



CEPPE

Centro de Pós-Graduação e Pesquisa

**MESTRADO EM ODONTOLOGIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO PERIODONTIA**

DIÊGO DE CARVALHO SOUZA

**DETECÇÃO DE PERIODONTOPATÓGENOS EM AMOSTRAS DE
BIOFILME SUBGENGIVAL E EM LESÕES VASCULARES
(ATEROMAS)**

Guarulhos
2008

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

DIÉGO DE CARVALHO SOUZA

**DETECÇÃO DE PERIODONTOPATÓGENOS EM
AMOSTRAS DE BIOFILME SUBGENGIVAL E EM LESÕES
VASCULARES (ATEROMAS)**

**Dissertação apresentada à Universidade
Guarulhos para a obtenção do título de Mestre em Odontologia
Área de concentração: Periodontia.
Orientadora: Prof.(a) Dra. Claudia Ota Tsuzuki
Co-Orientador: Prof. Dr. Jamil Awad Shibli**

Guarulhos
2008

S729d Souza, Diego de Carvalho
Detecção de periodontopatógenos em amostras de biofilme subgengival e em lesões vasculares (ateromas) / Diego de Carvalho Souza. Guarulhos, 2008.

54 f. ; 31 cm

Dissertação (Mestrado em Periodontia) - Centro de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão, Universidade Guarulhos, 2008.

Orientador (a): Prof^ª. Dr^ª. Claudia Ota Tsuzuki

Co-orientador (a): Prof^º. Dr^º. Jamil Awad Shibli

Bibliografia: f. 44-51

1. Doença Periodontal. 2. PCR. 3. Ateroma. 4. *Gengivalis*. I. Título. II. Universidade Guarulhos.

CDD 21st 617.6



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de MESTRADO, intitulada "DETECÇÃO DE PERIODONTOPATÓGENOS EM AMOSTRAS DE BIOFILME SUBGENGIVAL E EM LESÕES VASCULARES (ATEROMAS)", em sessão pública realizada em 10 de Dezembro de 2008, considerou o candidato Diêgo de Carvalho Souza aprovado.

1. Profa. Dra. Claudia Ota Tsuzuki

2. Profa. Dra. Priscila Larcher Longo

3. Prof. Dr. Marcelo de Faveri

Dedico este trabalho aos meus pais (GLEICE e CLOVIS) que sem eles nada disso poderia ser concretizado, que estavam do meu lado em todos os momentos dando incentivo, afago, conselhos e acima de tudo muito amor.

Á minha irmã (SUELLEN) que tanto amo, admiro e tenho orgulho.

Á minha namorada e futura esposa (INGRID) por estar sempre ao meu lado, servindo de apoio, escutando meus desabafos, compartilhando de todos os momentos e pelo nosso amor.

Não poderia deixar de citar DEUS, que é quem me acompanha em cada segundo dos meus passos e me conforta nos piores momentos, minha fé nele é inabalável.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Guarulhos, instituição reconhecida pela sua qualidade, onde tive a oportunidade de dar um importante passo rumo ao crescimento científico e profissional.

À Prof.(a) Dr.(a) Cláudia Ota Tsuzuki pela orientação e pela colaboração em todos os momentos de nossa pesquisa.

Ao meu Co-orientador Prof. Dr. Jamil Shibli pelos ensinamentos e pelas conversas aconselhadoras.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, pelos ensinamentos transmitidos, pelo exemplo profissional e pela amizade formada durante esses anos de Pós-Graduação.

Aos funcionários (Cristina, Izilvania, Adriana, Cintia) que de alguma forma contribuíram para os meus trabalhos durante este período.

Aos alunos da iniciação científica (Kedma, Tatiane, Priscila, Gisele, Patrícia e Luciana) que contribuíram de forma significativa para o meu aprendizado e para a execução deste trabalho.

A todos os pacientes participantes da pesquisa, o meu muito obrigado pela disponibilidade.

Aos amigos de turma Adriana, Marcel, Tatiana, Maike, Daniel, Beatriz e Mônica pela companhia, pelos momentos de diversão, aprendizado e ajuda. Agradeço a todos de coração.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste estudo.

Não precisa se preocupar em ganhar a vida. Os grandes mestres são aqueles que escolheram fazer a vida além de ganha-la.

(Neale Donald Walsch)

RESUMO

Nos últimos 25 anos, a relação entre a doença periodontal e doenças cardíacas tem sido amplamente estudada. Entre as abordagens utilizadas com essa finalidade, existe a detecção de periodontopatógenos em ambos, cavidade oral e lesões de ateroma. Os objetivos deste estudo foram: 1) determinar a prevalência de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Porphyromonas gingivalis* no biofilme subgingival de pacientes com doenças cardíacas e com diferentes condições periodontais; 2) determinar a prevalência de *A. actinomycetemcomitans* e *P. gingivalis* em biópsias de lesões ateromatosas. Anteriormente à cirurgia cardíaca, os pacientes foram submetidos à avaliação clínica oral e foram coletadas amostras de biofilme subgingival com curetas e suspensas em TE (pH 7,6), as biópsias de lesões ateromatosas foram obtidas durante a cirurgia e armazenados em TE (pH 8,0) à -20°C até o processamento. O DNA de ambas as amostras (biópsias e biofilme) foram extraídos e submetidos à reação de cadeia polimerase com primers espécies-específicos *16SrRNA* a fim de detectar as espécies acima. Os resultados mostraram que, no biofilme oral, *A. actinomycetemcomitans* e *P. gingivalis* foram detectado em 3 (14,28%) e 10 (47,62%) dos 21 pacientes, respectivamente. Nas lesões ateromatosas, *P. gingivalis* foi detectado em 5 (23,8%) e *A. actinomycetemcomitans* em 3 (14,28%) de 21 biópsias. Estes dados sugerem que apesar das lesões ateromatosas poderem abrigar os periodontopatógenos (*A. actinomycetemcomitans* e *P. gingivalis*), nem sempre eles são encontrados concomitantemente nas lesões ateromatosas e biofilme bucal.

Palavras-chave: Doença periodontal, PCR, Ateroma, *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*

ABSTRACT

In last 25 years, the relation between cardiac diseases and periodontal disease has been extensively studied. Among the approaches used with this purpose, there is the detection of periodontopathogens in both, oral cavity and atheroma lesions. The aims of this study were: 1) determine the prevalence of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in the subgingival biofilm of patients with cardiac diseases and with different periodontal conditions; 2) determine the prevalence the prevalence of *A. actinomycetemcomitans* and *P. gingivalis* in atheromatous lesions biopsies. Previous to the cardiac surgery, patients were submitted to oral clinical evaluation and the subgingival biofilm were collected with curettes and suspended in TE (pH 7.6), the biopsies of atheromatous lesions were obtained during the surgery and stored in TE (pH 8.0) at -20°C until processing. The DNA of both samples (biofilm and biopsies) were extracted and submitted to polymerase chain reaction with *16SrRNA* species-specific primers in order to detect the species above. The results showed that, in oral biofilm, *A. actinomycetemcomitans* and *P. gingivalis* were detected in 3 (14,28%) and 10 (47,62%) out 21 patients respectively. In atheromatous lesions, *P. gingivalis* could be detected in 5 (23,8%) and *A. actinomycetemcomitans* in 3 (14,28%) of 21 biopsies. These data suggest that eventhough the atheromatous lesions can harbor the periodontopathogens (*A. actinomycetemcomitans* and *P. gingivalis*) they are not always found together in atheromatous lesions and oral biofilm.

Key-words: Periodontal disease, PCR, atheroma, *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	9
1.1 Etiologia da doença periodontal.....	9
1.2 Etiologia da doença cardiovascular.....	10
1.3 Doença periodontal e Doença cardiovascular.....	11
2 PROPOSIÇÕES.....	19
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	20
3.1 Seleção das amostras.....	20
3.2 Critérios de inclusão e exclusão.....	20
3.3 Avaliação do <i>status</i> periodontal do paciente.....	21
3.3.1 Calibração dos examinadores.....	21
3.3.2 Exame clínico.....	21
3.4 Seleção dos sítios avaliados.....	22
3.5 Coleta das amostras de biofilme oral.....	22
3.5.1 Coleta das amostras de biofilme subgengival.....	22
3.5.2 Coleta do biofilme do dorso lingual.....	23
3.6 Obtenção do DNA das amostras de biofilme oral.....	23
3.7 Coleta das lesões de ateroma.....	23
3.8 Obtenção do DNA das lesões de ateroma.....	24
3.9 Avaliação da qualidade do DNA obtido.....	24
3.10 Detecção por PCR dos periodontopatógenos	25
3.11 Análise estatística.....	26
4 RESULTADOS.....	27
5 DISCUSSÃO.....	37
6 CONCLUSÃO.....	43
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44
ANEXOS.....	52

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

1.1 Etiologia da doença periodontal

A doença periodontal é uma doença infecciosa que acomete as estruturas de proteção e sustentação dos dentes, levando a perda de inserção, reabsorção óssea irreversível e eventualmente a perda do elemento dentário (AAP, 1999). A principal característica desta doença é ser causada por microrganismos específicos que colonizam os tecidos moles e duros da cavidade bucal e formam biofilmes (Socransky e Haffajee, 1994; Socransky *et al.*, 1998; Socransky e Haffajee, 2005).

Certos microrganismos presentes nos biofilmes bucais têm sido relacionados com o início e progressão da periodontite. Porém, a simples presença dessas bactérias na cavidade bucal não significa que o indivíduo obrigatoriamente desenvolverá a doença. O equilíbrio ecológico entre a microbiota periodontal e o hospedeiro na maioria das vezes é benigna e não oferece riscos para as estruturas de suporte dos dentes. Ocasionalmente um grupo de bactérias pode proliferar ou exibir novas propriedades que levem a destruição do periodonto. Sendo assim, pode-se considerar que a doença periodontal se desenvolve a partir de um desequilíbrio na interação do hospedeiro e microrganismos patogênicos que possuam o potencial de colonizar os biofilmes da cavidade bucal (Socransky e Haffajee, 2005).

O desenvolvimento, na década de 90, de técnicas imunológicas e de biologia molecular para a detecção dos microrganismos que compõe o biofilme bucal foi importante para uma descrição mais precisa das espécies bacterianas subgingivais relacionadas a diferentes formas de periodontite (Machtei *et al.*, 1999; Ávila-Campos *et al.*, 1999; Socransky *et al.*, 1994; Gomes *et al.*, 2006).

A grande vantagem dessas técnicas é a possibilidade de detecção de microrganismos difíceis de serem cultivados pelos métodos tradicionais, como a *Tannerella forsythia* e as espiroquetas.

Sendo a doença periodontal o resultado da interação entre uma infecção bacteriana, o sistema imune e resposta inflamatória do hospedeiro, vários estudos com diferentes abordagens foram realizados para verificar a correlação entre doença

periodontal e lesões ateromatosas. Suspeita-se que os periodontopatógenos poderiam alcançar a circulação sangüínea e agir diretamente sobre as placas ateromatosas ou poderiam ainda agir à distância aumentando os níveis de marcadores da inflamação sistêmica tais como a proteína C-reativa (Demmer e Desvarieux, 2006).

1.2 Etiologia da doença cardiovascular

Cerca de 16,7 milhões, ou seja, 29,2% do número de mortes no mundo tiveram como causa as doenças cardiovasculares nas suas diferentes formas. A OMS estima que até o ano de 2010 as doenças cardiovasculares serão a principal causa de morte nos países em desenvolvimento (WHO, 2003). Entre as patologias do sistema circulatório está a aterosclerose.

Em pacientes com doença cardiovascular, há uma lesão endotelial crônica e focal, seguida pela formação de um agrupamento de células. Esses lipídeos, principalmente, as lipoproteínas de baixa densidade (*Low Density Lipoproteins* - LDL) têm um conteúdo de colesterol alto e se oxidam no ateroma. Ocorre uma interação entre as células endoteliais, macrófagos, linfócitos T e células do músculo liso, devido à produção de citocinas. As citocinas derivadas do crescimento destas placas estimulam a proliferação de células do músculo liso para a parede interna dos vasos, produzindo um ateroma fibrogorduroso. O ateroma continua a crescer e pode causar oclusão parcial ou total dos vasos. Quando essa cápsula gordurosa se rompe, o interior do ateroma fibrogorduroso fica exposto e ocorre a formação de trombo, que bloqueia a artéria, levando a um enfarte distal e isquemia do miocárdio ou um ataque cardíaco (Joana-Marie *et al.*, 2008).

A aterosclerose humana é um processo crônico, progressivo e sistêmico. Caracterizado por uma resposta inflamatória e fibroproliferativa da parede arterial, em resposta as agressões à superfície. Hipercolesterolemia, hipertensão arterial, diabetes, tabagismo, reações imunológicas, inflamatórias e susceptibilidade genética individual figuram entre fatores de risco para a lesão arterial. As alterações vasculares coronárias presentes na aterosclerose derivam de três componentes fundamentais: disfunção endotelial, obstrução da luz do vaso pela placa

aterosclerótica e complicação trombótica no local da lesão (Luz *et al.*, 1999). Embora Madjid *et al.* (2007) sugiram que esta inflamação possa ser decorrente de processos infecciosos tanto agudos como crônicos, o mecanismo deste processo ainda não está totalmente esclarecido.

Segundo Sonis *et al.* (1996), a placa ateromatosa é decorrente do acúmulo anormal de lipídeos nas paredes das artérias e são lesões elevadas que podem levar a obstrução da luz vascular. As placas estão sujeitas a fibrose, calcificação, hemorragia interna e ulceração, funcionando como áreas de formação de trombose ou de coágulos sanguíneos no local.

Nos estágios avançados de aterosclerose, dois tipos de lesões podem ser encontradas: 1) placas fibrosas e estáveis, com uma porção central envolvida por uma camada rica em fibras colágenas e sem sinais de inflamação; estas lesões geralmente obstruem consideravelmente o vaso e são facilmente vistas por arteriografia; e 2) placas vulneráveis de alto risco, instáveis, com um corpo de gordura envolvido por uma fina camada de colágeno e com uma grande quantidade de macrófagos e linfócitos que levam à uma intensa reação inflamatória. Raramente obstruem os vasos e frequentemente não podem ser observados pela radiografia (Esper *et al.*, 2006).

1.3 Doença periodontal e Doença cardiovascular

Nos últimos 25 anos, a inter-relação doença periodontal – doenças sistêmicas (diabetes, alterações do sistema circulatório, eventos adversos durante a gestação e obesidade) vem sendo extensivamente estudada (Willams e Offenbacher, 2000; Reddy, 2007).

Novos fatores de risco para a aterosclerose, nos últimos 15 anos vêm sendo investigados, incluindo a inflamação e algumas infecções. Estudos soropidemiológicos sugerem uma associação entre alguns microrganismos e doenças coronarianas. O microrganismo ou parte de seus componentes estruturais são encontrados nas placas ateroscleróticas, mas poucos são os organismos encontrados viáveis (Leinonen e Pekka, 2002). *Chlamydia pneumoniae* é a mais

relacionada ao processo da aterosclerose (Coutinho *et al.*, 2000; Boman *et al.*, 2002 Higuchi *et al.*, 2003).

O primeiro estudo indicando a associação da doença periodontal com doenças sistêmicas foi realizado por Mackenzie e Millard, em 1963. Nesse estudo os autores inicialmente procuravam por uma relação entre o diabetes e alterações vasculares, perda óssea alveolar e mudanças arteriais. Analisaram 60 indivíduos com diabetes, 64 indivíduos com suspeita de diabetes, 54 ateroscleróticos não diabéticos e um grupo controle de 74 indivíduos sem nenhuma das condições citadas. E foi observado que o grupo aterosclerótico exibiu 62% mais perda óssea que o grupo controle.

Em 1968, estudos como o de Summers e Oberman, analisaram a casos de doença coronária associado à bronquite, em relação com o edentulismo e outras variáveis (fatores de risco para doença coronária), e tiveram como resultado uma estreita ligação entre doença coronária e edentulismo.

De 1968 até 1989, pesquisadores na área da cardiologia levantaram a hipótese de que poderia existir relação entre doença cardiovascular e infecção (Spodick, 1985; Wenke e Weinhold, 1988). Hipótese esta que levou ao surgimento de novos estudos buscando correlacionar a doença periodontal e a cardiovascular.

Há vários e consagrados fatores de risco para a doença coronariana. Porém, apenas na década de 80, surgiram afirmações de ligação entre infecção e doença cardíaca coronariana. O primeiro pesquisador a sugerir isso foi Spodik (1985), afirmando que certas infecções estão envolvidas na patogênese da doença cardíaca coronariana (DCC) e entre elas, as infecções dentárias.

Um estudo realizado por Syrjanen *et al.* (1989) sobre a associação de infecções dentárias (avaliada pela presença de cálculo subgingival ou a presença de supuração nas bolsas gengivais), ao acidente vascular cerebral em indivíduos jovens e de meia-idade mostrou evidências de que a saúde oral poderia predispor um paciente à outra desordem tromboembólica, como o infarto cerebral isquêmico.

Mattila *et al.*, realizaram uma série de estudos, sendo o primeiro deles publicado em 1989, o qual avaliou a saúde dental em 100 pacientes com infarto agudo do miocárdio recente e em 102 pacientes controles saudáveis, a saúde oral foi pior em pacientes com infarto agudo do miocárdio e essa associação permaneceu válida mesmo após o ajuste por idade, classe social, fumo, as concentrações de lipídeos séricos, bem como a presença de diabetes. Os autores

concluíram que seriam necessários mais estudos prospectivos em populações diferentes para confirmar a associação e para elucidar a sua natureza.

Mattila *et al.* (1993), mostraram outro estudo sobre a associação entre infecções dentárias e a aterosclerose coronariana. Neste estudo, foram avaliados, 100 indivíduos (88 homens e 12 mulheres) com média de idade de 48 anos (de 28 a 68 anos). O exame dental foi realizado analisando o índice dental total. A presença de aterosclerose foi detectada pela angiografia coronária. No grupo das mulheres não foi encontrada associação entre infecções dentárias e aterosclerose coronária, segundo os autores provavelmente pelo pequeno número da amostra. Após análise multivariada conduzida nos dados do grupo de indivíduos do sexo masculino, associações significantes foram encontradas entre infecções dentárias, idade, triglicérides e severos ateromas coronários.

Outros pesquisadores como Paunio *et al.* (1993), investigaram a associação entre o número de dentes perdidos e doenças isquêmicas diagnosticadas (angina pectoris e prévio infarto do miocárdio). Participaram desse estudo 1.384 homens, com idade de 45 a 64 anos, no qual observaram o número total de dentes e história de angina ou infarto do miocárdio prévio. Fatores como: idade, hipertensão, fumo e níveis séricos de colesterol também foram analisados. Quando considerado número de dentes perdidos associado ao hábito de fumar, observou-se correlação entre dentes perdidos e a prevalência de doenças cardíacas isquêmicas em homens de meia-idade.

Beck *et al.* (1996), foram um dos primeiros pesquisadores a levantarem a hipótese de que a associação entre a severidade da doença periodontal e o risco para a doença cardiovascular pode ser devida à uma peculiaridade de resposta inflamatória, presente em indivíduos com alto risco para desenvolver tanto a doença periodontal quanto a cardiovascular. Eles sugeriram que a doença periodontal, uma vez estabelecida, proporciona uma carga de endotoxina (lipopolissacarídeo) e citocinas inflamatórias (em especial a interleucina-1 β , prostaglandina e fator de necrose tumoral- α), que servem para iniciar e exacerbar a aterogênese e eventos tromboembólicos.

Em 1996, Joshipura *et al.*, investigaram a incidência da doença cardiovascular em relação ao número de dentes presentes e a presença da doença periodontal. A amostragem do estudo foi de 44.119 profissionais da área da saúde, do sexo masculino, sendo 58% deles Cirurgiões-Dentistas, com idade variando de

40 à 75 anos. Esses profissionais tiveram acompanhamento por seis anos, respondendo a questionários a cada dois anos e puderam concluir que a perda de dentes deve estar associada ao aumento do risco à doença cardiovascular, entre os indivíduos que possuem história de doença periodontal.

Em um estudo de Christen (1998), analisou dados do Estudo de Saúde dos Médicos dos Estados Unidos para determinar se a doença periodontal está associada ao risco para as doenças cardiovasculares. Esse estudo foi iniciado em 1982, e incluía 22.071 médicos com idade variando de 40 à 84 anos, dos quais um total de 2.563 relatou sua história pessoal da doença periodontal no primeiro exame (baseline). Os resultados não mostraram correlação estatisticamente significativa entre a doença periodontal e o risco para a doença cardiovascular.

A doença periodontal vem sendo correlacionada à outras doenças de ordem vascular, tais como as doenças periféricas vasculares (Mendez *et al.*, 1998). Como a doença cardiovascular e as doenças periféricas vasculares têm patofisiologia similar, os autores levantaram a hipótese de que a doença periodontal pode ser fator de risco para as doenças periféricas vasculares classificadas em: a) – claudicação ou coxeadura intermitente; b) – doença cerebrovascular extracranial; c) – aterosclerose aórtica, renal e doenças mesentéricas; d) – embolismo arterial e trombose.

Com o objetivo de estabelecer o papel dos microrganismos presentes na doença periodontal na evolução da doença cardiovascular, Dorn *et al.* (1999), demonstraram a capacidade que *P. gingivalis* e *Prevotella intermedia* possuem de invadir células endoteliais. Esta capacidade poderia constituir uma injúria crônica às paredes do vaso sanguíneo. Isto foi confirmado por Chou *et al.* (2005) que relatam a correlação entre a expressão de genes envolvidos nas respostas inflamatórias e aterogênicas induzidas por mecanismos fímbria dependentes de invasão de células endoteliais por *P. gingivalis*.

Expandindo o leque de correlação da doença periodontal com outras doenças de ordem vascular, Wu *et al.* (2000), avaliaram a associação entre a doença periodontal e o risco para doenças cerebrovasculares, utilizando os dados do Primeiro Estudo do Exame de Nutrição e Saúde Nacional dos Estados Unidos. Foram incluídos nesse estudo 9.962 adultos com idade variando de 25 a 74 anos, e concluíram que, pacientes com doença cerebrovasculares têm mais infecções dentais severas do que os do grupo controle.

Mattila *et al.* (2000), tiveram como proposta de estudo fornecer uma descrição detalhada das patologias dentais encontradas nos pacientes com doenças ateroscleróticas coronarianas nas diferentes doenças cardiovasculares, comparando-os com os do grupo controle incluindo indivíduos mais velhos. A amostra contou com 85 pacientes com diagnóstico de doença cardiovascular com média de idade de 56,8 anos e 53 pacientes para o grupo controle com média de idade de 56,3 anos. Os autores observaram que os índices dentais foram mais altos nos pacientes com doença cardiovascular do que nos do grupo controle, mas a diferença não foi estatisticamente significativa, levando-os a concluir que o papel das infecções dentárias como fator de risco para a doença cardiovascular varia de acordo com as características da população estudada.

Emingil *et al.* em 2000, investigaram a associação entre as condições periodontais e doenças ateroscleróticas coronarianas em pacientes com infarto agudo do miocárdio e doenças crônicas do coração, na população da Turquia. Fizeram parte da amostragem deste estudo 120 pacientes, 60 com infarto agudo do miocárdio e 60 com doenças ateroscleróticas coronarianas crônicas, levaram em consideração todos os fatores de risco para doença aterosclerótica. O número de dentes perdidos, profundidade de sondagem e sangramento a sondagem também serviram de parâmetros e eles puderam chegar à conclusão que houve uma correlação estatisticamente significativa entre doença periodontal e doença cardiovascular.

Katz *et al.* (2002), avaliaram a associação da doença periodontal com níveis elevados de lipídio no sangue, que é um fator de risco conhecido para a doença aterosclerótica. Participaram do estudo 10.590 militares de Israel, 9.421 homens e 1.169 mulheres, com idade variando de 19 a 61 anos (média 31 anos), como resultado, observaram que a presença de bolsa periodontal teve associação positiva com altos níveis de colesterol e níveis de lipoproteínas de baixa densidade nos homens. Nas mulheres não foi encontrada associação significativa.

Experimentos em animais mostram que a periodontite pode contribuir para a patogênese da aterosclerose favorecendo o depósito de lipídeos na aorta quando comparados aos animais controle (sem doença periodontal induzida). Entretanto neste mesmo estudo não foi possível detectar os periodontopatógenos nas amostras de tecido arterial fixado em formalina (Jain *et al.*, 2003).

A partir do ano de 2000, começaram a aparecer alguns estudos levando em consideração a proteína C-reativa como um forte marcador dessa correlação. D'Aiuto *et al.* (2004), realizou um estudo associando doença periodontal e proteína C-reativa com risco cardiovascular. A amostra contou com 94 pacientes sistemicamente saudáveis com periodontite severa generalizada. Os pacientes foram submetidos à terapia periodontal não-cirúrgica. Parâmetros periodontais e mediadores inflamatórios (Interleucina - 6 e Proteína C Reativa) foram monitorados aos 2 e aos 6 meses após a terapia. Foi observado que os indivíduos com melhor resposta oral após a terapia periodontal foram os mesmos que diminuíram de categoria de risco inflamatórios.

Cueto *et al.* (2005), fizeram um estudo associando a periodontite como fator de risco para infarto agudo do miocárdio. Um estudo de caso-controle que foi conduzido com 149 pacientes espanhóis idosos com idade entre 40 e 75 anos. Destes, 72 casos possuíam o quadro de infarto agudo do miocárdio incluindo: (fumantes, hipertensos, diabéticos e com hipercolesterolemia), e 77 controles. A periodontite foi medida com a porcentagem dos locais com perda clínica de inserção maior que 3 mm. Um modelo de regressão logística foi criado para estimar o “efeito” da periodontite no infarto agudo do miocárdio. Como resultado o grupo com infarto agudo do miocárdio (n=72) quando comparados ao grupo controle (n=77) tiveram sempre resultados piores para todas as variáveis periodontais estudadas: retração gengival, profundidade de bolsa e periodontite. Os autores concluíram que, quando foi feito os ajustes levando-se em consideração os fatores de risco conhecidos para o infarto agudo do miocárdio, a periodontite teve uma associação importante.

Utilizando a técnica da Reação da Polimerase em Cadeia (PCR), o DNA das espécies bacterianas do complexo vermelho (*P. gingivalis*, *Treponema denticola* e *T. forsythia*), descritas por Socransky *et al.* (1998), vem sendo detectado em lesões ateromatosas (Okuda *et al.*, 2001; Stelzel *et al.*, 2002; Ishihara *et al.*, 2004; Fiehn *et al.*, 2005; Tarquini *et al.*, 2007). *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* outra espécie relacionada à doença periodontal, também vem sendo detectada nestes tipos de lesão (Pucar *et al.*, 2007).

Com o intuito de confirmar a hipótese de que periodontopatógenos podem ter algum tipo de influência sobre a doença cardiovascular aterosclerótica, Padilla *et al.* (2006), realizaram um estudo sobre patógenos periodontais isolados de placas de ateromas isoladas de pacientes com periodontite crônica. Foram obtidos dados

clínicos de 12 pacientes com doença periodontal e placas de ateroma. Estas amostras foram cultivadas em meios de cultura apropriadas e incubadas em condições de anaerobiose. As bactérias periodontais foram identificadas usando o PCR e como resultado obtiveram que nove dos pacientes apresentaram diferentes espécies bacterianas de periodontopatógenos e em dois o *A. actinomycetemcomitans* esteve presente nas bolsas periodontais e nas placas ateromatosas.

Outros microrganismos que também já foram detectados em lesões vasculares são: *T. forsythia* (Tarquini *et al.*, 2007), *Eikenella corrodens*, *P. gingivalis* e *P. intermedia* (Dorn *et al.*, 1999), *T. denticola* (Okuda *et al.*, 2001), *C. pneumoniae*, (Boman *et al.*, 2002; Cochrame *et al.*, 2003), tornando evidente a grande diversidade de microrganismos já encontrados.

D' Aiuto *et al.* (2007), fizeram um estudo sobre os efeitos agudos da terapia periodontal em bio-marcadores da saúde vascular. Com uma amostra de 55 pacientes e idade variando entre 30 e 64 anos. Os pacientes com periodontite severa receberam uma sessão intensiva de terapia periodontal com anestesia local. Foi quantificada a concentração de marcadores inflamatórios, de solubilidade hemostática, endotelial do plasma e antígeno do fator de von Willebrand, tendo como resultados uma significativa mudança após a terapia periodontal que suscitou em uma importante ativação do sistema hemostático ($p < 0,001$) juntamente com uma disfunção endotelial moderada ($p < 0,05$) e no fator de Von Willebrand ($p < 0,01$).

Segundo Gotsman *et al.* (2007), o grau de destruição periodontal está relacionado com o quadro de doenças da artéria coronária enquanto que a qualidade do biofilme dental subgingival está relacionada às Síndromes Coronarianas Agudas. Estes autores observaram que pacientes com a Síndrome Coronariana Aguda apresentavam um índice de placa e o nível de *P. gingivalis* maiores que os pacientes que apresentavam um quadro estável.

A aterosclerose parece estar relacionada às infecções por periodontopatógenos, uma vez que a presença destes é detectada numa porcentagem alta (46,67%) em lesões ateromatosas, enquanto que em vasos como a artéria mamária interna, raramente afetada por alterações ateromatosas, estes patógenos não foram detectados (Pucar *et al.*, 2007).

É de grande divergência a porcentagem encontrada de periodontopatógenos em lesões ateromatosas, em decorrência das inúmeras variáveis contidas em cada pesquisa. Essas variáveis são decorrentes, desde a ausência de dentes na cavidade bucal, passando por uma coleta de biofilme em dentes mais anteriores, meios diagnósticos (sondas de DNA, cultura e PCR) até coletas em pacientes que se enquadram apenas no grupo com doença periodontal crônica avançada.

Ainda são poucos os estudos que tratam da correlação da doença periodontal com a doença cardiovascular através da detecção de periodontopatógenos em lesões ateromatosas, em sua maioria, as pesquisas se utilizam apenas de fatores de riscos clássicos para doença cardiovascular juntamente com parâmetros clínicos periodontais. Até mesmo por essa baixa quantidade de estudos detectando periodontopatógenos em lesões vasculares, a cada estudo feito surgem novos véis, tornando essa correlação cada vez mais complexa, e necessitando de mais estudos.

2 PROPOSIÇÕES

Baseado no exposto, este estudo se propõe:

1- Determinar a ocorrência de periodontopatógenos (*P. gingivalis* e *A. actinomycetemcomitans*) em amostras de biofilme subgengival e por meio de Reação de Polimerase em Cadeia (PCR) em pacientes com o diagnóstico clínico de aterosclerose com indicação para cirurgia cardíaca de Revascularização do Miocárdio.

2- Determinar a ocorrência de periodontopatógenos (*P. gingivalis* e *A. actinomycetemcomitans*) em lesões vasculares por meio de Reação de Polimerase em Cadeia (PCR) em pacientes com o diagnóstico clínico de aterosclerose com indicação para cirurgia cardíaca de Revascularização do Miocárdio.

3- Fazer a comparação da detecção nas amostras de biofilme subgengival e nas amostras de lesões vasculares.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Seleção da amostra

Foram selecionados n=21 pacientes, com o diagnóstico de Doença Coronariana Aterosclerótica para a remoção cirúrgica das lesões ateromatosas do setor de Cirurgia Cardiovascular (Equipe **Prof. Dr. Noedir Groppo Stolf**; Equipe **Prof. Dr. Kenji Nakiri**; Equipe **Dr. Gil Vicente Lico Cividanes**; Equipe **Prof. Dr. Bonno Van Bellen e Equipe Prof. Dr. Amarildo**) da Real Benemérita Associação Portuguesa de Beneficência / Hospital São Joaquim foram selecionados para participar deste estudo. O projeto foi submetido à apreciação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Real Benemérita Associação Portuguesa de Beneficência / Hospital São Joaquim e aprovado. (Anexo 1)

Todos os participantes foram informados dos objetivos do estudo, de seus riscos e benefícios. Os que concordaram em participar do estudo assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo 2), todos os pacientes também assinaram um termo de doação de material biológico (Anexo 3) e responderam a um questionário de saúde/anamnese (Anexo 4), estando de acordo com as diretrizes e normas do Conselho Nacional de Saúde (Resolução nº 196/96). Todas as informações e explicações sobre o estudo foram contempladas no TCLE e transmitidas aos participantes. Três alunos de pós-graduação, regularmente matriculados no curso de pós-graduação em Odontologia – área de concentração em Periodontia da Universidade Guarulhos foram responsáveis pela coleta do material. Os alunos foram selecionados e apresentados à equipe médica previamente ao início das coletas e orientados quanto aos procedimentos a serem realizados.

3.2 Critérios de inclusão e exclusão

Os critérios de inclusão foram: todos os pacientes com indicação cirúrgica de Revascularização do Miocárdio da Real Benemérita Associação Portuguesa de

Beneficência / Hospital São Joaquim.

Os critérios de exclusão foram os seguintes: grávidas ou lactantes; história de tratamento periodontal ou antibioticoterapia nos últimos seis meses; doença sistêmica que comprometa a resposta do hospedeiro (exceto diabetes) ou exija medicação profilática ao tratamento.

3.3 Avaliação do *status* periodontal do paciente

3.3.1 Calibração dos examinadores

A metodologia empregada para a calibração foi preconizada por Araújo *et al.* (2003) no qual se avaliou o erro padrão da medida (e.p.m) e o erro médio percentual (e.m.p) para os parâmetros clínicos contínuos (profundidade de sondagem e nível clínico de inserção). O (e.p.m.) e o (e.m.p.) inter-examinador foram respectivamente de 0,55mm e 15,32% para a profundidade de sondagem, 0,42mm e 9,35% para nível clínico de inserção e o (e.p.m.) e o (e.m.p.) intra-examinador (1) foram respectivamente de 0,35mm e 10,77% para profundidade de sondagem, 0,49mm e 12,09% para nível clínico de inserção e o intra-examinador (2) foram respectivamente 0,12mm e 3,21% para profundidade de sondagem, 0,35mm e 7,50% para nível clínico de inserção.

3.3.2 Exame clínico

As mensurações clínicas foram realizadas em seis sítios por dente (mesiovestibular, vestibular, distovestibular, mesiolingual, lingual, distolingual), em todos os dentes (exceto terceiros molares) e os dados registrados na ficha de exame periodontal. Para realização do exame clínico periodontal foi utilizada sonda periodontal milimetrada Carolina do Norte (Hu-Friedy, Chicago). Os parâmetros clínicos avaliados foram:

•Índice de Placa Visível – IPV: Observa-se a presença ou ausência de placa dentária supragengival visível, após lavagem e secagem dos dentes. A

ausência de placa recebe o escore 0 (não-visível) e na placa recebe o escore 1 (visível).

•Sangramento Gengival – ISG: Observa-se a presença ou ausência de sangramento na gengiva marginal após percorrer levemente com a sonda periodontal ao longo do sulco gengival. A ausência de sangramento recebe o (escore 0) e a presença de sangramento recebe o (escore 1).

•Sangramento à Sondagem – SS: Presença (escore 1) ou ausência (escore 0) de sangramento até 20 segundos após a sondagem com sonda periodontal milimetrada.

•Supuração – SUP: Presença (escore 1) ou ausência (escore 0) de supuração até 20 segundos após a sondagem com sonda periodontal milimetrada.

•Profundidade de Sondagem – PS: Distância, em milímetros, entre a margem gengival livre e a porção mais apical sondável do sulco/bolsa periodontal.

Nível Clínico de Inserção – NCI: Distância, em milímetros, entre a junção esmalte-cimento e a porção mais apical sondável do sulco/bolsa periodontal.

3.4 Seleção dos sítios avaliados

Foram selecionados os 6 sítios não-contíguos de cada voluntário, sendo 2 sítios de cada categoria de profundidade de sondagem (PS), ou seja, $PS \leq 3\text{mm}$ (rasos), PS entre 4-6mm (moderados) e $PS \geq 7\text{mm}$ (profundos). Na ausência de alguma das categorias, foram selecionados os sítios mais profundos e mais distais. Dentes com próteses mal-adaptadas e lesão de cárie extensa não foram selecionados.

3.5 Coleta das amostras de biofilme oral

3.5.1 Coleta das amostras de biofilme subgengival

Após a remoção do biofilme supragengival com gaze estéril, as amostras de biofilme subgengival foram coletadas dos 6 sítios previamente selecionados por meio de curetas Gracey estéreis, e colocadas separadamente em tubos de Eppendorf contendo 120 μl de solução tampão TE (10 mM Tris-HCL, 1 mM EDTA, pH 7,6), que foram armazenados a -20°C até serem processados.

3.5.2 Coleta do biofilme do dorso lingual

Nos casos dos pacientes edêntulos foi coletada amostra da região posterior da língua por meio de curetas Gracey estéreis, e colocadas separadamente em tubos de Eppendorf contendo 120 µl de solução tampão TE (10 mM Tris-HCL, 1 mM EDTA, pH 7,6), que foram armazenados a -20°C até serem processados.

3.6 Obtenção do DNA das amostras de biofilme oral

Para a realização da detecção dos periodontopatógenos (*P. gingivalis* e *A. actinomycetemcomitans*) foi preparado um "pool" das amostras subgengivais, onde 10 µl de cada amostra obtida foram aliqüotados e transferidos para um micro tubo limpo, resultando em amostra de 60 µl por paciente. Dos pacientes edêntulos foram utilizados 60 µl da amostra proveniente da saburra do paciente. Aos 60 µl do pool das amostras de biofilme subgengival ou da suspensão de saburra dos pacientes foram acrescidos 1,36µl de proteinase K (110mg/ml) (cód. P 6556, Sigma Aldrich) e Tween 20 (5%) (cód. 1280, Vetec Química Fina LTDA), os quais foram submetidos ao aquecimento à 55°C por 2 horas, seguindo-se uma incubação à 94°C por 10 minutos para a inativação das enzimas. (Paster *et al.*, 2001).

A quantificação do DNA presente nas amostras foi realizada em espectrofotômetro (Nanodrop - Thermo scientific-USA) e somente as amostras que atingiram a concentração de aproximadamente 50ng/µl foram utilizadas.

3.7 Coleta das lesões de ateroma

As lesões de ateroma foram obtidas de pacientes com indicação cirúrgica para remoção da placa ateromatosa. Durante o procedimento cirúrgico, o médico cirurgião cardíaco removeu as placas de ateroma e colocou separadamente em microtubos contendo 120 µl de solução tampão TE (10 mM Tris-HCL, 1 mM EDTA, pH 8,0).

3.8 Obtenção do DNA das lesões de ateroma

Os fragmentos de biópsia foram cortados em fragmentos menores com o auxílio de lâminas de bisturi esterilizadas e sobre a superfície de placas de petri descartáveis, esterilizadas e macerados com pistilos para microtubos.

A extração foi realizada conforme o fabricante utilizando o kit (MasterPure™ DNAPurification Epicentre).

3.9 Avaliação da qualidade do DNA obtido

Amostras subgengivais e lesões ateromatosas

Após a extração de DNA, conforme o descrito no item 3.6, as amostras foram submetidas às reações de polimerase em cadeia utilizando os primers Universais para procariotos. (Paster *et al.*, 2001):

Universal F: 5' GAG AGT TTG ATY MTG GCT CAG 3'

Universal R: 5' GAA GGA GGT GWT CCA RCC GCA 3'

Para cada reação foram adicionados 10mM de Tris-HCl; 50mM KCl; 1,5mM MgCl₂; 25pMoles do primer F; 25pMoles do primer R; e 1,0U de Taq polymerase Platinum (Invitrogen).

Parâmetros utilizados para a amplificação: Desnaturação inicial de: 94°C/4minutos seguidos de 35 ciclos de 94°C/45 segundos; 60°C/45 segundos; 72°C/90 segundos e uma extensão final a 72°C por 15 minutos. As reações foram mantidas a 4°C (Gen Amp PCR System 2400, Applied Biosystems, Califórnia, EUA).

As reações foram submetidas à corrida eletroforética em gel de agarose (Invitrogen) a 1,0%, em tampão Tris Acetato EDTA (TAE) (Tris acetato 40mM, pH 8,5; EDTA 2mM), e corados com "Blue Green" (LGC-Biotecnologia). Os amplicons foram visualizados sob luz ultravioleta (L-Genious; Syngene) e documentados utilizando o software GeneSnap (Syngene).

Amplicons de ~1500 pares de base indicaram positividade para presença de bactérias.

3.10 Detecção por PCR dos periodontopatógenos

A. actinomycetemcomitans

A detecção de *A. actinomycetemcomitans* na amostra de biofilme subgengival e nas lesões vasculares foi realizada pela técnica PCR utilizando primers *16SrRNA* espécie-específico para *A. actinomycetemcomitans* (Tran & Rudney, 1996).

Primers utilizados:

AaF: 5'ATTGGGGTTTAGCCCTGGTG3'

C11R: 5'ACGTCATCCCCACCTTCCTC3'

Para cada reação foram adicionados 10mM de Tris-HCl; 50mM KCl; 2,5mM MgCl₂; 0,25μM do primer AaF; 0,5μM do primer C11R e 3,5U de Taq polymerase (Invitrogen).

Parâmetros utilizados para a amplificação: 35 ciclos de 95°C/1minuto; 60,7°C/1minuto; 72°C/1minuto e uma extensão final a 72°C por 10 minutos. As reações foram mantidas a 4°C (Gen Amp PCR System 2400, Applied Biosystems, Califórnia, EUA).

As reações foram submetidas à corrida eletroforética em gel de agarose (Invitrogen) a 1,5%, em tampão Tris Acetato EDTA (TAE) (Tris acetato 40mM, pH 8,5; EDTA 2mM), e corados com "Blue Green" (LGC-Biotecnologia). Os amplicons foram visualizados sob luz ultravioleta (L-Genious; Syngene) e documentados utilizando o software GeneSnap (Syngene).

Amplicons de 360 pares de base indicaram positividade para *A. actinomycetemcomitans*

P. gingivalis

A detecção de *P. gingivalis* na amostra de biofilme subgengival e nas lesões vasculares foi realizada pela técnica de PCR utilizando primers *16SrRNA* espécie-específico (TRAN & RUDNEY, 1996).

Primers utilizados:

PgF: 5'TGTAGATGACTGATGGTGAAAACC3'

C11R: 5'ACGTCATCCCCACCTTCCTC3'

Para cada reação foram adicionados 10mM de Tris-HCl; 50mM KCl; 2,5mM MgCl₂; 0,80μM do primer PgF; 0,5μM do primer C11R e 3,5U de Taq polymerase (Invitrogen).

Parâmetros utilizados para a amplificação: 35 ciclos de 95°C/1minuto; 60,7°C/1minuto; 72°C/1minuto e uma extensão final a 72°C por 10 minutos. As reações foram mantidas a 4°C (Gen Amp PCR System 2400, Applied Biosystems, Califórnia, EUA).

As reações foram submetidas à corrida eletroforética em gel de agarose (Invitrogen) a 1,5%, em tampão Tris Acetato EDTA (TAE) (Tris acetato 40mM, pH 8,5; EDTA 2mM), e corados com “Blue Green”(Cód. 13-15009.0 LGC-Biotecnologia). Os amplicons foram visualizados sob luz ultravioleta (L-Genious; Syngene) e documentados utilizando o software GeneSnap (Syngene).

Amplicons de 197 pares de base indicaram positividade para *P. gingivalis*.

3.11 Análise estatística

Os dados foram avaliados por meio de análise descritiva.

4 Resultados

Para este estudo foram submetidos ao exame clínico oral, 118 pacientes que foram internados no Real e Benemerita Associação Portuguesa de Beneficência Portuguesa - Hospital São Joaquim no período de maio de 2008 à agosto de 2008. Destes, foram coletadas biópsias de lesões ateromatosas de 21 pacientes a partir dos quais foram obtidos os resultados deste trabalho.

Dos 21 pacientes 11 eram do sexo masculino e 10 eram do sexo feminino. A Tabela 1 apresenta a distribuição dos pacientes segundo a condição periodontal e o registro do número de pacientes usuários de prótese total.

Tabela 1: Distribuição dos pacientes segundo sua condição periodontal (AAP, 1999) e pacientes usuários de prótese total.

Condição periodontal do paciente:	Número de pacientes
Periodontite	(9)
Gengivite	(3)
Saúde	(5)
Usuário de prótese total	(4)
Total	(21)

Parâmetros clínicos: Saúde (PS \leq 3mm, SS<10%) Periodontite (PS e NCI>3,0mm) Gengivite PS>3mm).

As características de profundidade de sondagem, nível clínico de inserção, sangramento a sondagem, índice de sangramento gengival, índice de placa visível, supuração, idade, hábito de fumar e utilização de prótese total deste grupo de pacientes, estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2: Media dos parâmetros clínicos, hábito de fumar, uso de prótese total e idades dos pacientes.

Características	Pacientes (n=17)
PS	3,50
NCI	4,40
SS	31,36%
ISG	3,70%
IPV	73,50%
SUP	0,17%
Fumantes	8
Idade	61,85
Utilização de prótese total	4

PS: Profundidade de sondagem; NCI: Nível clínico de inserção;
 SS: Sangramento a sondagem; ISG: Índice de sangramento gengival;
 IPV: Índice de placa visível; SUP: Supuração.

A tabela 3, representa os grupos de pacientes com profundidade de sondagem maior que 3mm, distribuídos por grupos de dentes ausentes ou edêntulos totais.

Tabela 3: Grupo de pacientes com média de profundidade de sondagem maior que 3mm classificados por número de dentes ausentes ou edêntulos totais.

	Número de dentes		
	0-11 dentes ausentes	12-27 dentes ausentes	Edêntulos
Número de Pacientes	8 p.1, p.2, p.8, p.10, p.15, p.16, p.18, p.20	9 p.3, p.5, p.6, p.7, p.11, p.12, p.13, p.17, p.21	4 p.4, p.9, p.14, p.19
Número de pacientes com PS>3mm	3 (14,28%) p.1, p.2, p.10	6 (28,57%) p.5, p.6, p.7, p.12, p.13, p.21	-

PS: Profundidade de sondagem; P: Número dos pacientes.

A partir das amostras subgengivais (“pool” de 6 sítios coletados) e das biópsias de lesões ateromatosas foram realizadas extrações de DNA. Das amostras subgengivais, somente as que apresentaram uma concentração média de DNA de 50ng/μl. Para confirmar a integridade do DNA para os experimentos, foram

realizadas reações de polimerase em cadeia utilizando primers universais *16SrRNA* (Figura 1 e Figura 2).

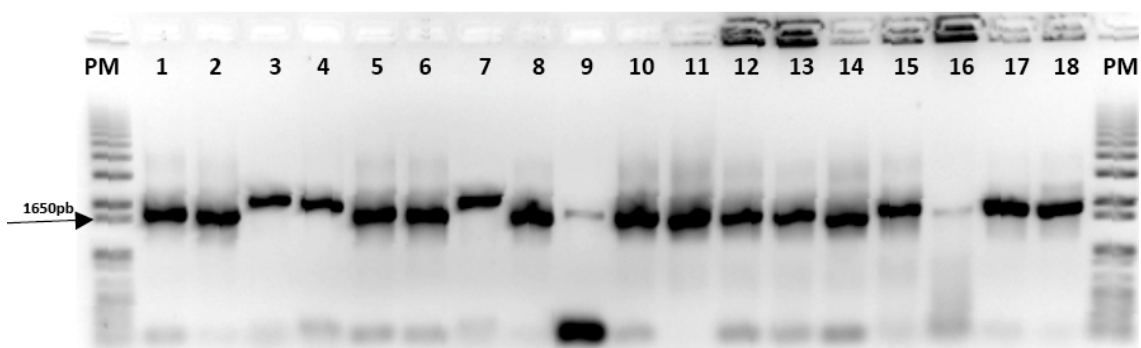


Figura 1: Imagem negativa da fotografia de gel de agarose (1%) em tampão TAE, onde produtos de PCR utilizando os primers universais e “pool” das amostras de biofilme subgengival. Os números indicam a codificação dos pacientes (1-18) neste estudo; PM indica marcador de peso molecular (1 KB “plus ladder-Invitrogen”).

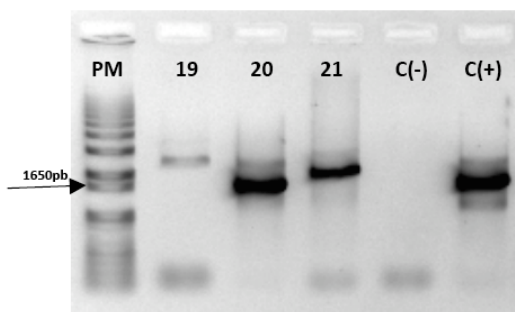


Figura 2: Imagem negativa da fotografia de gel de agarose (1%) em tampão TAE, onde produtos de PCR utilizando os primers universais e “pool” das amostras de biofilme subgengival. Os números indicam a codificação dos pacientes (19-21) neste estudo; PM indica marcador de peso molecular (1 KB “plus ladder-Invitrogen”); C(-): controle positivo; C(+): controle positivo (dna de *p.g.* pronto).

As mesmas amostras foram submetidas a reações de polimerase em cadeia utilizando-se primers *16SrRNA* espécies específicos para *P. gingivalis* (Figuras 3 e 4) e *A. actinomycetemcomitans* (Figuras 5 e 6).

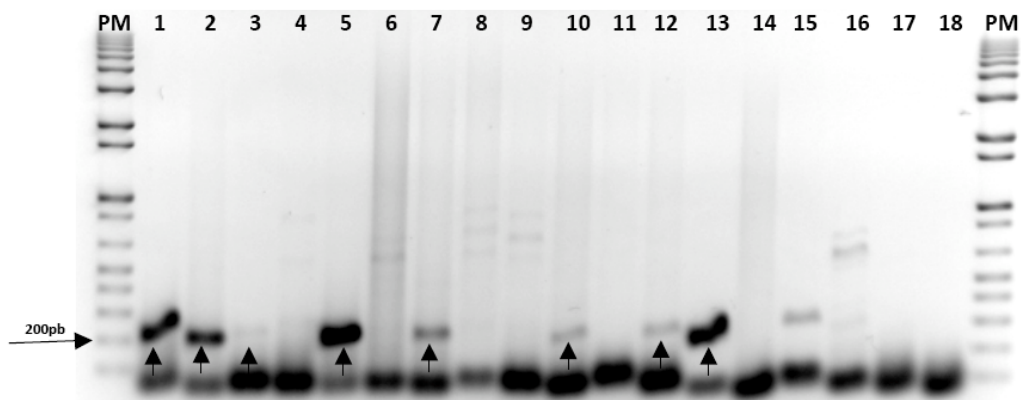


Figura 3: Imagem negativa da fotografia de gel de agarose (1%) em tampão TAE, onde produtos de PCR utilizando os primers *16SrRNA* espécie específicos para *P. gingivalis* e DNA do “pool” das amostras de biofilme subgingival. Os números indicam a codificação dos pacientes (1-18) neste estudo; PM indica marcador de peso molecular (1 KB “plus ladder-Invitrogen”).

(↑): indicam resultado positivo.

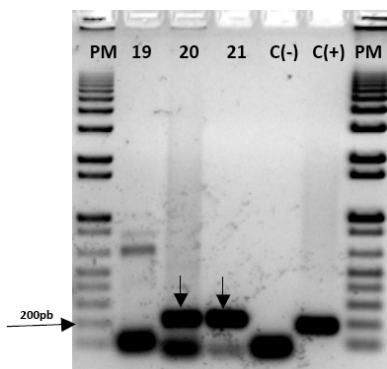


Figura 4: Imagem negativa da fotografia de gel de agarose (1%) em tampão TAE, onde produtos de PCR utilizando os primers *16SrRNA* espécie específicos para *P. gingivalis* e DNA do “pool” das amostras de biofilme subgingival. Os números indicam a codificação dos pacientes (19-21) neste estudo; PM indica marcador de peso molecular (1 KB “plus ladder-Invitrogen”); C(-): controle positivo; C(+): controle positivo.

(↑): indicam resultado positivo

A partir dos resultados obtidos, podemos observar que neste grupo de pacientes 10 (47,62%) albergavam *P. gingivalis* no biofilme subgingival ou saburra.

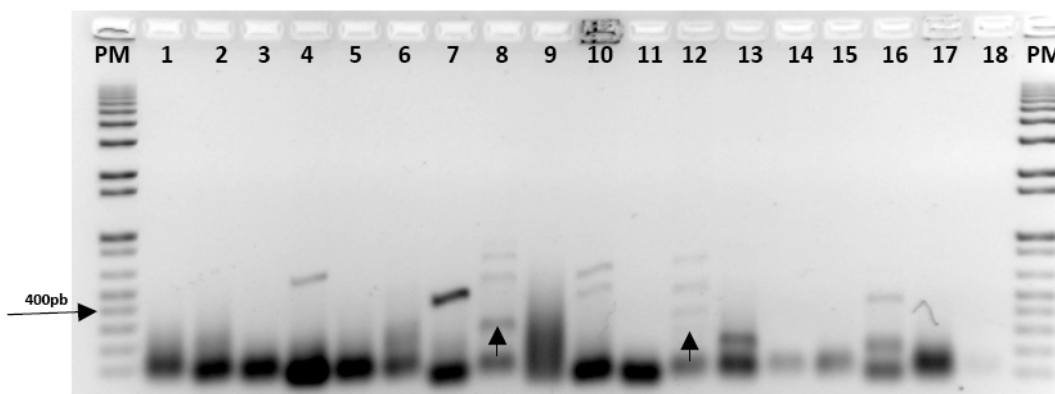


Figura 5: Imagem negativa da fotografia de gel de agarose (1%) em tampão TAE, onde produtos de PCR utilizando os primers *16SrRNA* espécie específicos para *A. actinomycetemcomitans* e DNA do “pool” das amostras de biofilme subgengival. Os números indicam a codificação dos pacientes (1-18) neste estudo; PM indica marcador de peso molecular (1 KB “plus ladder-Invitrogen”). (↑): indicam resultado positivo.

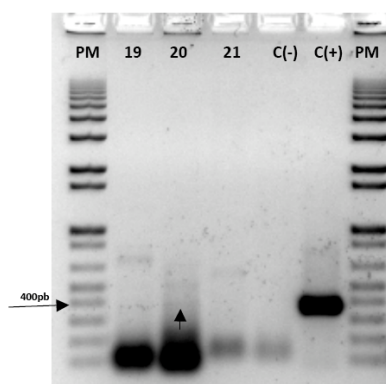


Figura 6: Imagem negativa da fotografia de gel de agarose (1%) em tampão TAE, onde produtos de PCR utilizando os primers *16SrRNA* espécie específicos para *A. actinomycetemcomitans* e DNA do “pool” das amostras de biofilme subgengival. Os números indicam a codificação dos pacientes (19-21) neste estudo; PM indica marcador de peso molecular (1 KB “plus ladder-Invitrogen”); C(-): controle positivo; C(+): controle positivo.

(↑): indicam resultado positivo

Das 21 amostras analisadas, 3 (14,28%) apresentavam produto de PCR com bandas de peso compatível com *A. actinomycetemcomitans*.

Com o objetivo de facilitar a visualização dos resultados, foi elaborada a tabela 4.

Tabela 4: Perfil dos pacientes com amostras de biofilme subgengival.

	Biofilme Oral		
	<i>16S</i>	<i>Aa</i>	<i>Pg</i>
Sem perda de inserção	8 p.3, p.11, p.15, p.16, p.17, p.18, p.20, p.21	2 p.11, p.20	4 p.3, p.11, p.20, p.21
PS>3mm	9 p.1, p.2, p.5, p.6, p.7, p.8, p.10, p.12, p.13	1 p.8	6 p.1, p.2, p.5, p.7, p.10, p.13
Edêntulo	4 p.4, p.9, p.14, p.19	0	0
Total	21	3 (14,28%)	10 (47,62%)

PS: Profundidade de sondagem; P: Número do paciente; 16S: 16SrRNA; *Aa*: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*; *Pg*: *Porphyromonas gingivalis*.

As biópsias de lesões ateromatosas foram submetidas à extração de DNA conforme o fabricante utilizando o kit (MasterPure™ DNAPurification Epicentre), a concentração de DNA e a sua pureza foi avaliada em espectrofotômetro (Nanodrop) e estas concentrações variaram de 50ng/μl até 850ng/μl.

A partir do DNA eluído, foram preparadas diluições para a obtenção de suspensões com aproximadamente 50ng/μl de DNA. Para verificarmos a presença de DNA procarioto nas amostras de tecido, foram realizadas reações de polimerase em cadeia utilizando primers universais *16SrRNA* (Figuras 7 e 8).

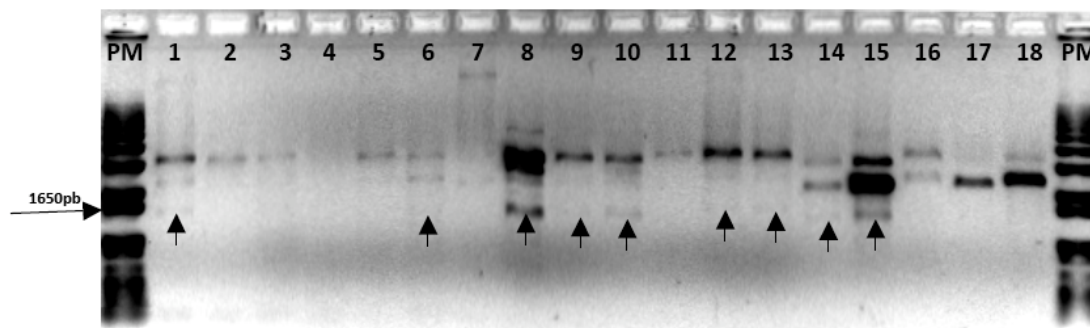


Figura 7: Imagem negativa da fotografia de gel de agarose (1%) em tampão TAE, onde produtos de PCR utilizando primers universais e DNA das biópsias de lesões ateromatosas. Os números indicam a codificação dos pacientes (1-18) neste estudo; PM indica marcador de peso molecular (1 KB “plus ladder-Invitrogen”).

(↑): indicam resultado positivo.

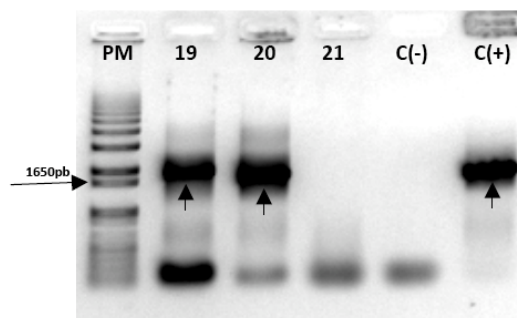


Figura 8: Imagem negativa da fotografia de gel de agarose (1%) em tampão TAE, onde produtos de PCR utilizando primers universais e DNA das biópsias de lesões ateromatosas. Os números indicam a codificação dos pacientes (19-21) neste estudo; PM indica marcador de peso molecular (1 KB “plus ladder-Invitrogen”); C(-): controle positivo; C(+): controle positivo.

(↑): indicam resultado positivo.

As reações de PCRs utilizadas neste estudo para a análise das biópsias resultaram em múltiplas bandas, sem exceções. Assim foram consideradas como reações positivas as que apresentavam bandas com peso molecular esperado: ~1500pb para os primers Universais; 196pb para *P. gingivalis* e 360pb para *A. actinomycetemcomitans*.

A partir de tais resultados verificamos que 11 (52,38%) das 21 biópsias analisadas continham DNA procarioto.

Seguiu-se a análise das biópsias para detecção de *P. gingivalis* (Fig. 9, 10).

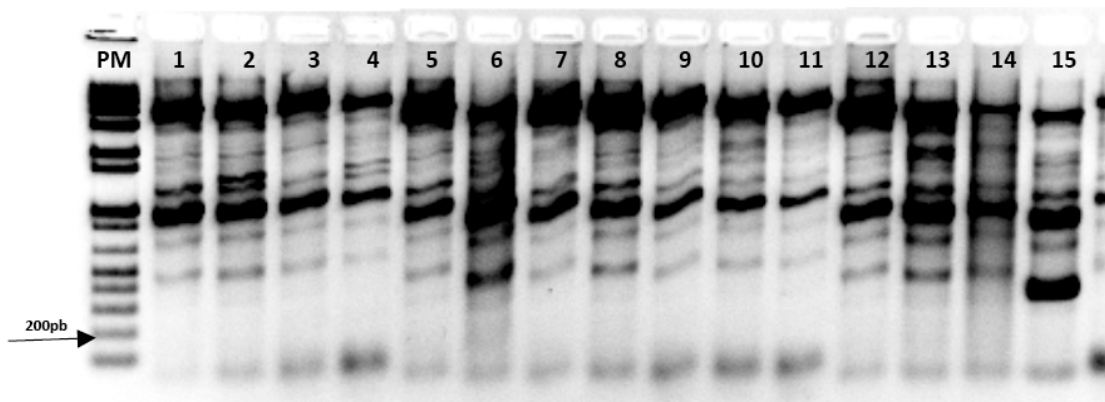


Figura 9: Imagem negativa da fotografia de gel de agarose (1%) em tampão TAE, onde produtos de PCR utilizando os primers *16SrRNA* espécie específicos para *P. gingivalis* e DNA das biópsias de lesões ateromatosas. Os números indicam a codificação dos pacientes (1-16) neste estudo; PM indica marcador de peso molecular (1 KB “plus ladder-Invitrogen”).

(↑): indicam resultado positivo.

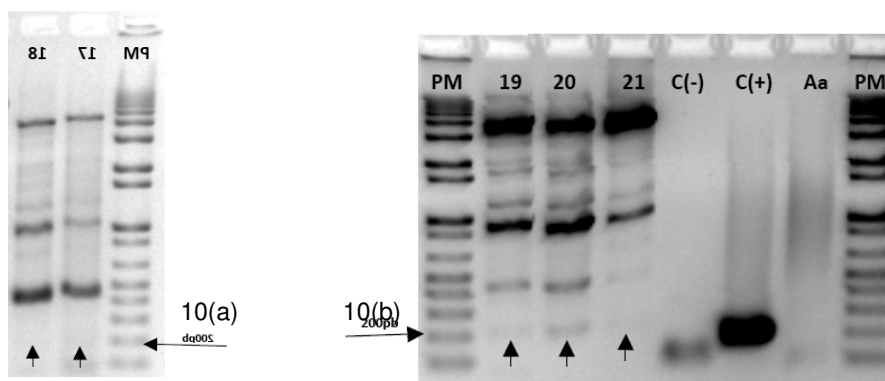


Figura 10: Imagem negativa da fotografia de gel de agarose (1%) em tampão TAE, onde produtos de PCR utilizando os primers *16SrRNA* espécie específicos para *P. gingivalis* e DNA das biópsias de lesões ateromatosas. Os números indicam a codificação dos pacientes neste estudo [10(a): 17-18 e 10(b): 19-21], C(-): controle negativo, C(+): controle positivo e PM indicam marcador de peso molecular (1 KB “plus ladder-Invitrogen”).

(↑): indicam resultado positivo.

Das 21 biópsias analisadas, apenas 5 (23,8%) apresentaram produto de PCR com tamanho compatível com *P. gingivalis*.

Seguiu-se a análise das biópsias para a detecção de *A. actinomycetemcomitans*. Tais resultados podem ser observados nas figuras 11 e 12.

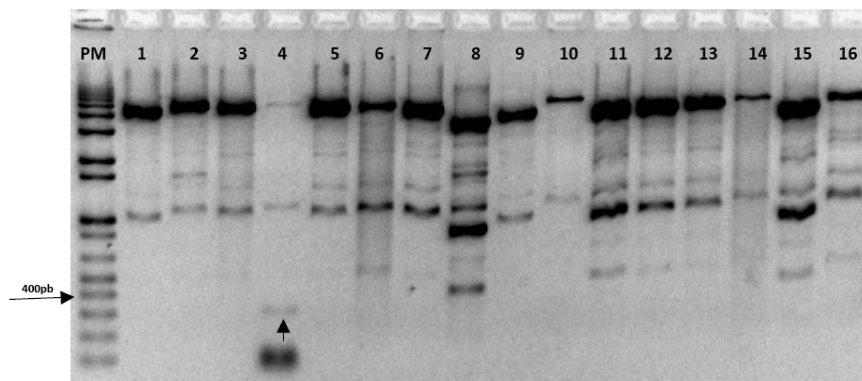


Figura 11: Imagem negativa da fotografia de gel de agarose (1%) em tampão TAE, onde produtos de PCR utilizando os primers *16SrRNA* espécie específicos para *A. actinomycetemcomitans* e DNA das biópsias de lesões ateromatosas. Os números indicam a codificação dos pacientes (1-16) neste estudo; PM indica marcador de peso molecular (1 KB “plus ladder-Invitrogen”).

(↑): indicam resultado positivo.

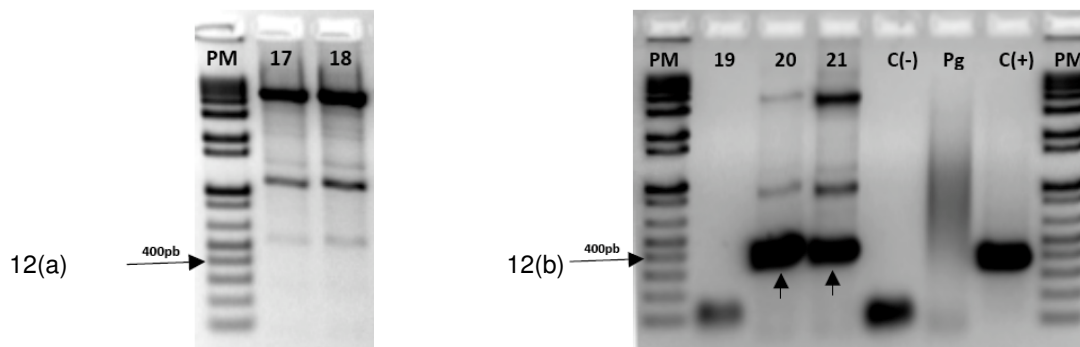


Figura 12: Imagem negativa da fotografia de gel de agarose (1%) em tampão TAE, onde produtos de PCR utilizando os primers *16SrRNA* espécie específicos para *A. actinomycetemcomitans* e DNA das biópsias de lesões ateromatosas. Os números indicam a codificação dos pacientes neste estudo [12(a): 17-18 e 12(b): 19-21], C(-): controle negativo, C(+): controle positivo e PM indica marcador de peso molecular (1 KB “plus ladder-Invitrogen”).

(↑): indicam resultado positivo

Das 21 amostras analisadas 3 (14,28%) apresentaram produto de PCR com peso compatível com *A. actinomycetemcomitans*.

A tabela 5 visa um entendimento mais facilitado dos perfis dos pacientes com achados microbiológicos nas lesões ateromatosas, comparados a perda de inserção, profundidade de sondagem >3mm e edêntulismo.

Tabela 5: Perfil dos pacientes com lesões ateromatosas.

	Ateroma		
	16S	Aa	Pg
Sem perda de inserção	2 p.15, p.20	2 p.20, p.21	4 p.17, p.18, p.20, p.21
PS>3mm	6 p.1, p.6, p.8, p.10, p.12, p.13	0	0
Edêntulos	3 p.9, p.14, p.19	1 p.4	1 p.19
Total	11	3 (14,28%)	5 (23,80%)

PS: Profundidade de sondagem; P: Número do paciente; 16S: 16SrRNA; Aa: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*; Pg: *Porphyromonas gingivalis*.

5 DISCUSSÃO

As doenças cardiovasculares figuram entre as mais prevalentes e significantes doenças em países desenvolvidos. Desordens dos vasos sanguíneos, hipertensão e aterosclerose lideram como causas de morte no mundo ocidental (Seymour *et al.*, 2003).

A hipótese de que a inflamação exerce alguma influência sobre processo da aterogênese não é nova, data já do século XIX. Entretanto, somente no século XX que esta teoria foi parcialmente confirmada, a presença de microrganismos nas lesões vasculares foi confirmada por meio de análises patológicas, sem, entretanto determinar o papel destes na patogênese da aterosclerose (Vercellotti, 2001).

Na literatura, os organismos comumente relacionados ao processo de aterogênese são: *C. pneumoniae* (Kuroda *et al.*, 2003), *Helicobacter pylori* (Espinola-Klein *et al.* 2002; Iriz *et al.*, 2008;) e *Mycoplasma pneumoniae* (Higuchi *et al.*, 2006).

Estudos epidemiológicos sugerem que infecções crônicas, especialmente a periodontite, podem constituir um importante fator de risco para as doenças cardiovasculares (Elkaim *et al.*, 2007). Pacientes com doença periodontal compartilham de fatores de risco em comum com pacientes portadores de doenças cardiovasculares: baixo “status” sócio econômico, “stress” e tabagismo (Paquette *et al.*, 2007). Segundo estes mesmos autores, destas semelhanças, surgiram os primeiros questionamentos sobre a possível relação entre doença periodontal e início/progressão da aterogênese e, por conseqüência, das doenças cardiovasculares.

Já está bem estabelecido que o paciente com periodontite crônica (severa à moderada) é desafiado continuamente pela microbiota oral. Em tais circunstâncias, ocorre uma extensa área ulcerada do epitélio sulcular que permitirá o intercâmbio de substâncias entre o biofilme subgengival e o hospedeiro (Seymour *et al.*, 2003). A resposta inflamatória faz parte deste processo, por isso muitos estudos investigam a correlação entre esta resposta inflamatória e o processo de aterogênese (Katz *et al.*, 2002; D’Aiuto *et al.*, 2004; Mattilla *et al.* 2005). Ainda neste contexto, existem na literatura estudos que buscam marcadores para avaliar o “grau de inflamação” de um indivíduo tais como: Proteína C reativa, IL6, fator de Von Willebrand, E-selectina

e TNF- α (Noack *et al.*, 2001; Seymour *et al.*, 2003; Ide *et al.*, 2004; D'Aiuto *et al.*, 2004; D'Aiuto *et al.*, 2004(b); D'Aiuto *et al.*, 2005; Leivadaros *et al.*, 2005; Tonetti *et al.*, 2007; D'Aiuto *et al.*, 2007). Em um estudo multicêntrico realizado por Offenbacher *et al.* (2008), os autores verificaram uma diminuição nos níveis séricos de CRP após a terapia periodontal e constataram que embora em pacientes com altos níveis de CRP (acima de 3mg/ml) esta terapia tenha sido efetiva, em pacientes com níveis mais baixos de CRP tal diminuição não é tão evidente. Os autores sugerem que a inflamação em pacientes com os níveis baixos de CRP, estes seriam originados somente pela inflamação do tecido cardiovascular.

Alguns estudos investigaram a correlação de alguns parâmetros clínicos como a destruição periodontal (profundidade de bolsa, nível clínico de inserção e sangramento sondagem) e perda de dentes com a ocorrência de doenças cardiovasculares (Emingil *et al.*, 2000; Beck e Offenbacher, 2002; Desvarieux *et al.*, 2003; Elter *et al.*, 2004; Holmlun *et al.*, 2006; Gotsman *et al.*, 2007).

Com base nos dados obtidos, podemos observar que entre os 21 pacientes analisados, a prevalências nesta população de indivíduos que perderam acima de 11 dentes é de aproximadamente 61,90%. Elter *et al.* (2004), afirmam que a perda de dentes associada à doença periodontal dos dentes remanescentes estão relacionados à um maior risco doenças coronarianas e que o mesmo não ocorre quando estes dois fatores são analisados isoladamente.

Desvarieux *et al.* (2003), já relacionaram a perda de dentes e a aterosclerose. Neste mesmo estudo, eles afirmam que quanto maior o número de dentes perdidos, maior é a severidade da doença periodontal; e isso pode ser comprovado em nosso estudo, que com nossos resultados permitem tal conclusão. Como podemos observar na tabela 3, em indivíduos com mais de 12 dentes ausentes a porcentagem de sítios com mais de 3 mm de profundidade de sondagem foi de 28,57% dos sítios analisados, enquanto que para indivíduos com até 11 dentes perdidos esta porcentagem foi de 14,28%.

Outra vertente dos estudos que buscam a correlação entre doenças cardiovasculares e a doença periodontal são as que estudam a participação dos microrganismos orais no processo de aterosclerose (Dorn *et al.*, 1999; Chung *et al.*, 2003; Cairo *et al.*, 2004; Fiehn *et al.*, 2005). Pussinem e Matilla (2004) sugeriram uma ligação de causa e efeito entre doença periodontal e doença cardiovascular pois alguns periodontopatógenos possuem a capacidade de invadir células

endoteliais e células do músculo liso promovendo a agregação plaquetária e a formação do trombo.

Alguns periodontopatógenos despertam os interesses de pesquisadores quanto aos mecanismos de virulência que podem exercer uma ação deletéria sobre os tecidos, inclusive o endotélio, atividade plaquetária e formação de trombo (Kuramitsu *et al.*, 2003; Chou *et al.*, 2005; Tonetti *et al.*, 2007; Paquette *et al.*, 2007).

No presente estudo, investigamos a presença dos periodontopatógenos: *Porphyromonas gingivalis* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* no biofilme oral de 21 pacientes portadores de lesões ateromatosas bem como nas biopsias de lesões ateromatosas removidas cirurgicamente dos mesmos 21 pacientes.

Das 21 amostras de biofilme subgingival submetidas a reações de polimerase em cadeia utilizando primers universais para procaríotos, para verificarmos a viabilidade do DNA presente nas amostras, todas as 21 amostras foram consideradas positivas para esta reação, embora algumas amostras (pacientes n. 3, 4, 7, 19 e 21) tenham apresentado produtos um pouco maiores que o esperado.

Os resultados pertinentes à detecção no biofilme de *A. actinomycetemcomitans* e *P. gingivalis* podem ser observados na Tabela 4. A prevalência nesta população foi 14,28% para *A. actinomycetemcomitans* e 47,62% para *P. gingivalis*. Ao compararmos nossos dados com os de Tanner *et al.* (2006) que, ao analisarem a microbiota de dorso lingual e do biofilme subgingival de pacientes com diversas condições periodontais, observamos uma prevalência semelhante de *A. actinomycetemcomitans* de aproximadamente 15% sendo que o mesmo não é observado, para a prevalência de *P. gingivalis* que foi de aproximadamente 19%.

Dados de Yoshida *et al.* (2003), usando a técnica da PCR observaram positividade para *A. actinomycetemcomitans* (19,5%) e *P. gingivalis* (27,1%) na população japonesa. Novamente houve uma concordância para os dados obtidos de *A. actinomycetemcomitans* e uma prevalência muito maior para *P. gingivalis* em nosso estudo.

Em estudo de Missailidis *et al.* (2004), que analisou a prevalência de *P. gingivalis* na população brasileira, em um grupo de 102 indivíduos com diversas condições periodontais foi de encontrado o valor de 48,3%, resultado este bem próximo ao por nós obtidos.

Estas variações entre as prevalências de determinados periodontopatógenos nas populações de diversas regiões geográficas já foram relatadas por pesquisadores como: Slots e Ting (1999) e Haffajee *et al.* (2004). Essas diferenças são atribuídas à diversos fatores culturais (menor controle sobre a venda de medicamentos sem prescrição, por exemplo); genéticos (origem étnica em cada uma das localidades) e sócio-ambientais (acesso aos serviços odontológicos, nutrição, etc.). Além disso, convém lembrar que este dado pode não ser representativo da prevalência na população em geral, já que o número de indivíduos analisados é pequeno, e, também, por tratar-se de um grupo de indivíduos com características específicas, isto é, portadores de doença cardiovascular crônica.

Por outro lado, analisando os dados obtidos separadamente para indivíduos com profundidade de sondagem >3mm (indicativo de periodontite crônica) e compararmos aos obtidos por Elkaim *et al.* (2007), que analisaram a microbiota subgingival de 22 pacientes com periodontite crônica que se submeteram a cirurgia cardíaca, foi possível observar uma maior semelhança de resultados. Aproximadamente 25% de prevalência de *A. actinomycetemcomitans* e aproximadamente 55% para *P. gingivalis*, contra os nossos dados de 11,11% e 55,55% de prevalência para as duas espécies, respectivamente.

As biópsias de lesões ateromatosas, foram analisadas utilizando primers *16SrRNA* universais para procariotos resultou em produtos de PCR com múltiplas bandas de diferentes pesos moleculares (figura 7). Na tentativa de solucionar este problema, diferentes estratégias foram empregadas, tais como: o aumento da temperatura de anelamento de 60°C para 62°C, visando a diminuição dos produtos inespecíficos e que resultou na negatividade da reação de amplificação. Outra estratégia utilizada foi a troca da *taq* polimerase por uma polimerase “hot-start (Platinum *taq* Invitrogen), que resultou em uma diminuição das bandas inespecíficas, mas não na sua eliminação.

Assim, foram consideradas como positivas as reações que apresentaram amplicons de ~1500pb. Das 21 biópsias analisadas, 11 (52,38%), apresentaram produtos de tamanhos compatíveis com procariotos.

Estudos prévios, utilizando PCR e primers universais, relatam prevalências de detecção de DNA procarioto variando de 88,5% a 100% (Stelzel *et al.*, 2002; Fiehn *et al.*, 2005; Lehtiniemi *et al.*, 2005). Uma possível explicação para esta variação poderia ser relativas as metodologias empregadas desde o processo

de extração de DNA até a reação de PCR propriamente dita que pode variar consideravelmente entre os laboratórios de pesquisa.

Alguns estudos analisaram a presença de bactérias orais nos ateromas (Fiehn *et al.*, 2005; Padilla *et al.*, 2006). Padilla *et al.* (2006) detectou, por método de cultura, somente espécie *A. actinomycetemcomitans* em 9 das 12 biópsias analisadas. Fiehn *et al.* (2005) detectou, também por métodos de cultura, espécies não orais que ele considerou como contaminantes da biópsia.

Mesmo com suas limitações, a utilização da técnica PCR parece ser a que oferece um melhor desempenho, pois detecta o DNA bacteriano de um maior número de espécies bem como parece apresentar uma sensibilidade maior quando comparada ao método de cultura. Entretanto, é necessário esclarecer que esta técnica apenas detecta o DNA bacteriano presente no tecido analisado, sem, entretanto, determinar se a célula está viável ou não.

As ocorrências de *P. gingivalis* e *A. actinomycetemcomitans* em lesões ateromatosas também foram investigadas. Para tal análise, optamos por realizar reações de PCR espécie-específicas em reações separadas, haja vista a multiplicidade de bandas apresentadas também para as reações utilizando primers *16SrRNA* espécie específicos. Assim, foram consideradas como positivas, as reações que produziram amplicons com tamanhos compatíveis para *P. gingivalis* e *A. actinomycetemcomitans*, 197pb e 360pb respectivamente.

P. gingivalis foi detectado em 5 (23,8%) das biópsias analisadas e *A. actinomycetemcomitans* foi detectado em 3 (14,28%) (Figuras 9, 10, 11 e 12).

Os resultados de pesquisas analisando a ocorrência de periodontopatógenos em lesões vasculares são controversos. Estes variam desde a completa ausência (Romano *et al.*, 2007) até a detecção de determinados patógenos, como por exemplo a *P. intermedia* em 100% das amostras analisadas (Fiehn *et al.*, 2005).

Os nossos resultados são semelhantes aos apresentados por Stelzel *et al.* (2002) que de 26 biópsias analisadas detectou *P. gingivalis* em 4 delas. Ishihara *et al.* (2004) analisaram 51 biópsias de artérias coronárias e detectaram a presença de *P. gingivalis* em 21,56% das amostras analisadas e a presença de *A. actinomycetemcomitans* em 23,52%.

Nakano *et al.* (2007) estudaram a prevalência de *A. actinomycetemcomitans* em biópsias provenientes de diversas condições

cardiovasculares (endocardite infecciosa, patologias da aorta e aneurismas e verificaram que em 31,1% esta espécie esteve presente.

Pudemos verificar que em apenas dois (pacientes n. 20 e 21) dos 21 pacientes ocorreram à presença concomitante de *P. gingivalis* na cavidade oral e lesão ateromatosa. Para *A. actinomycetemcomitans*, tal fato foi observado somente para o paciente n. 20.

Um fato que chama atenção é o fato de que algumas amostras apresentaram positividade somente nas lesões ateromatosas, *P. gingivalis* (pacientes n. 17,18 e 19) e *A. actinomycetemcomitans* (pacientes n. 4 e 21). Nakano *et al.* (2007), observaram que os sorotipos presentes na cavidade oral divergiam daqueles presentes nas biopsias cardiovasculares. Este dado poderia indicar que algumas células bacterianas possuem tropismo por determinados tipos de tecidos, fato este que pode ocorrer mesmo para as diferentes espécies. Por exemplo: pode ser que determinada espécie ou subtipo bacteriano tenha colonizado a cavidade oral temporariamente, e que por diversos motivos tenha conseguido alcançar a corrente sanguínea, sendo o seu tropismo por células endoteliais, poderá instalar-se nas paredes dos vasos e aí multiplicar-se e, ao mesmo tempo, pode ser eliminada da cavidade oral.

As bactérias podem alcançar a corrente sanguínea por diversos razões, desde a simples escovação até a extração do elemento dental (Heimdahl *et al.*, 1990; Bahrani-Mouegeot *et al.*, 2008). A periodontite deve favorecer a ocorrência da bacteremia, pela maior quantidade de biofilme presente no sulco gengival seja pela condição endotelial alterada ou pela inflamação presente nestes casos.

6 CONCLUSÃO

A partir dos dados obtidos na população estudada e com a metodologia utilizada podemos concluir que:

1- *P. gingivalis* foi detectada no biofilme subgengival de 10 (47,62%) indivíduos.

2- *A. actinomycetemcomitans* foi detectada no biofilme subgengival de 3 (14,28%) indivíduos.

3- Das 21 amostras, em 11 (52,38%) foi possível detectar DNA procarioto.

4- *P. gingivalis* foi detectada nas biopsias de lesão vascular de 5 (23,8%) indivíduos

5- *A. actinomycetemcomitans* foi detectada na biópsia de lesão vascular de 3 (14,28%) indivíduos.

6- A ocorrência concomitante de periodontopatógenos, no biofilme oral e na lesão ateromatosa, nem sempre ocorre.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS *

Aimetti M, Romano F, Nessi F. Microbiologic analysis of periodontal pocketes and carotid atheromatous plaques in advanced chronic periodontitis patients. J Periodontol. 2000. 2007; 78:1718-1723.

Americam Academy of Periodontology, The 1999 International workshop for a classification of periodotal disease and conditions. Ann of Periodontol. 1999; 47-38.

Araujo MW, Hovey KM, Benedek JR, Grossi SG, Dorn J, Wactawski-Wende J. Reproducibility of probing depth measurement using a constant-force electronic probe: analysis on inter- and intraexaminer variability. J Periodontol. 2003; 74:1736-40.

Ávila-Campos MJ, Sacchi CT, Whitney AM, Steigerwalt AG, Mayer LW. Specific primer for AP-PCR identification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. J Clin Periodontol. 1999; 26:699-704.

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; 46:2129-32.

Beck JD, Garcia R, Heiss G, Vokonas PS, Offenbacher S. Periodontal disease and cardiovascular disease. J Periodontol. 1996; 67:1123–1135, Supplement.

Beck JD, Offenbacher S. The association between periodontal diseases and cardiovascular diseases: a state-of-the-science review. Ann Periodontol. 2001; 6:9-15.

Bomam J, Hammerschlag MR. Chlamydia pneumoniae and atherosclerosis: critical assessment of diagnostic methods and relevance to treatment studies. Clinical microbiology reviews. 2002; 15:1-20.

Cairo F, Gaeta C, Dorigo W, Oggioni MR, Pratesi C, Pini Prato GP et al., Periodontal pathogens in atheromatous plaques. A controlled clinical and laboratory trial. J Periodontal Res. 2004; 39:442-6.

Chou H, Yumoto H, Davey M, Takahashi Y, Miyamoto T, Gibson FCIII, Genco CA. *Porphyromonas gingivalis* fimbria-dependent activation of inflammatory genes in human aortic endothelial cells. Infec Immunol. 2005; 73:5367-78.

Christen WG. Periodontal disease and risks of cardiovascular disease. Circulation. 1998; 87:821.

*Baseada no modelo Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

- Chung SW, Kang HS, Park HR, Kim SJ, Kim SJ, Choi JI. Immune responses to heat shock protein in Porphyromonas gingivalis-infected periodontitis and atherosclerosis patients. J Periodontal Res. 2003; 38:388-93.
- Cochrane M, Andreas P, Philip W, Harry G, Peter T. Distribution of *Chlamydia pneumoniae* DNA in atherosclerotic carotid arteries: significance for sampling procedures. Journal of clinical microbiology. 2003; 41:1454-1457.
- Coutinho MSA, Nakamae FJD, Menezes ME. *Chlamydia pneumoniae* e aterosclerose. Identificação do DNA bacteriano na parede arterial. Arq Bras Cardiol. 2000; 74:119-23.
- Cueto A, Mesa F, Bravo M, Ocana-Riola R. Periodontitis as risk factor for acute myocardial infarction. A case control study of Spanish adults. J Periodont Res. 2005; 40:36-42.
- D'Aiuto F, Parkar M, Tonetti MS. Acute effects of periodontal therapy on bio-markers of vascular health. Journal Clinical Periodontol. 2007; 34:124-129.
- D'Aiuto F, Ready D, Tonetti MS. Periodontal disease and C-reactive protein-associated cardiovascular risk. Journal. Periodont Res. 2004; 39:236-241.
- D'Aiuto F, Parkar M, Andreou G, Suvan J, Brett PM, Ready D, Tonetti MS. Periodontitis and systemic inflammation: control of the local infection is associated with a reduction in serum inflammatory markers. J Dent Res. 2004 (b); 83:156-60.
- D'Aiuto F, Nibali L, Parkar M, Suvan J, Tonetti MS. Short-term effects of intensive periodontal therapy on serum inflammatory markers and cholesterol. J Dent Res. 2005:269-73.
- Demmer RT, Desvarieux M. Periodontal infections and cardiovascular diseases. JADA. 2006; 137:14S-20S.
- Desvarieux M, Demmer RT, Rundek T, Boden-Albala B, Jacobs DR Jr, Papapanou PN. Relationship between periodontal disease, tooth loss, and carotid artery plaque: the Oral Infections and Vascular Disease Epidemiology Study (INVEST). Stroke. 2003; 34:2120-5.
- Dorn BR, Dunn WAJR, Progulske-Fox A. Invasion of human coronary artery cells by periodontal pathogens. Infect Immunol. 1999; 67:5792-8.
- Elkaim R, Dahan M, Kocgozlu L, Kanter D, Kretz JG, Tenenbaum H. Prevalence of periodontal pathogens in subgingival lesions, atherosclerotic plaques and healthy blood vessels: a preliminary study. J Periodont Res. 2007.
- Elter JR, Champagne CM, Offenbacher S, Beck JD. Relationship of periodontal disease and tooth loss to prevalence of coronary heart disease. J Periodontol. 2004; 75:782-90.

Emingil G, Buduneli E, Aliyev A, Akilli A, Atilla G. Association between periodontal disease and acute myocardial infarction. *J Periodontol.* 2000; 71:1882–1886.

Esper RJ, Nordaby RA, Vilariño JO, Paragano A, Cacharrón JL, Machado RA. Endothelial dysfunction: a comprehensive appraisal. *Cardiovasc Diabetol.* 2006;5:1-18.

Espinola-Klein C, Rupprecht HJ, Blankenberg S, Bickel C, Kopp H, Rippin G, Victor A. *et al.*, Impact of infectious burden on extent and long-term prognosis of atherosclerosis. *Circulation.* 2002; 105:15-21.

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

Genco R e Zambon J. Revisão geral dos fatores de risco para doença periodontal e implicações para o diabetes e doenças cardiovasculares . In: Simpósio internacional de medicina bucal aspectos periodontais e saúde sistêmica. Dental Learning Systems. 1998.

Gomes SG, Piccinin FB, Oppermann RV, Susin C, Nonnenmacher CL, Mutters R. Periodontal status in smokers and never-smokers: Clinical findings and real-time polymerase chain reaction quantification of putative periodontal pathogens. *J Periodontol.* 2006; 77:1483-1490.

Gotsman I, Lotan C, Soskolne A, Rassovsk S, Pugatsch T, Lapidus L, Novikov Y, Masrawa S, Stabholz A. Periodontal destruction is associated with coronary artery disease and periodontal infection with acute coronary syndrome. *J Periodontol.* 2007; 78:849-58.

Gregory MV. Microbes, inflammation and atherosclerosis: will old pathology lessons guide new therapies? *Transactions of the American clinical and climatological association.* 2001; 112.

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; 31:996-1002.

Heimdahl A, Hall G, Hedberg M, Sandberg H, Söder PO, Tunér K *et al.*, Detection and quantitation by lysis-filtration of bacteremia after different oral surgical procedures. *J Clin Microbiol.* 1990; 28:2205-9.

Higuchi ML, Reis MM, Sambiase NV, Palomino SAP, Castelli JB, Gutierrez OS, Aiello VD, Ramires JAF. Co-infecção por *Mycoplasma pneumoniae* e *Chlamydia pneumoniae* em placas rotas associadas a infarto agudo do miocárdio. *Arq Bras Cardiol.* 2003; 81:1-11.

Higuchi ML, Góis JM, Reis MM, Higuchi-Dos-Santos MH, Diament J, Sousa JM. *et al.*, Co-infection ratios versus inflammation, growth factors and progression of early atheromas. *APMIS.* 2006; 114:338-44.

Holmlund A, Holm G, Lind L. Severity of periodontal disease and number of remaining teeth are related to the prevalence of myocardial infarction and hypertension in a study based on 4,254 subjects. *J Periodontol.* 2006; 77:1173-8.

Iriz E, Cirak MY, Engin ED, Zor MH, Erer D, Ozdogan ME. *et al.*, Detection of *Helicobacter pylori* DNA in aortic and left internal mammary artery biopsies. *Tex Heart Inst J.* 2008; 35:130-5.

Ide M, Jagdev D, Coward PY, Crook M, Barclay GR, Wilson RF. The short-term effects of treatment of chronic periodontitis on circulating levels of endotoxin, C-reactive protein, tumor necrosis factor-alpha, and interleukin-6. *J Periodontol.* 2004; 75:420-8.

Ishihara K, Nabuchi A, Ito R, Miyachi K, Kuramitsu HK, Okuda K. Correlation between detection rates of periodontopathic bacterial DNA in carotid coronary stenotic artery plaque and in dental plaque samples. *J Clin Microbiol.* 2004; 42:1313-5.

Jain A, Batista EL, Serhan C, Sthal GL, Van Dyke TE. Role for periodontitis in the progression of lipid deposition in a animal model. *Infec Immunol.* 2003; 71:6012-8.
Joshi KJ, Rimm EB, Douglass CW, Trichopoulos D, Ascherio A, Willett WC. Poor oral health and coronary Heart disease. *J. Dent. Res.* 1996; 75:1631–1636.

Joanna-Marie H. Jeff NK. John BCF. Angela MC. The application of proteomics technology to thrombosis research: the identification of potential therapeutic targets in cardiovascular disease. *Diabetes vasc dis res* 2008; 5:205–12.

Katz J, Flugelman MY, Goldberg A, Heft M. Association between periodontal pockets and elevated cholesterol and low density lipoprotein cholesterol levels. *J Periodontol.* 2002; 73:494 – 500.

Kuramitsu HK, Kang IC, Qi M. Interactions of *Porphyromonas gingivalis* with host cells: implications for cardiovascular diseases. *J Periodontol.* 2003; 74:85-9.

Kuroda S, Kobayashi T, Ishii N, Ikeda J, Shinohe Y, Houkin K. *et al.*, Role of *Chlamydia pneumoniae*-infected macrophages in atherosclerosis developments of the carotid artery. *Neuropathology.* 2003; 23:1-8.

Lehtiniemi J, Karhunen PJ, Goebeler S, Nikkari S, Nikkari ST. Identification of different bacterial DNAs in human coronary arteries. *Eur J Clin Invest.* 2005; 35:13-6.

Leinonen M, Pekka S. Evidence for infectious agents in cardiovascular disease and atherosclerosis. *Lancet Infec Dis.* 2002; 2:11-7.

Leivadaros E, van der Velden U, Bizzarro S, ten Heggeler JM, Gerdes VE, Hoek FJ. *et al.*, A pilot study into measurements of markers of atherosclerosis in periodontitis. *J Periodontol.* 2005; 76:121-8.

Luz PL, Favarato D. Doença coronariana crônica. *ARQ BRAS CARDIOL.* 1999; 72:05-21.

Machtei EE, Hausmann E, Dunford R, Grossi S, Ho A, Davis G, Chandler J, Zambon J, Genco RJ. Longitudinal study of predictive factor for periodontal disease and tooth loss. *Journal Clin Periodontol.* 1999; 26:374-80.

Mackenzie RS, Millard HD. Interrelated effects of diabetes, arteriosclerosis and calculus on alveolar bone loss. *JADA.* 1963; 66:191-199.

Madjid M, Vela D, Khalili-Tabrizi H, Casscells SW, Litovsky S. Systemic infections cause exaggerated local inflammation in atherosclerotic coronary arteries. *Tex Heart Inst J.* 2007; 34:11-8.

Mattila KJ, Asikainen S, Wolf J, Jousimies-Somer H, Valtonen V, Nieminen MAGE. Dental infections, and coronary heart disease. *Journal Dent Res.* 2000; 79(2):756-760.

Mattila KJ, Nieminen MS, Valtonen V, Rasi VP, Kesaniemi YA, Syrjala SL, Jungell PS, Isoluoma M, Hietaniemi K, Jokinen MJ. Association between dental health and acute myocardial infarction. *Br Med Journal.* 1989a; 298:779-782.

Mattila KJ, Valle MS, Nieminen MS, Valtonen VV, Hietaniemi KL. Dental infections and coronary atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 1993; 103:205-211.

Mattila KJ, Pussinen PJ, Paju S. Dental infections and cardiovascular diseases: a review. *J Periodontol.* 2005; 76:2085-8.

Mendez MV, Scott T, Lamorte W, Vokonas P, Menzoian JO, Garcia R. An association between periodontal disease and peripheral vascular disease. *Am J Surgery.* 1998; 176:153-157.

Missailidis CG, Umeda JE, Ota-Tsuzuki C, Anzai D, Mayer MP. Distribution of fimA genotypes of *Porphyromonas gingivalis* in subjects with various periodontal conditions. *Oral Microbiol Immunol.* 2004 Aug;19:224-9.

Nakano K, Inaba H, Nomura R, Nemoto H, Tamura K, Miyamoto E, Yoshioka H et. al., Detection and serotype distribution of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in cardiovascular specimens from Japanese patients. *Oral Microbiology Immunology.* 2007; 22:136-139.

Noack B, Genco RJ, Trevisan M, Grossi S, Zambon JJ, De Nardin E. Periodontal infections contribute to elevated systemic C-reactive protein level. *J Periodontol.* 2001; 72:1221-7.

Offenbacher S, Beck JD, Moss K, Mendoza L, Paquette DW, Barrow D. Results from the PAVE study (periodontitis and vascular events): a pilot multi-centered, randomized controlled trial to study effects of periodontal therapy in a secondary prevention model of cardiovascular disease. *J Periodontology,* 2008 (unelited).

Okuda K, Ishihara K, Nakagawa T, Hirayama A, Inayama Y, Okuda K. *J Clin Microbiol.* 2001; 39:1114-7.

- Padilla C, Lobos O, Hubert E, Gonzalez C, Matus S, Pereira M, Hasbun S, Descouvieres C. Periodontal pathogens in atheromatous plaques isolated from patients with chronic periodontitis. *Journal Periodont Res.* 2006; 41:350–353.
- Paquette DW, Brodala N, Nichols TC. Cardiovascular disease, inflammation, and periodontal infection. *Periodontol 2000.* 2007; 44:113-26.
- Paster BJ, Boches SK, Galvin JL, Ericson RE, Lau CN, Levanos VA, Sahasrabudhe A, Dewhirst FE. Bacterial diversity in human subgingival plaque. *Journal Bacteriol.* 2001; 183:3770-83.
- Paunio K, Impivaara O, Tiekso J, Mäki J. Missing teeth and ischaemic heart disease in men aged 45-64 years. *Eur Heart J.* 1993; 54–56. Supplement K.
- Pucar A, Milasin J, Lekovic V, Vukadinovic M, Ristic M, Putnik S, Kenney EB. *J Periodontol.* 2007; 78:677-82.
- Pussinen PJ, Mattila K. Periodontal infections and atherosclerosis: mere associations? *Curr opin lipidol.* 2004; 15:583-588.
- Reddy MS. Recahing a better understanding of non oral disease and the implication of periodontal infection. *Periodontol 2000.* 2007; 44:9-14.
- Romano F, Barbui A, Aimetti M. Periodontal pathogens in periodontal pockets and in carotid atheromatous plaques. *Minerva Stomatologia.* 2007; 56:169-179.
- Seymour RA, Preshaw PM, Thomason JM, Ellis JS, Steele JG. Cardiovascular disease and periodontology. *J Clin Periodontol.* 2003; 30:279-292.
- Slots J, Ting M. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in human periodontal disease: occurrence and treatment. *Periodontol 2000.* 1999; 20:82-121.
- Socransky SS e Haffajee AD. Implications of periodontal microbiology for the treatment of periodontal infections. *J Clin Periodontol.* 1994; 18:668-93.
- Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol.* 1998; 25:134-44.
- Socransky SS, Smith C, Martin L, Paster BJ, Dewhirst FE, Levin AE. Checkerboard DNA-DNA hybridization. *Biotechniques.* 1994; 17:788-92.
- Socransky SS, Haffajee AD. Periodontal microbial ecology. *Periodontol 2000.* 2005; 38:135-87.
- Spodick DH. Inflammation and the onset of myocardial infarction. *Ann Intern Med.* 1985; 102:699-702.

Stelzel M, Conrads G, Pankuweit S, Maisch B, Vogt S, Moosdorf R, Flores-de-Jacoby L. Detection of *Porphyromonas gingivalis* in aortic tissue by PCR. J Periodontol. 2002; 73:868-70.

Sonis TS, Robert CF, Leslie F. Princípios e praticas de medicina oral. P.31-83. 2ed. Editora Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, 1996.

Summers CJ, Oberman A. Association of oral disease with 12 selected variables: II. Edentulism. J Dent Res. 1968; 47:594–598.

Syrjanen J, Peltola J, Valtonen V, Iivanainen M, Kaste M, Huttunen JK. Dental infections in association with cerebral infarction in young and middle-aged men. J Intern Med. 1989; 225:179–184.

Tanner AC, Paster BJ, Lu SC, Kanasi E, Kent R Jr, Van Dyke T et al., Subgingival and tongue microbiota during early periodontitis. J Dent Res. 2006; 85:318-23.

Tarquini CA, Manfredi AS, Ronda JA, Tarquini CCG, Hidalgo H. Identificación molecular de *Tannerella forsythensis* (Tf) em bolsa periodontal y ateroma ulcerado trombosado de arteria femoral: reporte de um caso. Ver Med Universitária. UNACuyo 2007; 03.

Tonetti MS, D'Aiuto F, Nibali L, Donald A, Storry C, Parkar M et al., Treatment of periodontitis and endothelial function. N Engl J Med. 2007; 356:911-20.

Tran DS, Rudney JD. Multiplex PCR using conserved and species-specific 16SrRNA gene primers for simultaneous detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*. J Clin Microbiol. 1996; 34:2674-8.

Tu YK, Galobardes B, Smith GD, McCarron P, Jeffreys M, Gilthorpe MS. Associations between tooth loss and mortality patterns in the Glasgow Alumni Cohort. Heart. 2007; 93:1098-103.

Vercellotti GM. Microbes, inflammation and atherosclerosis: will old pathology lessons guide new therapies? Trans Am Clin Climatol Assoc. 2001; 112:215-22.

Wenk k, Weinhold C. Heart valve replacement in acute infectious endocarditis. Fortschr Med. 1988; 106:704-7.

Willians RC e Offenbacher S. Periodontal medicine: the emergence of a new branch of periodontology. Periodontol 2000. 2000; 23:9-12.

World Health Organization. Cardiovascular disease: prevention and control,2003.(<http://www.who.int/dietphysicalactivity/publications/facts/cvd/en/print.html>) (download:05 de setembro de 2007).

Wu T, Trevisan M, Genco RJ, Dorn JP, Falkner KL, Sempos CT. Periodontal disease and risk of cerebrovascular disease. Arch. International Med. 2000b; 160:2749-2755. Supplement.

Yoshida A, Suzuki N, Nakano Y, Oho T, Kawada M, Koga T. Development of a 5' fluorogenic nuclease-based real-time PCR assay for quantitative detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*. *J Clin Microbiol.* 2003; 41:863-6.



Real e Beneficente Associação Portuguesa de Beneficência
HOSPITAL SÃO JOAQUIM
 COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

DATA DA ENTRADA: 29 de Janeiro de 2008.

DATA DA AVALIAÇÃO: 27 de Fevereiro de 2008.

CAAE: 0002.0.360.000-08

Nº DO PROTOCOLO NO CEP: 359-08

(este nº deverá citar nas correspondências referentes a este projeto)

INVESTIGADOR PRINCIPAL: Dr^a. Cláudia Ota-Tsunaki

Área de Especialização: Microbiologia

Nº de Sujeitos no Centro: 100

Nº de Sujeitos no Brasil: 100

Nº de Sujeitos Total: 100

Projeto de Pesquisa: "Prevalência de periodontopatógenos em lesões vasculares (ateromatoses e aneurismas) e influência sobre a resposta inflamatória de células endoteliais e macrófagos".

Considerações/Comentários: O objetivo primário deste estudo é investigar a presença concomitante na cavidade oral e na lesão vascular dos periodontopatógenos *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* e suas respectivas variantes genotípicas bem como a influência de cada uma delas sobre as lesões ateromatosas e de aneurismas.

Ao se proceder à análise ao projeto em questão, considere-se que:

- a) O projeto preenche os requisitos fundamentais das resoluções CNS 195/96, 251/97 e 262/98, sobre as Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos, do Conselho Nacional de Saúde / Conselho Nacional de Ética em Pesquisa / Agência Nacional de Vigilância Sanitária e as Boas Práticas de Pesquisa Clínica do ICH-GCP.

Rua Manoel Carlos, 763 - Blocos V, Torre - Liberdade
 CEP 01325-000
 São Paulo - SP
 Telefone: (11) 2855-8001

1



Real e Benemerita Associação Portuguesa de Beneficência
HOSPITAL SÃO JOAQUIM
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

- b) O Comitê de Ética em Pesquisa avaliou o Protocolo de Estudo e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.
- c) O Comitê de Ética em Pesquisa segue os preceitos das resoluções CNS196/96, 251/97 e 292/99, sobre as Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos, do Conselho Nacional de Saúde / Conselho Nacional de Ética em Pesquisa / Agência Nacional de Vigilância Sanitária e as Boas Práticas de Pesquisa Clínica do ICH-GCP.

Diante do exposto, O Comitê de Ética em Pesquisa, manifesta-se:

- Projeto de Pesquisa em Português – Aprovado
- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Aprovado
- Termo de Consentimento para Doação de Material Biológico – Aprovado
- Termo de Consentimento para Doação de Material Biológico (Sangue) – Aprovado
- Declaração sobre a forma de obtenção dos termos – Entregue
- Declaração sobre o uso e destinação do material e/ou dados coletados – Entregue
- Declaração quanto a ausência de ônus para a instituição – Entregue
- Autorização para utilização das instalações dos laboratórios da Universidade Guarulhos – Entregue
- Termo de anuência das equipes médicas – Entregue

O Comitê de Ética em Pesquisa, solicita:

- Apresentação de relatórios parciais e finais.
- Notificação de eventos adversos.
- Notificação de eventuais emendas ou modificações no protocolo.



Real e Benemerita Associação Portuguesa de Beneficência
HOSPITAL SÃO JOAQUIM
COMITÉ DE ÉTICA EM PESQUISA

Situação: Protocolo Avaliado e Aprovado em reunião ordinária no dia 27 de Fevereiro de 2008.

Prof. Dr. Rogério van Bellen
 Coordenador do CEP-EP

São Paulo, 29 de Fevereiro de 2008.

MEMBROS DO COMITÉ DE ÉTICA EM PESQUISA – Mandato 2008 – 2011

Nome	Profissão/ Especialidade	Maior Titulação
01. Adalvio de Oliveira e Silva	Médico	Livre Docente
02. Alcileia dos Santos Oliveira	Enfermeira	Bacharel
03. Rogério Van Bellen	Médico	Livre Docente
04. Dante Fagnaniello Souza	Médico	Doutor
05. Jacira Rodrigues Almeida	Representante dos usuários	Bacharel
06. João Egidio Bonda Junior	Médico	Livre Docente
07. Marcia de Alcântara	Farmacêutica	Bacharel
08. Maria de Lourdes Hirata Hasegawa	Enfermeira	Bacharel
09. Maria Ligia de A. C. Karalikian	Fisioterapeuta	Bacharel
10. Maria Luiza Campos Gomes	Nutricionista	Bacharel
11. Rachelina Santangelo	Advogada	Bacharel
12. Valéria Bezerra de Carvalho	Médica	Livre Docente

Anexo 2

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Por esse instrumento particular declaro, para os efeitos éticos e legais, que eu (nome) _____, (nacionalidade) _____, (profissão) _____, portador do R.G. _____, C.I.C. _____, residente e domiciliado à Rua _____, telefone _____, na cidade de _____, Estado de _____, concordo em participar da pesquisa **Prevalência de periodontopatógenos em lesões vasculares (ateromatosas e aneurismas)** Estou ciente que essa pesquisa pretende identificar os microrganismos (bactérias) presentes na placa dentária de indivíduos com indicação para a remoção da lesão vascular e possível concomitante detecção de DNA de periodontopatógeno na lesão. Para participar desse estudo é necessário estar com boa saúde geral, não ser grávidas ou lactantes; não possuir história de tratamento periodontal ou antibioticoterapia nos últimos seis meses; não apresentar doença sistêmica que comprometa a resposta do hospedeiro ou exija medicação profilática ao tratamento. Os participantes serão submetidos a um exame completo dos dentes e das gengivas que será efetuado por profissionais formados em Odontologia, sob a supervisão dos pesquisadores responsáveis por esta pesquisa. Nesta oportunidade, amostras de placa dentária serão coletadas por meio de curetas odontológicas estéreis, para a realização do exame microbiológico e identificação dos microrganismos presentes na placa dentária dos pacientes será coletada uma amostra por sítio e 6 sítios por paciente.

Os procedimentos são simples, não oferecem risco além de leve incômodo na gengiva durante a realização do exame clínico e coleta de placa dentária. Os benefícios recebidos serão os seguintes: Todos os indivíduos participantes deste estudo receberão informações sobre a importância da higiene oral para a saúde geral do indivíduo. O tratamento da infecção periodontal, para os que necessitarem e após liberação médica, está garantido na Clínica Odontológica da UnG para os participantes do estudo. Indivíduos que necessitarem de outros tratamentos serão encaminhados às diferentes especialidades na Clínica de Graduação.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo "**Prevalência de periodontopatógenos em lesões vasculares (ateromatosas e aneurismas) e influência sobre a resposta inflamatória de células endoteliais e macrófagos**".

Eu discuti com a **Profa. Dra. Claudia Ota-Tsuzuki**, sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia de acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo em participar voluntariamente deste estudo e poderei retirar meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Por estar de pleno acordo com o presente termo, assino abaixo o mesmo.

São Paulo, ____ de _____ de 20__.

Assinatura do voluntário

Dra. Claudia Ota-Tsuzuki
CROSP 52098 - Pesquisador Responsável
Universidade Guarulhos - UnG
CEPPE
(Centro de Pós Graduação, Pesquisa e
Extensão)
tel: 11-64641769/fax:11-64641758

(*) Assinatura de testemunha

(*) para casos de pacientes menores de
18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de
deficiência auditiva ou visual

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento
Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste
estudo.

São Paulo, ____ de _____ de 20__.

Dra. Claudia Ota-Tsuzuki
CROSP 52098 - Pesquisador Responsável
Universidade Guarulhos – UnG CEPPE
(Centro de Pós Graduação, Pesquisa e Extensão)
tel: 11-64641769/fax:11-64641758

Anexo 3

TERMO DE CONSENTIMENTO PARA DOAÇÃO DE MATERIAL BIOLÓGICO

Por este instrumento particular declaro, para os efeitos éticos e legais, que eu (nome) _____, (nacionalidade) _____, (profissão) _____, portador do RG _____, CPF _____, residente e domiciliado à Rua _____, telefone _____ na cidade de _____, Estado de _____, faço a doação de biopsias de tecido vascular para a realização da pesquisa **“Prevalência de periodontopatógenos em lesões vasculares (ateromatosas e aneurismas) e influência sobre a resposta inflamatória de células endoteliais e macrófagos”**, coordenada pela Profa. Dra. Claudia Ota-Tsuzuki (Pesquisadora Responsável).

Estou ciente também de que este material biológico, no caso biopsia de lesão vascular, será armazenado no “Laboratório de Pesquisa em Odontologia – Microbiologia, Imunologia e Biologia Molecular” da UnG, e que poderá ser utilizado em pesquisas futuras com o objetivo único de estudar a influência bacteriana sobre a evolução das lesões vasculares como ateromas e aneurismas. A guarda e autorização do uso deste material são de responsabilidade única e exclusiva do Pesquisador Responsável: Profa. Dra. Claudia Ota-Tsuzuki, e que o mesmo se compromete a submeter para aprovação do Comitê de Ética toda pesquisa nova que venha a utilizar este material biológico. Quando pertinente e necessário, a pesquisa poderá ser também submetida a apreciação e julgamento pela Comissão Nacional de Pesquisa – CONEP.

Em nenhuma hipótese será minha identidade declarada ou revelada. Dessa forma, o material biológico doado, no caso biopsia de tecido vascular será armazenada em tubos plásticos codificados por números sem que meu nome esteja presente nos mesmos.

Os participantes do estudo, uma vez doadores de biopsias de tecido vascular, poderão ser contatados para o esclarecimento do resultado do estudo ou para obtenção de consentimento específico para uso em um novo projeto de pesquisa. Da mesma forma, poderão buscar novos esclarecimentos a qualquer momento.

Por estar de pleno acordo com o presente termo de doação, assino e autorizo o armazenamento do material biológico pelo período de 5 anos, podendo haver renovação mediante solicitação da instituição depositária – Universidade Guarulhos, conforme Resolução N° 347 (CNS)

São Paulo, _____ de _____ de _____.

Assinatura do voluntário

Dra. Claudia Ota-Tsuzuki
CROSP 52098 - Pesquisador

Responsável

Universidade Guarulhos - UnG
CEPPE
(Centro de Pós Graduação, Pesquisa e

Extensão)

tel: 11-64641769/fax:11-64641758

Anexo 4



Clínica Odontológica Integrada

Data: ____/____/____

INFORMAÇÕES GERAIS

Paciente: _____

Nº do Prontuário: _____ Nº de Matrícula: _____

R.G.: _____ Sexo: Masculino Feminino Data de Nascimento: ____/____/____

Endereço (res.): _____ Bairro: _____

____ Cidade (estado): _____ CEP: _____

Telefone (s): _____

Naturalidade (estado de nascimento): _____ Local de Residência: Zona Urbana Zona RuralEstado Civil: Solteiro Casado civil Casado SeparadoCor: Branca Preta Pardo Indígena Amarelo IgnoradoProfissão: _____ Local de Residência: Zona Urbana Zona RuralEducação: Analfabeto 1º Grau Completo 2º Grau Completo 3º Grau Completo 1º Grau Incompleto 2º Grau Incompleto 3º Grau Incompleto Pós-graduaçãoEmprego atual: Formal (carteira) Estudante Dona de casa Desempregado Informal Autônomo Aposentado Não trabalha OutroRenda Familiar: até 1 salário mínimo 2 a 5 salários mínimos 6 a 10 salários mínimos > 10 salários mínimos Sem renda fixa

Aluno: _____ Nº: _____

Professor Responsável: _____

Queixa principal (motivo pelo qual procurou tratamento):

Por este instrumento de autorização por mim assinado, dou pleno consentimento às disciplinas clínicas do Curso de Odontologia da Universidade Guarulhos para, por intermédio de seus professores, estagiários e alunos devidamente autorizados, fazer quaisquer diagnósticos, planejamentos e tratamentos, de acordo com os conhecimentos enquadrados no campo dessa especialidade, DECLARANDO TER CONHECIMENTO DOS ASPECTOS PARTICULARES DOS MESMOS, DE SEUS EVENTUAIS RISCOS E POSSÍVEIS SEQÜELAS, BEM COMO DA NECESSIDADE DE OBSERVAR OS CUIDADOS RECOMENDADOS PARA A CORRETA CONDUÇÃO DOS MESMOS. Tenho pleno conhecimento que esta clínica à qual me submeto para fins de diagnóstico e/ou tratamento tem como principal objetivo a instrução e demonstração para estudantes e profissionais da Odontologia. Concordo pois, com toda a orientação seguida quer para fins didáticos, de diagnóstico e/ou tratamento.

Concordo plenamente também, que todas as radiografias, modelos, fotos, históricos de antecedentes familiares, resultados de exames clínicos e de laboratório, bem como, quaisquer outras informações concernentes ao planejamento de diagnósticos e/ou tratamentos, constituem propriedade exclusiva desta Universidade, à qual dou plenos direitos de retenção, uso para quaisquer fins de pesquisa de ensino e de divulgação em jornais e/ou revistas científicas do país e do exterior.

Concordo em me submeter aos horários estabelecidos para o atendimento, bem como estar de acordo em ter minha matrícula cancelada caso tenha duas faltas consecutivas sem justificção. Fui informado que os serviços de atendimento são gratuitos, porém os pagamentos dos custos dos materiais envolvidos no tratamento são de minha responsabilidade bem como as condições de pagamento acordados no orçamento. O tratamento será interrompido se não houver pagamento destes custos.

Concordo também que uma vez terminado o tratamento proposto, tendo sido avaliado pelo professor responsável, retornarei no prazo estipulado pelos professores para controle clínico, sendo que o prosseguimento do tratamento a ser realizado no(s) dente(s) tratado(s) será de minha responsabilidade, tendo em vista que o atendimento da clínica-escola dá-se por uma oferta variável de disciplinas, o número de alunos no curso é variável e, a prioridade dos atendimentos é pedagógica (ou seja, somente os casos que podem ser resolvidos por alunos podem ser atendidos).

Rubrica do Paciente: _____

Data: ____/____/____

Declaro que entendi as perguntas acima e as informações acima prestadas são verdadeiras

UnG635



Sua Universidade. Sua Carreira.

ESTADO DE SAÚDE GERAL:**ATUALIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES MÉDICAS**Está atualmente em tratamento médico? Sim Não

Há quanto tempo fez a última avaliação médica? _____

Está tomando algum medicamento no momento? Sim Não Qual? Quanto tempo? _____Foi hospitalizado? Sim NãoDependência química? Sim NãoPassou por alguma transfusão de sangue? Sim NãoPassou por tratamentos de radio ou quimioterapia? Sim NãoTeve reações indesejáveis a algum medicamento? Sim NãoTem ou teve qualquer tipo de alergia? Sim Não Qual (is)? _____O sr.(a) ou alguém de sua família é diabético? Sim NãoJá esteve exposto ao vírus da AIDS? Sim NãoJá esteve exposto à DST? Sim Não Há quanto tempo? _____Sente dor de cabeça com frequência? Sim NãoTem ou teve articulações doloridas ou inchadas? Sim Não

Já sofreu ou sofre de: (Marque com um "X" no quadrado à esquerda, se a resposta for afirmativa)

- | | | | | |
|--|--|--|--|--|
| <input type="checkbox"/> Pressão alta, | <input type="checkbox"/> <u>Meningite.</u> | <input type="checkbox"/> Hemofilia, | <input type="checkbox"/> Problemas hepáticos, | <input type="checkbox"/> Infecções repetidas, |
| <input type="checkbox"/> Palpitação, | <input type="checkbox"/> <u>Malária.</u> | <input type="checkbox"/> Emagrecimento, | <input type="checkbox"/> Apendicite, | <input type="checkbox"/> <u>Tuberculose.</u> |
| <input type="checkbox"/> Colesterol alto, | <input type="checkbox"/> <u>Hepatite.</u> | <input type="checkbox"/> Insônia, | <input type="checkbox"/> Ataque cardíaco | <input type="checkbox"/> <u>Febre amarela.</u> |
| <input type="checkbox"/> Halitose, | <input type="checkbox"/> Asma, | <input type="checkbox"/> Osteoporose, | <input type="checkbox"/> Dificuldade respirar, | <input type="checkbox"/> <u>Cólera.</u> |
| <input type="checkbox"/> Alteração coagulação, | <input type="checkbox"/> Icterícia, | <input type="checkbox"/> Diabetes, | <input type="checkbox"/> Febre reumática, | <input type="checkbox"/> <u>Toxoplasmose.</u> |
| <input type="checkbox"/> Ganho de peso, | <input type="checkbox"/> Tumores, | <input type="checkbox"/> Candidose, | <input type="checkbox"/> Desmaios, | <input type="checkbox"/> Catapora, |
| <input type="checkbox"/> Ansiedade, | <input type="checkbox"/> Sopro no Coração, | <input type="checkbox"/> <u>Sarampo.</u> | <input type="checkbox"/> Úlcera, | <input type="checkbox"/> Pneumonia, |
| <input type="checkbox"/> Menopausa, | <input type="checkbox"/> Derrame, | <input type="checkbox"/> <u>Dengue.</u> | <input type="checkbox"/> Bócio, | <input type="checkbox"/> Verminoses, |
| <input type="checkbox"/> Problemas renais, | <input type="checkbox"/> Dor no peito, | <input type="checkbox"/> <u>Doença Chagas.</u> | <input type="checkbox"/> Alteração tireóide, | <input type="checkbox"/> Sinusite. |
| <input type="checkbox"/> Herpes, | <input type="checkbox"/> Convulsões, | <input type="checkbox"/> <u>Hanseníase.</u> | <input type="checkbox"/> Xerostomia, | |
| <input type="checkbox"/> <u>Sífilis.</u> | <input type="checkbox"/> Gastrite, | <input type="checkbox"/> Bronquite, | <input type="checkbox"/> Abscesso, | |

ATUALIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES ODONTOLÓGICASTeve alguma complicação em tratamento odontológico? Sim NãoTem algum receio em relação ao tratamento odontológico? Sim NãoConsidera-se uma pessoa ansiosa ou nervosa? Sim NãoSua articulação dói ou estala quando mastiga? Sim NãoTem o hábito de ranger ou apertar aos dentes? Sim NãoSuas gengivas sangram com facilidade? Sim NãoToma regularmente bebidas alcoólicas? Sim NãoÉ fumante? Sim Não Destilados FermentadosPara as mulheres: você está grávida? Sim Não Há quantos anos? _____ Quantos cigarros/dia? _____Teve instruções para uma correta higiene oral? Sim Não Obs.: _____**HIGIENE DENTÁRIA**Higiene: Boa Satisfatória InsatisfatóriaFrequência de escovação: 1 X 2X 3 ou +Uso do fio dental: Diário De vez em quando 3 ou +Predisposição: Cárie Doença periodontalUtiliza outros meios auxiliares de higiene: Sim Não Quais? _____

Motivação do paciente: _____

Anotações importantes: _____

Data: ____/____/____

Rubrica do Paciente: _____

Declaro que entendi as perguntas acima e as informações acima prestadas são verdadeiras

UnG635



Sua Universidade. Sua Carreira.

EXAME EXTRA-ORAL:

Dor muscular?	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Direito	<input type="checkbox"/> Esquerdo
Dor articular?	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Direito	<input type="checkbox"/> Esquerdo
Dor articular quando carregada?	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Direito	<input type="checkbox"/> Esquerdo
Desvios?	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Direito	<input type="checkbox"/> Esquerdo
Ruídos?	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Direito	<input type="checkbox"/> Esquerdo
Presença de infartamento ganglionar:	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	Quais? _____	
Exposição dos dentes durante sorriso:	<input type="checkbox"/> Terço Incisal	<input type="checkbox"/> Terço Médio	<input type="checkbox"/> Dente Inteiro	<input type="checkbox"/> Dente e Gengiva
Parafunção:	<input type="checkbox"/> Sem Sinais / Não Relatada	<input type="checkbox"/> Bruxismo	<input type="checkbox"/> Apertamento	<input type="checkbox"/> Outros Hábitos
D.V.O.:	<input type="checkbox"/> Satisfatória	<input type="checkbox"/> Diminuída	<input type="checkbox"/> Aumentada	
Grau de abertura:	<input type="checkbox"/> Normal	<input type="checkbox"/> Reduzido _____ mm	Cor dos dentes: _____	Escala: _____

AValiação DA HISTÓRIA MÉDICA

Sistema digestório:

História de problemas estomacais, intestinais ou do fígado Sim Não _____

História de hepatite Sim Não _____

História de problemas alimentares como anorexia ou bulimia Sim Não _____

História de ganho ou perda de peso não intencional Sim Não _____

História de ganho ou perda de peso não intencional Sim Não _____

Sistema Cardiovascular:

História de problemas no coração ou febre reumática Sim Não _____

História de cirurgia cardíaca ou indicação de cirurgia relacionada ao coração Sim Não _____

História de dor no peito ou pressão alta Sim Não _____

História de alteração no metabolismo de lipídeos (colesterol, triglicérides, etc.) Sim Não _____

Trato Geniturinário:

História de infecções, problemas na bexiga ou nos rins Sim Não _____

História de cálculo renal Sim Não _____

Mulheres: História de alterações no útero ou ovários Sim Não _____

Gravidez ou amamentação Sim Não _____

Homens: História de alteração na próstata ou órgãos relacionados Sim Não _____

Sistema nervoso:

História de convulsão, tonturas, desmaios, ausência ou perda de consciência Sim Não _____

História de trauma craniano Sim Não _____

História de distúrbio sensitivo (audição, sensibilidade, etc.) Sim Não _____

História de enxaqueca Sim Não _____

Sistema respiratório:

História de pneumonia ou tuberculose Sim Não _____

História de sinusite ou sinusite Sim Não _____

História de asma, bronquite, ou de dificuldade de respirar Sim Não _____

Sistema endócrino:

História de diabetes Sim Não _____

História de alterações do metabolismo do cálcio ou reposição hormonal Sim Não _____

História de alterações na tireóide ou outras glândulas Sim Não _____

Doenças Infecto-contagiosas

Sistema hematopoiético e linfático:

História de anemia Sim Não _____

História de transfusões Sim Não _____

História de dificuldade de cicatrização, hematomas frequentes, sangramento excessivo Sim Não _____

História de susceptibilidade maior a doenças que outras pessoas Sim Não _____

História de gânglios infartados ou doloridos Sim Não _____

Pele:

História de problemas na pele Sim Não _____

História de herpes ou erupções Sim Não _____

Sistema muscular e locomotor:

História de limitação dos movimentos de pernas e braços Sim Não _____

História de artrite ou de outros problemas articulares Sim Não _____

História de problemas musculares Sim Não _____

Data: ____/____/____

Rúbrica do Paciente: _____

Declaro que entendi as perguntas acima e as informações acima prestadas são verdadeiras

UnG035

Livros Grátis

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

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

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

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

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