) micrômetros e corados pela hematoxilina/eosina conforme protocolo adaptado de Junqueira & Carneiro (1999) [28].

#### *Análise Estatística*

Análise estatística descritiva foi utilizada para caracterizar a amostra e analisar patógenos orais específicos identificados 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) e analisadas pelo teste exato de *Fisher* ou Qui-quadrado com correção de *Bonferroni*. Foi utilizado o *software* estatístico EpiInfo para *Windows* e estabeleceu-se, em todas as análises, índice de significância  $p < 0.05$ .

## **Resultados**

#### *Caracterização da amostra*

Um total de 13 pacientes, com média de idade de 68,5±10,1 anos (Média±DP) (variação 45-82 anos), foram incluídos no estudo. Destes, 53,8% apresentavam estenose de carótida e 46,2%, aneurisma de aorta. A maioria dos pacientes eram edêntulos (76,9%), sendo observada uma média de dentes perdidos de 30,8±2,6 (Média±DP). Com relação à análise periodontal, bolsa de 4-5mm foi observada em 1,3% dos sextantes, 1,3% apresentaram sangramento, e 97,4% dos sextantes foram excluídos (Tabela 2).

Histórico médico dos pacientes está expresso na tabela 2. Aproximadamente 70,0% dos participantes apresentaram hipertensão, 61,5% apresentaram dislipidemia e 23,7% não tinham nenhuma comorbidade ou fator de risco clássico associado à aterosclerose. Com relação ao histórico de fumo, a maioria dos pacientes nunca fumou (46,2%) ou era ex-fumante (46,2%) (Tabela 2).

Quanto à origem da placa aterosclerótica, 57,1% (n=8) foram obtidas a partir de cirurgia de endarterectomia de carótida e 42,9% (n=6) foram obtidas através de cirurgia de aneurisma de aorta. Duas amostras foram obtidas de um mesmo paciente, em momentos diferentes, durante endarterectomia de carótida direita e esquerda.

Histopatologicamente, todos os espécimes demonstraram características de lesão aterosclerótica severa. Espécimes de endarterectomia exibiram presença de fendas de cristais

de colesterol, focos de calcificação, estruturas amorfas basofílicas consistente com depósitos de cálcio, edema, necrose, hemorragia, macrófagos espumosos, além de células inflamatórias histiolinfoplasmocitárias (Figuras 1 e 2). Em placas ateroscleróticas coletadas através de cirurgia de aneurisma, visualizou-se tecido muscular amplamente substituído por tecido conjuntivo fibroso, blocos de tecido adiposo, placas mineralizadas, depósitos de cálcio, macrófagos espumosos, infiltrado inflamatório linfoplasmocitário e vasos ectásicos (Figuras 3 e 4). Nenhum espécime apresentou evidência morfológica de colonização bacteriana.

### PCR

Resultados da PCR para presença/ausência das bactérias estudadas em amostras orais (saliva, placa bacteriana supragengival e placa bacteriana subgengival) e placas ateroscleróticas estão expressos na tabela 3. *S. mutans* foi identificado em todos os pacientes, tanto em amostras orais (100,0%) como em placas ateroscleróticas (100,0%), enquanto que *P. intermedia* foi detectada em amostras orais de 12 pacientes (92,0%). Apenas 1 paciente (7,1%) apresentou positividade para esta bactéria na amostra vascular, mas não na amostra oral. Dois pacientes (15,3%) apresentaram amostras orais positivas para *P. gingivalis* e 4 (30,7%) para *T. denticola*. Entretanto, estas bactérias não foram identificadas em amostras vasculares. A Figura 5 mostra a frequência das bactérias estudadas em placas ateroscleróticas, evidenciando maior prevalência de *S. mutans* ( $p < 0,05$ ) (teste exato de Fisher/ $X^2$  com correção de Boferroni). A Figura 6 apresenta a frequência das bactérias estudadas em amostras orais e placas ateroscleróticas. Observa-se diferença estatisticamente significativa com relação à presença de *P. gingivalis* e *T. denticola* na cavidade oral e amostra vascular ( $p < 0,05$ ) (teste exato de Fisher/ $X^2$  com correção de Boferroni). A Figura 3 mostra a detecção de bactérias em amostras orais e de ateroma considerando pacientes dentados (Fig. 7 A) e pacientes desdentados (Fig. 7 B).

### Discussão

De 1999 a 2011, diversos estudos pesquisaram a presença de bactérias orais em placas ateroscleróticas [1-25], encontrando resultados variados. A metodologia mais utilizada foi a Reação em Cadeia da Polimerase, sendo esta convencional [1,3-5,17,19,20,24,25], nested [6,12,18] ou em tempo real [7,9,23]. Outras metodologias como hibridização [11,14], cultura de bactérias [13,21], imunohistoquímica [22] e microscopia eletrônica [21] também foram realizadas.

No presente estudo, PCR em tempo real foi a metodologia escolhida, por ter demonstrado anteriormente alta sensibilidade e eficácia em detectar DNA bacteriano em tecido vascular e amostras orais, mesmo quando em pouca quantidade [7,9,23]. Apesar de não ter sido visualizada evidência morfológica de colonização bacteriana nas placas ateroscleróticas, todas as amostras foram positivas para, pelo menos, uma bactéria estudada, ressaltando a sensibilidade da técnica. Alguns estudos que utilizaram PCR convencional, por outro lado, não conseguiram detectar DNA de bactérias orais em suas amostras [4,19].

Apenas pacientes que foram submetidos a exame bucal foram incluídos no presente estudo. A média de dentes perdidos devido à cárie foi bastante alta. Esse resultado está de acordo com a literatura, já que edentulismo vem sendo relacionado à doença cardiovascular, de maneira idade-dependente [29]. A condição oral dos pacientes incluídos em estudos anteriores foi bastante variável, o que dificulta o estabelecimento de um perfil de saúde bucal desses pacientes. Em alguns estudos, por exemplo, apenas pacientes com periodontite avançada preencheram os critérios de inclusão [7,10-14]. Em outros, exame oral e coleta de placa bacteriana não foram realizados [1,3,15,17,18,21-23], ou foram realizados em apenas parte da amostra [6,8,22,24,25], muitas vezes não sendo possível correlacionar condição oral e detecção de bactérias orais em tecido vascular. Além disso, a inclusão de pacientes desdentados tem sido controversa, já que edentulismo foi considerado critério de exclusão por alguns autores [12] ou utilizado como controle por outros [14,19].

No presente estudo, pelo menos duas das bactérias investigadas foram detectadas em todas as amostras orais, apesar de a maioria dos pacientes serem desdentados. *S. mutans* foi a bactéria mais frequente em cavidade oral, presente em 100.0% da amostra, seguida de *P. intermedia* (92,0%), *T. denticola* (30,7%), e *P. gingivalis* (15,3%). Esses dados corroboram os achados de Kononen e colaboradores (1991) que encontraram alta prevalência de *S. mutans* em pacientes desdentados que utilizavam próteses totais [30]. Para bactérias periodontais, estudos mostram que estas podem colonizar a cavidade oral, mesmo em condições edêntulas, porém em menor frequência, quando comparado com pacientes dentados [31-33].

A frequência de *P. gingivalis* e *T. denticola* em cavidade oral foi abaixo da relatada em outros estudos, entretanto esses autores avaliaram apenas pacientes dentados e com periodontite severa [5,7,8,10-14,19,20,24]. Esse achado pode ser atribuído à ausência de sulco gengival, importante nicho de bactéria periodontal, em pacientes desdentados do presente estudo [32].

O perfil bacteriano oral e o perfil bacteriano vascular dos pacientes do presente estudo foi distinto, já que apenas *S. mutans* e *P. intermedia* foram identificados em placas

ateroscleróticas. A presença de *S. mutans* em todos os espécimes vasculares e em todas as amostras orais dos pacientes sugere que essa bactéria pode ter sido oriunda da cavidade oral e, provavelmente, alcançou as placas ateroscleróticas, através de bacteremia. A detecção de *S. mutans*, em alta frequência, nas placas ateroscleróticas pode ser correlacionada com alta média de dentes perdidos devido à cárie.

É sabido que bactérias orais entram na corrente sanguínea após procedimentos odontológicos que, geralmente, causam sangramento, como extração dentária, cirurgia periodontal e raspagem, além de procedimentos de higiene de rotina, como escovação e utilização do fio dental, e até mesmo após mastigação [34-36]. Uma diversidade de patógenos orais tem sido detectada em amostras sanguíneas após bacteremia ocasionada por diferentes estímulos, incluindo *Streptococcus* e bactérias periodontais [34]. Além disso, estudo de Lockhart e colaboradores (2004) [37] encontrou maior incidência de *S. mutans* em sangue de crianças, quando comparado com outras espécies bacterianas, sugerindo que *S. mutans* tem maior facilidade em entrar na corrente sanguínea que outras bactérias, o que pode indicá-lo como possível fator etiológico para doença vascular [8,37].

No presente estudo, foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre a presença de *P. intermedia* e *T. denticola* em cavidade oral e amostra vascular, o que sugere que essas bactérias têm maior dificuldade em adentrar a corrente sanguínea, quando comparadas com *S. mutans*.

A frequência das bactérias orais pesquisadas em placas ateroscleróticas tem sido bastante variável. Nos poucos estudos que investigaram a presença de *S. mutans*, sua frequência variou de 62,8% a 74,0% [8,23-25], valores inferiores ao encontrado no presente estudo (100,0%). Por outro lado, alta frequência de *P. intermedia* [9], *P. gingivalis* [3,5-7,9,14] e *T. denticola* [5,7,24] foi relatada em alguns estudos, porém outros apresentaram amostras negativas para essas bactérias [4,12,13,17,19,21]. 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 PCR, diferenças quanto a critérios de inclusão e de exclusão da amostra e número da amostra variável. Além disso, os estudos são realizados em diferentes regiões geográficas, e é sabido que pacientes de países diferentes apresentam perfil bacteriano oral diferente [38].

Poucos estudos têm investigado a presença de bactérias orais em placas ateroscleróticas de pacientes desdentados [4,6,14,19,23], e, desses, nenhum analisou o perfil bacteriano oral dos mesmos. Pacientes desdentados foram incluídos no presente estudo

porque, em estudos anteriores, mesmo quando esses pacientes eram considerados como controle, amostras de placas ateroscleróticas foram positivas para bactérias orais [14,23].

A presença de bactérias orais em placas ateroscleróticas de pacientes desdentados pode ser resultado de bacteremia recorrente enquanto os pacientes ainda possuíam dentes, considerando que o processo de formação de placa aterosclerótica é um processo a longo prazo, que pode ter início na infância [14,39]. Outra hipótese a ser considerada é a de que essas bactérias poderiam adentrar a corrente sanguínea através de úlceras ou lesões epiteliais diversas, presentes na cavidade oral de pacientes desdentados, aderindo a lesões ateroscleróticas já existentes [5,14].

*P. intermedia* foi detectada em placa aterosclerótica de 1 paciente, no presente estudo, porém esse paciente não apresentou a mesma bactéria em amostra oral, o que apoia a teoria de que esse micro-organismo pode ter colonizado a placa aterosclerótica durante bacteremia pregressa, enquanto o paciente ainda apresentava elementos dentários na boca.

Deteção molecular de bactérias orais em placas ateroscleróticas sugere que essas bactérias podem estar associadas à doença vascular, e o papel do *S. mutans* na aterogênese tem sido bastante investigado [8,23-25].

Diversos estudos *in vitro* tem demonstrado que algumas cepas de *S. mutans* estão associadas a importantes mecanismos de virulência relacionados a doenças vasculares [40]. A capacidade de *S. mutans* de se adaptar a estresses do ambiente, durante colonização do hospedeiro [41], e sobreviver na corrente sanguínea durante até 72 horas (período maior que outras bactérias) [42,43], associada à sua baixa susceptibilidade à fagocitose por polimorfonucleares [43-45] 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) [46], induzir agregação plaquetária [42, 47], invadir células endoteliais humanas [48,49], e induzir o aumento de produção de citocinas fortemente associadas à patogênese da aterosclerose, como interleucina (IL) 1, IL-6 e proteína quimioatrativa de monócitos 1 (MCP-1) [48]. Além disso, essas bactérias podem induzir a formação de macrófagos espumosos, que estão relacionados diretamente ao desenvolvimento dessa doença [50-52].

Em busca de resultados mais conclusivos, estudos de modelo animal para investigar a patogênese de uma infecção sistêmica crônica por *S. mutans* e subsequente aterosclerose tem sido realizados. Apesar de alguns autores não encontrarem relação entre infecção sistêmica com *S. mutans* e aumento do crescimento da placa aterosclerótica [53], estudo de Kesavalu e colaboradores (2012) [40] 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, sugere-se que cepas invasivas de *S. mutans* podem estar relacionadas à doença vascular em humanos, contribuindo possivelmente para a progressão de lesões ateroscleróticas.

Os achados do presente estudo apontam que infecção de placas ateroscleróticas por bactérias orais ocorre mesmo para pacientes desdentados, podendo contribuir para a progressão dessa doença. Ressalta-se, portanto, a importância de acompanhamento odontológico de rotina e em longo prazo de pacientes dentados ou edêntulos, cardiopatas ou em risco para doença aterosclerótica, a fim de manter a saúde oral em uma tentativa de reduzir episódios recorrentes de bacteremia.

### **Limitações do estudo**

Durante a execução do estudo, os autores encontraram dificuldade na obtenção da amostra, considerando que, atualmente, existem modalidades de tratamento de estenose de carótida menos invasivas que a endarterectomia e amplamente utilizadas.

### **Conclusões**

A partir dos resultados encontrados, pode-se concluir que bactérias orais estavam presentes em placas ateroscleróticas, porém, os perfis bacterianos vasculares e orais dos mesmos pacientes foram distintos. *S. mutans* foi encontrado em alta frequência em amostras orais e vasculares, mesmo de pacientes desdentados, e sua presença em placas ateroscleróticas sugere o possível envolvimento desse patógeno na progressão da doença.

## Referências

1. Haraszthy VI, Zambon JJ, Trevisan M, Zeid M, Genco RJ. Identification of periodontal pathogens in atheromatous plaques. *J Periodontol* 2000;71(10):1554-60.
2. Renko J, Lepp PW, Oksala N, Nikkari S, Nikkari ST. Bacterial signatures in atherosclerotic lesions represent human commensals and pathogens. *Atherosclerosis* 2008;201(1):192-7.
3. 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(4):677-82.
4. Aquino AR, 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(3):303-9.
5. Toyofuku T, Inoue Y, Kurihara N, et al. Differential detection rate of periodontopathic bacteria in atherosclerosis. *Surg Today* 2011;41(10):1395-400.
6. Figuero E, Sánchez-Beltrán M, Cuesta-Frechoso S, et al. Detection of periodontal bacteria in atheromatous plaque by nested polymerase chain reaction. *J Periodontol* 2011;82(10):1469-77.
7. 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(2):248-52.
8. Nakano K, Nemoto H, Nomura R, et al. Detection of oral bacteria in cardiovascular specimens. *Oral Microbiol Immunol* 2009;24(1):64-8.
9. Gaetti-Jardim E, Marcelino SL, Feitosa AC, Romito GA, Avila-Campos MJ. Quantitative detection of periodontopathic bacteria in atherosclerotic plaques from coronary arteries. *J Med Microbiol* 2009;58(Pt 12):1568-75.
10. Zhang YM, Zhong LJ, Liang P, Liu H, Mu LT, Ai SK. Relationship between microorganisms in coronary atheromatous plaques and periodontal pathogenic bacteria. *Chin Med J* 2008;121(16):1595-7.
11. 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(2):322-7.

12. Aimetti M, Romano F, Nessi F. Microbiologic analysis of periodontal pockets and carotid atheromatous plaques in advanced chronic periodontitis patients. *J Periodontol* 2007;78(9):1718-23.
13. Padilla C, Lobos O, Hubert E, et al. Periodontal pathogens in atheromatous plaques isolated from patients with chronic periodontitis. *J Periodontal Res* 2006;41(4):350-3.
14. Zaremba M, Górska R, Suwalski P, Czerniuk MR, Kowalski J. Periodontitis as a risk factor of coronary heart diseases? *Adv Med Sci* 2006;51(Suppl 1):34-9.
15. da Silva RM, Caugant DA, Eribe ER, et al. Bacterial diversity in aortic aneurysms determined by 16S ribosomal RNA gene analysis. *J Vasc Surg* 2006;44(5):1055-60.
16. 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(1):13-6.
17. da Silva RM, Caugant DA, Lingaas PS, Geiran O, Tronstad L, Olsen I. Detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* but not bacteria of the red complex in aortic aneurysms by multiplex polymerase chain reaction. *J Periodontol* 2005;76(4):590-4.
18. Fiehn NE, Larsen T, Christiansen N, Holmstrup P, Schroeder TV. Identification of periodontal pathogens in atherosclerotic vessels. *J Periodontol* 2005;76(5):731-6.
19. Cairo F, Gaeta C, Dorigo W, et al. Periodontal pathogens in atheromatous plaques. A controlled clinical and laboratory trial. *J Periodontal Res* 2004;39(6):442-6.
20. 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(5):553-8.
21. da Silva RM, Lingaas PS, Geiran O, Tronstad L, Olsen I. Multiple bacteria in aortic aneurysms. *J Vasc Surg* 2003;38(6):1384-9.
22. Chiu B. Multiple infections in carotid atherosclerotic plaques. *Am Heart J* 1999;138(5):S534-6.
23. 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(3):687-93.
24. Nakano K, Inaba H, Nomura R, et al. Detection of cariogenic *Streptococcus mutans* in extirpated heart valve and atheromatous plaque specimens. *J Clin Microbiol* 2006;44(9):3313-7.

25. Nakano K, Nemoto H, Nomura R, et al. Serotype distribution of *Streptococcus mutans* a pathogen of dental caries in cardiovascular specimens from Japanese patients. *J Med Microbiol* 2007;56(Pt 4):551-6.
26. Swart D, Panday S. The surveillance and monitoring of tobacco control in South Africa. World Health Organization 2003.
27. Wilson K. Preparation of genomic DNA from bacteria. *Current Protocols in Molecular Biology* 2001:2-4.
28. Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia Básica*. 9ª edição. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 1999.
29. Dietrich T, Jimenez M, Krall Kaye EA, Vokonas PS, Garcia RI. Age-dependent associations between chronic periodontitis/edentulism and risk of coronary heart disease. *Circulation* 2008;117(13):1668-74.
30. Könönen E, Asikainen S, Alaluusua S, et al. Are certain oral pathogens part of normal oral flora in denture-wearing edentulous subjects? *Oral Microbiol Immunol* 1991;6(2):119-22.
31. Yasui M, Ryu M, Sakurai K, Ishihara K. Colonisation of the oral cavity by periodontopathic bacteria in complete denture wearers. *Gerodontology* 2012;29(2):e494-502.
32. Socransky SS, Haffajee AD. Periodontal microbial ecology. *Periodontol* 2000 2005;38(1):135-87.
33. Quirynen M, Van Assche N. Microbial changes after full-mouth tooth extraction, followed by 2-stage implant placement. *J Clin Periodontol* 2011;38(6):581-9.
34. Forner L, Larsen T, Kilian M, Holmstrup P. Incidence of bacteremia after chewing, tooth brushing and scaling in individuals with periodontal inflammation. *J Clin Periodontol* 2006;33(6):401-7.
35. Brennan MT, Kent ML, Fox PC, Norton HJ, Lockhart PB. The impact of oral disease and nonsurgical treatment on bacteremia in children. *J Am Dent Assoc* 2007;138(1):80-5.
36. Bahrani-Mougeot FK, Paster BJ, Coleman S, Ashar J, Barbuto S, Lockhart PB. Diverse and novel oral bacterial species in blood following dental procedures. *J Clin Microbiol* 2008;46(6):2129-32.
37. Lockhart PB, Brennan MT, Kent ML, Norton HJ, Weinrib DA. Impact of amoxicillin prophylaxis on the incidence, nature, and duration of bacteremia in children after intubation and dental procedures. *Circulation* 2004;109(23):2878-84.

38. Haffajee AD, Bogren A, Hasturk H, Feres M, Lopez NJ, Socransky SS. Subgingival microbiota of chronic periodontitis subjects from different geographic locations. *J Clin Periodontol* 2004;31(11):996-1002.
39. Mattila KJ, Valtonen VV, Nieminen MS, Asikainen S. Role of infection as a risk factor for atherosclerosis, myocardial infarction, and stroke. *Clinical Infectious Diseases* 1998;26(3):719-34.
40. Kesavalu L, Lucas AR, Verma RK, et al. Increased atherogenesis during streptococcus mutans infection in apoe-null mice. *J Dent Res* 2012;91(3):255-60.
41. Negrini TC, Duque C, Vizoto NL, et al. Influence of vicrk and covr on the interactions of Streptococcus mutans with phagocytes. *Oral Dis* 2012;18(5):485-93.
42. 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(11-12):1246-55.
43. 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(Pt 7):891-5.
44. Jung CJ, Zheng QH, Shieh YH, Lin CS, Chia JS. Streptococcus mutans autolysin atla is a fibronectin-binding protein and contributes to bacterial survival in the bloodstream and virulence for infective endocarditis. *Mol Microbiol* 2009;74(4):888-902.
45. Tsuda H, Yamashita Y, Toyoshima K, et al. Role of serotype-specific polysaccharide in the resistance of streptococcus mutans to phagocytosis by human polymorphonuclear leukocytes. *Infect Immun* 2000;68(2):644-50.
46. Nomura R, Nakano K, Naka S, et al. Identification and characterization of a collagen-binding protein, cbm, in Streptococcus mutans. *Mol Oral Microbiol* 2012.
47. Matsumoto-Nakano M, Tsuji M, Inagaki S, et al. Contribution of cell surface protein antigen c of streptococcus mutans to platelet aggregation. *Oral Microbiol Immunol* 2009;24(5):427-30.
48. 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(1):78-88.
49. Abranches J, Zeng L, Bélanger M, et al. Invasion of human coronary artery endothelial cells by streptococcus mutans OMZ175. *Oral Microbiol Immunol* 2009;24(2):141-5.

50. Nakano K, Tsuji M, Nishimura K, Nomura R, Ooshima T. Contribution of cell surface protein antigen pac of *Streptococcus mutans* to bacteremia. *Microbes Infect* 2006;8(1):114-21.
51. Jung CJ, Zheng QH, Shieh YH, Lin CS, Chia JS. *Streptococcus mutans* autolysin atla is a fibronectin-binding protein and contributes to bacterial survival in the bloodstream and virulence for infective endocarditis. *Mol Microbiol* 2009;74(4):888-902.
52. Kuramitsu HK, Qi M, Kang I, Chen W. Role for periodontal bacteria in cardiovascular diseases. *Annals of Periodontology* 2001;6(1):41-7.
53. 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 Immunol Med Microbiol* 2010;59(2):143-51.

## Tabelas e gráficos

**Tabela 1:** Lista de *primers* e sondas confeccionados para identificação de diferentes micro-organismos cariogênicos e periodontopatogênicos em placa dental, saliva e placas ateroscleróticas dos pacientes do presente estudo. Fortaleza-CE, Brasil, 2013.

Micro-organismo	Primer/Sonda TaqMan (sequencia 5'-3')
<i>S. mutans</i>	
Foward	GGCTCTCTGGTCTGTCACTGA
Reverse	TCGTTTACGGCGTGGACTAC
Sonda	FAM-CACGCTTTCGAGCCTC-NFQ
<i>P. intermedia</i>	
Foward	AGATATCATGACGAACTCCGATTGC
Reverse	CGAGCTTAAGCGTCAGTAACT
Sonda	FAM-CCGTACGCTGCCTTC-NFQ
<i>P. gingivalis</i>	
Foward	AACACGTCCGCCAACAGA
Reverse	CTATCCTTGTCCTTGACGGTG TAG
Sonda	FAM-CCCCTCCTGCAGATCT-NFQ
<i>T. denticola</i>	
Foward	TCCTTCTGTTCTTTCCTGAACTCTTTT
Reverse	GGGATTCGAACCCCTGACCTA
Sonda	FAM-CAAAGCCGCGCTCTA-NFQ

**Tabela 2:** Caracterização demográfica, clínica e odontológica de pacientes com estenose de carótida ou aneurisma de aorta. Fortaleza-CE, Brasil, 2013.

<b>Variáveis</b>	<b>Amostras</b>
<b>Demográficas</b>	<b>13 pacientes</b>
Idade	68,5± 10,1 (45-82)
Sexo	
Masculino	6 (46,1)
Feminino	7 (53,9)
<b>Diagnóstico Clínico</b>	<b>14 placas ateroscleróticas</b>
Estenose de carótida	8 (57,1)
Aneurisma de Aorta	6 (42,9)
<b>Comorbidades Médicas</b>	<b>13 pacientes*</b>
HAS	9 (69,2)
Dislipidemia	8 (61,5)
Diabetes	2 (15,4)
Outras	9 (69,2)
Nenhuma	3 (23,1)
<b>Histórico de Fumo</b>	<b>13 pacientes</b>
Fumante	1 (7,7)
Ex-fumante	6 (46,2)
Nunca fumou	6 (46,2)
<b>Perfil Odontológico</b>	<b>13 pacientes/78 sextantes</b>
CPO-D	31,5± 1,4 (27-32)
Dentes Hígidos	7 (1,7)
Dentes Cariados	7 (1,7)
Dentes Restaurados	2 (0,5)
Dentes Perdidos	400 (96,1)
PSR	
Sextantes sadios	0 (0)
Sextantes com sangramento	0 (0)
Sextantes com cálculo	1 (1,3)
Sextantes com Bolsa 4-5mm	1 (1,3)
Sextantes com Bolsa >6mm	0 (0)
Sextantes excluídos ( $\leq 1$ dente)	76 (97,4)

HAS, hipertensão arterial sistêmica; CPO-D, dentes cariados, perdidos e obturados; PSR, registro periodontal simplificado. Dados quantitativos expressos em forma de “Média±SD (mínima-máxima)”. Dados qualitativos expressos em forma de “n (%)”.

\*Comorbidades podem estar associadas ( $n_{\text{comorbidades}}=31$ ).

**Tabela 3:** Resultados de PCR em tempo real para presença/ausência de bactérias orais em amostras orais e arteriais.

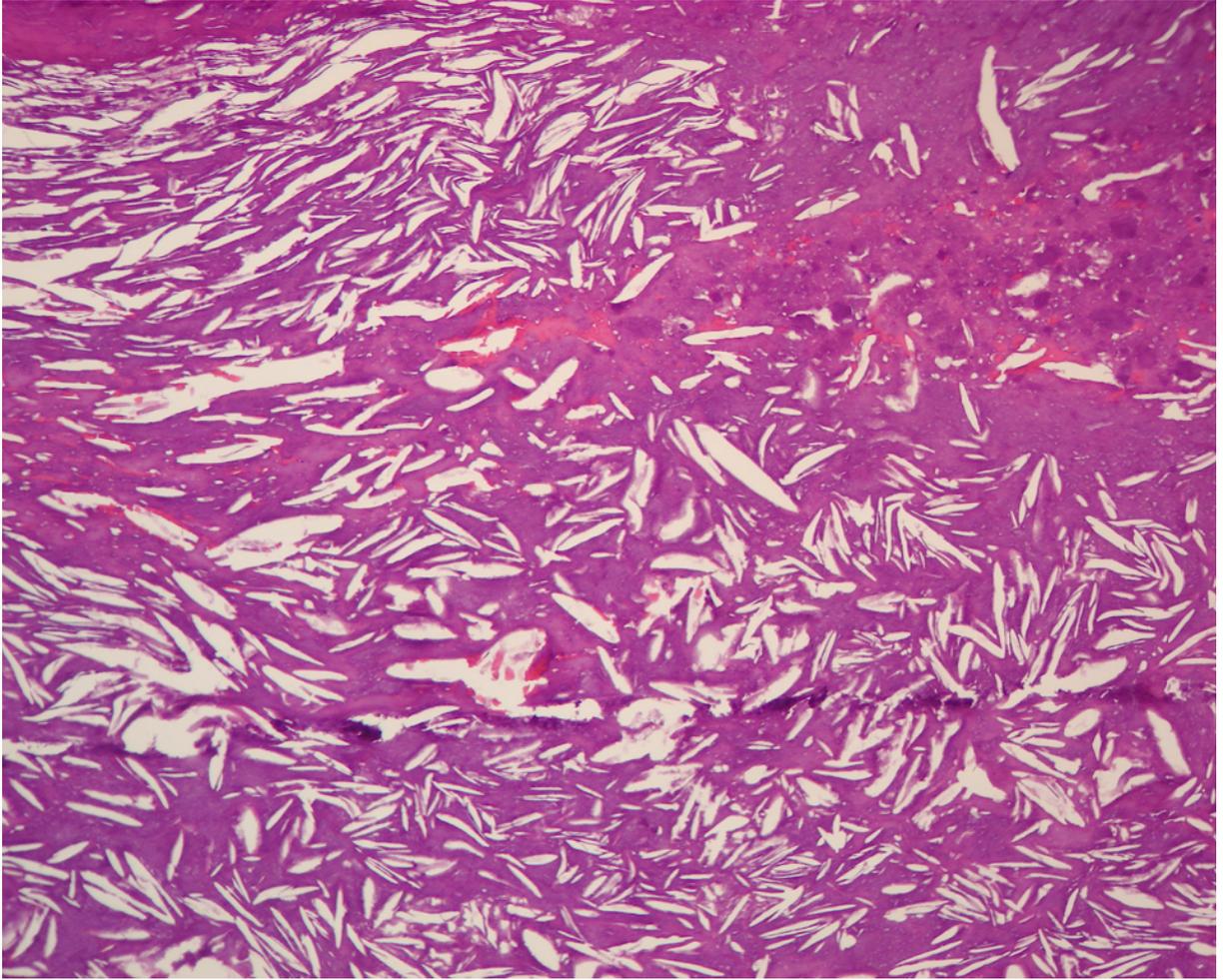
Paciente	Sm		Pi		Pg		Td	
	AO	AA	AO	AA	AO	AA	AO	AA
<b>1</b>	+	+	+	-	-	-	-	-
<b>2</b>	+	+	+	-	-	-	+	-
<b>3*</b>	+	+	+	-	-	-	-	-
<b>4**</b>	+	+	+	-	+	-	+	-
<b>5</b>	+	+	+	-	-	-	-	-
<b>6</b>	+	+	-	+	+	-	+	-
<b>7</b>	+	+	+	-	-	-	-	-
<b>8**</b>	+	+	+	-	-	-	+	-
<b>9</b>	+	+	+	-	-	-	-	-
<b>10</b>	+	+	+	-	-	-	-	-
<b>11**</b>	+	+	+	-	-	-	-	-
<b>12</b>	+	+	+	-	-	-	-	-
<b>13</b>	+	+	+	-	-	-	-	-

AO, amostra oral; AA, amostra arterial; Sm, *Streptococcus mutans*; Pi, *Prevotella intermedia*; Pg, *Porphyromonas gingivalis*; Td, *Treponema denticola*.

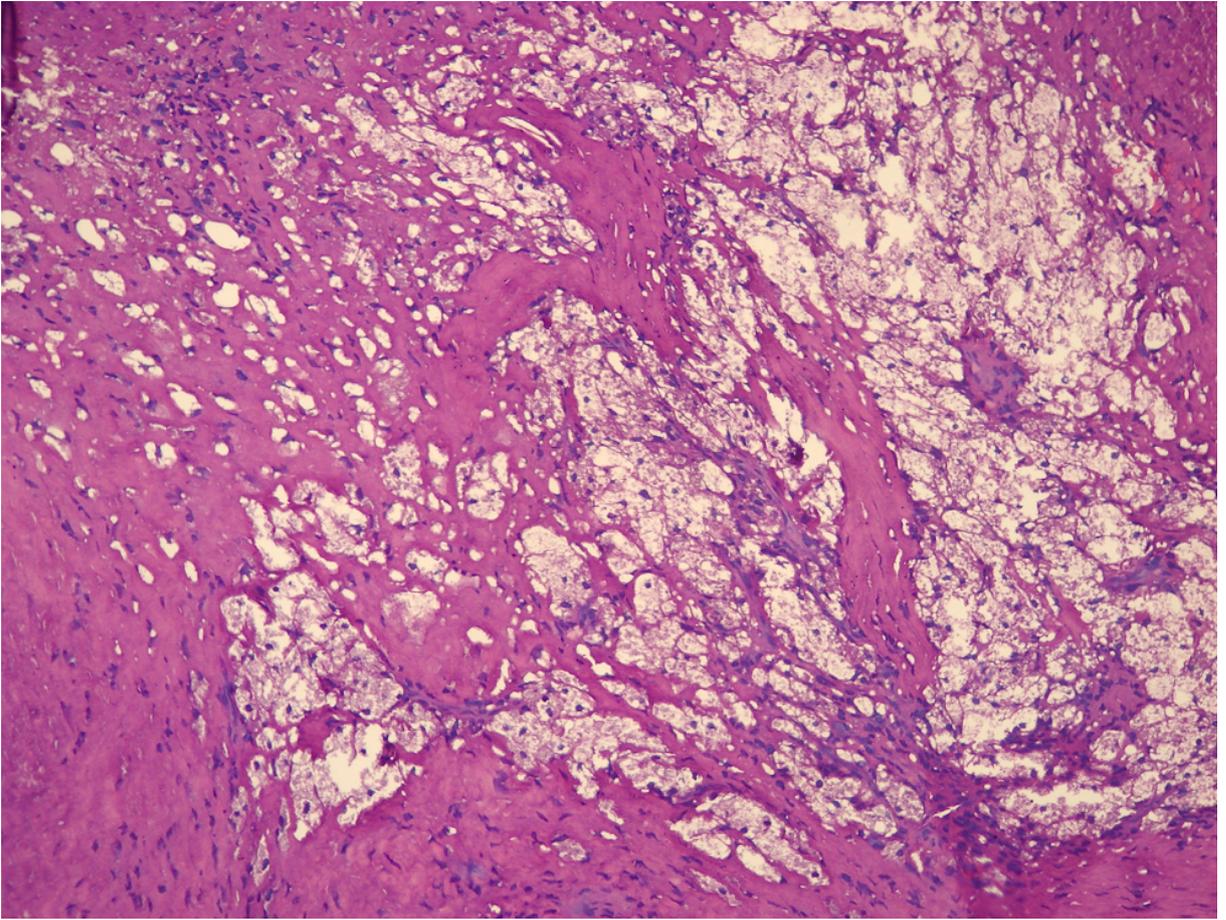
\* Paciente 3 possui duas amostras vasculares, provenientes de endarterectomias de carótidas direita e esquerda, realizadas em momentos cirúrgicos distintos.

\*\* Pacientes dentados.

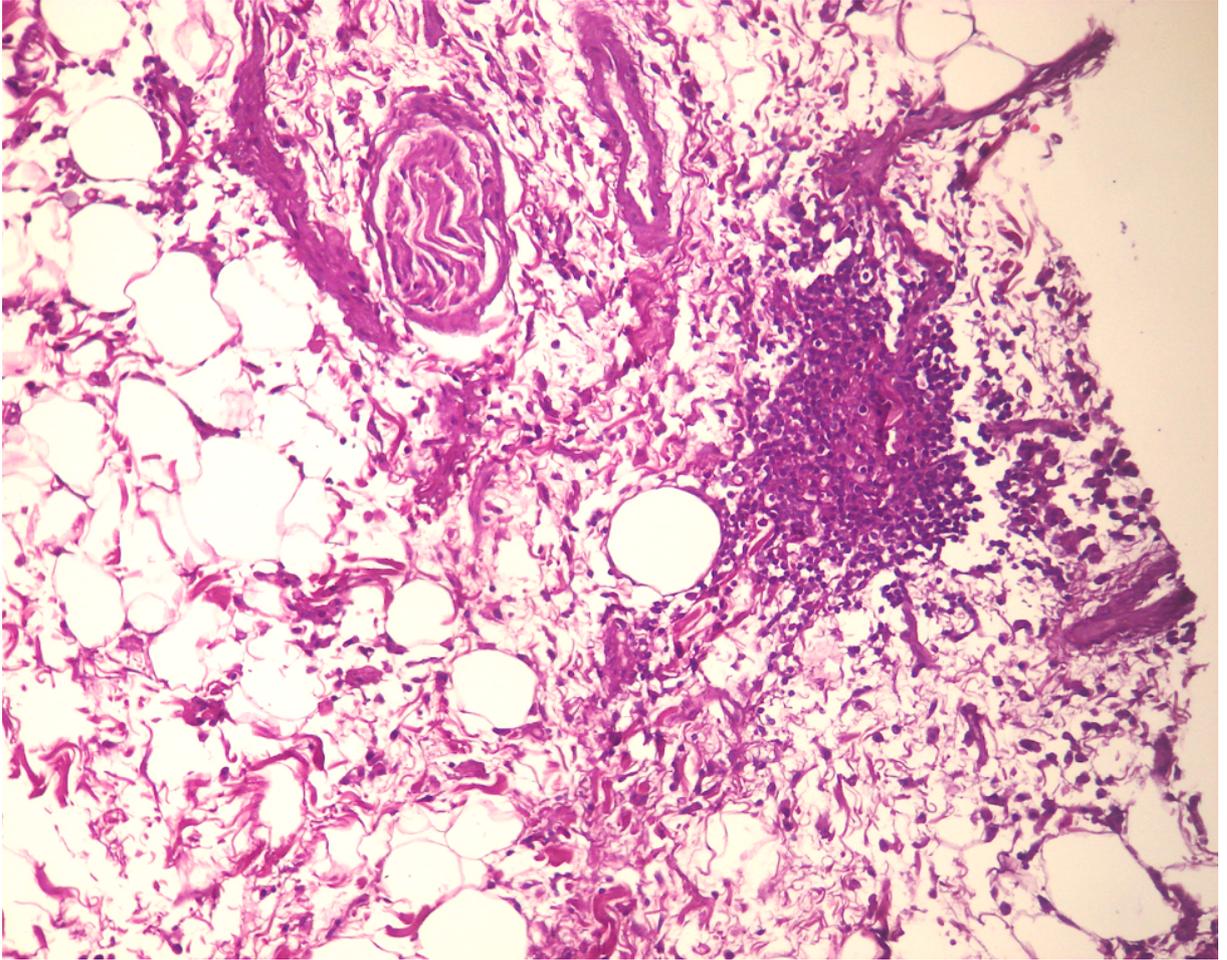
**Figura 1**



**Figura 2**



**Figura 3**



**Figura 4**

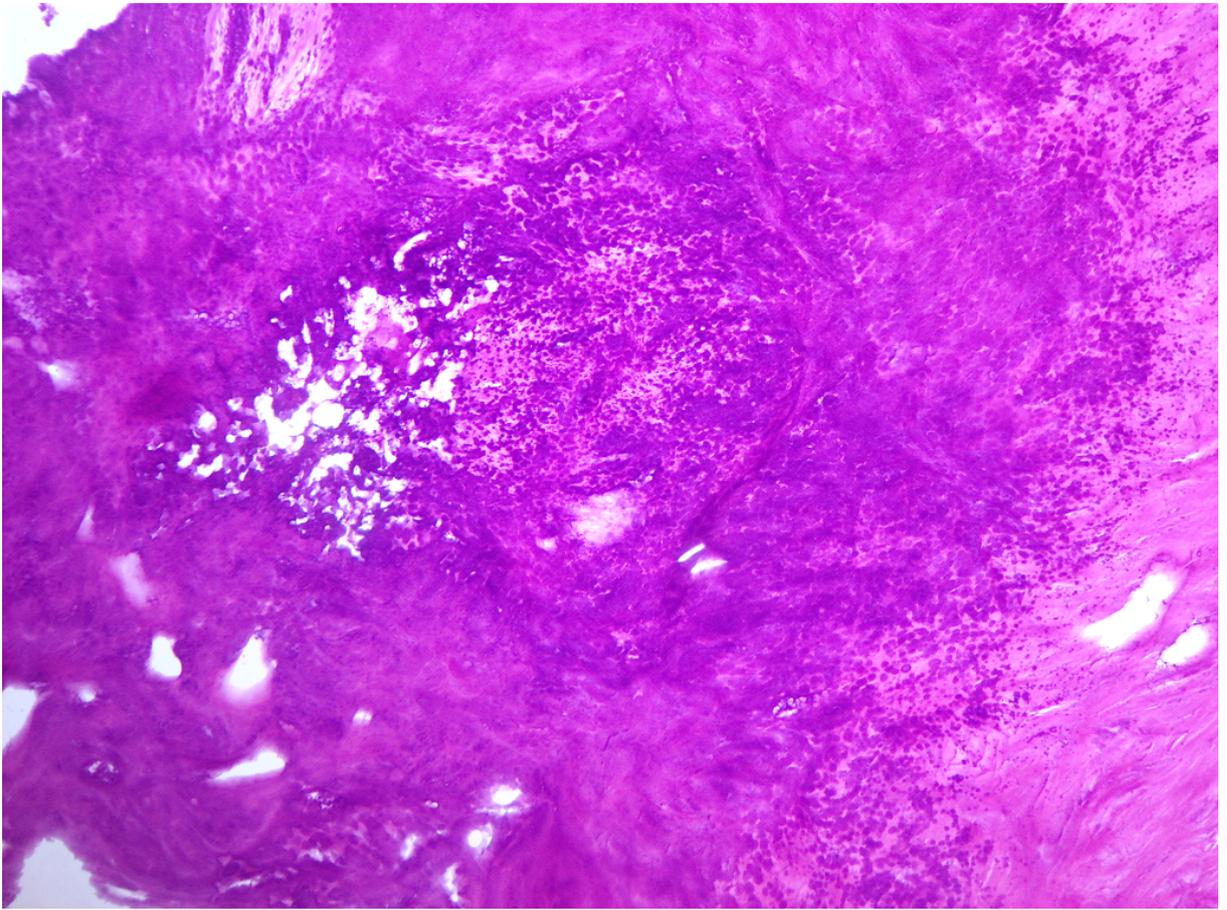


Figura 5

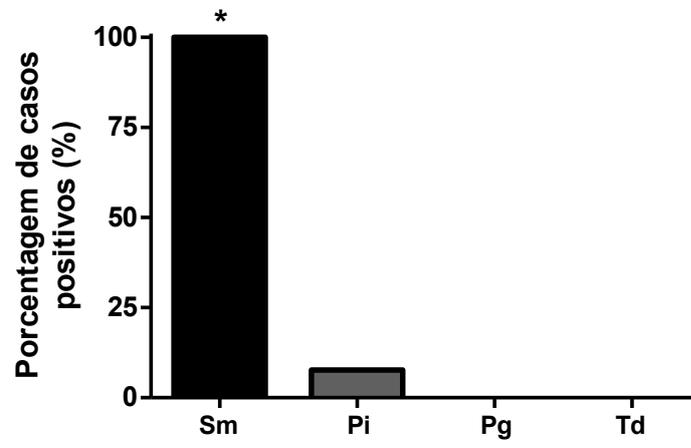


Figura 6

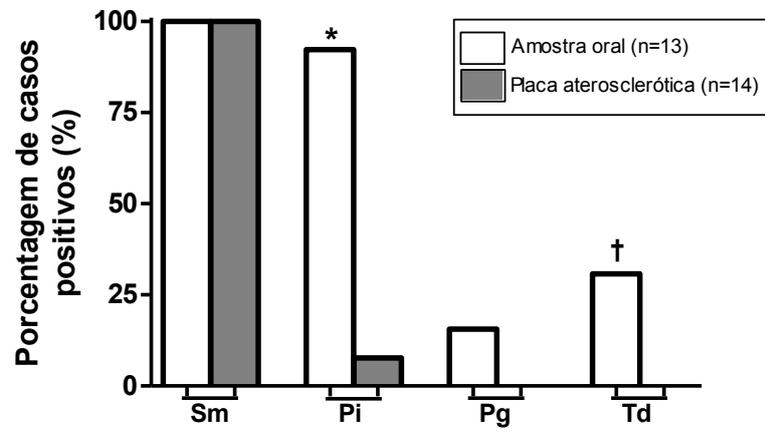
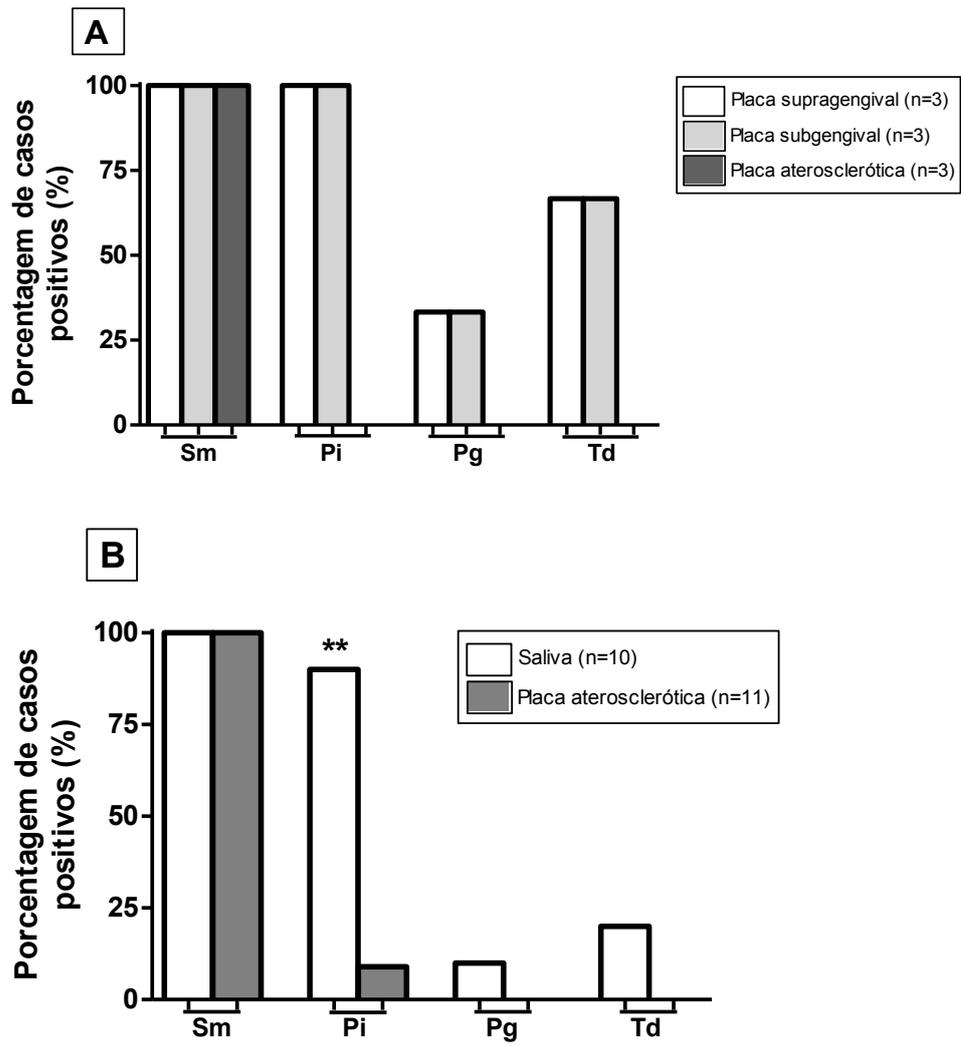


Figura 7



## Legendas das figuras

**Figura 1.** Fotomicrografia de placa aterosclerótica de estenose de carótida exibindo inúmeras fendas de cristais de colesterol. 400X.

**Figura 2.** Fotomicrografia de placa aterosclerótica de estenose de carótida. Observa-se diversos macrófagos espumosos. 400X.

**Figura 3.** Fotomicrografia de placa aterosclerótica de aneurisma de aorta exibindo células adiposas e infiltrado inflamatório. 200X.

**Figura 4.** Fotomicrografia de placa aterosclerótica de aneurisma de aorta evidenciando calcificações distróficas e depósitos de sais de cálcio. 200X.

**Figura 5:** Distribuição percentual de bactérias cariogênicas e periodontopatogênicas em amostras de placa aterosclerótica. \* Significância estatística ( $p < 0.05$ ) da frequência de Sm em relação aos demais grupos ( $n=14$ ) (teste de Fisher/ $X^2$  com correção de Boferroni). Sm, *Streptococcus mutans*; Pi, *Prevotella intermedia*; Pg, *Porphyromonas gingivalis*; Td, *Treponema denticola*.

**Figura 6:** Distribuição percentual de bactérias cariogênicas e periodontopatogênicas em amostras orais (saliva, placa supragengival ou placa subgengival) e de placas ateroscleróticas. \* Significância estatística ( $p < 0.05$ ) da frequência de Pi em amostras orais em relação a amostras de placas ateroscleróticas. † Significância estatística ( $p < 0.05$ ) da frequência de Td em amostras orais em relação a amostras de placas ateroscleróticas (teste de Fisher/ $X^2$  com correção de Boferroni). Sm, *Streptococcus mutans*; Pi, *Prevotella intermedia*; Pg, *Porphyromonas gingivalis*; Td, *Treponema denticola*.

**Figura 7:** Distribuição percentual de bactérias cariogênicas e periodontopatogênicas em amostras orais (saliva, placa supragengival ou placa subgengival) e de placas ateroscleróticas em: A. Pacientes dentados (amostras orais representadas por placa supragengival e placa subgengival). B. Pacientes desdentados (amostras orais representadas por saliva). \*\* Significância estatística ( $p < 0.05$ ) da frequência de Pi em amostras orais em relação a amostras de placas ateroscleróticas (teste de Fisher/ $X^2$  com correção de Boferroni).

#### 4 CONCLUSÃO GERAL

A partir dos resultados do presente estudo, pode-se concluir que:

- Bactérias orais estão presentes em placas ateroscleróticas, mesmo de pacientes desdentados.
- *S. mutans* foi a bactéria oral mais prevalente nas amostras vasculares.
- O perfil bacteriano oral e o perfil bacteriano vascular dos mesmos pacientes foi distinto.
- *S. mutans* foi encontrado em alta frequência em amostras orais e vasculares, mesmo de pacientes desdentados, e sua presença em placas ateroscleróticas sugere o possível envolvimento desse patógeno na progressão da doença.

## REFERÊNCIAS

- 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. **J. Clin. Microbiol.**, v. 46, n. 6, p. 2129-2132, 2008.
- BEHLE, J. H.; PAPAPANOU, P. N. Periodontal infections and atherosclerotic vascular disease: an update. **Int. Dent. J.**, v. 56, n. S4, p. 256-262, 2006.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Departamento de Atenção Básica. Área Técnica de Saúde Bucal. **Projeto SBI2000**: condições de saúde bucal da população brasileira no ano 2000: manual de calibração de examinadores. Brasília, 2001.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Análise de Situação de Saúde. **Saúde Brasil 2009**: uma análise da situação de saúde e da agenda nacional e internacional de prioridades em saúde. Brasília, 2010.
- BRENNAN, M. T.; KENT, M. L.; FOX, P. C.; NORTON, H. J.; LOCKHART, P. B. The impact of oral disease and nonsurgical treatment on bacteremia in children. *J. Am. Dent. Assoc.*, v. 138, n. 1, p. 80-85, 2007.
- 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. **J. Periodontal Res.**, v. 39, n. 6, p. 442-446, 2004.
- COLOMBO, A. P.; TELES, R. P.; TORRES, M. C.; SOUTO, R.; ROSALÉM, W. J.; MENDES, M. C.; UZEDA, M. Subgingival microbiota of brazilian subjects with untreated chronic periodontitis. **J. Periodontol.**, v. 73, n. 4, p. 360-369, 2002.
- CULLINAN, M. P.; FORD, P. J.; SEYMOUR, G. J. Periodontal disease and systemic health: Current status. *Aust. Dent. J.*, v. 54, p. S62-69, 2009.
- D'AIUTO, F.; PARKAR, M.; ANDREOU, G.; SUVAN, J.; BRETT, P. M.; READY, D.; TONETTI, M. S. Periodontitis and systemic inflammation: Control of the local infection is associated with a reduction in serum inflammatory markers. **J. Dent. Res.**, v. 83, n. 2, p. 156-160, 2004.
- DANESH, J.; WHEELER, J. G.; HIRSCHFIELD, G. M.; EDA, S.; EIRIKSDOTTIR, G.; RUMLEY, A.; LOWE, G. D.; PEPYS, M. B.; GUDNASON, V. C-reactive protein and other circulating markers of inflammation in the prediction of coronary heart disease. **N. Engl. J. Med.**, v. 350, n. 14, p.1387-1397, 2004.
- DE NARDIN, E. The role of inflammatory and immunological mediators in periodontitis and cardiovascular disease. **Ann. Periodontol.**, v. 6, n. 1, p. 30-40, 2001.
- DEMMER, T.; DESVARIEUX, M. Periodontal infections and cardiovascular disease: the heart of the matter. **J. Am. Dent. Assoc.**, v. 137, Suppl., p. 14S-20S, quiz 38S, 2006.
- EBERSOLE, L. Humoral immune responses in gingival crevice fluid: local and systemic implications. **Periodontol 2000**, v. 31, p. 135-166, 2003.

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. **J. Periodontol.**, v. 82, n. 10, p. 1469-1477, 2011.

FONG, I. W. Infections and their role in atherosclerotic vascular disease. **J. Am. Dental Assoc.**, v.133, Suppl. 1, p. 7S-13S, 2002.

FRIEDEWALD, V. E.; KORNMAN, 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. **J. Periodontol.**, v. 80, n. 7, p. 1021-1032, 2009.

GAETTI-JARDIM JÚNIOR, E.; ZANOLI, T.; PEDRINI, D. O tabagismo como fator de risco para as doenças periodontais: aspectos microbiológicos. **Rev. Odontol. Univ. São Paulo**, v.12, n. 4, p. 315-321, 1998.

HARASZTHY, V. I.; ZAMBON, J. J.; TREVISAN, M.; ZEID, M.; GENCO, R. J. Identification of periodontal pathogens in atheromatous plaques. **J. Periodontol.**, 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. **J. Gen. Intern. Med.**, 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 Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v. 95, n. 5, p. 559-569, 2003.

LEHTINIEMI, J.; KARHUNEN, P. J.; GOEBELER, S.; NIKKARI, S.; NIKKARI, S. T. Identification of different bacterial DNAs in human coronary arteries. **Eur. J. Clin. Invest.**, v. 35, n. 1, p.13-16, 2005.

LIBBY, P.; RIDKER, P. M.; MASERI, A. Inflammation and atherosclerosis. **Circulation**, v. 105, n. 9, p.1135-1143, 2002.

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. **Crit. Rev. Oral Biol. Med.**, v. 15, n. 6, p. 403-413, 2004.

MILLER-TORBERT, A.; SHARMA, S.; HOLT, R. G. Inactivation of a gene for a fibronectin-binding protein of the oral bacterium streptococcus mutans partially impairs its adherence to fibronectin. **Microbial Pathogenesis**, v. 45, n. 1, p. 53-59, 2008.

MUSSA, F. F.; CHAI, H.; WANG, X.; YAO, Q.; LUMSDEN, A. B.; CHEN, C. Chlamydia pneumoniae and vascular disease: An update. **J. Vasc. Surg.**, 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. **J. Periodontol.**, v. 78, n. 12, p. 2289-2302, 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. **Mol. Oral Microbiol.**, v. 26, n. 1, p. 78-88, 2011.

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.**, v. 44, n. 9, p. 3313-3317, 2006.

PARAHITIYAWA, N. B.; SCULLY, C.; LEUNG, W. K.; YAM, W. C.; JIN, L. J.; SAMARANAYAKE, L. P. Exploring the oral bacterial flora: Current status and future directions. **Oral Dis.**, v. 16, n. 2, p. 136-145, 2010.

PASTER, B. J.; DEWHIRST, F. E. Molecular microbial diagnosis. **Periodontol.** 2000, v. 51, n. 1, p. 38-44, 2009.

PIERRI, H.; HIGUCHI-DOS-SANTOS, M. H.; HIGUCHI, M. L.; PALOMINO, S.; SAMBIASE, N. V.; DEMARCHI, L. M.; RODRIGUES, G. H.; NUSSBACHER, A.; RAMIRES, J. A.; WAJNGARTEN, M. Density of chlamydia pneumoniae is increased in fibrotic and calcified areas of degenerative aortic stenosis. **Int. J. Cardiol.**, v. 108, n. 1, p. 43-47, 2006.

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. **J. Periodontol.**, v. 78, n. 4, p. 677-682, 2007.

ROTH, G. A.; MOSER, B.; ROTH-WALTER, F.; GIACONA, M. B.; HARJA, E.; PAPAPANOU, P. N.; SCHMIDT, A. M.; LALLA, E. Infection with a periodontal pathogen increases mononuclear cell adhesion to human aortic endothelial cells. **Atherosclerosis**, v. 190, n. 2, p. 271-281, 2007.

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. **J. Clin. Periodontol.**, v. 31, n. 12, p. 1034-1047, 2004.

SHAY, K. Infectious complications of dental and periodontal diseases in the elderly population. **Clin. Infect. Dis.**, v. 34, n. 9, p. 1215-1223, 2002.

STINSON, M. W.; ALDER, S.; KUMAR, S. Invasion and killing of human endothelial cells by viridans group streptococci. **Infect. Immun.**, v. 71, n. 5, p. 2365-2372, 2003.

VIDAL, F.; FIGUEREDO, C. M.; CORDOVIL, I.; FISCHER, R. G. Periodontal therapy reduces plasma levels of interleukin-6, c-reactive protein, and fibrinogen in patients with severe periodontitis and refractory arterial hypertension. **J. Periodontol.**, v. 80, n. 5, p. 786-791, 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global atlas on cardiovascular disease prevention and control, 2011. Disponível em: <[http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789241564373\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789241564373_eng.pdf)>. Acesso em: 20 Sept. 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Oral health surveys: basic methods.** 4th ed. Geneva, 1997.

## APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado(a) para participar, como voluntário, do projeto de pesquisa intitulado: “Análise molecular de bactérias orais em biofilme dental e placas ateroscleróticas de pacientes com doença vascular”, que tem por objetivo identificar, através de um exame, se bactérias da boca também estão presentes no coração.

Exame da boca será realizado no leito do hospital até um dia antes da cirurgia, com a utilização de materiais odontológicos básicos, como explorador e espelho, para avaliar os dentes, se estão cariados, com restauração ou se já foram extraídos, e verificar também a saúde da gengiva. Dois dentistas realizarão esse exame e, após essa avaliação, irão colher um pouco da sua saliva com a ajuda de um cone de papel para realizar uma análise, mas isso não irá causar dor para você.

Durante o exame odontológico, você pode sentir pequeno desconforto, que logo passará quando o exame terminar. Durante a cirurgia vascular, materiais danificados (placas ateroscleróticas), que seriam descartados como resíduos de materiais biológicos, serão coletados pelo cirurgião vascular e utilizados para se avaliar se existem bactérias da boca nesses materiais.

Essa coleta não irá trazer nenhum risco para você. Você pode desistir do estudo quando quiser, e mesmo assim ainda poderá realizar seu tratamento na faculdade de Odontologia. Não será divulgada a identidade (nome e imagem) de nenhum paciente que participar deste estudo.

Os pesquisadores irão utilizar os dados e o material coletado só para essa pesquisa. Além disso, os participantes ficarão sabendo dos resultados do estudo. Você não irá gastar nenhum dinheiro se participar dessa pesquisa, nem em exames ou consultas. Mas você também não irá receber nenhum dinheiro para participar.

Em qualquer etapa do estudo, você poderá falar com os dentistas responsáveis pela pesquisa para tirar qualquer dúvida. Um dos dentistas é a Dra. Clarissa Pessoa Fernandes, que pode ser encontrada no endereço: Rua Tomás Acioli, 1100, ap. 603, Joaquim Távora. CEP: 60135-180; telefones: (85) 3246-2950; Cel: (85) 96759825. Email: clarissa\_pf@hotmail.com.

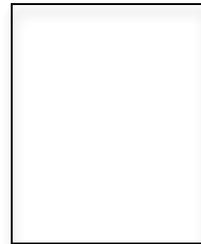
Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do HUWC (Hospital Universitário Walter Cantídeo) – Rua Francisco Pedro, 1290 – Rodolfo Teófilo - Fortaleza/Ce; fone: (85) 3366-85-89 – E-mail: : [cephuwc@huwc.ufc.br](mailto:cephuwc@huwc.ufc.br)”

Se você achar que está bem informado sobre o estudo que irá participar, os objetivos do estudo, o que será realizado, quais são os riscos e desconfortos, que é garantido que seu nome e imagem não serão divulgados, que você só participa desse estudo se quiser, e que você não irá receber nenhum dinheiro para participar dessa pesquisa, pedimos que assine no espaço abaixo.

Data \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

---

Assinatura do paciente/ representante legal



Impressão  
Digital

---

Assinatura do responsável pelo estudo

## APÊNDICE B – ÍNDICES CPOD E PSR

**CPO-D** - Registro dos números de dentes cariados, perdidos e obturados. A cada dente examinado atribui-se um dos seguintes códigos e condição ou estado dental:

Dentes Permanentes (Código)	Condição ou estado dental
0	Hígido
1	Cariado
2	Restaurado, mas com cárie
3	Restaurado e sem cárie
4	Perdido devido à cárie
5	Perdido por outras razões
6	Apresenta selante
7	Apoio de ponte ou coroa
8	Não irrompido - raiz não exposta
T	Trauma (Fratura)
9	Excluído

**PSR** – índice que avalia, através da utilização da sonda OMS-621, a condição periodontal quanto a higidez, sangramento, presença de cálculo dental ou bolsa periodontal, atribuindo, por sextante, os seguintes códigos:

**0** – faixa colorida da sonda totalmente visível. Ausência de sangramento à sondagem, cálculo ou margem de restauração defeituosa;

**1** – faixa colorida totalmente visível. Sextante com sangramento à sondagem, ausência de cálculo ou margem de restauração defeituosa;

**2** - faixa colorida totalmente visível. Sangramento à sondagem, presença de cálculo e/ou restaurações mal adaptadas;

**3** – faixa colorida parcialmente visível. Sangramento à sondagem, presença de cálculo, fatores retentivos de placa, bolsas rasas de 4 a 5 mm.

**4** – faixa colorida não visível. Sangramento à sondagem, presença de cálculo, fatores retentivos de placa, bolsas profundas de 6 mm ou mais.

\* - utilizado para indicar mobilidade dentária, recessão gengival, envolvimento de furca.

**X** - sextante excluído (menos de dois dentes presentes no sextante);

## APÊNDICE C - FICHA CLÍNICA



# Universidade Federal do Ceará

Programa de Pós-graduação em Odontologia

Mestrado em Clínica Odontológica

**Nome**

**Nascimento (DDIMMIAA)**

**Sexo**

 F  M

**Raça**

**Idade**

**Procedência**

**Cardiopatia Isquêmica**

**Fumante**

- Sim  
 Não  
 Ex-fumante

**Fatores Associados  
Comorbidades**

- HAS  Obesidade  
 Diabetes Mellitus  História Familiar  
 Dislipidemia  Outros \_\_\_\_\_

**Exame intra-oral (Pré-operatório)**

**CPO-D**

18 17 16 15 14 13 12 11 21 22 23 24 25 26 27 28

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

48 47 46 45 44 43 42 41 31 32 33 34 35 36 37 38

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

**C**

**P**

**O**

**CPOD**

CODIGO	ESTADO DENTAL
0	HIGIDO
1	CARIADO
2	R C-CARIE
3	R S-CARIE
4	P D-CARIE
5	P D-OUTRAS RAZOES
6	SELANTE
7	APOIO PONTE OU COROA
8	N-IRROMPIDO; RAIZ NAO EXPOSTA
T	TRAUMA
9	EXCLUIDO

**PSR**

1	2	3
6	5	4

- 0 - Faixa colorida da sonda totalmente visível. Ausência de sangramento à sondagem, cálculo ou margem da restauração defeituosa.
- 1 - Faixa colorida totalmente visível. Sextante com sangramento à sondagem, ausência de cálculo ou margem da restauração defeituosa.
- 2 - Faixa colorida totalmente visível. Sangramento à sondagem, presença de cálculo e/ou restaurações mal adaptadas.
- 3 - Faixa colorida parcialmente visível. Sangramento à sondagem, presença de cálculo, fatores retentores, bolsas rasas de 4 a 5 mm.
- 4 - Faixa colorida não visível. Sangramento à sondagem, presença de cálculo, fatores retentores, bolsas profundas de 6 mm ou mais.
- \* - Utilizado para indicar mobilidade dentária, envolvimento de furca, recessão gengival e problemas mucogengivais.
- X - Sextante Excluído (menos de 2 dentes)

Elemento dentário (sítio) com maior profundidade de sondagem:

Data do exame. intra-oral:

Data da coleta subgengival

Data da coleta supragengival:

Sítio para Coleta Subgengival

**Coleta Placa de Ateroma (Trans-operatório)**

Vasos Coronarianos

Outros Vasos. Qual: \_\_\_\_\_

Fase Aguda

Fase Crônica

Data:

## 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.ppgq.ufc.br>.

**ANEXO B – Protocolo de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa****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](mailto: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