ADRIANA MOURA FOZ

**Perfil inflamatório de pacientes submetidos à endarterectomia de carótida e
sua relação com doença periodontal crônica**

São Paulo
2015

ADRIANA MOURA FOZ

**Perfil inflamatório de pacientes submetidos à endarterectomia de carótida e
sua relação com doença periodontal crônica**

Versão Corrigida

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia
da Universidade de São Paulo, para obter o
título de Doutora, pelo Programa de Pós-
Graduação em Ciências Odontológicas.

Área de concentração: Periodontia

Orientador: Prof. Dr. Giuseppe Alexandre Romito

São Paulo

2015

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo da Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Foz, Adriana Moura.

Perfil inflamatório de pacientes submetidos à endarterectomia de carótida e sua relação com doença periodontal crônica / Adriana Moura Foz; orientador Giuseppe Alexandre Romito. -- São Paulo, 2015.

62p. : fig., tab. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) -- Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas – Área de concentração - Periodontia. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão corrigida.

1. Endarterectomia. 2. Doenças periodontais. 3. Inflamação. I. Romito, Giuseppe Alexandre II. Título.

Foz AM. Perfil inflamatório de pacientes submetidos à endarterectomia de carótida e sua relação com doença periodontal crônica. Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutora em Ciências Odontológicas.

Aprovado em: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Dedico este trabalho

Ao meu marido **João Paulo**, por me apoiar nas minhas escolhas profissionais, e principalmente por ser meu companheiro, amigo e agora, pai do **Felipe**.

Aos meu pais **Guilherme e Mônica**, pelo apoio incondicional.

À minha avó e dentista **Dra. Edir Foz**.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por absolutamente tudo.

Ao meu orientador, **Prof. Titular Giuseppe Alexandre Romito**, por continuar confiando em mim, me ajudando e orientando, e abrindo portas para meu futuro profissional. Obrigada por tudo.

Aos professores **Prof. Titular Fabio Daumas Nunes**, **Prof. Titular Mario Julio Ávila-Campos**, **Prof. Titular Pedro Puech Leão** por abrirem as portas de seus laboratórios/ ambulatório para que eu pudesse realizar minha pesquisa.

A **Viviane Aparecida Arenas Rodrigues** e **Michella Bezerra Lima**, pela ajuda importante que me deram para que eu completasse esse trabalho.

Aos Professores dessa casa: **Prof. Dr. Cláudio Mendes Pannuti**, **Prof. Dr. Giorgio de Micheli**, **Prof. Dr. João Batista César Neto**, **Prof. Luiz Alves P. Lima**, **Prof. Dr. Marco Antônio Paupério Georgetti**, **Profa. Dra. Marina Clemente Conde**, **Profa. Dra. Cristina Villar**, **Profa. Dra. Luciana Saraiva de Campos** e **Profa. Dra. Marinella Holzhausen** pela prontidão em ajudarem, orientarem e também conversarem, sempre que precisei.

Aos meus amigos e companheiros do projeto Diabetes, **Mariana Sousa Rabelo**, **Anna Carolina Ratto Tempestini Horliana**, **Giovane Hisse Gomes** e **Hilana Paula Carillo Artese**. É muito bom trabalhar com vocês.

A toda equipe da Disciplina de Cirurgia Vascular do Hospital das Clínicas (FMUSP), que me recebeu sempre com muita paciência e respeito.

A toda equipe do Laboratório de Patologia Molecular (FOUSP), por todo o respeito e ajuda.

Aos meus colegas de pós graduação: **Samuel Ferreira Junior, Ana Paula Sassá, Gislene Sakata Inoue e Livia Tolentino**, por uma amizade que há muito tempo já saiu das dependências da USP.

À secretária e à técnica da Disciplina de Periodontia: **Marcia Maria dos Santos e Marília Camargo Gomes** por toda a ajuda e amizade.

À **FAPESP**, pelo Auxílio à Pesquisa (2010/06758-4).

Agradeço a todos que de alguma forma participaram de todo este processo do meu Doutorado.

RESUMO

Foz AM. Perfil inflamatório de pacientes submetidos à endarterectomia de carótida e sua relação com doença periodontal crônica [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2015. Versão Corrigida.

A relação entre periodontite e doenças cardiovasculares (DCV) tem sido amplamente discutida, embora os mecanismos de interação não estejam claros. Foi sugerido que pacientes com periodontite apresentam inflamação sistêmica e um pequeno aumento no risco cardiovascular. Patógenos periodontais foram encontrados em placas de ateroma, mas a influência destes microrganismos na aterosclerose ainda não é compreendida. O objetivo primário deste estudo foi delinear o perfil inflamatório sistêmico de pacientes submetidos à endarterectomia carotídea. Os objetivos secundários foram associar o perfil inflamatório dos participantes à condição periodontal e à presença de patógenos orais encontrados na cavidade oral e em placas de ateroma. Trinta e cinco pacientes submetidos à endarterectomia carotídea foram incluídos neste estudo. Antes da cirurgia vascular, um exame clínico periodontal foi realizado e foram coletadas amostras de sangue, saliva e biofilme subgengival. Durante a endarterectomia, uma amostra da placa de ateroma foi coletada. As amostras de soro foram testadas com o ensaio imunoenzimático de alta sensibilidade Multiplex para dezessete marcadores de células Th17. Amostras de saliva, biofilme subgengival e placa de ateroma foram submetidas ao PCR quantitativo para avaliação de dez patógenos periodontais. Este estudo foi capaz de detectar vários marcadores inflamatórios circulantes, o que indica a presença de inflamação sistêmica como uma característica da população. *T. forsythia* foi o microrganismo mais frequentemente encontrado em amostras de ateroma (37% das amostras). Níveis de *T. forsythia* em amostras de ateroma foram positivamente correlacionados com os níveis séricos de IL-7, IL-6, IL-17, IL-13, IL-12p70, IFN- γ , GCS-F ($p<0,05$) e IL-10 ($p<0,01$). Níveis séricos de IL-2 foram positivamente correlacionados com os concentrações salivares de *P. intermedia*, *P. endodontalis* ($p<0,05$) e *T. denticola* ($p<0,01$). Níveis séricos de TNF- α foram positivamente correlacionados com concentrações salivares de *P. endodontalis* ($p<0,01$). Concentrações de *P. endodontalis* em amostras subgengivais foram correlacionadas positivamente com IL-2 ($p<0,05$). A inflamação periodontal (PISA) foi positivamente correlacionada com IL-2 ($p<0,05$). A coexistência de patógenos

periodontais comuns na cavidade oral e na placa de ateroma está associada a um estado inflamatório sistêmico, o que poderia ser relevante para a compreensão dos mecanismos que ligam periodontite com DCV.

Palavras-chave: Doença aterosclerótica. Doença periodontal. Medicina periodontal. Inflamação sistêmica. Periodontopatógenos.

ABSTRACT

Foz AM. Inflammatory profile of patients undergoing carotid endarterectomy and its relationship to chronic periodontal disease [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2015. Versão Corrigida.

The relationship between periodontitis and cardiovascular diseases (CVD) has been widely discussed, although the mechanisms of interaction are not clear. It has been suggested that patients with periodontitis exhibit systemic inflammation and mild increase in future cardiovascular risk. Periodontal pathogens have been found in atheromatous plaques, but their exact role in atherosclerosis are not yet understood. The primary aim of this study was to screen the systemic inflammation profile in patients undergoing carotid endarterectomy. The secondary aims were to associate participant's inflammatory profiles with periodontal status and the presence of periodontal pathogens found in oral cavity and atheromatous plaques. Thirty-five patients who underwent carotid endarterectomy were enrolled in this study. Prior to the vascular surgery, a clinical periodontal exam was conducted, and samples of blood, saliva and subgingival biofilm were collected. During endarterectomy, a sample of the atheromatous plaque was retrieved. Serum samples were assayed with high sensitivity Multiplex assay for seventeen Th17 biomarkers. Saliva, subgingival biofilm and atheromatous plaque samples were submitted to quantitative PCR for ten periodontal pathogens. This study was able to detect several circulating inflammatory markers, indicating the systemic inflammatory burden as a characteristic of this population. *T. forsythia* was the more frequent microorganism found in atheromatous samples (37% of the samples). *T. forsythia* titres in atheromatous samples were positively correlated with serum levels of IL-7, IL-6, IL-17, IL-13, IL-12p70, IFN- γ , GCS-F ($p<0.05$) and IL-10 ($p<0.01$). Circulating levels of IL-2 were positively correlated with salivary titres of *P. intermedia*, *P. endodontalis* ($p<0.05$) and *T. denticola* ($p<0.01$). Circulating levels of TNF- α were positively correlated with salivary titres of *P. endodontalis* ($p<0.01$). Subgingival levels of *P. endodontalis* were positively correlated with IL-2 ($p<0.05$). Periodontal inflammation (PISA) was positively correlated with IL-2 ($p<0.05$). The co-existence of common periodontal pathogens in the oral cavity and in atheromatous plaque is associated

with a systemic inflammatory state that could be relevant to understanding the mechanisms linking periodontitis to CVD.

Keywords: Atherosclerotic disease. Periodontal disease. Periodontal medicine. Systemic inflammation. Periodontal pathogens.

LISTA DE FIGURAS

Figura 4.1 – Fluxograma do processo de inclusão	27
Figura 5.1 – Valores de PISA de cada participante	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 - Estudos que investigaram a presença de patógenos periodontais em placas de ateroma	20
Tabela 4.1 - Sequência de nucleotídeos dos primers de cada espécie bacteriana utilizadas no qPCR	32
Tabela 5.1 - Características demográficas de todos os participantes	35
Tabela 5.2 - Número e porcentagens de amostras positivas para cada uma das citocinas avaliadas e concentrações médias de citocinas observadas nas amostras.....	36
Tabela 5.3 -Teste de Mann-Whitney para comparar níveis médios (ng/ μ L) de citocinas entre pacientes dentados e edêntulos	37
Tabela 5.4 – Frequência e concentrações mínima e máxima de bactérias encontradas nas amostras	38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DCV	Doenças cardiovasculares
hs-CRP	Proteína C-reativa de alta sensibilidade
IL	Interleucina
DP	Doença periodontal crônica
NHAHES	<i>National Health and Nutritional Survey</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
PCR	Reação em cadeia de polimerase
USP	Universidade de São Paulo
rpm	Rotações por minuto
PCS	Profundidade clínica de sondagem
NCI	Nível clínico de inserção
PISA	Área de superfície periodontal inflamada
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
FO	Faculdade de Odontologia
qPCR	PCR quantitativo
Th17	<i>T helper 17</i>
IFN	<i>Interferon</i>
TNF	Fator de necrose tumoral
GM-CSF	Fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos
M-CSF	Fator estimulante de colônia de macrófagos
G-CSF	Fator estimulante de colônias de granulócitos
MIP	Proteína inflamatória de macrófagos
MCP	Proteína quimiotática de monócitos
HbA1c	Hemoglobina glicada
dp	desvio padrão
r	Coeficiente de correlação de <i>Spearman</i>
p	Valor de p
VCAM-1	<i>Vascular cell adhesion molecule 1</i>
MMP	Metaloproteinase
rDNA	DNA ribossômico

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
mL	Mililitros
°C	Graus Celsius
mm	Milímetros
μL	Microlitros
®	Marca registrada
ng	Nanogramas
≥	Maior ou igual

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DA LITERATURA	18
3 PROPOSIÇÃO	25
4 MATERIAL E MÉTODOS	26
5 RESULTADOS.....	34
6 DISCUSSÃO	41
7 CONCLUSÕES	46
REFERÊNCIAS.....	47
ANEXOS	57

1 INTRODUÇÃO

Doenças cardiovasculares (DCV) são as principais responsáveis pela mortalidade no mundo, representando um dos maiores desafios da medicina atual (Mendis et al., 2011). A maioria das DCV é de origem aterosclerótica, caracterizada por uma lesão fibro-lipídica crônica que ocorre nas paredes internas de vasos de largo e médio calibre (Lockhart et al., 2012). Os principais fatores de risco para o processo aterosclerótico são fatores comportamentais (como o fumo e a dieta inadequada) e metabólicos (como hipertensão, diabetes e hipercolesterolemia) (Mendis et al., 2011), porém não são suficientes para explicar a etiopatogenia deste processo multifatorial (Chun et al., 2005).

A etiopatogenia da doença aterosclerótica não está apenas relacionada ao acúmulo de colesterol nas paredes de vasos mas, principalmente, é guiada pela inflamação, que influencia o início, a progressão e as complicações finais da doença, como o infarto agudo do miocárdio (Libby et al., 2010). Como diversos marcadores pró-inflamatórios estão relacionados à aterogênese (Libby, 2002), o perfil inflamatório do paciente poderia se tornar um guia à prevenção cardiovascular até mesmo para pacientes aparentemente saudáveis (Libby et al., 2010), porém ainda não se sabe como estes dados podem ser utilizados na prática clínica (Pearson et al., 2003). Novos fatores de risco para DCV têm sido investigados, entre estes, a Doença Periodontal Crônica (DP) tem recebido bastante atenção por ser uma doença crônica inflamatória associada ao aumento de marcadores inflamatórios em nível sistêmico (Pearson et al., 2003; Hasturk et al., 2012; Van Dyke e van Winkelhoff, 2013).

Evidências recentes sugerem que um dentre cada dois americanos com mais de 30 anos é portador de periodontite, representando uma prevalência de 64,7 milhões de pessoas apenas nos Estados Unidos (Thornton-Evans et al., 2013). No Brasil, não existem dados que possam fornecer a prevalência da doença periodontal de toda a população, porém estudos em populações brasileiras isoladas confirmam a alta prevalência de periodontite e perda de dentes entre adultos com mais de 30 anos (Susin et al., 2005; Corraini et al., 2008; Corraini et al., 2009; Gaio et al., 2012).

A Doença Periodontal está associada a um moderado, porém consistente aumento do risco de DCV, independentemente de fatores de risco tradicionais (Friedewald et al., 2009). Esta associação pode ser explicada por (i) um mecanismo direto, no qual patógenos presentes no biofilme oral são disseminados para a corrente sanguínea (Horliana et al., 2014), (ii) pela condição inflamatória sistêmica associada à periodontite (Van Dyke e Van Winkelhoff, 2013) ou (iii) pela combinação destes dois mecanismos (Pizzo et al., 2010). A detecção de patógenos periodontais em placas de ateroma já foi reportada diversas vezes (Haraszthy et al., 2000; Ford et al., 2005; Kozarov et al., 2006; Gaetti-Jardim et al., 2009; Marcelino et al., 2010; Figuero et al., 2014) mas nunca associada ao estado inflamatório sistêmico de pacientes com DCV. Este estudo tem como hipótese que a condição periodontal pode contribuir com a inflamação sistêmica e influenciar lesões ateroscleróticas de pacientes diagnosticados com estenose de carótida.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A relação entre a condição bucal e as condições sistêmicas é descrita na história da humanidade há muito tempo: relatos médicos dos séculos VI e IV AC já sugeriam que a saúde sistêmica poderia ser beneficiada através da extração de dentes (Vieira; Caramelli, 2009). A abordagem da doença periodontal como a principal condição bucal relacionada às condições sistêmicas ganhou maior atenção apenas quando Mattila et al. (1989) demonstraram uma relação entre a saúde bucal inadequada e infarto agudo do miocárdio. Consequentemente, estudos epidemiológicos surgiram relacionando doenças periodontais com DCV (DeStefano et al., 1993; Beck et al., 1998) e ganharam credibilidade pelo avanço de técnicas moleculares que permitiam melhores análises microbiológicas e imunológicas.

Patógenos relacionados às DP já foram associados a eventos cardiovasculares (Epstein et al., 2000; D'Aiuto et al., 2004) e estudos demonstraram um efeito significativo da antibioticoterapia para a diminuição de complicações cardiovasculares (Stone et al., 2002; Wiesli et al., 2002).

Em 2000, Haraszthy e colaboradores demonstraram pela primeira vez a presença de patógenos periodontais em placas de ateroma. Através de evidências epidemiológicas de que periodontite estava relacionada a doenças coronarianas (Matilla et al., 1989; DeStefano et al., 1993; Beck et al., 1998), os autores levantaram a hipótese de que a infecção crônica oral poderia estar envolvida no desenvolvimento do processo aterosclerótico. Ao avaliarem 50 amostras de placas de ateroma carotídeas, através do método de reação em cadeia de polimerase (PCR) convencional, os autores demonstraram a presença de *T. forsythia*, *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans* e *P. intermedia* (em 33%, 28%, 18% e 14% das amostras, respectivamente).

Nos anos subsequentes, diversos estudos (Tabela 2.1) procuraram confirmar estes resultados, utilizando-se de diferentes técnicas moleculares. A maioria destes estudos utilizou a técnica de PCR convencional (Okuda et al., 2001; Taylor-Robinson et al., 2002; Cairo et al., 2004; Cavrini et al., 2005; Padilla et al., 2006; Nakano et al., 2007; Pucar et al., 2007; Nakano et al., 2008; Zhang et al., 2008; Mahendra et al., 2009; Marcelino et al., 2010; Rafaelli et al.,

2010; Aquino et al., 2011; Figuero et al., 2011; Toyofuku et al., 2011; Ohki et al., 2012), apesar desta técnica ter a limitação de apenas detectar a presença de uma determinada sequência de DNA (Siqueira; Roças, 2005), excluindo a possibilidade de resultados quantitativos.

Os resultados dos estudos logo demonstraram a heterogeneidade de patógenos orais encontrados em placas de ateroma. Em 2001, Okuda et al. procuraram detectar a presença de patógenos periodontais em placas de ateroma da artéria aorta e também em aortas que não apresentavam lesões ateroscleróticas. Surpreenderam-se por detectarem apenas *T. denticola* em 23,1% das amostras com lesão, e por não encontrarem *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *T. forsythia* ou *C. rectus* em nenhuma destas mesmas amostras. As amostras que não possuíam lesão aterosclerótica, porém, não apresentaram nenhuma das bactérias avaliadas.

Além disso, alguns estudos não foram capazes de detectar nenhum patógeno periodontal em placas de ateroma (Aimetí et al., 2007; Rafaelli et al., 2010; Aquino et al., 2011).

Os poucos trabalhos que utilizaram a técnica de PCR quantitativo (Ford et al., 2005; Kozarov et al., 2006; Gaetti-Jardim et al., 2009; Figuero et al., 2014), que tem a vantagem de ser mais sensível e específica do que o PCR convencional (Valasek; Repa, 2005), também não encontraram resultados semelhantes.

Ford et al. (2005), Gaetti-Jardim et al. (2009) e Figuero et al. (2014) utilizaram metodologias similares de PCR quantitativo (através da sonda TaqMan) e encontraram, como microrganismos mais prevalentes, *P. gingivalis*, *P. intermedia* e *A. actinomycetemcomitans* respectivamente.

Mesmo que os achados microbiológicos em placas de ateroma ainda não expliquem o papel da doença periodontal na doença aterosclerótica, é possível que estes microrganismos disseminados pela corrente sanguínea estejam relacionados a um aumento da inflamação sistêmica de baixa intensidade (D'Aiuto et al., 2004). De fato, pacientes com DP apresentam maiores níveis séricos de importantes marcadores relacionados às DCV.

Tabela 2.1- Estudos que investigaram a presença de patógenos periodontais em placas de ateroma.

Estudo	País	Número de participantes	Amostras avaliadas	Microrganismos avaliados	Técnica microbiológica	Resultados em placas de ateroma
Figuro et al. (2014)	Espanha	70	Biofilme subgingival (36), estenose carotídea (35), artérias periféricas (26), aneurismas (9)	<i>P.g.</i> , <i>A.a.</i> , <i>T.f.</i> , <i>C. rectus</i>	PCR quantitativo	<i>A.a.</i> : 3%; <i>T.f.</i> : 3%; <i>C. rectus</i> : 1,6%; <i>P.g.</i> : 0%
Mahendra et al. (2013)	India	51	Biofilme subgingival, Estenose coronariana	<i>A.a.</i> , <i>T.f.</i> , <i>P.g.</i> , <i>P.g.(fimA)</i> , <i>T.d.</i>	PCR convencional	<i>T.d.</i> : 51%; <i>P.g.</i> : 45,1%; <i>P.g.(fimA)</i> : 39,2%; <i>T.f.</i> : 31,4%; <i>A.a.</i> : 0%
Ohki et al. (2012)	Japão	81	Amostras de sangue com trombos coronarianos	<i>A.a.</i> , <i>P.g.</i> , <i>P.i.</i> , <i>T.f.</i> , <i>T.d.</i>	PCR convencional	<i>A.a.</i> : 21%; <i>P.g.</i> : 3,7%; <i>T.d.</i> : 2,5%; <i>P.i.</i> : 0%; <i>T.f.</i> : 0%
Toyofuku et al. (2011)	Japão	74	estenoses carotídeas (5), estenoses femurais (2), estenoses ilíacas (3), lesões anastomóticas (43), controles (21)	<i>A.a.</i> , <i>P.g.</i> , <i>P.i.</i> , <i>T.f.</i> , <i>T.d.</i>	PCR convencional	<i>P.g.</i> : 51%; <i>T.d.</i> : 43%; <i>P.i.</i> : 15%; <i>T.f.</i> : 0%; <i>A.a.</i> : 0%
Figuro et al. (2011)	Espanha	42	Estenose carotídea	<i>A.a.</i> , <i>P.g.</i> , <i>T.f.</i> , <i>E. corrodens</i> , <i>F. nucleatum</i> , <i>C. rectus</i>	PCR convencional	<i>P.g.</i> : 78,57%; <i>T.f.</i> : 61,9%; <i>E.c.</i> : 54,76%; <i>F.n.</i> : 50%; <i>C.r.</i> : 9,52%; <i>A.a.</i> : 6,67%
Aquino et al. (2011)	Brasil	30	estenoses carotídeas (8), estenoses femurais (17), estenoses coronarianas (5)	<i>A.a.</i> , <i>P.g.</i> , <i>T.d.</i> , <i>Synergistetes sp.</i>	PCR convencional	0%
Marcelino et al. (2010)	Brasil	30	Biofilme subgingival Estenose coronariana	<i>A.a.</i> , <i>P.g.</i> , <i>P.i.</i> , <i>T.f.</i> , <i>T.d.</i> , <i>C. rectus</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>F. nucleatum</i> , <i>P. endodontalis</i> , <i>P. nigrescens</i>	PCR convencional	<i>P.g.</i> : 50%; <i>P.i.</i> : 16,6%; <i>P. nigrescens</i> : 16,6%; <i>E. faecalis</i> : 16,6%; <i>A.a.</i> : 6,6%; <i>T.f.</i> : 6,6%; <i>C. rectus</i> : 6,6%; <i>T.d.</i> : 3,3%; <i>P. endodontalis</i> : 3,3%; <i>F. nucleatum</i> : 0%
Mahendra et al. (2010)	India	51	Biofilme subgingival Estenose coronariana	<i>P.g.</i> , <i>T.d.</i> , <i>C. rectus</i>	PCR convencional	<i>T.d.</i> : 49,01%; <i>P.g.</i> : 45,1%; <i>C. rectus</i> : 21,51%

P.g.= *Porphyromonas gingivalis*; *A.a.*= *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*; *T.f.*= *Tannerella forsythia*; *C.r.*= *Campylobacter rectus*; *P.i.*= *Prevotella intermedia*; *T.d.*= *Treponema denticola*; *E. corrodens*= *Eikenella corrodens*; *F. nucleatum*= *Fusobacterium nucleatum*; *E. faecalis*= *Enterococcus faecalis*; *P. endodontalis*= *Porphyromonas endodontalis*; *P. nigrescens*= *Prevotella nigrescens*; *C. pneumoniae*= *Chlamydia pneumoniae*; *S. aureus*= *Staphylococcus aureus*; *S. epidermis*= *Staphylococcus epidermis*; *S. mutans*= *Streptococcus mutans*; *H. pylori*= *Helicobacter pylori*; *H. influenzae*= *Haemophilus influenzae*; *sp.*= species

Tabela 2.1- (continua)

Estudo	País	Número de participantes	Amostras avaliadas	Microrganismos avaliados	Técnica microbiológica	Resultados em placas de ateroma
Rafaelli et al. (2010)	Itália	19	Estenoses de válvulas aórticas	<i>A.a.</i> , <i>P.g.</i> , <i>P.i.</i> , <i>T.f.</i> , <i>T.d.</i> , <i>E. corrodens</i> , <i>F. nucleatum</i> , <i>C. rectus</i>	PCR convencional	0%
Gaetti-Jardim et al. (2009)	Brasil	44	Estenose coronariana	<i>A.a.</i> , <i>P.g.</i> , <i>P.i.</i> , <i>T.f.</i> , <i>F. nucleatum</i> , <i>P. nigrescens</i>	PCR quantitativo	ateromas em pacientes com periodontite (n=39): <i>P.i.</i> : 59 %; <i>P.g.</i> : 53,8 %; <i>A.a.</i> : 46,2 %; <i>T.f.</i> : 25,6 %; <i>P. nigrescens</i> : 17,9%. Ateromas em pacientes sem periodontite (n=5), <i>P.g.</i> : 20%
Mahendra et al. (2009)	Índia	51	Biofilme subgengival Estenose coronariana	<i>P.g.</i> , <i>T.d.</i> , <i>C.rectus</i> , <i>E. Corrodens</i>	PCR convencional	<i>T.d.</i> : 49,01%; <i>P.g.</i> : 45,1%; <i>E.corrodens</i> : 27,45 %; <i>C.rectus</i> : 21,51%
Zhang et al. (2008)	China	51	Biofilme subgengival Estenose coronariana	<i>A.a.</i> , <i>P.g.</i> , <i>P.i.</i> , <i>T.f.</i> , <i>F. nucleatum</i>	PCR convencional	<i>P.g.</i> : 33%; <i>T.f.</i> : 31%; <i>P.i.</i> : 18%; <i>F. nucleatum</i> : 12%; <i>A.a.</i> : 0%
Nakano et al. (2008)	Japão	192	válvulas cardíacas (112), estenoses de aneurismas(80), biofilme subgengival (56)	<i>P. gingivalis fim A</i>	PCR convencional	<i>P.g.</i> :10.4%
Aimeti et al. (2007)	Itália	33	Biofilme subgengival Estenose carotídea	<i>A.a.</i> , <i>P.g.</i> , <i>P.i.</i> , <i>T.f.</i> , <i>T.d.</i>	PCR convencional	Bactérias-alvo: 0%. DNA bacteriano: 94%
Romano et al. (2007)	Itália	21	Biofilme subgengival Estenose carotídea	<i>A.a.</i> , <i>P.g.</i> , <i>P.i.</i> , <i>T.f.</i> , <i>T.d.</i>	Hibridização reversa e PCR convencional	0%
Pucar et al. (2007)	Sérvia	15	Estenose coronariana (15), estenose de mamária interna (15)	<i>A.a.</i> , <i>P.g.</i> , <i>P.i.</i> , <i>T.f.</i> , <i>C. pneumoniae</i> , <i>Human Cytomegalovirus (CMV)</i>	PCR convencional	Artéria coronária: CMV: 66,67%; <i>P.g.</i> :53,33%; <i>A. a.</i> : 26,67%; <i>P. i.</i> : 33,33%; <i>T. f.</i> :13,33%; <i>C. pneumoniae</i> : 33,33%. Mamária interna: CMV: 46,67%; <i>C. pneumoniae</i> : 40%; <i>P.g.</i> , <i>A.a.</i> , <i>P.i.</i> , <i>T.f.</i> : 0%;

Tabela 2.1- (continua)

Estudo	País	Número de participantes	Amostras avaliadas	Microrganismos avaliados	Técnica microbiológica	Resultados em placas de ateroma
Zaremba et al. (2007)	Polônia	20	Biofilme subgengival	<i>A.a.</i> , <i>P.g.</i> , <i>P.i.</i> , <i>T.f.</i> , <i>T.d.</i> , <i>E. corrodens</i> , <i>F. nucleatum</i> , <i>C. rectus</i>	Hibridização DNA-DNA	P.g.: 50%; T.d.: 30%; T.f.: 25%; F.n.:25%; Cr:20%; .P.i.: 15%; E.c.: 15%; A.a.: 5%
Nakano et al. (2007)	Japão	160	Válvulas cardíacas (60), estenoses de aneurismas (46), biofilme subgengival (56)	<i>A.a.</i>	PCR convencional	A.a.: 31,1%
Padilla et al. (2006)	Chile	12	Estenose carotídea, estenoses de membros inferiores, biofilme subgengival	<i>A.a.</i> , <i>P.g.</i> , <i>T.f.</i> , <i>P.i.</i>	PCR convencional e cultura	A.a.: 16,6%; P.g., T.f., P.i.: 0%
Kozarov et al. (2006)	EUA	29	Estenoses de lesões aórticas	<i>A.a.</i> , <i>P.g.</i> , <i>P.i.</i> , <i>T.f.</i> , <i>T.d.</i> , <i>E. corrodens</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermis</i> , <i>S. mutans</i> , <i>C. pneumoniae</i>	PCR quantitativo	<u>Pacientes jovens</u> (n=20): C.p.:44%; A.a.: 40%; S.m.: 22,5%; T.d.:19,1%; P.g.: 18,3%; E.c.: 17,5%; T.f.:15%; P.i.: 15%; S.e.:10,8%; S.a.: 5%. <u>Pacientes idosos</u> (n=9): P.g.: 88,8%; P.i.:77,7%; A.a.:55,5%; S.a.:55,5%; S.m.:44,4%; C.p.:37,5%; S.e.:33,3%; T.d.:33,3%; E.c.:22,2%; T.f.:22,2% P.g.: 100%. F. nucleatum: 84%, T.f.: 48%; C. pneumoniae: 28%; H. pylori: 4%, H. influenzae: 4%
Ford et al. (2005)	Australia	25	Estenose carotídea	<i>P.g.</i> , <i>T.f.</i> , <i>F. nucleatum</i> , <i>H. pylori</i> , <i>C. pneumoniae</i> , <i>H. influenzae</i>	PCR convencional e PCR em tempo real	P.g.: 100%. F. nucleatum: 84%, T.f.: 48%; C. pneumoniae: 28%; H. pylori: 4%, H. influenzae: 4%
Fiehn et al. (2005)	Dinamarca	79	Estenoses carotídea ou femural	<i>A.a.</i> , <i>P.g.</i> , <i>P.i.</i> , <i>T.f.</i> , <i>P. nigrescens</i> , <i>C. rectus</i> , <i>Streptococcus sp.</i>	PCR convencional (24 amostras) e cultura (79 amostras)	Cultura: 0%. PCR convencional: P.i.:100%; P. nigrescens: 8,3%; P.g.: 4,16%, A.a., T. f., C. rectus, Streptococcus sp.: 0%
Cavrini et al. (2005)	Itália	2	Biofilme subgengival, estenose carotídea, estenose de aneurismas	<i>P. gingivalis</i> , <i>T. denticola</i>	PCR convencional e FISH	Paciente 1: <i>T. denticola</i> detectado por PCR convencional e FISH. Paciente 2: <i>P. gingivalis</i> detectado por PCR convencional e FISH

Tabela 1. (conclusão)

Estudo	País	Número de participantes	Amostras avaliadas	Microrganismos avaliados	Técnica microbiológica	Resultados em placas de ateroma
Cairo et al. (2004)	Itália	40	Biofilme subgengival Estenose carotídea	<i>A.a.</i> , <i>P. g.</i> , <i>P. i.</i> , <i>T. f.</i> , <i>T. d.</i>	PCR convencional	0%
Taylor-Robinson et al. (2002)	Reino Unido	38	Artérias de largo calibre com aterosclerose (aorta, ilíaca, pulmonar, coronária, femoral...)	<i>Chlamydia Pneumoniae</i> , <i>A. a.</i> , <i>T. forsythia</i> , <i>F. nucleatum</i> , <i>P.gingivalis</i> , <i>P. intermedia</i> , <i>Streptococcus oralis/mitis</i> , <i>Treponema denticola</i> , <i>E. coli</i> and <i>T. fragilis</i>	PCR convencional	<i>C. pneumoniae</i> : 35,4%; <i>A.a.</i> : 31,2%; <i>P.i.</i> : 21,8%; <i>T. f.</i> , <i>F. nucleatum</i> , <i>P. g.</i> , <i>S. oralis/mitis</i> , <i>T. d.</i> , <i>E.coli</i> , <i>T. fragilis</i> : 0%
Okuda et al. (2001)	Japão	40	Estenoses de aorta (26), artérias aortas sem estenose (14)	<i>A.a.</i> , <i>P. g.</i> , <i>T. f.</i> , <i>T. d.</i> , <i>C. rectus</i>	PCR convencional	<i>T.d.</i> : 23,1%; <i>A.a.</i> , <i>P.g.</i> , <i>T. f.</i> , <i>C. rectus</i> : 0%
Haraszthy et al. (2000)	EUA	50	Estenose carotídea	<i>A.a.</i> , <i>P. g.</i> , <i>P.i.</i> , <i>T. f.</i> , <i>C. pneumoniae</i> , Human Cytomegalovirus (CMV)	PCR convencional	CMV: 38%; <i>T.f.</i> : 30%; <i>P.g.</i> : 26%; <i>C. pneumoniae</i> : 18%; <i>A.a.</i> : 18%; <i>P.i.</i> : 14%

Cutler et al. (1999), ao avaliarem 26 pacientes com periodontite e 25 pacientes saudáveis, observaram que a presença de DP estava associada a altos níveis séricos de triglicérides e colesterol, apesar da associação não estabelecer uma relação causal entre DP e hipercolesteremia. Nakarai et al. (2011), ao avaliarem radiografias panorâmicas de 162 pacientes, observaram uma associação entre perda óssea e triglicérides.

Loos et al. (2000) demonstraram que pacientes com periodontite apresentavam maiores níveis séricos de proteína C-reativa (CRP), interleucina (IL)-6 e neutrófilos, quando comparados a pacientes sem DP. Os autores sugeriram que, quando não diagnosticada, a DP pode ser um processo infeccioso responsável pelo aumento de fatores inflamatórios que influenciam lesões ateroscleróticas e, consequentemente, complicações cardiovasculares.

O tratamento periodontal também parece contribuir para uma diminuição de marcadores inflamatórios sistêmicos. Quando bem sucedido, o tratamento periodontal está associado à diminuição nos níveis de CRP (Iwamoto et al., 2003; D'Aiuto et al., 2004; Tuter et al., 2007), moléculas de adesão associadas à aterogênese (Pischon et al., 2007) e fator de necrose tumoral (TNF)- α (Iwamoto et al., 2003).

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo primário deste estudo foi estudar marcadores inflamatórios sistêmicos de pacientes que seriam submetidos à endarterectomia carotídea. Os objetivos secundários foram associar o perfil inflamatório dos participantes à condição periodontal e à presença de patógenos orais encontrados na cavidade oral e em placas de ateroma.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Inclusão de participantes

Este foi um estudo transversal, previamente aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (USP) (Anexos A e B). Entre Janeiro de 2010 e Dezembro de 2012, os pacientes que estavam internados no Departamento de Cirurgia Vascular do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP e que tinham recebido o diagnóstico de estenose carotídea, foram convidados a participar deste estudo. Durante o período mencionado, 110 pacientes foram abordados, mas apenas aqueles que seriam submetidos à endarterectomia e que se adequavam aos critérios de inclusão da pesquisa foram convidados a participar do estudo.

Os critérios de inclusão foram:

- Pacientes que não foram submetidos à terapia periodontal 3 meses antes do estudo;
- Pacientes que não tomaram antibióticos 6 meses antes do estudo.

Pacientes que receberam tratamento clínico (9) ou que seriam submetidos à angioplastia de carótida (61) - técnica na qual não há remoção de placa de ateroma - não foram considerados para este estudo. No total, 40 pacientes foram convidados a participar desta pesquisa, porém dois declinaram o convite. Trinta e oito pacientes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo C), porém as amostras de placa de ateroma de três pacientes não foram coletadas durante a cirurgia, resultando a inclusão final de 35 pacientes neste estudo. A figura 1 mostra o fluxograma de inclusão de pacientes do estudo.

Figura 4.1- Fluxograma do processo de inclusão

Coleta de dados e amostras

Coleta de sangue

Um dia antes da cirurgia, nos leitos da enfermaria do serviço de Cirurgia Vascular do Hospital das Clínicas, uma amostra de sangue dos participantes foi coletada em tubos do tipo Vacutainer® contendo anticoagulante (BD Diagnostics, Franklin Lakes NJ, EUA) e centrifugados a 3000rpm por 10 minutos, para a obtenção do soro. Todas as coletas de sangue foram realizadas pela manhã, em jejum, antes de qualquer procedimento. As amostras de sangue foram encaminhadas para a Faculdade de Odontologia (USP) e alíquotas de 1,5mL de soro foram então armazenadas a -80°C. Amostras de três pacientes não puderam ser coletadas na ocasião, resultando 32 pacientes para a análise de perfil imunológico.

Exame clínico

Logo após a coleta de sangue, os pacientes foram submetidos a um questionário socioeconômico e anamnese (Anexo D), a fim de se obter informações demográficas dos participantes. Quando necessário, os prontuários médicos foram avaliados para complementar as informações do questionário, desconhecidas pelos pacientes.

Um exame clínico periodontal completo também foi realizado por uma das duas pesquisadoras previamente calibradas (Adriana Moura Foz e Hilana Paula Carillo Artese), no próprio leito do paciente, com o auxílio de uma lanterna de cabeça para assegurar que o exame fosse conduzido corretamente. O exame periodontal foi realizado em seis sítios por dente, em todos os dentes presentes, com exceção dos terceiros molares. Cinco parâmetros periodontais foram aferidos por sítio: índice de placa (IP), índice gengival (IG), profundidade clínica de sondagem (PCS), nível clínico de inserção (NCI) e sangramento à sondagem (SS). A calibração das pesquisadoras foi realizada através do cálculo de Coeficiente de Correlação Intraclassas no *software* SPSS, versão 19. As reprodutibilidades intra e intercalasses das examinadoras foram consideradas satisfatórias, considerando uma variação de 1mm; foi alcançado um acordo de 76% para PCS e de 90% para NCI. Novas calibrações foram realizadas a cada 6 meses de estudo.

O diagnóstico periodontal, utilizado para descrever as características da população, foi baseado em Lopez et al. (2002): DP foi diagnosticada pela presença de 4 ou mais dentes com um ou mais sítios com PCS ≥ 4 mm e com NCI ≥ 3 mm no mesmo sítio.

A condição inflamatória periodontal de cada paciente foi determinada pelo cálculo da área de superfície periodontal inflamada, designada como PISA, que remete à área de superfície do epitélio da bolsa periodontal com sangramento, em milímetros quadrados (Nesse et al., 2008). Os valores de PISA foram utilizados para a correlação estatística com os níveis de marcadores inflamatórios sistêmicos obtidos neste estudo.

Coleta de biofilme subgengival e saliva

No mesmo dia do exame clínico periodontal, foram coletadas amostras de saliva não estimulada (1,5mL) de todos os participantes e, em pacientes dentados, amostras de biofilme subgengival da bolsa ou sulco periodontal mais profundo. Para

a coleta de biofilme subgengival, roletes de algodão isolaram a região e biofilme supragengival foi removido com o auxílio de curetas e bolinhas de algodão (Marcelino et al., 2010). Um cone de papel estéril nº 35 foi inserido por 30 segundos na bolsa periodontal e armazenado em um eppendorf estéril. Para as amostras de saliva, pacientes cuspiram em um coletor universal estéril até a saliva alcançar 1,5mL, e depois a amostra foi armazenada em tubos eppendorf estéreis. Para prevenir a degradação de proteínas, as amostras de biofilme subgengival e saliva foram imediatamente transportadas, em gelo seco, para o Laboratório de Patologia Molecular da Faculdade de Odontologia (FO) da USP. Neste mesmo dia, as amostras foram submetidas à extração de DNA e armazenadas no laboratório a -20°C, até a análise microbiológica.

Coleta de placas de ateroma

Durante a cirurgia de endarterectomia dos participantes, uma amostra de placa de ateroma foi coletada e armazenada em tubos estéreis de 15mL contendo 5mL de RNAlater® (Ambion, Applied Biosystem, Foster CT, EUA). As amostras foram encaminhadas para o Laboratório de Patologia Molecular (FO-USP), submetidas à extração de DNA e armazenadas a -20°C, até a análise microbiológica.

Análises microbiológicas

Extração de DNA

As amostras de saliva e placa subgengival passaram pelo processo de extração de DNA com o Kit ChargeSwitch® Forensic DNA Purification Kit (Invitrogen, Carlsbad CA, EUA), segundo as instruções do fabricante. As amostras de placa de ateroma também passaram pelo processo de extração de DNA realizado com o Kit CST GDNA Mini Tissue Kit (Invitrogen, Carlsbad, EUA), segundo as instruções do fabricante. O material extraído foi armazenado a -20°C. A extração de DNA e o armazenamento do material extraído foram realizados no Laboratório de Patologia Molecular, da FO-USP, pela mesma pesquisadora (Adriana Moura Foz).

Análise de PCR quantitativo (qPCR)

Análises microbiológicas de todos os materiais de DNA extraído foram realizadas por duas pesquisadoras (Adriana Moura Foz e Viviane Arenas) no

Laboratório de Anaeróbios do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP. As amostras de DNA foram submetidas à técnica de qPCR com o sistema SYBR Green, para a detecção dos seguintes microrganismos: *A. actinomycetencomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythia*, *T. denticola*, *P. nigrescens*, *F. nucleatum*, *D. pneumosintes*, *E. faecalis* e *P. endodontalis*.

As amostras de DNA foram analisadas em duplicata e foram amplificadas utilizando-se *primers* específicos baseados na sequência do gene 16S rRNA, sintetizados pela Invitrogen (Invitrogen do Brasil, LTDA, São Paulo, SP, Brasil). As amplificações foram realizadas em volumes finais de 20µL contendo 2µL de amostra e 18µL do mix de: SYBR Green dye GoTaq® qPCR Master Mix (Promega, Wisconsin, EUA), H₂O e *primers forward* e *reverse*. A proporção da mistura era, para uma amostra: 10µL de SYBR Green dye GoTaq® qPCR Master Mix (Promega, Wisconsin, EUA), 7,1µL de H₂O e 0,45µL de cada primer. A reação de amplificação foi realizada pelo termociclador Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Qiagen, Hilden, Alemanha) programado para as condições ideais de PCR para cada microrganismo. Cada reação de amplificação foi realizada com os seguintes parâmetros de ciclo:

- Para *A. actinomycetencomitans*: denaturação inicial a 95°C por 2 minutos, 40 ciclos de PCR a 95°C por 45 segundos, 60°C por 120 segundos. A temperatura de anelamento foi de 60 °C.
- Para *P. gingivalis*: denaturação inicial a 95°C por 2 minutos, 40 ciclos de PCR a 95°C por 45 segundos, 60°C por 60 segundos. A temperatura de anelamento foi de 60 °C.
- Para *P. intermedia*: denaturação inicial a 95°C por 2 minutos, 40 ciclos de PCR a 95°C por 45 segundos, 60°C por 60 segundos. A temperatura de anelamento foi de 55 °C.
- Para *T. forsythia*: denaturação inicial a 95°C por 10 minutos, 45 ciclos de PCR a 95°C por 15 segundos, 57°C por 60 segundos. A temperatura de anelamento foi de 59 °C.
- Para *T. denticola*: denaturação inicial a 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de PCR a 95°C por 15 segundos, 57°C por 60 segundos. A temperatura de anelamento foi de 60 °C.
- Para *P. nigrescens*: denaturação inicial a 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de PCR a 95°C por 15 segundos, 57°C por 60 segundos. A temperatura de anelamento foi de 56 °C.

- Para *F. nucleatum*: denaturação inicial a 95°C por 2 minutos, 40 ciclos de PCR a 95°C por 45 segundos, 60°C por 60 segundos. A temperatura de anelamento foi de 56 °C.

- Para *D. pneumosintes*: denaturação inicial a 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de PCR a 95°C por 15 segundos, 55°C por 60 segundos. A temperatura de anelamento foi de 55 °C.

- Para *E. faecalis* e *P. endodontalis*: denaturação inicial a 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de PCR a 95°C por 15 segundos, 60°C por 60 segundos. A temperatura de anelamento foi de 60 °C.

Os resultados foram analisados no *software* analítico da Rotor-Gene 6000, versão 1.7.87 (Corbett Research, Qiagen, Hilden, Alemanha). A intensidade de fluorescência foi monitorada na temperatura de anelamento e pela análise de curva de dissociação. A análise das curvas de *melting*, tanto dos primers *forward* como dos primers *reverse*, revelou um pico único. A curva padrão foi avaliada para cada bactéria, usando-se seus respectivos primers sob uma série de 10 diluições para cada microrganismo. As concentrações de DNA (ng/μL) foram calculadas baseadas nas curvas padrões. A Tabela 4.1 mostra a sequência de nucleotídeos dos primers usados no qPCR. Os primers foram sintetizados pela Life Technologies (Carlsbad, California, EUA).

Tabela 4.1- Sequência de nucleotídeos dos primers de cada espécie bacteriana utilizadas no qPCR

Primers Bacterianos	Sequência	Referência
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>		Kuboniwa et al. (2004)
Forward	5'-CCCATCGCTGGTTGGTTA-3'	
Reverse	5'-GGCACGTAGGCGGACC-3'	
<i>Porphyromonas gingivalis</i>		Lombardo Bedran et al. (2011)
Forward	5'-ACCTTACCCGGGATTGAAATG-3'	
Reverse	5'-CAACCATGCAGCACCTACATAGAA-3'	
<i>Prevotella intermedia</i>		Okamoto et al. (1999)
Forward	5'-CGTGGACCAAAGATTCATCGGTGGA-3'	
Reverse	5'-CCGCTTTACTCCCCAACAAA-3'	
<i>Tanarella forsythia</i>		Kuboniwa et al. (2004)
Forward	5'-AGCGATGGTAGCAATACCTGTC-3'	
Reverse	5'-TTCGCCGGGTATCCCTC-3'	
<i>Treponema denticola</i>		Kuboniwa et al. (2004)
Forward	5'-CCGAATGTGCTCATTTACATAAAGGT-3'	
Reverse	5'-GATACCCATCGTTGCCCTTGGT-3'	
<i>Prevotella nigrescens</i>		Kuboniwa et al., 2004
Forward	5'-CCGTTGAAAGACGGCCTAA-3'	
Reverse	5'-CCCATCCCTTACCGGTA-3'	
<i>Fusobacterium nucleatum</i>		Perisamy e Kolenbrander (2009)
Forward	5'-CTTAGGAATGAGACAGAGATG-3'	
Reverse	5'-TGATGGTAACATACGAAAGG-3'	
<i>Dialister pneumosintes</i>		Nonnenmacher et al. (2005)
Forward	5'-GAGGGGTTTGC GACTGATTA-3'	
Reverse	5'-CCGTCAGACTTTCGTCCATT-3'	
<i>Porphyromonas endodontalis</i>		Lombardo Bedran et al. (2011)
Forward	5'-GCTGCAGCTCAACTGTAGTCTTG-3'	
Reverse	5'-TCAGTGTCAGACGGAGCCTAGTAC-3'	
<i>Enterococcus faecalis</i>		Williams et al. (2006)
Forward	5'-CGCTTCTTTCTCCCGAGT-3'	
Reverse	5'-GCCATGCGGCATAAACTG-3'	

Análises imunológicas

Para a caracterização dos parâmetros inflamatórios dos pacientes, as 32 amostras de soro coletadas foram mantidas a -80°C até serem submetidas ao exame laboratorial imunoenzimático de Multiplex. Foi utilizado o kit Bio-Plex Pro Human Th17 Cytokine Assay (Kit #171-AA001M, Bio-Rad®, Hercules, CA, EUA)

para a determinação dos seguintes marcadores inflamatórios: IL-1 β , IL-8, IL-7, IL-6, IL-5, IL-4, IL-2, IL-17, IL-13, IL-12p70, IL-10, Fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), Fator estimulante de colônias de granulócitos (G-CSF), Interferon (IFN)- γ , Proteína inflamatória de macrófagos (MIP)-1 β , fator de necrose tumoral (TNF)- α , Proteína quimiotática de monócitos (MCP)-1. As análises imunológicas foram realizadas em duplicata e aconteceram no Laboratório de Patologia Molecular da Faculdade de Odontologia. Três pesquisadoras (Adriana Moura Foz, Mariana Sousa Rabelo e Michella Bezerra Lima) conduziram a análise segundo as instruções do fabricante, e com o apoio técnico da empresa (Bio-Rad®, Hercules, CA, EUA). O princípio da análise é similar ao princípio da técnica de ELISA. Anticorpos específicos dos marcadores inflamatórios ficam ligados a beads magnéticos e reagem com as amostras que contêm os marcadores inflamatórios em questão. Depois de uma série de lavagens para se remover as proteínas que não ficaram ligadas, um anticorpo biotinilado é adicionado para criar o complexo de sanduiche. Para a detecção final, streptavidina contendo um indicador fluorescente (SA-PE) é adicionada ao complexo e as amostras são analisadas no Bioplex 200 Suspension Array System/ Luminex (Bio- Rad®, Hercules, CA, EUA) através do *software* Bio-Plex Manager, versão 4.1 (Bio-Rad®, Hercules, CA, EUA).

Análises estatísticas

As características demográficas dos participantes foram descritas como estatísticas de frequência (relativa e absoluta). Para comparar níveis médios de citocinas entre pacientes edêntulos e dentados, foi realizado o teste não paramétrico de *Mann-Whitney*. Através do teste estatístico de correlação de *Spearman*, os níveis de marcadores inflamatórios séricos foram correlacionados com periodontopatógenos presentes em saliva, biofilme subgengival e ateroma. Além disso, níveis de marcadores inflamatórios séricos foram correlacionados com a condição inflamatória periodontal, representada por PISA. Análise de regressão logística de multivariáveis foi realizada para testar a associação entre condição periodontal e presença de patógenos em placas de ateroma e para testar a influência de fatores de confusão na inflamação sistêmica. O *software* usado para conduzir as medidas qualitativas foi *SPSS version 19*, e o *software* usado para as análises de correlação de *Spearman* foi *Statgraphics Plus*.

5 RESULTADOS

Trinta e cinco pacientes que foram submetidos à endarterectomia de carótida fizeram parte deste estudo. Os dados obtidos do questionário médico e socioeconômico serviram para delinear as características da população estudada (Tabela 5.1). A idade média dos participantes foi de 71,09 anos (dp=9,6), 82,9% da população eram do sexo masculino e 42,9% da população eram edêntulos. Vinte e sete pacientes não terminaram o ensino fundamental, sendo que quatro eram analfabetos. Quatorze pacientes (40%) foram diagnosticados com Diabetes Mellitus do tipo 2, mas apenas três apresentaram altos níveis de hemoglobina glicada (HbA1c) (9-10%), caracterizando-os como pacientes diabéticos não controlados. Os outros pacientes diagnosticados com diabetes apresentaram HbA1c entre 6,4 e 7,5%.

Dez pacientes eram fumantes e onze eram ex-fumantes (há mais de 5 anos). Dos pacientes fumantes, seis foram diagnosticados com doença periodontal e quatro eram edêntulos.

Todos os pacientes dentados (20) foram submetidos ao exame periodontal, e tiveram amostras de biofilme subgengival coletadas. Dezesete pacientes dentados (85% do grupo) foram diagnosticados com doença periodontal (Lopez et al., 2002). Amostras de saliva e de ateroma foram coletadas de todos os trinta e cinco participantes.

Tabela 5.1- Características demográficas de todos os participantes

		n	%
Edêntulos	Não	20	57,14
	Sim	15	42,86
Doença periodontal (pacientes dentados)	Não	3	15,00
	Sim	17	85,00
	Total	20	100,00
Sexo	Masculino	29	82,86
	Feminino	6	17,14
Diabetes	Não	21	60,00
	Sim	14	40,00
Fumo	Não	14	40,00
	Ex-fumante (≥ 5 anos)	11	31,43
	Sim	10	28,57
Escolaridade	Analfabeto	4	11,43
	Ensino fundamental incompleto	17	48,57
	Ensino fundamental	6	17,14
	Ensino médio	5	14,29
	Curso superior incompleto	2	5,71
	Curso superior completo	1	2,86
Mediana (Min -- Max)			
Número de dentes perdidos (n=20)		10 (1 -- 26)	
Idade (n=35)		72 (48 -- 88)	
Glicose (mg/dL) (n=28)		92 (70 -- 143)	
Colesterol total (mg/dL) (n=32)		137 (73 -- 204)	
HDL (mg/dL) (n=32)		42,5 (17 -- 76)	
LDL (mg/dL) (n=32)		72 (35 -- 140)	
VLDL (mg/dL) (n=31)		22 (12 -- 46)	
Triglicérides (mg/dL) (n=32)		110 (60 -- 303)	

Todos os 17 marcadores avaliados foram observados nas amostras, sendo que IL-8, IL-7, G-CSF, MIP- β e MCP-1 foram detectados em todas as amostras. A tabela 5.2 mostra as concentrações médias dos marcadores detectadas pela técnica de Multiplex.

Tabela 5.2- Número e porcentagens de amostras positivas para cada uma das citocinas avaliadas e concentrações médias de citocinas observadas nas amostras

Citocinas	Amostras positivas (n, %)	Média (ng/μL) (dp)
IL-1β	12 (37,5%)	8,1 (37,48)
IL-8	32 (100%)	386,12 (1352,71)
IL-7	32 (100%)	3,52 (1,8)
IL-6	30 (93,75%)	60,13 (283,78)
IL-5	12 (37,5%)	0,72 (1,44)
IL-4	30 (93,75%)	0,94 (0,81)
IL-2	4 (12,5%)	0,79 (2,42)
IL-17	28 (87,5%)	9,6 (11,59)
IL-13	22 (68,75%)	2,32 (2,78)
IL-12p70	30 (93,75%)	4,72 (3,87)
IL-10	27 (84,37%)	0,67 (0,66)
GM-CSF	24 (75%)	4,9 (8,95)
G-CSF	32 (100%)	8,41 (5,93)
IFN-γ	28 (87,5%)	48,17 (81,87)
MIP-β	32 (100%)	125,42 (218,60)
TNF-α	27 (84,37%)	16,61 (44,69)
MCP-1	32 (100%)	192,12 (661,24)

Análises de multivariáveis não encontraram associação entre marcadores inflamatórios e fatores de confusão entre periodontite e doença cardiovascular (diabetes, fumo, idade, sexo, escolaridade).

Quando os participantes foram divididos entre dentados (9) e edêntulos (13) para a comparação de seus níveis médios de citocinas, foi possível observar que os níveis médios de citocinas em pacientes dentados eram maiores do que em pacientes edêntulos, porém não houve diferença estatística entre os grupos (Tabela 5.3).

Tabela 5.3- Teste de Mann-Whitney para comparar níveis médios (ng/μL) de citocinas entre pacientes dentados e edêntulos

	Dentados Média (dp)	Edêntulos Média (dp)	p
IL-1β	13,29 (48,45)	0,51 (1,52)	0,88
IL-8	581,86 (1734,72)	100,03 (252,63)	0,59
IL-7	3,27 (1,67)	3,88 (1,98)	0,42
IL-6	99,47 (366,96)	2,63 (3,04)	0,47
IL-5	0,42 (0,75)	1,16 (2,04)	0,65
IL-4	1,02 (0,99)	0,83 (0,47)	0,88
IL-2	1,33 (3,06)	0 (0)	0,32
IL-17	11,16 (14,46)	7,31 (4,9)	1
IL-13	2,5 (3,04)	2,05 (2,4)	0,82
IL-12p	4,82 (4,35)	4,59 (3,19)	0,97
IL-10	0,67 (0,65)	0,67 (0,7)	0,82
GM-CSF	6,44 (11,21)	2,66 (3,09)	0,38
G-CSF	9,25 (7,24)	7,18 (3,09)	0,59
IFN-γ	61,16 (103,57)	29,19 (23,78)	0,54
TNF-α	24,92 (56,99)	4,46 (4,23)	0,54
MIP-β	164,67 (278,78)	68,07 (29,5)	0,73
MCP-1	313,76 (846,71)	24,18 (15,01)	0,07

A presença de patógenos periodontais em placas de ateroma, biofilme subgengival e saliva pode ser observada na tabela 5.4. Este estudo foi capaz de detectar o DNA de pelo menos uma bactéria-alvo em 18 das 35 amostras de ateroma (51,42%). O periodontopatógeno mais frequentemente encontrado foi *T. forsythia*, observado em 37% dos casos. *T. denticola* foi o patógeno encontrado com maior concentração no ateroma, embora só tenha sido identificado em duas amostras. *F. nucleatum*, *P.gingivalis* e *D.pneumosintes* foram observadas em todas as amostras subgengivais.

Tabela 5.4. Frequência e concentrações mínima e máxima de bactérias encontradas nas amostras

Ateroma (n=35)			
	Amostras positivas para bactéria- n (%)	Min (cópias/ μ L)	Máx (cópias/ μ L)
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	1 (2,86)	2,15E+00	2,15E+00
<i>E. faecalis</i>	0 (0)	ND	ND
<i>F. nucleatum</i>	1 (2,86)	1,41E+01	1,41E+01
<i>P. gingivalis</i>	2 (5,71)	2,27E+00	3,21E+00
<i>P. intermedia</i>	5 (14,29)	1,67E+00	2,55E+11
<i>P. nigrescens</i>	0 (0)	ND	ND
<i>T. forsythia</i>	13 (37,14)	4,67E+02	9,14E+05
<i>T. denticola</i>	2 (5,71)	2,46E+03	7,96E+11
<i>D. pneumosintes</i>	0 (0)	ND	ND
<i>P. endodontalis</i>	0 (0)	ND	ND

Saliva (n=35)			
	Amostras positivas para bactéria- n (%)	Min (cópias/ μ L)	Máx (cópias/ μ L)
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	3 (8,57)	1,26E+01	1,44E+03
<i>E. faecalis</i>	3 (8,57)	2,93E+01	7,32E+03
<i>F. nucleatum</i>	33 (94,29)	1,87E+00	1,62E+06
<i>P. gingivalis</i>	34 (97,14)	2,02E+00	3,73E+04
<i>P. intermedia</i>	19 (54,29)	2,03E+01	1,09E+06
<i>P. nigrescens</i>	16 (45,71)	3,80E+00	8,93E+05
<i>T. forsythia</i>	30 (85,71)	4,33E+03	2,34E+09
<i>T. denticola</i>	20 (57,14)	1,56E+02	3,59E+06
<i>D. pneumosintes</i>	35 (100)	3,42E+02	1,04E+09
<i>P. endodontalis</i>	22 (62,86)	4,00E-04	6,81E+00

Biofilme subgengival (n=20)			
	Amostras positivas para bactéria- n (%)	Min (cópias/ μ L)	Máx (cópias/ μ L)
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	2 (10)	2,23E+01	1,19E+03
<i>E. faecalis</i>	0 (0)	ND	ND
<i>F. nucleatum</i>	20 (100)	3,96E+00	1,43E+05
<i>P. gingivalis</i>	20 (100)	2,05E+00	3,00E+04
<i>P. intermedia</i>	13 (65)	5,56E+02	1,14E+06
<i>P. nigrescens</i>	12 (60)	9,81E+00	4,90E+06
<i>T. forsythia</i>	17 (85)	1,32E+04	8,54E+06
<i>T. denticola</i>	18 (90)	3,38E+03	4,41E+ 06
<i>D. pneumosintes</i>	20 (100)	1,73E+00	7,42E+05
<i>P. endodontalis</i>	13 (65)	1,95E-05	1,14E+01

ND= não detectado. E= $\times 10$; +n= elevado a n. Ex: E+00= $\times 10^0$; E+01= $\times 10^1$...

A inflamação periodontal de cada paciente foi calculada através de valores de PISA (Figura 5.1). Todos os pacientes edêntulos receberam valores de PISA iguais a zero. Dos três pacientes dentados que não receberam o diagnóstico de periodontite (Lopez et al., 2002), um recebeu um valor de PISA de zero (sem

presença de bolsas periodontais, e sem sangramento à sondagem), e os outros dois receberam valores de 88,9mm² e 104,6mm², indicando a presença de inflamação gengival sem perda de nível clínico de inserção (gengivite). O maior valor de PISA encontrado foi de 2180,9 mm².

Figura 5.1- Valores de PISA de cada participante

O teste de *Spearman* para correlacionar níveis de marcadores inflamatórios e concentrações de bactérias resultou em alguns resultados positivos:

Em amostras de ateroma, níveis de *T. forsythia* foram positivamente associados a níveis séricos de IL-7 ($r = 0,4215$), IL-6 ($r = 0,4027$), IL-17 ($r = 0,4949$), IL-13 ($r = 0,5244$), IL-12p70 ($r = 0,4102$), IFN- γ ($r = 0,3609$), GCS-F ($r = 0,3532$) ($p < 0,05$ para todos) e IL-10 ($r = 0,4657$, $p < 0,01$).

Em amostras de saliva, níveis de *P. intermedia* foram positivamente associados a IL-2 ($r = 0,4561$, $p < 0,05$); níveis de *T. denticola* foram positivamente associados a TNF- α ($r = 0,3624$, $p < 0,05$) e IL-2 ($r = 0,4835$, $p < 0,01$); e níveis de *P. endodontalis* foram positivamente associados a IL-2 ($r = 0,3961$, $p < 0,05$).

Em amostras de biofilme subgengival, níveis de *P. intermedia* foram positivamente associados a IL-2 ($r = 0,4170$, $p < 0,05$).

Testes de correlação entre marcadores inflamatórios e PISA também resultaram em uma associação positiva entre níveis de IL-2 e a inflamação periodontal ($r= 0,4111$, $p<0,05$).

6 DISCUSSÃO

Muitas citocinas pró-inflamatórias são apenas detectáveis na circulação periférica em resposta a mudanças patológicas (Zhou et al., 2010), e este estudo conseguiu detectar diferentes marcadores inflamatórios em todas as amostras, indicando a presença de inflamação sistêmica como uma característica da população estudada. Além disso, este estudo conseguiu associar a inflamação sistêmica à presença de patógenos periodontais em placas de ateroma e em amostras orais. Este foi o primeiro estudo a associar a inflamação sistêmica de pacientes submetidos à endarterectomia de carótida a suas condições periodontais, o que pode ajudar a entender o papel da periodontite na doença aterosclerótica.

A inflamação tem um papel fundamental na aterosclerose. Níveis sistêmicos de fibrinogênio, proteína C-reativa de alta sensibilidade (hs-CRP) e interleucina (IL)-6 já foram descritos como importantes marcadores de futuros eventos cardiovasculares (McCarty, 1999; Ridker; Silvertown, 2008; McColl et al., 2009), mas outros marcadores podem também influenciar as complicações da doença, já que as respostas inflamatórias envolvem uma cascata de eventos vasculares e moleculares (Leng et al., 2008).

Os perfis inflamatórios sistêmicos dos pacientes foram analisados através do teste imunoenzimático Multiplex, para citocinas de Th17. A linhagem de células Th17 produz inúmeras citocinas em resposta às infecções microbianas, como a doença periodontal (Gaffen e Hajishengallis, 2008). Além disso, estas citocinas estão envolvidas em todo o processo aterosclerótico, com importantes funções na formação, crescimento e ruptura da placa aterosclerótica (Libby, 2002). Citocinas pró-inflamatórias importantes à aterogenese (IL-8, IL-7, G-CSF, MIP- β e MCP-1) foram encontradas em todas as amostras desse estudo, e os altos níveis de IL-8, MCP-1, MIP- β , IL-6, IFN- γ , TNF- α , IL-17, G-CSF e IL-1 β confirmam a inflamação sistêmica como característica da população estudada.

Em pacientes diagnosticados com estenose carotídea, a vulnerabilidade da placa de ateroma é considerada um dos principais riscos para as complicações cardiovasculares, e tem sido associada ao aumento de diversas citocinas, como TNF- α , IL-1 β e IL-6, que estimulam metaloproteinases da matriz (MMP) especializadas em degradar componentes da membrana basal sub-endotelial (Libby, 2002). A vulnerabilidade da placa é também associada à diminuição de IL-10

(Shindo et al., 2014), um marcador anti-inflamatório capaz de desativar macrófagos (De Vries, 1995). IL-10 é também antagonista de IFN- γ e CSFs e ajuda a alcançar a homeostase (Duarte et al., 2014). Interessantemente, IL-10 foi a citocina com os menores níveis médios encontrados neste estudo.

A presença da inflamação sistêmica poderia ser parcialmente explicada por diversos fatores de risco em comum entre periodontite e aterosclerose, como diabetes mellitus (DM), fumo, idade, nível de instrução e nível social (Lockhart et al., 2012; Tonetti et al., 2013; de Weerd et al., 2014). Apesar disso, análises estatísticas indicaram que essa associação era independente de fatores de risco em comum, assim como já demonstrado em outros estudos (Lockhart et al., 2012).

Apesar de não ter havido diferença estatística entre níveis de citocinas de pacientes dentados e edêntulos, este estudo demonstrou que a maioria dos marcadores pró-inflamatórios apresentou maiores níveis médios no grupo de pacientes dentados. A falta de significância estatística ocorreu provavelmente pelo tamanho da amostra estudada, mas os resultados sugerem uma tendência à maior inflamação sistêmica em pacientes dentados quando comparados a edêntulos.

Edentulismo (total ou parcial) foi um fator em comum de todos os participantes do estudo. Pelo menos um dente perdido foi observado em cada paciente e, dentre os 20 pacientes dentados, a média de perda de dentes foi de 13,15 (dp= 8,99). Quinze pacientes eram totalmente edêntulos. Estas características estão de acordo com outras características da população estudada; a idade média era de 71,09 anos e a maioria da população era do sexo masculino (82,86%) com baixos níveis de educação (apenas 8 participantes completaram o ensino médio). Todos esses fatores já foram previamente relacionados à doença periodontal crônica e à perda de dentes (Neely et al., 2005; Van Der Velden et al., 2006).

Já foi sugerido que a perda de dentes poderia ser um bom indicador de risco à aterosclerose em uma população idosa, já que o número de dentes presentes pode ser um bom parâmetro substituto para a inflamação oral que foi acumulada durante a vida de uma pessoa (Holmlund; Lind, 2012). No momento do estudo, uma possível periodontite prévia no paciente edêntulo pode já ter tido o seu papel na aterosclerose, anos antes da abordagem clínica (Palm et al., 2013). Além disso, pacientes edêntulos podem continuar a hospedar periodontopatógenos (Cortelli et al., 2008; Van Assche et al., 2009), sugerindo uma história prévia de periodontite (Saygun et al., 2011; Liljestrand et al., 2014). Neste estudo, os 15 pacientes

edêntulos foram analisados quanto à presença de periodontopatógenos em suas amostras de saliva, e todos foram positivos para pelos menos uma espécie de patógeno periodontal. Todos os pacientes edêntulos eram positivos para *P. gingivalis* e *D. pneumosintes*, e 73% eram positivos para *T. forsythia*.

Para se observar a presença de periodontopatógenos em amostras orais e de placas de ateroma, este estudo utilizou-se de qPCR, que é capaz de detectar uma sequência de DNA de forma mais sensível e precisa do que o PCR convencional, além de quantificar estes microrganismos dentro de um amplo espectro de concentração (Valasek; Repa, 2005). Mesmo assim, encontrar e quantificar patógenos periodontais em placas de ateroma não tem sido o suficiente para entender o papel destes microrganismos no processo aterosclerótico. Achados em placas de ateroma não são homogêneos ou constantes para nenhum microrganismo oral específico, mesmo quando comparando apenas trabalhos que usaram a técnica de qPCR (Ford et al., 2005; Kozarov et al., 2006; Gaetti-Jardim et al., 2009; Figuero et al., 2014). Neste estudo, o patógeno oral mais frequentemente encontrado foi *T. forsythia*, enquanto outros encontraram como bactérias mais prevalentes *P. gingivalis* (Ford et al., 2005; Kozarov et al., 2006), *P. intermedia* (Gaetti-Jardim et al., 2009) ou *A. actinomycetemcomitans* (Figuero et al., 2014). Além disso, não apenas patógenos periodontais foram encontrados em placas de ateroma: mais de 50 diferentes tipos de bactérias foram encontradas em lesões ateroscleróticas, através do sequenciamento de 1500 clones (Ott et al., 2006).

É possível presumir que, até o momento, não há evidência de que um patógeno oral específico seja capaz de colonizar mais facilmente do que outros em placas de ateroma. Isto pode significar que o risco à DCV em pacientes com periodontite não é relacionado à uma infecção de um patógeno oral, como ocorre na endocardite bacteriana (Carmona et al., 2002). Infecções bacterianas não parecem ser necessárias ou suficientes para causar aterosclerose (Katz; Shannon, 2006), mas periodontopatógenos podem facilmente aderir a qualquer *locus minoris resistentiae* (região que oferece pouca resistência às invasões bacterianas) e provavelmente participam de etapas da aterogênese (Van Dyke; van Winkelhoff, 2013). Apesar de estudos *in vitro* terem demonstrado uma grande capacidade de periodontopatógenos e seus fatores de virulência de promoverem respostas pró-aterogênicas (Ridker; Silvertown, 2008; Miyauchi et al., 2012), esta influência não pode ser provada em estudos *in vivo*, nos quais a proporção de patógenos e células

de hospedeiro é bem menor do que em testes laboratoriais (Kebschull et al., 2010). Desta maneira, este estudo também teve como objetivo associar os achados microbiológicos à inflamação sistêmica encontrada nos participantes.

Concentrações de *T. forsythia* encontradas em placas de ateroma foram positivamente correlacionadas a níveis séricos de 8 marcadores inflamatórios: IL-7, IL-6, IL-17, IL-13, IL-12p70, IFN- γ , GCS-F e IL-10. Estas associações positivas sugerem que o papel de periodontopatógenos em placas de ateroma está relacionado ao aumento da inflamação sistêmica. A baixa frequência dos outros nove patógenos estudados em placas de ateroma impossibilitou suas associações com marcadores inflamatórios sistêmicos.

Níveis séricos de IL-2 foram positivamente associados às concentrações salivares de *P. intermedia*, *P. endodontalis* e *T. denticola*. Níveis séricos de TNF- α também estavam positivamente associados às concentrações salivares de *T. denticola*. Em amostras de biofilme subgengival, as concentrações de *P. endodontalis* estavam positivamente correlacionadas a IL-2. IL-2 e TNF- α já foram relacionados à resposta patogênica em tecidos gengivais inflamados, em pacientes com periodontite crônica grave (Górska et al., 2003). É possível que as poucas associações positivas encontradas neste estudo foram resultado de uma alta taxa de pacientes edêntulos na população estudada (42,86%), pois seus níveis de patógenos na cavidade oral tendem a ser menores quando comparados a pacientes dentados (Cortelli et al., 2008).

Uma limitação deste estudo foi que não foi possível realizar o cálculo de amostra da população, já que não existe evidência que associe níveis séricos de marcadores inflamatórios e patógenos periodontais em placas de ateroma e na cavidade oral. É possível que um maior número de participantes seja necessário para se observar mais correlações significantes. Este estudo foi capaz de incluir apenas 35 participantes, já que a realização de exames orais e de sangue previamente à endarterectomia resulta em maiores dificuldades para a inclusão de participantes. Estas mesmas dificuldades foram observadas em diversos estudos similares a este (Aimetti et al., 2007; Zhang et al., 2008; Mahendra et al., 2009; Marcelino et al., 2010).

Também foi uma questão deste estudo se a condição periodontal poderia ser relacionada a uma maior inflamação sistêmica. Para tanto, valores de PISA foram utilizados em vez de perda de NCI, já que foi sugerido que quanto maior a área de

tecido gengival inflamado, mais fácil seria para periodontopatógenos acessarem a corrente sanguínea e aumentarem a inflamação sistêmica (Kinane; Lowe, 2000). A área de ferida de tecidos periodontais expostos aos patógenos orais pode alcançar o tamanho da palma de uma mão em casos mais severos (Page, 1998). Os resultados demonstraram uma associação positiva entre PISA e níveis séricos de IL-2 ($r=0,4111$, $p<0.05$), mas nenhum outro marcador foi associado à inflamação periodontal. Resultados de outro estudo sugeriram que que, embora diversas citocinas (IL-1 β , IL-2, IFN- γ , TNF- α e IL-10) tenham sido encontradas em maiores níveis em pacientes com periodontite quando comparados a pacientes saudáveis, o padrão inflamatório individual de cada paciente variou bastante, e portanto a presença de tais marcadores não reflete a severidade da periodontite (Górska et al., 2003). Desta maneira, associações entre inflamação periodontal e marcadores inflamatórios séricos ainda devem ser interpretadas com cuidado.

Apesar das limitações desse trabalho, foi possível observar que a doença periodontal está relacionada ao aumento da inflamação sistêmica em pacientes com estenose de carótida. Estes resultados, juntamente com as evidências apresentadas, sugerem que o tratamento periodontal pode ser benéfico não apenas do ponto de vista odontológico, mas também sistêmico, possivelmente auxiliando na prevenção de futuras complicações cardiovasculares. Apesar das dificuldades metodológicas, esta abordagem precisaria ser verificada através de estudos observacionais longitudinais e/ou intervencionais, nos quais o desfecho final deve ser o evento cardiovascular.

7 CONCLUSÕES

Este estudo demonstrou que pacientes submetidos à endarterectomia de carótida apresentaram inflamação sistêmica, que pode levar a complicações cardiovasculares e que patógenos periodontais podem ser encontrados com frequência em lesões ateroscleróticas. A coexistência de patógenos periodontais comuns na cavidade oral e na placa de ateroma está associada a um estado inflamatório sistêmico, o que poderia ser relevante para a compreensão dos mecanismos que ligam periodontite com DCV.

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(9):1718-23.

Aquino ARL, Lima KC, Paiva MS, Roças IN, Siqueira JF Jr. Molecular survey of atheromatous plaques for the presence of DNA from periodontal bacterial pathogens, archaea and fungi. *J Periodont Res.* 2011; 46: 303–9.

Beck JD, Offenbacher S, Williams R, Gibbs P, Garcia R. Periodontitis: a risk factor for coronary heart disease? *Ann Periodontol.* 1998;3(1):127-41.

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 Periodont Res.* 2004; 39; 442–6.

Carmona IT, Diz Dios P, Scully C. An update on the controversies in bacterial endocarditis of oral origin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2002;93:660-70.

Cavrini F, Sambri V, Moter A, Servidio D, Marangoni A, Montebugnoli L, et al. Molecular detection of *Treponema denticola* and *Porphyromonas gingivalis* in carotid and aortic atheromatous plaques by FISH: report of two cases. *J Med Microbiol.* 2005;54:93-6.

Chun Y-HP, Chun K-RJ, Olguin D'A, Wang H-L. Biological foundation for periodontitis as a potential risk factor for atherosclerosis. *J Periodontal Res.* 2005;40(1):87-95.

Corraini P, Baelum V, Pannuti CM, Pustiglioni AN, Romito GA, Pustiglioni FE. Periodontal attachment loss in an untreated isolated population of Brazil. *J Periodontol.* 2008;79(4):610-20.

Corraini P, Baelum V, Pannuti CM, Pustiglioni AN, Romito GA, Pustiglioni FE. Tooth loss prevalence and risk indicators in an isolated population of Brazil. *Acta Odontol Scand.* 2009;67(5):297-303.

¹ De acordo com Estilo Vancouver.

Cortelli JR, Aquino DR, Cortelli SC, Nobre Franco GC, Fernandes CB, Roman-Torres CV, et al. Detection of periodontal pathogens in oral mucous membranes of edentulous individuals. *J Periodontol*. 2008;79:1962-5.

Cutler CW, Shinedling EA, Nunn M, Jotwani R, Kim BO, Nares S, et al. Association between periodontitis and hyperlipidemia: cause or effect? *J Periodontol*. 1999;70(12):1429-34.

D'Aiuto F, Ready D, Tonetti MS. Periodontal disease and C-reactive protein-associated cardiovascular risk. *J Periodontal Res*. 2004;39(4):236-41.

de Vries JE. Immunosuppressive and anti-inflammatory properties of interleukin 10. *Ann Med*. 1995;27:537-41.

de Weerd M, Greving JP, Hedblad B, Lorenz MW, Mathiesen EB, O'Leary DH, et al. Prediction of asymptomatic carotid artery stenosis in the general population: identification of high-risk groups. *Stroke*. 2014;45:2366-71.

DeStefano F, Anda RF, Kahn HS, Williamson DF, Russell CM. Dental disease and risk of coronary heart disease and mortality. *BMJ*. 1993;306(6879):688-91.

Duarte PM, Bezerra JP, Miranda TS, Feres M, Chambrone L, Shaddox LM. Local levels of inflammatory mediators in uncontrolled type 2 diabetic subjects with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2014;41:11-8.

Epstein JB, Chong S, Le ND. A survey of antibiotic use in dentistry. *J Am Dent Assoc*. 2000;131(11):1600-9.

Fiehn NE, Larsen T, Christiansen N, Holmstrup P, Schroeder TV. Identification of periodontal pathogens in atherosclerotic vessels. *J Periodontol*. 2005;76(5):731-6.

Figuro E, Lindahl C, Marín MJ, Renvert S, Herrera D, Ohlsson O, et al. Quantification of periodontal pathogens in vascular, blood, and subgingival samples from patients with peripheral arterial disease or abdominal aortic aneurysms. *J Periodontol*. 2014;85:1182-93.

Figuro E, Sánchez-Beltrán M, Cuesta-Frechoso S, Tejerina JM, del Castro JA, Gutiérrez JM, et al. Detection of periodontal bacteria in atheromatous plaque by nested polymerase chain reaction. *J Periodontol*. 2011;82(10):1469-77.

Ford PJ, Gemmell E, Hamlet SM, Hasan A, Walker PJ, West MJ, et al. Cross-reactivity of GroEL antibodies with human heat shock protein 60 and quantification of pathogens in atherosclerosis. *Oral Microbiol Immunol*. 2005;20:296-302.

Friedewald VE, Kornman KS, Beck JD, Genco R, Goldfine A, Libby P, et al. The American Journal of Cardiology and Journal of Periodontology Editors' Consensus: periodontitis and atherosclerotic cardiovascular disease. *Am J Cardiol*. 2009;104:59-68.

Gaetti-Jardim E, Marcelino SL, Feitosa AC, Romito GA, Avila-Campos MJ. Quantitative detection of periodontopathic bacteria in atherosclerotic plaques from coronary arteries. *J Med Microbiol*. 2009;58:1568-75.

Gaffen SL, Hajishengallis G. A new inflammatory cytokine on the block: re-thinking periodontal disease and the Th1/Th2 paradigm in the context of Th17 cells and IL-17. *J Dent Res*. 2008;87:817-28.

Gaio EJ, Haas AN, Carrard VC, Oppermann RV, Albandar J, Susin C. Oral health status in elders from South Brazil: a population-based study. *Gerodontology*. 2012;29(3):214-23.

Górska R, Gregorek H, Kowalski J, Laskus-Perendyk A, Syczewska M, Madaliński K. Relationship between clinical parameters and cytokine profiles in inflamed gingival tissue and serum samples from patients with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2003;30:1046-52.

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

Hasturk H, Kantarci A, Van Dyke TE. Oral inflammatory diseases and systemic inflammation: role of the macrophage. *Front Immunol*. 2012;3:1-17.

Holmlund A, Lind L. Number of teeth is related to atherosclerotic plaque in the carotid arteries in an elderly population. *J Periodontol*. 2012;83:287-91.

Horliana AC, Chambrone L, Foz AM, Artese HP, Rabelo MeS, Pannuti CM, et al. Dissemination of periodontal pathogens in the bloodstream after periodontal procedures: a systematic review. *PLoS One*. 2014;9:e98271.

Iwamoto Y, Nishimura F, Soga Y, Takeuchi K, Kurihara M, Takashiba S, et al. Antimicrobial periodontal treatment decreases serum C-reactive protein, tumor necrosis factor-alpha, but not adiponectin levels in patients with chronic periodontitis. *J Periodontol*. 2003;74(8):1231-6.

Katz JT, Shannon RP. Bacteria and coronary atheroma: more fingerprints but no smoking gun. *Circulation*. 2006;113:920-2.

Kebschull M, Demmer RT, Papapanou PN. "Gum bug, leave my heart alone!"--epidemiologic and mechanistic evidence linking periodontal infections and atherosclerosis. *J Dent Res*. 2010;89(9):879-902.

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

Kozarov E, Sweier D, Shelburne C, Progulske-Fox A, Lopatin D. Detection of bacterial DNA in atheromatous plaques by quantitative PCR. *Microbes Infect*. 2006;8(3):687-93.

Kuboniwa M, Amano A, Kimura KR, Sekine S, Kato S, Yamamoto Y, et al. Quantitative detection of periodontal pathogens using real-time polymerase chain reaction with TaqMan probes. *Oral Microbiol Immunol*. 2004;19(3):168-76.

Leng SX, McElhaney JE, Walston JD, Xie D, Fedarko NS, Kuchel GA. ELISA and multiplex technologies for cytokine measurement in inflammation and aging research. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2008;63:879-84.

Libby P, Okamoto Y, Rocha VZ, Folco E. Inflammation in atherosclerosis: transition from theory to practice. *Circ J*. 2010;74(2):213-20.

Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*. 2002 19-26;420(6917):868-74.

Liljestrand JM, Gursoy UK, Hyvärinen K, Sorsa T, Suominen AL, Könönen E, et al. Combining salivary pathogen and serum antibody levels improves their diagnostic ability in detection of periodontitis. *J Periodontol*. 2014;85:123-31.

Lockhart PB, Bolger AF, Papapanou PN, Osinbowale O, Trevisan M, Levison ME, et al. Periodontal disease and atherosclerotic vascular disease: does the evidence support an independent association?: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation*. 2012;125(20):2520-44.

Lombardo Bedran TB, Marcantonio RA, Spin Neto R, Alves Mayer MP, Grenier D, Spolidorio LC, et al. *Porphyromonas endodontalis* in chronic periodontitis: a clinical and microbiological cross-sectional study. *J Oral Microbiol.* 2012;4.

Loos BG, Craandijk J, Hoek FJ, Wertheim-van Dillen PM, van der Velden U. Elevation of systemic markers related to cardiovascular diseases in the peripheral blood of periodontitis patients. *J Periodontol* 2000;71(10):1528-34.

López NJ, Smith PC, Gutierrez J. Periodontal therapy may reduce the risk of preterm low birth weight in women with periodontal disease: a randomized controlled trial. *J Periodontol.* 2002;73(8):911-24.

Mahendra J, Mahendra L, Felix J, Romanos G. Prevalence of periodontopathogenic bacteria in subgingival biofilm and atherosclerotic plaques of patients undergoing coronary revascularization surgery. *J Indian Soc Periodontol.* 2013;17(6):719-24.

Mahendra J, Mahendra L, Kurian VM, Jaishankar K, Mythilli R. 16S rRNA-based detection of oral pathogens in coronary atherosclerotic plaque. *Indian J Dent Res.* 2010;21(2):248-52.

Mahendra J, Mahendra L, Kurian VM, Jaishankar K, Mythilli R. Prevalence of periodontal pathogens in coronary atherosclerotic plaque of patients undergoing coronary artery bypass graft surgery. *J Maxillofac Oral Surg.* 2009;8(2):108-13.

Marcelino SL, Gaetti-Jardim E, Nakano V, Canônico LA, Nunes FD, Lotufo RF, et al. Presence of periodontopathic bacteria in coronary arteries from patients with chronic periodontitis. *Anaerobe.* 2010;16:629-32.

Mattila KJ, Nieminen MS, Valtonen VV, Rasi VP, Kesäniemi YA, Syrjälä SL, et al. Association between dental health and acute myocardial infarction. *Br Med J.* 1989; 298: 779–81.

McCarty MF. Interleukin-6 as a central mediator of cardiovascular risk associated with chronic inflammation, smoking, diabetes, and visceral obesity: down-regulation with essential fatty acids, ethanol and pentoxifylline. *Med Hypotheses.* 1999;52(5):465-77.

McColl BW, Allan SM and Rothwell NJ. Systemic infection, inflammation and acute ischemic stroke. *Neuroscience* 2009; 158: 1049–1061.

Mendis S, Puska P, Norrving B, editors. Global Atlas on Cardiovascular Disease Prevention and Control. World Health Organization, Geneva 2011.

Miyauchi S, Maekawa T, Aoki Y, Miyazawa H, Tabeta K, Nakajima T, et al. Oral infection with *Porphyromonas gingivalis* and systemic cytokine profile in C57BL/6.KOR-ApoE sh1 mice. *J Periodontal Res*. 2012;47:402-8.

Nakano K, Inaba H, Nomura R, Nemoto H, Takeuchi H, Yoshioka H, Toda K, Taniguchi K, Amano A, Ooshima T. Distribution of *Porphyromonas gingivalis* fimA genotypes in cardiovascular specimens from Japanese patients. *Oral Microbiol Immunol* 2008; 23: 170–172.

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

Nakarai H, Yamashita A, Takagi M, Adachi M, Sugiyama M, Noda H, et al. Periodontal disease and hypertriglyceridemia in Japanese subjects: potential association with enhanced lipolysis. *Metabolism*. 2011;60(6):823-9.

Neely AL, Holford TR, Löe H, Anerud A, Boysen H. The natural history of periodontal disease in humans: risk factors for tooth loss in caries-free subjects receiving no oral health care. *J Clin Periodontol*. 2005;32:984-93.

Nesse W, Abbas F, van der Ploeg I, Spijkervet FKL, Dijkstra PU, Vissink A. Periodontal inflamed surface area: quantifying inflammatory burden. *J Clin Periodontol*. 2008; 35: 668–673.

Nonnenmacher C, Dalpke A, Rochon J, Flores-de-Jacoby L, Mutters R, Heeg K. Real-time polymerase chain reaction for detection and quantification of bacteria in periodontal patients. *J Periodontol*. 2005;76(9):1542-9.

Ohki T, Itabashi Y, Kohno T, Yoshizawa A, Nishikubo S, Watanabe S, et al. Detection of periodontal bacteria in thrombi of patients with acute myocardial infarction by polymerase chain reaction. *Am Heart J*. 2012;163(2):164-7.

Okamoto M, Maeda N, Kondo K, Leung KP. Hemolytic and hemagglutinating activities of *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens*. *FEMS Microbiol Lett*. 1999;178(2):299-304.

Okuda K, Ishihara K, Nakagawa T, Hirayama A, Inayama Y, Okuda K. Detection of *Treponema denticola* in atherosclerotic lesions. *J Clin Microbiol*. 2001;39(3):1114-7.

Ott SJ, El Mokhtari NE, Musfeldt M, Hellmig S, Freitag S, Rehman A, et al. Detection of diverse bacterial signatures in atherosclerotic lesions of patients with coronary heart disease. *Circulation*. 2006;113:929-37.

Padilla C, Lobos O, Hubert E, Gonzalez C, Matus S, Pereira M, et al. Periodontal pathogens in atheromatous plaques isolated from patients with chronic periodontitis. *J Periodont Res*. 2006; 41: 350–53.

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

Palm F, Lahdentausta L, Sorsa T, Tervahartiala T, Gokel P, Bugge F, et al. Biomarkers of periodontitis and inflammation in ischemic stroke: A case-control study. *Innate Immun*. 2013;20:511-8.

Pearson TA, Mensah GA, Alexander RW, Anderson JL, Cannon RO, Criqui M, et al. Markers of inflammation and cardiovascular disease: application to clinical and public health practice: A statement for healthcare professionals from the Centers for Disease Control and Prevention and the American Heart Association. *Circulation*. 2003;107:499-511.

Periasamy S, Kolenbrander PE. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* builds mutualistic biofilm communities with *Fusobacterium nucleatum* and *Veillonella* species in saliva. *Infect Immun*. 2009;77(9):3542-51.

Pischon N, Hägewald S, Kunze M, Heng N, Christan C, Kleber BM, et al. Influence of periodontal therapy on the regulation of soluble cell adhesion molecule expression in aggressive periodontitis patients. *J Periodontol*. 2007;78(4):683-90.

Pizzo G, Guiglia R, Lo Russo L, Campisi G. Dentistry and internal medicine: from the focal infection theory to the periodontal medicine concept. *Eur J Intern Med*. 2010;21:496-502.

Pucar A, Milasin J, Lekovic V, Vukadinovic M, Ristic M, Putnik S, Kenney EB. Correlation between atherosclerosis and periodontal putative pathogenic bacterial infections in coronary and internal mammary arteries. *J Periodontol*. 2007;78(4):677-82.

Raffaelli L, Santangelo R, Falchetti P, Galluccio F, Luciani N, Anselmi A, et al. Examination of periodontal pathogens in stenotic valve specimens and in whole blood samples in patients affected by aortic valve stenosis and chronic periodontitis. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2010;23(2):561-6.

Ridker PM, Silvertown JD. Inflammation, C-reactive protein, and atherothrombosis. *J Periodontol*. 2008; 79 (8 Suppl):1544-51.

Romano F, Barbui A, Aimetti M. Periodontal pathogens in periodontal pockets and in carotid atheromatous plaques. *Minerva Stomatol*. 2007;56(4):169-79.

Saygun I, Nizam N, Keskiner I, Bal V, Kubar A, Açikel C, et al. Salivary infectious agents and periodontal disease status. *J Periodontal Res*. 2011;46:235-9.

Shindo A, Tanemura H, Yata K, Hamada K, Shibata M, Umeda Y, et al. Inflammatory biomarkers in atherosclerosis: pentraxin 3 can become a novel marker of plaque vulnerability. *PLoS One*. 2014;9:e100045.

Siqueira JF Jr, Rôças IN. Exploiting molecular methods to explore endodontic infections: Part 1--current molecular technologies for microbiological diagnosis. *J Endod*. 2005;31(6):411-23.

Stone AF, Mendall MA, Kaski JC, Edger TM, Risley P, Poloniecki J, et al. Effect of treatment for *Chlamydia pneumoniae* and *Helicobacter pylori* on markers of inflammation and cardiac events in patients with acute coronary syndromes: South Thames Trial of Antibiotics in Myocardial Infarction and Unstable Angina (STAMINA). *Circulation*. 2002;106(10):1219-23.

Susin C, Oppermann RV, Haugejorden O, Albandar JM. Tooth loss and associated risk indicators in an adult urban population from south Brazil. *Acta Odontol Scand*. 2005;63(2):85-93.

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(10):755-7.

Thornton-Evans G, Eke P, Wei L, Palmer A, Moeti R, Hutchins S, et al. Periodontitis among adults aged ≥ 30 years - United States, 2009-2010. *MMWR Surveill Summ*. 2013;62 Suppl 3:129-35.

Tonetti MS, Van Dyke TE; Working group 1 of the joint EFP/AAP workshop. Periodontitis and atherosclerotic cardiovascular disease: consensus report of the Joint EFP/AAP Workshop on Periodontitis and Systemic Diseases. *J Periodontol*. 2013;84:S24-9.

Toyofuku T, Inoue Y, Kurihara N, Kudo T, Jibiki M, Sugano N, et al. Differential detection rate of periodontopathic bacteria in atherosclerosis. *Surg Today*. 2011;41(10):1395-400.

Tuter G, Kurtis B, Serdar M, Aykan T, Okyay K, Yucel A, et al. Effects of scaling and root planing and sub- antimicrobial dose doxycycline on oral and systemic biomarkers of disease in patients with both chronic periodontitis and coronary artery disease. *J Clin Periodontol*. 2007; 34: 673–81.

Valasek MA, Repa JJ. The power of real-time PCR. *Adv Physiol Educ*. 2005; 29: 151–159.

Van Assche N, Van Essche M, Pauwels M, Teughels W, Quirynen M. Do periodontopathogens disappear after full-mouth tooth extraction? *J Clin Periodontol*. 2009;36:1043-7.

Van der Velden U, Abbas F, Armand S, Loos BG, Timmerman MF, Van der Weijden GA, et al. Java project on periodontal diseases. The natural development of periodontitis: risk factors, risk predictors and risk determinants. *J Clin Periodontol*. 2006;33:540-8.

Van Dyke TE, van Winkelhoff AJ. Infection and inflammatory mechanisms. *J Clin Periodontol*. 2013;40 Suppl 14:S1-7.

Vieira CL, Caramelli B. The history of dentistry and medicine relationship: could the mouth finally return to the body? *Oral Dis*. 2009 Nov;15(8):538-46.

Wiesli P, Czerwenka W, Meniconi A, Maly FE, Hoffmann U, Vetter W, Schulthess G. Roxithromycin treatment prevents progression of peripheral arterial occlusive disease in Chlamydia pneumoniae seropositive men: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Circulation*. 2002;105(22):2646-52.

Williams JM, Trope M, Caplan DJ, Shugars DC. Detection and quantitation of *E. faecalis* by real-time PCR (qPCR), reverse transcription-PCR (RT-PCR), and cultivation during endodontic treatment. *J Endod*. 2006;32(8):715-21.

Zaremba M, Górski R, Suwalski P, Kowalski J. Evaluation of the incidence of periodontitis-associated bacteria in the atherosclerotic plaque of coronary blood vessels. *J Periodontol*. 2007;78(2):322-7.

Zhang YM, Zhong LJ, Liang P, Liu H, Mu LT, Ai SK. Relationship between microorganisms in coronary atheromatous plaques and periodontal pathogenic bacteria. *Chin Med J*. 2008;121(16):1595-7.

Zhou X, Fragala MS, McElhaney JE, Kuchel GA. Conceptual and methodological issues relevant to cytokine and inflammatory marker measurements in clinical research. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2010;13(5):541-7.

ANEXO A - Parecer emitido pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 18/11/2009, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **1084/09**, intitulado: **"INFLUÊNCIA DA DOENÇA PERIODONTAL NA FORMAÇÃO DA PLACA DE ATROMA"** apresentado pelo Departamento de **CIRURGIA**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **Prof. Dr. Pedro Puech-Leão**

Pesquisador (a) Executante: **Adriana Moura Foz**

CAPPesq, 18 de Novembro de 2009

Prof. Dr. Eduardo Massad
Presidente da Comissão de
Ética para Análise de Projetos
de Pesquisa

ANEXO B – Parecer emitido pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia
Comitê de Ética em Pesquisa

PARECER DE APROVAÇÃO
FR – 231920
Protocolo 224/08

Com base em parecer de relator, o Comitê de Ética em Pesquisa **APROVOU** o protocolo de pesquisa **"Influência da doença periodontal na formação da placa de ateroma"**, de responsabilidade dos Pesquisadores Adriana Moura Foz, Cynthia Luciancencov Petrillo e Camila Manoel Bispo, sob orientação do Professor Doutor Giuseppe Alexandre Romito.

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados a este Comitê relatórios anuais referentes ao andamento da pesquisa e ao término cópia do trabalho em "cd". Qualquer emenda do projeto original deve ser apresentada a este CEP para apreciação, de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

São Paulo, 17 de fevereiro de 2009.

Prof. Dr. João Gualberto de Cerqueira Luz
Coordenador do CEP-FOUSP

ANEXO C – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO- FACULDADE DE ODONTOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ESTOMATOLOGIA- DISCIPLINA DE PERIODONTIATermo de Informação para Participação em Pesquisa

Titulo da Pesquisa: **Influência da Doença Periodontal na Formação da Placa de Ateroma.**

1. Dados de Identificação do Sujeito da Pesquisa ou Responsável Legal:

Nome: _____

Nº do Documento de Identidade: _____ Sexo: M () F ()

Data de Nascimento: ____/____/____

Endereço: _____

Bairro: _____ Estado: _____

CEP: _____ Telefone() _____

2. Informações sobre a pesquisa científica:

Este documento contém informações sobre esta pesquisa, da qual o Sr(a) poderá participar. Por favor, leia atentamente e, em caso de dúvidas, estaremos à sua disposição para esclarecimentos.

2.1. Objetivos da pesquisa

Esta pesquisa pretende verificar se há relação entre a saúde das suas gengivas e a condição de suas veias e/ou artérias.

2.2. Benefícios ao paciente

A pesquisa dará ao Sr (a) o diagnóstico de sua condição periodontal, e os pesquisadores irão orientá-lo a procurar tratamento odontológico, se preciso, após a cirurgia vascular, com o consentimento médico.

2.3. O que será realizado no paciente

Durante o período que o Sr (a) estiver internado no ambulatório do Hospital das Clínicas, no próprio leito em que o Sr (a) se encontrar, serão realizados exames odontológicos que consistem em: 1- exame gengival, que visa saber a condição de sua gengiva; 2- coleta da placa bacteriana subgengival, que visa analisar os tipos de bactérias presentes entre seu dente e sua gengiva. Esses procedimentos não provocam sofrimento, dano físico ou moral ao Sr(a). O exame da condição da sua gengiva pode causar um leve desconforto momentâneo na região, mas não causa nenhum dano a sua saúde

Além desses exames, iremos recolher dados do seu exame de sangue feito antes da cirurgia de revascularização, e os dados de um novo exame de sangue feito rotineiramente três meses após a cirurgia.

Também iremos coletar a placa de ateroma removida na cirurgia de revascularização, para analisarmos os tipos de bactérias presentes nela.

2.4. Se houver necessidade de outro exame para diagnóstico

Caso haja necessidade, os exames odontológicos serão repetidos.

2.5. Compensação

Não há previsão de indenizações ou pagamentos aos pacientes, pois não existirão gastos ou riscos graves relacionados à pesquisa. Os procedimentos realizados farão parte de rotina de investigação, e o Sr (a) não precisará se deslocar para nenhum outro lugar além das dependências do Hospital das Clínicas.

Quando o Sr(a) receber consentimento médico poderá procurar o tratamento odontológico adequado, se preciso. Nossa pesquisa consiste apenas em diagnosticar sua condição bucal, e estudar a presença de bactérias em sua boca e sua placa de ateroma. O tratamento odontológico não faz parte do nosso trabalho.

2.6. Garantias ao paciente

Como participante dessa pesquisa, o Sr(a) terá acesso aos resultados obtidos e permitirá o acesso dos mesmos aos pesquisadores envolvidos e aos membros da Comissão de Ética. Os resultados desse trabalho poderão ser apresentados em congressos ou publicados em revistas científicas, sendo a identidade do Sr(a) sempre preservada.

O Sr(a) terá acesso, a qualquer tempo, às informações sobre os procedimentos, riscos e benefícios da pesquisa. Além disso o Sr(a) terá direito à privacidade e todas as informações obtidas dos prontuários clínicos e ambulatoriais permanecerão confidenciais, nos âmbitos da lei, assegurando a proteção de sua imagem e identidade.

Está assegurada ao Sr(a) a liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento, e de deixar de participar da pesquisa, sem que isto lhe traga qualquer prejuízo.

Caso seja necessário, o contato com os pesquisadores responsáveis poderá ser feito pelos telefones: Adriana Foz (0xx11- 3079-9543) ou Dr. Giuseppe Romito (0xx11- 3091-7813)

CONSENTIMENTO ESCLARECIDO

Declaro que, tendo lido e compreendido o termo de informação e consentimento para a pesquisa clínica, concordo em participar deste estudo. Sei que minha participação é voluntária e que posso interrompê-la a qualquer momento, sem penalidades. Autorizo a utilização dos dados obtidos pelos pesquisadores para a publicação em revistas científicas e apresentação em Congressos.

Recebi uma cópia do termo de informação para participar da pesquisa.

São Paulo, _____ de _____ de _____

Assinatura do Paciente ou Responsável

Assinatura do Pesquisador

ANEXO D- Ficha de Anamnese e questionário sócio-econômico.

INFLUÊNCIA DA DOENÇA PERIODONTAL NA FORMAÇÃO DE PLACA DE ATEROMA

FICHA DE ANAMNESE

DISCIPLINA DE PERIODONTIA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Data:		Nome:	
Naturalidade/ Nacionalidade:			Paciente n°:
N° de registro:		Estado Civil: ☐ Solteiro ☐ Casado ☐ Viúvo	
Sexo: M ☐ F ☐	Idade:	Data Nascimento:	
Peso:	Altura:	IMC:	
Periograma: ☐ Data: __/__/__		Placa Subgengival: ☐ Data: __/__/__	
Saliva: ☐ Data: __/__/__	Soro: ☐ Data: __/__/__	Placa de ateroma: ☐ Data: __/__/__	

SAÚDE GERAL

1- Diagnóstico Vascular: _____

2- Tem diabetes? SIM ☐ DIABETES TIPO: _____ NÃO ☐

2.a.. Há quanto tempo diagnosticado: _____

2.b.. Nível glicêmico em jejum: _____ no dia: _____

2.c. Nível de HbA1c: _____ no dia: _____

3- Tem/ teve tuberculose? SIM ☐ NÃO ☐

4- Tem pressão alta? SIM ☐ NÃO ☐ 4.a.: Pressão arterial: _____

5- Sofre dos rins ou bexiga? SIM ☐ NÃO ☐

6- Quais são os medicamentos que toma? _____

6.a. Usou antibióticos nos últimos 6 meses? SIM ☐ NÃO ☐ Qual? _____

7- Tem alguma doença sexualmente transmissível? SIM ☐ NÃO ☐ _____

8- Tem alguma outra doença sistêmica? _____

9- Fuma? ☐ SIM, HÁ ____ ANOS ☐ NUNCA FUMOU ☐ PAROU HÁ ____ ANOS

9.a. Se fuma ou já fumou, quantos cigarros ao dia? _____

10- Sente-se estressado? SIM ☐ NÃO ☐

INFLUÊNCIA DA DOENÇA PERIODONTAL NA FORMAÇÃO DE PLACA DE ATHEROMA

FICHA DE ANAMNESE

DISCIPLINA DE PERIODONTIA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Data: _____	
Nome: _____	Paciente n°: _____
N° de registro: _____	

QUESTIONÁRIO SÓCIO ECONÔMICO

- 1- Qual seu grau de escolaridade? _____
- 2- Quantas pessoas vivem em sua casa? _____
- 3- Qual é sua renda familiar? 1-2 Salários Mínimos (SM) ☐ 3-4 SM ☐ 5 ou mais SM ☐
- 4- Profissão: _____
- 5- Trabalha no momento? SIM ☐ NÃO ☐ APOSENTADO ☐

PARTE ODONTOLÓGICA

- 1- Qual foi a ultima vez que foi ao dentista? _____
- 2- Está em tratamento periodontal? _____
- 3- Já fez tratamento periodontal? _____
- 4- Tomou alguma medicação prescrita por um dentista no ultimo ano? SIM ☐ NÃO ☐
- 4.1. Qual medicação? _____
- 5- Tem sangramento gengival? SIM ☐ NÃO ☐
- 6- Tem dor nas gengivas? SIM ☐ NÃO ☐
- 7- Perdeu dentes por causa de doença periodontal (dentes com mobilidade)? SIM ☐ NÃO ☐
- 8- Quantas vezes ao dia escova os dentes? _____
- 9- Utiliza fio/fita dental? SIM ☐ NÃO ☐
- 10- Usa outros métodos de limpeza? _____
- 11- Já foi instruído de como fazer higiene oral? SIM ☐ NÃO ☐
- 12- Come muito doce? SIM ☐ NÃO ☐