SILVIA LINARD MARCELINO

**OCORRÊNCIA DE BACTÉRIAS PERIODONTAIS EM ATEROMAS
COLETADOS DE ARTÉRIA CORONÁRIA DE PACIENTES
PORTADORES DE PERIODONTITE CRÔNICA**

São Paulo

2008

Silvia Linard Marcelino

**Ocorrência de bactérias periodontais em ateromas coletados de
artéria coronária de pacientes portadores de periodontite crônica**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da
Universidade de São Paulo, para obtenção do
título de Mestre, pelo Programa de Pós-
Graduação em Ciências Odontológicas.

Área de Concentração: Periodontia

Orientador: Prof. Dr. Giuseppe Alexandre Romito

São Paulo

2008

FOLHA DE APROVAÇÃO

Marcelino SL. Ocorrência de bactérias periodontais em ateromas coletados de artéria coronária de pacientes portadores de periodontite crônica [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo; 2008.

São Paulo, / / 2008

Banca Examinadora

1) Prof.(a) Dr.(a) _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

2) Prof.(a) Dr.(a) _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

3) Prof.(a) Dr.(a) _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho

Aos meus pais **Nelson e Iracema**, as pessoas mais importantes da minha vida. Obrigada por estarem sempre ao meu lado, pelo amor incondicional em todas as minhas decisões, que sempre me guiaram quanto aos corretos princípios, me inspiraram pelas pessoas excepcionais que são e, que além de tudo, sempre estiveram presentes com amor e confiança. Devo tudo o que sou hoje, a vocês.

Ao meu irmão **Nelsinho**, por fazer parte da minha vida, mesmo estando a milhares de quilômetros de distância, está no meu coração todos os dias.

Ao meu marido **Marco Alexandre**, que com todo seu amor e paciência esteve sempre ao meu lado nesta caminhada difícil.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A **Deus**,

Pela oportunidade de viver cercada de paz, amor e solidariedade. Por guiar os meus caminhos para sempre me tornar uma pessoa melhor.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Giuseppe Alexandre Romito**, agradeço em primeiro lugar a confiança depositada. Obrigada pelo apoio, pelas correções, críticas, estímulo e, principalmente por sempre me fazer acreditar ser capaz.

Ao **Prof. Titular Mario Julio Avila-Campo**, pelo exemplo, pela oportunidade, por ter contribuído de maneira intensa com este trabalho, sempre disponível para ensinar e dirimir dúvidas com seu brilhantismo e saber.

Ao **Prof. Ass. Fabio Daumas Nunes**, pela dedicação ao laboratório, e à maneira muito simples com que sempre estava disposto a ajudar. Muito obrigada.

À **Prof. Dra Nívea Maria de Freitas** e ao **Mestrando Marcio Seto Yu Yuen**, muito obrigada por vocês serem mais que meus amigos.

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Titular Francisco Emílio Pustiglioni**, pelos ensinamentos transmitidos de forma competente e a oportunidade de integrar este curso.

Aos Professores da Disciplina de Periodontia da FOUSP, **Prof. Dr. Roberto Fraga Moreira Lotufo** (*in memoriam*), **Prof. Ass. Giorgio de Micheli**, **Prof. Ass. Luiz Antônio Pugliesi Alves de Lima**, **Prof. Dr. Marco Antônio P. Georgetti**, **Prof. Dr. Cláudio Mendes Pannuti**, que muito me ensinaram enriquecendo sobremaneira meus conhecimentos em Periodontia.

Aos meus colegas, amigos queridos de pós-graduação: **Marcio Seto Yu Yuen** e **Giovane H. Gomes**, obrigada pela nossa amizade, pelo companheirismo e, colaborando efetivamente para que o nosso objetivo fosse realizado.

À minha querida Prof. de Inglês, **Andrea Cristofaro**, você faz parte desta conquista; muito obrigada.

Aos meus colegas de pós-graduação: **Mariana S. Ragghianti**, **Flavia Sukekava**, **Daniele Salami**, **Vanessa Tubero E. Alves**, **Leandro Chambrone**, **André Hespanhol**, **Marcio Seto Yu Yuen**, **Osmar Okuda**, **Rodrigo Carlos. N. C. Pinto** e **Rodrigo A. B. dos Santos**. Sou extremamente grata pela amizade, pelos risos descontraídos e pelas experiências que pudemos compartilhar.

Em um lugar especial estão a **Mariana S. Ragghianti** e a **Flavia Sukekava**, eternas companheiras de estudos, amigas queridas que ganhei durante este curso.

À **Prof. Dra. Maria Naira P. Friggi**, minha sogra, exemplo de profissional, pessoa muito querida, muito obrigada.

À minha primeira orientadora **Prof. Dra. Marina Clemente Conde**, quando crescer quero ser igual a você.

A todos os meus amigos e amigas, em especial **Priscila M. Bertoncini, Alessandra Ribeiro, Andrea Ribeiro, Cristina Vieira, Luciana Sanchez, Celina Tabata**. “Os amigos são irmãos que Deus nos permite escolher”.

Aos meus tios **Adivaldo** e **Ieda** por acompanharem meus passos com carinho.

À minha querida afilhada **Juliane** pela presença em cada momento da minha vida.

Aos meus amigos do Laboratório de Patologia Molecular: **Nívea Maria de Freitas, Osmar Okuda, Ana Vitória Imbronito, Sabrina Rosa Grande, Paulo Henrique Braz, Thais Aquafreda, Tatiana Libório, Marcia Sampaio Campos, Patricia Leonel, Débora de Oliveira França** pela amizade e a atenção carinhosa.

Aos meus amigos do Laboratório de Anaeróbios: **Prof. Ass. Elerson Gaetti Jardim Junior, Antonio Fabris, Thais Cristiane Washasugui, Tiago Felipe de Souza, Victor Rafael Castilho Moreno, Zulmira Alves Souza** muito obrigada.

A todos dos consultórios: **Alexandre, Naira, Cláudia, Priscila, Fábila, Marcos, Ana Cláudia, Andrea, Anne Beatriz, Alfredo, Rebeca, Ju, Márcia, Lilian, Dayane, Patricia, Leila, Gislaine, Ticiane, Valdeci, Rita, Tatiane, Lidiane** muito obrigada por todos os momentos em que estive ausente cuidando das minhas bactérias.

Às secretárias da Disciplina de Periodontia: **Márcia Maria dos Santos, Gilmara Luisa Hortêncio e Vera Lúcia Cordeiro dos Santos Almeida**, pela amizade e pela sempre pronta colaboração a qualquer momento; muito obrigada por tudo.

Aos funcionários da Biblioteca da FOU SP: **Maria Aparecida Pinto, Vânia Martins Bueno de Oliveira Funaro, Glauci Elaine Damasio Fidelis** sempre dispostas a ajudar.

À **FAPESP**, pelo auxílio à pesquisa (protocolo nº 04/03199-3).

À **CAPES**, pela bolsa de mestrado.

Agradeço a todos que, de alguma forma participaram colaborando na elaboração deste trabalho a todos aqueles que me incentivaram a prosseguir sempre.

Marcelino SL. Ocorrência de bactérias periodontais em ateromas coletados de artéria coronária de pacientes portadores de periodontite crônica [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2008.

RESUMO

Hoje em dia existe um consenso de que a prevenção e o tratamento de doenças periodontais são importantes na redução de mortalidade e morbidade associadas à doença cardíaca, e uma correlação entre aterosclerose e doença periodontal ainda é desconhecida. Neste estudo, a presença de *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*, *Fusobacterium nucleatum*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Campylobacter rectus* e *Enterococcus faecalis* em placas de ateroma de artérias coronárias foram detectadas. Trinta pacientes programados para endarterectomia, 28 pacientes com periodontite crônica e 2 sem doença periodontal foram incluídos no estudo. DNA bacteriano foram extraídos dos ateromas e a presença de bactérias periodontais foram detectadas através da reação em cadeia da polimerase. DNA bacteriano periodontal foi encontrado em 28 amostras de ateroma de pacientes periodontais: *P. gingivalis* em 14 (50%); *P. nigrescens* em 4 (14,3%), *P. intermedia* em 3 (10,7%); *E. faecalis* em 3 (10,7%), *T. forsythia* em 2 (7,1%); *A. actinomycetemcomitans* em 2 (7,1%); *C. rectus* em 2 (7,1%); *T. denticola* em 1 (3,6%); e *P. endodontalis* em 1 (3,6%). *Fusobacterium nucleatum* não foi encontrado em nenhuma das amostras analisadas. Em duas amostras de ateroma de pacientes sem doença periodontal, *P. gingivalis* e *E. faecalis* foram observadas em uma amostra e *P. intermedia* em ambas as

amostras. Nossos resultados sugerem que a presença de *P. gingivalis* em ateroma de artérias coronárias pode apresentar um envolvimento com aterosclerose e parecendo ser um microrganismo da relação aterosclerose e periodontite crônica.

Palavras-Chaves: periodontite crônica, periodontopatógenos, aterosclerose, PCR, artéria coronária

Marcelino SL. Occurrence of periodontal bacteria in atheroma coronary arteries from patients with chronic periodontitis [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2008.

ABSTRACT

Nowadays there is a consensus that prevention and treatment of periodontal diseases are important in the reduction of mortality and morbidity associated to cardiovascular diseases, and a correlation between atherosclerosis and periodontal disease is still unclear. In this study, the presence of *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*, *Fusobacterium nucleatum*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Campylobacter rectus* and *Enterococcus faecalis* in atheroma plaques from coronary arteries was determined. Thirty patients scheduled for endarterectomy, 28 patients with chronic periodontitis and 2 without periodontal diseases were included in this study. Bacterial DNA was extracted from atheroma and periodontal bacteria detection was done by polymerase chain reaction. Periodontal bacterial DNA was found in 28 atheroma samples from periodontal patients: *P. gingivalis* in 14 (50%); *P. nigrescens* in 4 (14.3%); *P. intermedia* in 3 (10.7%); *E. faecalis* in 3 (10.7%), *T. forsythia* in 2 (7.1%); *A. actinomycetemcomitans* in 2 (7.1%); *C. rectus* in 2 (7.1%); *T. denticola* in 1 (3.6%); and *P. endodontalis* in 1 (3.6%) samples. *Fusobacterium nucleatum* was not detected in any atheroma analyzed. In two atheroma samples from patients without periodontal disease, *P. gingivalis* and *E. faecalis* were observed in one sample and *P. intermedia* in both samples. Our results suggest that the presence of *P. gingivalis* in atheroma from

coronary arteries may be involved in atherosclerosis, and it appears to be a relationship microorganism atherosclerosis and chronic periodontitis.

Keywords: chronic periodontitis; periodontopathogens; atherosclerosis; PCR; coronary arteries

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 - Bactéria alvo, sequência dos primers, temperatura de anelamento, pares de base e referência	27
Tabela 5.1 - Prevalência de bactérias presentes em ateroma de pacientes com ou sem periodontite crônica	29
Tabela 5.2 - Combinação bacteriana encontrada em amostras de ateroma de pacientes com e sem periodontite.....	30

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μg	unidade de medida referente a micrograma
μl	unidade de medida referente a microlitro
μM	unidade de concentração molar referente a micromolar
ATCC	American Type Culture Collection
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> ácido desoxirribonucléico
dNTP	solução de 2' – deoxinucleotídeos 5 –trifosfato: dATP, dTTP, dCTP e dGTP deoxinucleotideo trifosfato.
M	molar ou molaridade
mg	unidade de medida referente a miligrama
ml	unidade de medida referente a mililitro
mM	unidade de medida referente a milimolar
MgCl_2	cloreto de magnésio
pb	pares de bases
PCR	polymerase chain reaction reação em cadeia da polimerase
$t\text{ }^\circ\text{C}$	temperatura de associação

SUMÁRIO

	p.
1 INTRODUÇÃO.....	16
2 REVISÃO DA LITERATURA	18
3 PROPOSIÇÃO	22
4 MATERIAL E MÉTODOS	23
4.1 Pacientes.....	23
4.2 Coleta do ateroma	24
4.3 Extração do DNA.....	25
4.4 Detecção bacteriana	25
5 RESULTADOS	28
6 DISCUSSÃO	31
7 CONCLUSÕES	37
REFERÊNCIAS	38
ANEXO A	42

1 INTRODUÇÃO

A doença periodontal é uma infecção polimicrobiana, crônica, que tem sua patogenia determinada pela interação de microrganismos e, juntamente com fatores imunológicos, ambientais, comportamentais e hereditários, levam a uma resposta inflamatória dos tecidos periodontais (KORNMAN; PAGE; TONETTI 1997). São cerca de setecentas espécies bacterianas isoladas de tecidos moles da cavidade bucal ou do biofilme bacteriano e, somente uma pequena parte dessas bactérias têm o potencial de causar destruição dos tecidos periodontais (PEREA, 2004). A patogênese da doença periodontal é derivada do acúmulo do biofilme de espécies bacterianas subgengivais, atuando isoladamente ou em associação, sendo predominantemente bactérias Gram-negativas tais como: *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*, *Fusobacterium nucleatum*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, e *Campylobacter rectus* (HAFFAJEE; SOCRANSKY, 1994).

As doenças ateroscleróticas representam uma série de respostas celulares e moleculares altamente específicas, que podem ser descritas como uma doença inflamatória (ROSS 1999). A doença cardíaca é a principal causa de morte prematura entre homens nos países industrializados e a sua base patológica é a aterosclerose (KINANE; LOWE 2000).

LIBBY, RIDKER, MASERI, 2002 relataram que exposições sistêmicas de bactérias orais ou endotoxinas bacterianas podem agir direta ou indiretamente na

parede vascular. Além disso, as infecções crônicas podem contribuir para o desenvolvimento de ateromas através da agregação plaquetária, lesão endotelial, anticorpos e a produção de citocinas. Estudos têm relatado que vários fatores que aumentam o risco da aterosclerose ou as suas complicações, ainda são desconhecidos.

A periodontite e a aterosclerose apresentam em comum muitos mecanismos patogênicos potenciais. Ambas as doenças possuem causas complexas, predisposições genéticas, sexo, hipertensão, diabetes, obesidade e a mais significativa é o tabagismo (KINANE; LOWE 2000). Uma associação entre a presença de organismos periodontais e a aterosclerose nas artérias coronárias tem sido relatada previamente (PUCAR et al., 2007) e evidências epidemiológicas sugerem a plausibilidade biológica da associação entre as infecções periodontais e a patogenia da doença cardíaca (CUETO et al., 2005).

2 REVISÃO DA LITERATURA

Desde o início do século XX estabeleceu-se que lesões infecciosas situadas na boca, principalmente a periodontite severa, constituem fatores de risco para o desenvolvimento da endocardite infecciosa, uma doença grave que se instala nas válvulas cardíacas. Estudos recentes têm sugerido que a doença periodontal pode predispor à doença cardíaca, como a aterosclerose, esta podendo levar à isquemia e infarto do miocárdio (COUTINHO; NAKAMAE; MENEZES, 2000).

A doença cardíaca tem um importante significado clínico e econômico, respondendo anualmente por centenas de milhares de mortes prematuras e, conseqüentemente, por gastos cada vez mais elevados na maioria dos países desenvolvidos (KINANE; LOWE, 2000). No Brasil, dados fornecidos pelo Ministério da Saúde indicam que a maior taxa de mortalidade é decorrente de doenças cardíacas (FERREIRA, 2006).

A luz dos vasos sangüíneos deve ser lisa, permitindo a livre circulação de sangue do coração para todas as partes do corpo. No entanto, com o passar dos anos e associado a vários fatores de risco, pode-se formar, no interior das artérias, placas duras e gordurosas que tornam mais difícil a passagem do sangue para os diferentes órgãos. A progressão da formação e o desenvolvimento dessas placas constituem o processo denominado aterosclerose. O centro das placas de ateroma está associado com um infiltrado celular, no qual estão presentes células musculares lisas hipertróficas, macrófagos e alguns linfócitos (GARCIA; HENSHAW; KRALL, 2001). Cada vez mais,

evidências sugerem que a inflamação na parede do vaso sanguíneo tem um papel essencial no desenvolvimento da aterosclerose (ROSS, 1999).

As doenças periodontais são multifatoriais, iniciadas por biofilme bacteriano específico. Constituído predominantemente por bactérias gram-negativas anaeróbias (HAFFAJEE; SOCRANSKY, 1994), as quais ativam mecanismos teciduais que levam à produção de uma série de eventos inflamatórios e imunológicos ocasionando a destruição dos tecidos periodontais. A doença periodontal está entre as doenças crônicas mais comum em humanos e pode afetar de 5 a 30% da população adulta entre 25 a 75 anos de idade (BROWN; LÖE, 1993).

Os estudos de Beck et al. (1996) e De Stefano et al. (1993) mostraram que a infecção e a inflamação causada pela doença periodontal aumentaram o risco de doença cardíaca.

Haraszthy et al. (2000), utilizando a PCR, analisaram 50 ateromas de pacientes submetidos à cirurgia de endarterectomia em consequência da estenose de carótida. Os resultados demonstraram que 44% eram positivos para pelo menos um dos patógenos testados: *Bacteróides forsythus*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermédia* e o *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Os resultados sugerem que a infecção periodontal possa ter um papel na aterosclerose e trombogêneses. Os autores concluíram que a prevenção e o tratamento das infecções periodontais poderiam ser importantes na redução da mortalidade e morbidade associadas à doença cardíaca.

No estudo clínico controlado de Cairo et al. (2004), com a casuística de 40 pacientes, sendo que 19 pacientes com dentes presentes (grupo teste) e 21 pacientes edêntulos (grupo controle). Foram coletadas as amostras de ateroma de carótida em ambos os grupos e da bolsa periodontal somente no grupo teste. Os autores avaliaram

a presença de *P. gingivalis*, *P. intermédia*, *T. forsythensis*, *F. nucleatum*, e *A. actinomycetemcomitans*. Os resultados demonstraram ausência de DNA bacteriano nas amostras de ateroma em ambos os grupos.

A identificação de *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *P. nigrescens*, *T. forsythia*, *A. actinomycetemcomitans* e *C. rectus* em vasos ateroscleróticos através da técnica da PCR, de uma amostra de 79 pacientes (52 placas coletadas da carótida e 27 da artéria femoral). Os autores concluíram que o DNA da bactéria não poderia ser isolado do ateroma, porém outros estudos confirmam que o DNA de patógenos periodontais pode ser detectado em placas de ateromas (FIEHN et al., 2005).

Padilla et al. (2006) realizaram um estudo para isolar e identificar bactérias periodontopatogênicas de paciente com periodontite crônica e comparar com microrganismos detectados na placa de ateroma. A casuística contou com 12 pacientes, sendo que 6 apresentavam estenose da artéria carótida e 6 com obliteração da extremidade inferior. Foram realizadas cultura de bactéria e a PCR para identificação. Os resultados demonstraram que apenas a bactéria *Actinobacillus actinomycetemcomitans* estava presente na bolsa periodontal e na placa de ateroma de 2 pacientes. Os autores concluíram que o periodontopatógeno pode desempenhar algum papel no processo da aterosclerose.

No estudo de Pucar et al. 2007 identificaram bactérias periodontais em amostras de artéria coronária de pacientes com aterosclerose através da PCR. Os resultados demonstraram que das 15 amostras foram detectadas: *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythensis*, e *A. actinomycetemcomitans*. Os autores concluíram que organismos periodontais possam ter uma associação no desenvolvimento e progressão na aterosclerose.

Poucos estudos têm demonstrado a presença de bactérias periodontais em ateroma e as relações entre eles. O objetivo deste estudo foi detectar a presença de microrganismos em ateroma de artérias coronárias.

3 PROPOSIÇÃO

A proposição deste estudo foi de avaliar a presença de *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*, *Fusobacterium nucleatum*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Campylobacter rectus* e *Enterococcus faecalis* nas amostras de ateroma provenientes da artéria coronária e sua relação com a doença periodontal.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Pacientes

Foram selecionados 30 pacientes com média de 61 anos $\pm$ 11,50, 28 (22 homens e 6 mulheres) com periodontite crônica e 2 (1 homem e 1 mulher) sem periodontite. No período de março de 2005 a março de 2007 no Hospital Evangélico da Cidade de Londrina, Paraná; os pacientes que necessitavam de endarterectomia nas artérias coronárias foram escolhidos. Antes da cirurgia cardíaca os pacientes foram submetidos a exame periodontal completo, em ambiente hospitalar. Foram considerados critérios de inclusão: não deveriam terem sido submetidos à antibioticoterapia, nem a tratamento periodontal nos últimos três meses, ter no mínimo seis dentes na cavidade bucal, fumantes ou não fumantes e não serem diabéticos. Os pacientes portadores de periodontite crônica apresentavam perda de inserção de ≥ 5 mm em $\geq 30\%$ dos dentes presentes (TONETTI; CLAFFEY, 2005).

Os exames clínicos foram realizados por um único examinador treinado e calibrado. Um auxiliar odontológico era responsável pela anotação dos dados em uma ficha.

Utilizando um espelho clínico plano¹, e uma sonda milimetrada manual², os sulcos/bolsas foram examinados em 6 sítios por dente (faces mesio-lingual, lingual,

¹ Espelho nº #5, Hu Friedy, Chicago, IL, USA

² PCPUNC – 15, Hu Friedy, Chicago, IL, USA

distolingual, méso-vestibular, vestibular e disto-vestibular) em todos os dentes permanentes.

Os seguintes parâmetros clínicos foram registrados:

1. Profundidade clínica de sondagem (PCS): distância (mm) compreendida entre a margem gengival e o fundo do sulco gengival ou da bolsa periodontal.
2. Distância da linha esmalte-cimento à margem gengival (LEC-MG): distância (mm) que vai da linha esmalte-cimento à margem gengival. Se a LEC estivesse localizada apicalmente à margem gengival, o parâmetro receberia um valor negativo.
3. Nível clínico de inserção (NCI): é o valor correspondente à soma dos valores de PCS e LEC-MG³.

Além disso, o protocolo de pesquisa e o termo de Consentimento Livre e Esclarecido foram submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (Anexo A).

4.2 Coleta do ateroma

As placas de ateroma das artérias coronárias foram coletadas através de um procedimento denominado endarterectomia. Essas amostras foram armazenadas

³ NCI = PCS + (LEC-MG)

imediatamente em tubos estéreis com 5 ml RNAlater⁴ a -20°C e transferidos ao Laboratório de Patologia Molecular para o processamento.

4.3 Extração do DNA

Aproximadamente 100 mg de tecido foram utilizados para a extração do DNA que foi obtido através do Kit de Extração para Tecido ChargeSwitch⁵ gDNA Mini Tissue Kit de acordo com as instruções do fabricante.

4.4 Detecção Bacteriana por PCR

As amostras de DNA foram amplificadas pela técnica da PCR utilizando-se iniciadores específicos baseados na sequência do gene 16S rRNA e foram sintetizadas pela Invitrogen⁵ conforme Ashimoto et al. 1996, para *Fusobacterium nucleatum* segundo Avila-Campos et al. 1999 e *Enterococos faecalis* segundo Ke et al. (1999). As amplificações foram realizadas em volume final de 25 µL contendo 2,5 µl de 10 X PCR buffer,⁵ 1,0 µl of MgCl₂ (50 mM),⁵ 1,0 µl de dNTP mix (0,2 mM),⁵ 1,0 µl de cada iniciador específico (0,4 M),⁵ 0,25 µl Taq Platinum DNA polymerase (0,5U),⁵ e 2 µl de DNA das

⁴ Ambion, Applied Biosystem, Foster CT, USA

⁵ Invitrogen do Brasil, LTDA, São Paulo, São Paulo, Brazil.

amostras. A reação de amplificação foi realizada em um termociclador⁶ programado para 94°C por cinco minutos, 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, temperatura de anelamento adequada para cada par de iniciadores (Tabela 4.1) por 30 segundos; 72°C por 30 segundos, e 72°C por 5 minutos para a extensão final do DNA.

Os controles positivos foram DNA de cultura pura de bactérias: *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277, *Porphyromonas endodontalis* ATCC 35406, *Prevotella intermedia* ATCC 25611, *Prevotella nigrescens* ATCC 33563, *Tannerella forsythia* ATCC 43037, *Treponema denticola* ATCC 33520, *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25611, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ATCC 29523, *Campylobacter rectus* ATCC 33238 e *Enterococcus faecalis* ATCC 33563. O controle negativo foi composto por todos os reagentes presentes na reação e isento do DNA genômico.

O produto de amplificação (10 µl) foi observado por eletroforese (70 V por 2,5 horas) em gel de agarose 2%, e a corado com brometo de etídio a 0,5 µg/ml e fotografado sob um transluminador de luz ultravioleta⁷. Como marcador molecular foi usado 1-kb plus DNA ladder⁵.

⁵ Invitrogen do Brasil, LTDA, São Paulo, São Paulo, Brazil.

⁶ Perkin Elmer, Gene Amp PCR System 9700, Norwalk, CT, USA

⁷ Fotodyne, Inc Hartland, WI

Tabela 4.1 - Bactéria alvo, sequência dos primers, temperatura de anelamento, pares de base e referência

Bactéria alvo	Sequência dos Primers (5' --- 3')	Temperatura de anelamento	Amplificação (bp)	Referência
Universal Primers 16S rRNA	AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG CAA TAC TCG TAT CGC CCG TTA TTC	60 °C	1500	Amano et al. (1999)
<i>P. gingivalis</i>	AGG CAG CTT GCC ATA CTG CG ACT GTT AGC AAC TAC CGA TGT	60 °C	404	Ashimoto et al. (1996)
<i>P. endodontalis</i>	GCT GCA GCT CAA CTG TAG TC CCG CTT CAT GTC ACC ATC TC	60 °C	672	Ashimoto et al. (1996)
<i>P. intermedia</i>	TTT GTT GGG GAG TAA AGC GGG TCAA CAT CTC TGT ATC CTG CGT	50 °C	575	Ashimoto et al. (1996)
<i>P. nigrescens</i>	ATG AAA CAA AGG TTT TCC GGT AAG CCC ACG TCT CTG TGG GCT GCG A	55 °C	804	Ashimoto et al. (1996)
<i>T. forsythia</i>	GCC TAT GTA ACC TGC CCG CA TGC TTC AGT GTC AGT TAT ACC T	60 °C	641	Ashimoto et al. (1996)
<i>T. denticola</i>	TAA TAC CGA ATG TGC TCA TTT ACA T TCA AAG AAG CAT TCC CTC TTC TTC TTA	55 °C	316	Ashimoto et al. (1996)
<i>F. nucleatum</i>	ATT GTG GCT AAA AAT TAT AGT T ACC CTC ACT TTG AGG ATT ATA G	40 °C	500	Avila-Campos et al. (1999)
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	AAA CCC ATC TCT GAG TTC TTC TTC ATG CCA ACT TGA AGT TAA AT	56 °C	557	Ashimoto et al. (1996)
<i>C. rectus</i>	TTT CGG AGC CAT ACG TCC TAA G TTT CTG CAA GCA GAC ACT CTT	50 °C	598	Ashimoto et al. (1996)
<i>E. faecalis</i>	TAG TGA CAA ACC ATT CAT GAA TG AAC TTC GTC ACC AAC GCG AAC	55 °C	112	Ke et al. (1999)

5 RESULTADOS

Neste estudo participaram 7 mulheres e 23 homens (77%) com idade de 61 anos $\pm$ 11,50, sendo 2 pacientes (7%) sem a doença periodontal (SP) e 28 pacientes (93,3%) com periodontite crônica (CP). A média de dentes presentes para a periodontite crônica foi $14,85 \pm 6,72$ e pacientes sem a doença de $22,5 \pm 3,54$. Os DNA das amostras de ateroma foram amplificados com primers universais. Todos os controles positivos apresentaram a amplificação esperada para os primers específicos.

A detecção das taxas de espécies bacterianas nas placas de ateromas foram identificadas por PCR e descritas na tabela 5.1. A prevalência de bactéria periodontal no ateroma de pacientes com periodontite crônica foi a seguinte: *P. gingivalis* em 14 (50%); *P. nigrescens* em 4 (14,3%), *P. intermedia* em 3 (10,7%); *E. faecalis* em 3 (10,7%), *T. forsythia* em 2 (7,1%); *A. actinomycetemcomitans* em 2 (7,1%); *C. rectus* em 2 (7,1%); *T. denticola* em 1 (3,6%); e *P. endodontalis* em 1 (3,6%). Nos pacientes sem a doença periodontal uma amostra apresentou *P. gingivalis* e *E. faecalis*, e a outra *P. intermedia* (100%). Foram observadas combinações bacterianas em pelo menos 39,3% das amostras de pacientes com periodontite crônica. *P. gingivalis* e *P. nigrescens* foram encontrados em combinação com uma ou mais espécies bacterianas examinadas. A prevalência da coinfeção bacteriana em ateroma é apresentada na tabela 5.2. Os ateromas de pacientes sem periodontite, só apresentou uma amostra de combinação *E. faecalis* - *P. nigrescens* - *P. gingivalis*.

Tabela 5.1 – Prevalência de bactérias presentes em ateroma de pacientes com ou sem periodontite crônica

Bactéria	Pacientes			
	Periodontite (28)		Sem periodontite (2)	
	No.	%	No.	%
<i>P. gingivalis</i>	14	50,0	1	50,0
<i>P. nigrescens</i>	4	14,3	0	0,0
<i>P. intermedia</i>	3	10,7	2	100
<i>E. faecalis</i>	3	10,7	1	50,0
<i>T. forsythia</i>	2	7,1	0	0,0
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	2	7,1	0	0,0
<i>C. rectus</i>	2	7,1	0	0,0
<i>P. endodontalis</i>	1	3,6	0	0,0
<i>T. denticola</i>	1	3,6	0	0,0

Tabela 5.2 - Combinação bacteriana encontrada em amostras de ateroma de pacientes com e sem periodontite.

Bactéria	Pacientes			
	Periodontite (28)		Sem periodontite (2)	
	No.	%	No.	%
<i>P. gingivalis</i> , <i>P. intermedia</i>	3	10,7	0	0,0
<i>P. gingivalis</i> , <i>E. faecalis</i>	3	10,7	0	0,0
<i>P. gingivalis</i> , <i>A. actinomycetemcomitans</i>	1	3,6	0	0,0
<i>P. intermedia</i> , <i>C. rectus</i>	1	3,6	0	0,0
<i>P. nigrescens</i> , <i>P. endodontalis</i>	1	3,6	0	0,0
<i>P. gingivalis</i> , <i>P. intermedia</i> , <i>A. actinomycetemcomitans</i>	1	3,6	0	0,0
<i>T. denticola</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>C. rectus</i>	1	3,6	0	0,0
<i>P. gingivalis</i> , <i>P. nigrescens</i> , <i>E. faecalis</i>	0	0,0	1	50

6 DISCUSSÃO

Nos últimos anos, vários estudos; Page (1998), Lindsberg e Grau (2003), Joshipura et al. (2003), Pussinen e Mattila (2004) e Kozarov et al. (2006) têm mostrado a doença periodontal como um fator de risco para o desenvolvimento de outras condições sistêmicas e interferindo no curso da doença periodontal como fatores modificadores. Como consequência, a American Academy of Periodontology 1998 considera que infecções bucais como a doença periodontal, pode contribuir na etiopatogênese da doença cardíaca, sendo comparáveis a fatores de risco como tabagismo, diabetes, hipertensão e alto teor de triglicérides.

Na última década, alguns estudos como o de Beck et al. (1998) formularam a hipótese de que infecções crônicas como as doenças periodontais podem estar relacionadas com doenças cardíacas, onde os microrganismos periodontopatógenos podem entrar na corrente sangüínea, se alojar em alguma área da artéria e provocar a formação e/ou atingir a placa de ateroma e precipitar o seu rompimento.

Neste estudo a presença de *P. gingivalis* em ateroma de pacientes com ou sem periodontite foi detectado em (50%). Este resultado está de acordo com dados mostrados de Ishihara et al. (2004) e Pucar et al. (2007) que demonstraram estatisticamente as correlações significantes entre a presença de *P. gingivalis* em amostras de placa de artéria coronárias.

A associação entre as doenças periodontais e a aterosclerose está na existência de uma base genética de susceptibilidade, reforçada pelo fato dessas duas condições serem consideradas doenças crônicas e de etiologia multifatorial,

para as quais o fator de risco clássico não é observado em muitos casos (HARASZTHY et al., 2000).

Quanto à identificação de patógenos periodontais tais como, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythia* e *A. actinomycetemcomitans* em placas de ateromas pela PCR é importante considerar que, a detecção ocorre somente pela presença do DNA alvo e não pelas células bacterianas viáveis, representativas de uma espécie patogênica periodontal. Portanto, é possível que apenas algumas seqüências de ácidos nucleicos de uma célula bacteriana degradada estejam acumuladas em ateromas que ocluem as artérias, sem produzir injúrias no endotélio (HARASZTHY et al., 2000).

Socransky et al. (2002) descreveram que os principais agentes etiológicos considerados da periodontite crônica são: *P. gingivalis*, *T. forsythia* e *T. denticola*, porém, no estudo, a prevalência destes microrganismos, apresentou uma baixa taxa (*T. forsythia* 7,1% e *T. denticola* 3,6%), além disso, a prevalência de *P. nigrescens* e *P. intermedia* eram respectivamente 14,3% e 10,7%, concordando com o estudo de Ishihara et al., (2004). A presença de *P. gingivalis* é um microrganismo capaz de invadir e proliferar células endoteliais, podendo levar ao acúmulo de plaquetas e fibrina dentro dos vasos cardíacos (Deshpande, Khan, Genco 1998).

A presença de *A. actinomycetemcomitans* foi observada em 7,1% das amostras de ateroma. Essa bactéria também tem sido associada à periodontite agressiva e às várias infecções extrabucais, como endocardite, pneumonias, septicemias e abscessos (MALHEIROS; AVILA-CAMPOS, 2004). Nossos resultados demonstraram uma baixa detecção desta bactéria em contraste com outros estudos, como o de Padilla et al. (2006) que detectaram a presença do DNA bacteriano em 16,6% das amostras de ateroma (carótida e tibia) e Ishihara et al. (2004) que

detectaram a presença de *A. actinomycetemcomitans* em 26,4% das amostras de artéria coronária. Surpreendentemente *E. faecalis* foi detectado em 10,7% das amostras analisadas e *C. rectus* e *P. endodontalis* em 7,1% e 3,6%, respectivamente. *Enterococcus faecalis* e *P. endodontalis* são importantes organismos presentes no conduto radicular, porém nenhum paciente apresentava infecções endodônticas. Foi interessante observar que o *F. nucleatum* sendo uma bactéria importante na doença periodontal não foi observada nas placas de ateroma de pacientes com e sem periodontite.

A detecção de *P. gingivalis*, *P. intermedia* e *E. faecalis* em amostras sem periodontite sugerem que a invasão nas artérias coronárias é possível, mas estudos adicionais serão necessários para esclarecer a presença destes microrganismos nos pacientes referidos (sem periodontite). As placas mais profundas do ateroma que possuem uma tensão de oxigênio baixa, proporcionam o crescimento de anaeróbios. Estas considerações conduzem a hipótese de que os patógenos periodontais anaeróbios podem ser importantes na patogênese do ateroma, não somente durante a sua iniciação, como também, durante a progressão da doença cardíaca. (FIEHN et al., 2005)

A grande dificuldade nos estudos que relacionam periodontopatógenos com aterosclerose, é estabelecer se as bactérias são residentes ou transitórias, o que poderia determinar as diferenças nas taxas de detecção em vários estudos. (ISHIHARA et al., 2004; TAYLOR-ROBINSON et al., 2002).

P. gingivalis foi detectada com *P. intermedia* ou *E. faecalis* em 10,7% das amostras de ateroma e, no dobro e triplo de associação bacteriana, entre outras bactérias avaliadas, detectou-se uma taxa de 3,6% (Tabela 5.2). Apenas um

paciente sem a doença peridontal apresentou na amostra de ateroma o DNA de *P. gingivalis* - *P. nigrescens* - *E. faecalis*.

Nossos resultados estão de acordo com Ishihara et al., (2004), Padilla et al, (2006) que detectaram a presença de *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* e *T. forsythia* em diferentes taxas. Neste estudo foi detectada a presença de bactérias periodontopatôgenicas e, a composição bacteriana da placa de subgingival não foi determinada, portanto nenhuma associação poderia ser feita.

Neste estudo detectamos a presença *T. denticola* em 3,6% das amostras. Este resultado é inferior aos dados de Okuda et al. (2001) e Ishihara et al. (2004) que detectaram este organismo em 23,1% e 29,4% dos ateromas avaliados. Esta diferença na taxa de detecção poderia ser explicada porque é impossível estabelecer, se presentes naquela região, as bactérias são residentes ou transitórias.

Em complemento, nossos resultados são consistentes com aqueles previamente relatados por Pucar et al. (2007) que detectaram *P. gingivalis* (53,33%), *P. intermedia* (33,33%), *A. actinomycetemcomitans* (26,67%) e *T. forsythia* (13,33%). Taylor-Robinson et al. (2002) detectaram a presença de *P. intermedia* e *A. actinomycetemcomitans* em 31,2% das amostras das artérias aorta, ilíaca, mamária interna e artéria coronária. Haraszthy et al. (2000) detectaram *T. forsythia* em 30%, *P. gingivalis* em 26%, *A. actinomycetemcomitans* em 18% e *P. intermedia* em 14%. Esses achados representam clara evidência que patógenos periodontais entram na circulação causando uma bacteremia transitória e podem se alojar nas paredes das artérias.

O *P. endodontalis* tem sido associado exclusivamente com infecções endodônticas e a sua patogenicidade depende da presença de outras espécies

associadas (van WINKELHOFF, CARLEE, GRAAFF 1985). Neste trabalho foi detectada a presença desta bactéria em uma amostra de paciente com periodontite crônica, é possível que uma fase intermitente de bacteremia pudesse alcançar e colonizar as paredes das artérias.

Neste estudo detectou-se a presença do *E. faecalis* em 10,7% das amostras de pacientes com periodontite crônica. A literatura tem demonstrado que os patógenos periodontais podem ser encontrados no biofilme supra e subgengival de indivíduos sadios (SOCRANSKY et al., 1998). Este estudo observou associação entre a *P. gingivalis*, *P. nigrescens* e *P. gingivalis* ou *T. denticola* e *C. rectus*, e estes microrganismos tornam-se patogênicos quando ocorrem associações entre si, formando complexos microbianos e com fatores de risco que podem deixar o indivíduo com pré-disposição para manifestação da doença periodontal (GENCO, 1996).

O estudo de Beck et al. (1996) enfatizam que a periodontite é uma infecção crônica onde se geram níveis sistêmicos elevados de fatores de risco, tais como a proteína C-reativa, fibrinogênio e citocinas (IL-1 β , IL-6, TNF- α). Esses fatores quando elevados podem aumentar a atividade inflamatória nas lesões ateroscleróticas, aumentando potencialmente o risco dos eventos cardíacos. Embora na literatura mencione-se a ocorrência de diferenças na presença de bactérias periodontopatogênicas em ateromas, certamente pode ser explicado através da diferença étnica nas populações estudadas, nas espécies microbianas subgengivais e a resposta imune do hospedeiro (AIMETTI et al., 2007).

Estes resultados podem ser importantes para a descoberta de novos mecanismos, demonstrando que pesquisas nesta área são válidas por agregarem conhecimento a um problema que afeta uma parcela significativa da população. A

questão sobre se a infecção pode predispor à aterosclerose ainda não foi respondida, porém certamente, patógenos bacterianos podem desempenhar um papel direto ou indireto da etiopatogenia da aterosclerose.

7 CONCLUSÃO

Podemos concluir que foi possível a detecção, através da técnica da PCR, dos microrganismos *P. gingivalis*; *P. endodontalis*, *P. intermedia*; *P. nigrescens*; *T. forsythia*; *T. denticola*; *A. actinomycetemcomitans*; *C. rectus* e *E. faecalis* nas amostras analisadas. A presença de *P. gingivalis* pode estar relacionada com ateroma de artérias coronárias de pacientes com aterosclerose e parecendo ser um microrganismo da relação entre a aterosclerose e periodontite crônica.

REFERÊNCIAS¹

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

Amano A, Nakagawa I, Kataoka K, Morisaki I, Hamada S. Distribution of Porphyromonas gingivalis strains with *fimA* genotypes in periodontitis patients. J Clin Microbiol. 1999;37:1426-30.

American Academy of Periodontology AAP. Periodontal disease as a potential risk factor for systemic diseases (position paper). J Periodontal 1998;69:841-50.

Ashimoto A, Chen C, Bakker I, Slots J. Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. Oral Microbiol Immunol 1996;11:266-73.

Avila-Campos MJ, Such CT, Whitney AM, Steigerwalt AG, Mayer LW. Arbitrarily primed-polymerase chain reaction for identification and epidemiologic subtyping of oral isolates of Fusobacterium nucleatum. J Periodontol. 1999;70:1202-8.

Beck J, Garcia R, Heiss G, Vokonas PS, Offenbacher S. Periodontal disease and cardiovascular disease. J Periodontol 1996;67:1123-37.

Beck JD, Offenbacher S, Williams R, Gibbs P, Garcia R. Periodontitis: a risk factor for coronary heart disease. Ann Periodontol 1998;3:127-41.

Brown JL, Loe H. Prevalence, extent, severity and progression of periodontal disease. Periodontol 2000 1993; 2:57-71.

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

¹ De acordo com o Estilo Vancouver e abreviatura de periódicos segundo as Bases Medline.

Coutinho MSSA, Nakamae FJD, Menezes ME. *Chlamydia pneumoniae* and atherosclerosis. Identification of bacterial DNA on the arterial wall. Arq Bras Card 2000;74(2):119-28.

Cueto A, Mesa F, Bravo M, Ocanã-Riola R. Periodontitis as risk factor for acute myocardial infarction. A case control study of Spanish adults. J Periodontal Res 2005; 40:36-42.

Deshpande RG, Khan MB, Genco CA. Invasion of aortic and heart endothelial cells by *Porphyromonas gingivalis*. Infect Immun 1998;66:5337-43.

Ferreira C. Doenças cardiovasculares aterosclerose e fatores de risco. Disponível em: URL: <<http://unifesp.br/dmed/cardio/ch/cardio.htm>> [2006 16 Nov].

Fiehn NE, Larsen T, Christiansen N, Holmstrup P, Schroeder T. Identification of periodontal pathogens in atherosclerotic vessels. J Periodontol 2005;76:731-6.

Garcia R I, Henshaw MM, Krall EA. Relationship between periodontal disease and systemic health. Periodontol 2000 2001; 25:21-36.

Genco RJ. Current view of risk factors for periodontal diseases. J Periodontol 1996; 67:1041-9.

Haffajee AD, Socransky SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. Periodontol 2000 1994;5:78-111.

Haraszthy VI, Zambon JJ, Trevisan M, Zeid M, Genco RJ. Identification of periodontal pathogens in atheromatous plaques. J Periodontol 2000;71:1554-60.

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

Joshiyura KJ, Hung HC, Rimm EB, Willett WC, Ascherio A. Periodontal disease, tooth loss, and incidence of ischemic stroke. Stroke 2003;34:47-52.

Ke D, Picard FJ, Martineau F, Ménard C, Roy PH, Ouellette M, Bergeron MG. Development of a PCR assay for rapid detection of enterococci. J Clin Microbiol 1999; 37:3497-503.

Kinane DF, Lowe GD. How periodontal disease may contribute to cardiovascular disease. *Periodontol 2000* 2000;23:121-6.

Kornman KS, Page RC, Tonetti MS. The host response to the microbial challenge in periodontitis: assembling the players. *Periodontol 2000* 1997;14:33-53.

Kozarov E, Sweier D, Shelburne C, Progulske-Fox A, Lopatin D. Detection of bacterial DNA in atheromatous plaques by quantitative PCR. *Microbes Infect* 2006;8:687-93.

Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 2002;105:1135-43.

Lindsberg PJ, Grau AJ. Inflammation and infections as risk factors for ischemic stroke. *Stroke* 2003;34:2518-32.

Malheiros VJ, Avila-Campos MJ. Detection of pathogens from periodontal lesions. *Rev Saúde Pública* 2004;38:723-8.

Okuda K, Ishihara K, Nakagawa T, Hirayama A, Inayama Y, Okuda K. Detection of *Treponema denticola* in atherosclerotic lesions. *J Clin Microbiol* 2001;39:1114-7

Padilla C, Lobos O, Hubert E, González C, Matus S, Pereira M, Hasbun S, et al. Periodontal pathogens in atheromatous plaques isolated from patients with chronic periodontitis. *J Periodont Res* 2006;41:350-3.

Page RC. The pathobiology of periodontal diseases may affect systemic diseases: inversion of a paradigm. *Ann Periodontol*. 1998;3:108-20.

Perea EJ. Oral flora in the age of molecular biology. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2004;9:6-10.

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

Pussinen PJ, Mattila K. Periodontal infections and atherosclerosis: mere associations? *Curr Opin Lipidol* 2004;15:583-8.

Ross R. Mechanisms of disease: atherosclerosis: an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999; 340:115-26.

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, Haffajee AD. Subgingival microbial profiles in refractory periodontal disease. *J Clin Periodontol* 2002;29:260-268.

Taylor-Robinson D, Aduse-Opoku J, Sayed P, Slaney JM, Thomas BJ, Curtis MA. Oro-dental bacteria in various atherosclerotic arteries. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2002;21:755-7.

Tonetti MS, Claffey N. Advances in the progression of periodontitis and proposal of definitions of a periodontitis case and disease progression for use in risk factor research. *J Clin Periodontol* 2005;32:210-3.

van Winkelhoff AJ, Carlee AW, de Graaff J. *Bacteroides endodontalis* and other black-pigmented *Bacteroides* species in odontogenic abscesses. *Infect Immun* 1985;49:494-7.

ANEXO A - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

Faculdade de Odontologia
Universidade de São Paulo

CEP/OF.270/02

São Paulo, 11 de outubro de 2002

Senhor Pesquisador

Informamos a Vossa Senhoria, que diante do Parecer de Aprovação do Comitê de Ética do Hospital Evangélico da Sociedade Evangélica Beneficente de Londrina, estamos cientes da aprovação do projeto de pesquisa intitulado *"Avaliação microbiológica da presença de periodontopatógenos em arterioma de pacientes submetidos a endarterectomia coronariana e sua relação com a condição clínica periodontal"* de sua autoria, não havendo nenhuma oposição por parte deste CEP, com relação a sua realização.

Sendo o que se nos apresentava, valemo-nos da oportunidade para reiterar-lhe os nossos protestos de elevada estima e distinta consideração.

Profa.Dra. **Célia Regina Martins Delgado Rodrigues**
Coordenadora do CEP-FOUSP

Ilustríssimo Senhor
Professor Doutor **Giuseppe Alexandre Romito**
Disciplina de Periodontia