ARIANE JAMILE GALLO

Avaliação da presença de microrganismos bucais em placas ateromatosas por real-time PCR

Araçatuba-SP

2011

ARIANE JAMILE GALLO

Avaliação da presença de microrganismos bucais em placas ateromatosas por real-time PCR

Trabalho de Conclusão de Curso como parte dos requisitos para a obtenção do título de Bacharel em Odontologia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

Orientador: Prof. Dr. Elerson Gaetti Jardim Júnior
Co-orientadora: Profª. Dr. Ana Cláudia Okamoto

Araçatuba-SP

2011

Dedicatória

“Aos meus pais, José Antônio e Águeda, que lutaram comigo para a realização desse sonho, com carinho, amor, exemplo de dignidade e perseverança e incansável apoio ao longo desses anos !”

Agradecimentos

À Deus por me amparar nos momentos difíceis, me dar força interior para superar as dificuldades, mostrar os caminhos nas horas incertas e me suprir em todas as minhas necessidades.

Ao meu orientador Elerson Gaetti Jardim Júnior e co-orientadora Ana Cláudia Okamoto, por acreditarem em mim, me mostrarem o caminho da ciência, contribuírem para o meu crescimento profissional e pessoal, sempre com carinho, apoio e incentivo em todos os momentos.

Aos meus pais, José e Águeda e aos meus irmãos, Júnior e Anelita, a qual amo muito, pelo carinho e apoio incondicional.

Ao meu namorado, Alexandre, pela presença, paciência, companheirismo e compreensão.

Aos meus amigos, pelo carinho, amizade e apoio nesta caminhada comum.

Ao técnico do laboratório, Robson Ranieri, pela colaboração, dedicação e amizade.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela concessão da bolsa de iniciação científica e pelo apoio financeiro para a realização da pesquisa.

À Universidade Estadual Paulista, pela oportunidade de realização do curso de graduação.

"Ensinar é um exercício de imortalidade.
De alguma forma continuamos a viver
naqueles cujos olhos aprenderam a ver o mundo
pela magia da nossa palavra.
O professor, assim, não morre jamais..."
(Rubem Alves)

GALLO, A. J. **Avaliação da presença de microrganismos bucais em placas ateromatosas por real-time PCR.** 2011. Trabalho de Conclusão de Curso- Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2011.

Resumo

No presente estudo, avaliou-se a presença de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Eikenella corrodens*, grupo *Fusobacterium nucleatum-periodonticum-simiae*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens* e *Tannerella forsythia* nas placas ateromatosas de artérias coronárias através de PCR em tempo real. Quarenta e sete pacientes com doença cardiovascular foram submetidos a exame periodontal e endarterectomia das coronárias. Aproximadamente de 60 a 100mg de tecidos ateroscleróticos foram removidos. A detecção quantitativa dos microrganismos periodontopatogênicos foi realizada através de iniciadores e sondas do sistema TaqMan. DNA bacteriano foi observado em 91,5% das placas ateromatosas, enquanto DNA de microrganismos periodontopatogênicos foi encontrado em 87.2% das lesões. Todos os microrganismos periodontopatogênicos estudados, com exceção do grupo *F. nucleatum-periodonticum-simiae*, foram detectados e seu DNA representou aproximadamente 45% do total do DNA microbiano obtido. *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, *P. intermedia* e T. forsythia foram as mais freqüentemente detectadas. A presença de duas ou mais espécies nas amostras foi observada em 61,7% dos espécimes. Ainda verificou-se que mesmo nas amostras em que DNA desses microrganismos periodontopatogênicos foi detectado, DNA bacteriano não identificado pode ser encontrado. A significativa quantidade de DNA de bactérias periodontopatogênicas sugere que a presença desses microrganismos em ateromas das coronárias não é fruto de contaminação acidental e que, de fato, podem contribuir para o desenvolvimento dessas doenças vasculares.

Palavras-chave: Bactérias. Coronárias. Doenças vasculares. Prevenção.

GALLO, A. J. **Presence of oral microorganisms in atheromatous plaque by real-time PCR.** 2011. Trabalho de Conclusão de Curso- Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2011.

Abstract

In this study, the presence of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Eikenella corrodens*, *Fusobacterium nucleatum-periodonticum-simiae* group, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, and *Tannerella forsythia* in atheromatous plaques from coronary arteries was determined by real-time PCR. Forty-seven patients displaying cardiovascular disease were submitted to periodontal examination and endarterectomy of coronary arteries. Approximately, 60 mg to 100 mg of atherosclerotic tissues were surgically removed and DNA was obtained. The quantitative detection of periodontopathic bacteria was performed by using species-specific TaqMan probe/primer sets. Total bacterial and periodontopathic bacteria DNA were found in 91.5% and 87.2% of the atheromatous plaques. All periodontal bacteria, excepting *F. nucleatum-periodonticum-simiae* group were detected and their DNA represented about 45% of the total bacterial DNA obtained. *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans* and *P. intermedia* were the most often detected. Presence of two or more periodontal species DNA could be observed in 61.7% of the samples. In addition, even in samples in which a single periodontal species was detected, additional unidentified microbial DNA could be observed. The significant amount of periodontopathic bacteria DNA in atherosclerotic tissues samples from patients with periodontitis suggests that the presence of these microorganisms in coronary lesions is not an accidental phenomenon and they may in fact contribute to the development of vascular diseases.

Key-words: Bacterias. Coronary. Vascular diseases. Prevention.

Lista de Figuras

Figura 1 - Avaliação quantitativa da presença de microrganismos periodontopatogênicos em placas ateromatosas obtidas de 47 pacientes submetidos à endarterectomia e com diferentes condições de saúde periodontal. 23

Figura 2- Avaliação quantitativa da presença de microrganismos periodontopatogênicos no sulco gengival ou bolsa periodontal 47 pacientes submetidos à endarterectomia e com diferentes condições de saúde periodontal 24

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Iniciadores e sondas específicos para as reações envolvendo o real-time PCR. 17

Figura 2- Iniciadores utilizados na genotipagem do gene *fimA* de *P. gingivalis* e detecção dos genótipos sorotipo-específicos de *A. actinomycetemcomitans*. 19

Tabela 3 - Parâmetros clínicos periodontais dos pacientes (47) submetidos à endarterectomia das coronárias. 20

Figura 4- Ocorrência dos diferentes microrganismos periodontopatogênicos na microbiota subgengival de pacientes com periodontite (PP) ou periodontalmente sadios (PS), segundo dados obtidos por amplificação do DNA microbiano por real-Time PCR. 21

Figura 5- Associações microbianas em amostras de 47 ateromas das artérias coronárias. 22

Sumário

1- Introdução, Justificativa e Relevância

2- Objetivos

3- Materiais e Métodos

3.1. População estudada

3.2. Coleta das amostras do biofilme subgengival e das placas ateromatosas

3.3. Detecção dos principais periodontopatógenos através do real-time PCR

3.4. Distribuição de diferentes genótipos de *P. gingivalis* e de genótipos sorotipo-específicos de *A. actinomycetemcomitans* nas amostras periodonatis e de placas ateromatosas

4- Análise estatítica

5- Resultados

6- Discussão

7- Conclusões

Referências

1. Introdução, justificativa e relevância.

A literatura vem mostrando que uma parcela significativa dos pacientes com doenças vasculares é portadora de periodontite, sugerindo que as condições de saúde bucal podem estar direta ou indiretamente ligadas a um aumento do risco de doenças cardiovasculares (KOZAROV et al., 2006; AIMETTI et al., 2007). Nesse sentido, condições precárias de higiene e a deterioração das condições periodontais desses pacientes têm mostrado correlações estatisticamente significativas com o risco de lesões cardíacas isquêmicas (KOZAROV et al., 2006; AIMETTI et al., 2007; CAIRO et al., 2008; JOHANSSON et al., 2008).

Embora teorias venham procurando inter-relacionar as observações clínicas que sugerem um papel para as infecções bucais crônicas no risco de desenvolvimento de doenças vasculares, particularmente as lesões ateromatosas, ainda não existem dados suficientes que relacionem de forma coerente as bacteremias envolvendo microrganismos bucais, as condições de saúde do periodonto e o desenvolvimento de alterações inflamatórias na parede dos grandes vasos, em particular as coronárias (LI et al., 2000; CHUN et al., 2005).

Dentre as enfermidades que acometem a parede dos vasos sanguíneos merece destaque a aterosclerose, não apenas pelos danos que promove, mas principalmente por estar associada às demais doenças vasculares. Nesse sentido, o desenvolvimento de lesões ateroscleróticas parece ser relevante no estabelecimento das doenças cardiovasculares, as quais são as principais causas de óbitos entre idosos (CHUN et al., 2005). A aterosclerose tem sido definida como uma enfermidade progressiva que leva ao espessamento gradual da parede das artérias de parede muscular ou elástica, de grande ou médio calibre, estando associada a vários fatores de risco, como diabetes, hipercolestoremia, obesidade, hipertensão arterial, consumo de tabaco, inatividade física e, mais recentemente, infecções bucais e/ou respiratórias crônicas (FIEHN et al., 2005; KOZAROV et al., 2006; PUCAR et al, 2007; CAIRO et al., 2008).

Essas infecções persistentes podem participar da patogênese das lesões ateroscleróticas de diferentes formas, destacando-se os danos diretos ao endotélio vascular (SHEETS et al., 2006), liberação de citocinas e outros mediadores inflamatórios (PUCAR e tel., 2007), recrutando e

ativando células do sistema imunológico e induzindo hiperplasia da parede vascular (ROTH et al., 2007; ZHANG et al., 2008).

A proliferação celular e o processo inflamatório crônico desses ateromas sugerem que o componente infeccioso pode estar, de fato, na origem desse fenômeno (LIBBY, 1996), sendo que alguns microrganismos bucais, em particular os anaeróbios estritos e microaerófilos, como *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* entre outros, estão intimamente associados às doenças periodontais e são capazes de aderir e invadir células epiteliais e endoteliais, além de produzir potentes indutores da síntese e secreção de citocinas pró-inflamatórias (DORN et al., 1998; DORN et al., 1999; CHUN et al., 2005; RUDNEY et al., 2005; SHEETS et al., 2006), além de aumentar a adesão e migração de células inflamatórias na parede vascular (ROTH et al., 2007), possuir metabolismo proteolítico capaz de facilitar sua disseminação nos tecidos (OGAWA et al., 2006; YUAN et al., 2008) e provocar hiperplasia da parede vascular (ZHANG et al., 2008).

Alguns dados sustentam o papel desses mediadores de inflamação induzidos por processos infecciosos, como os níveis de proteína C reativa, que se mostram muito mais elevados em pacientes com infarto do miocárdio (RIDKER et al., 1997). Vários fatores podem alterar os níveis séricos dessa proteína, sendo que a presença de *Porphyromonas gingivalis, Prevotella intermedia, Campylobacter rectus* e *Bacteroides fragilis* no biofilme subgengival se mostrou ligada a níveis elevados dessa proteína na corrente circulatória (NOACK et al., 2001). Desde que um dos aspectos mais relevantes das doenças periodontais é a inflamação tecidual, é possível que a elevação dos níveis dessa proteína como conseqüência da infecção periodontal possa ter relação com o desenvolvimento das doenças vasculares citadas.

Além desses mecanismos, infecções crônicas poderiam potencializar o desenvolvimento das placas ateromatosas e outras enfermidades envolvendo o sistema cardiovascular através da capacidade microbiana de induzir agregação plaquetária, de aumentar a deposição tecidual de colesterol de baixa densidade e lipoproteínas na parede arterial, bem como de estimular a liberação de mediadores químicos pelas células inflamatórias, o que pode acelerar o dano às estruturas vasculares (DORN et al, 1999; SHARMA et al, 2000; LIBBY et al., 2002).

Alguns desses patógenos, como *P. gingivalis*, aparentemente são capazes de se perpetuar através de transmissão entre as células endoteliais (LI et al., 2008) o que poderia estar associado à progressão dos danos às paredes vasculares e a manutenção do quadro inflamatório. Além desse aspecto, em pacientes infectados por *P. gingivalis* foram observados níveis mais elevados de lipídeos na corrente circulatória (CUTLER et al., 1999), sendo que os níveis de colesterol de baixa densidade e o colesterol total se mostram mais elevados em pacientes com doença periodontal (CAIRO et al., 2008).

Estudos têm mostrado a presença de DNA de *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia* e *Prevotella intermedia* em placas ateromatosas através de PCR convencional (HARASZTHY et al., 2000; PUCAR et al., 2007), verificando-se uma correlação entre a freqüência de detecção desse DNA, o comprometimento das condições de saúde periodontal do paciente. (ISHIHARA et al., 2004; AIMETTI et al., 2007) e a idade do paciente (KOZAROV et al., 2006).

Dentre esses microrganismos, *P. gingivalis* parece reunir o mais completo arsenal de fatores de virulência capaz de participar da etiopatogênese das enfermidades vasculares. Entretanto, segundo Häheim et al. (2008), através de estudo sobre a resposta imunológica a esses microrganismos em pacientes portadores de patologias cardiovasculares, nenhum microrganismo bucal isoladamente seria profundamente associado às doenças cardiovasculares, mas associações microbianas entre esses anaeróbios e outros membros do biofilme subgengival poderiam desempenhar diferentes papéis no desenvolvimento das lesões ateromatosas nas coronárias.

A despeito da literatura que suporta o conceito de que microrganismos bucais, especialmente os periodontopatogênicos, podem estar presentes no interior das placas ateromatosas das coronárias (HARASZTHY et al., 2000; KOZAROV et al., 2006; PUCAR et al., 2007), essas evidências são circunstanciais e epidemiológicas e não representam uma prova segura de que essas infecções seriam relevantes (STELZEL et al., 2002; TAYLOR-ROBINSON et al., 2002; FIEHN et al, 2005; LEHTINIEMI et al., 2005).

Nesse particular, em função da elevada sensibilidade do PCR e outros métodos moleculares empregados para avaliar a presença de microrganismos nos ateromas coronarianos, falsos positivos poderiam se originar em função de bacteremias transitórias ou contaminação da

amostra no procedimento cirúrgico. Assim, não se pode afirmar com segurança que o microrganismo detectado colonizava o tecido removido na endarterectomia ou se ele teria sido acidentalmente introduzido. Entretanto, com o emprego de métodos de PCR quantitativo, como o real-time PCR, pode-se quantificar o DNA alvo nas amostras clínicas (JERVOE-STORM et al, 2005) de forma que bacteremias podem ser diferenciadas de infecções crônicas de longa evolução, como poderia ocorrer no interior das placas ateromatosas (KOZAROV et al., 2006).

Na literatura consultada, apenas Kozarov et al. (2006) utilizaram o real-time PCR para alguns dos microrganismos alvo na avaliação da microbiota presente em ateromas, sendo que a contaminação observada sugere que sua origem não estaria ligada à contaminação acidental da amostra estudada. Entretanto, o sistema TaqMan, dentre as modalidades de sistemas disponíveis para o real-time PCR, ainda permitiria, além da quantificação do DNA alvo, uma confirmação de sua identificação, visto que a presença de uma sonda de oligonucleotídeos marcada, ao hibridizar com o DNA alvo, em um sítio situado entre os dois iniciadores empregados na amplificação, confirmaria a identidade do DNA, dando maior credibilidade e reprodutibilidade ao processo como um todo. Assim, no sistema TaqMan, só há a detecção da amplificação quando existirem sítios de anelamento tanto para o par de iniciadores como para a sonda.

2. Objetivos

Assim, desde que a periodontite é a doença infecciosa bucal crônica mais prevalente em adultos brasileiros e evidências sugerem uma ligação entre a mesma e a ocorrência de doenças cardiovasculares, o presente estudo objetivou:

1) detectar e quantificar a população dos principais microrganismos anaeróbios e microaerófilos associados às infecções periodontais em material biológico removido da parede de artérias coronárias com evidências de presença de placas ateromatosas;

2) verificar a presença desses microrganismos nos sítios periodontais desses mesmos pacientes;

3) avaliar a presença de possíveis associações entre diferentes microrganismos bucais nas lesões ateromatosas e no periodonto desses pacientes.

3. Materiais e métodos

3.1. População estudada.

A amostra estudada foi constituída de 47 pacientes (36 homens e 11 mulheres), com idade media de 57,8 ± 12,2 anos, portadores de ateromas extensos nas coronárias submetidos à endarterectomia na Santa Casa de Misericórdia de Araçatuba, Araçatuba-SP, na Santa Casa de Misericórdia de Ponta Grossa, Ponta Grossa-PR, Hospital Evangélico de Londrina, Londrina-PR, e Santa Casa de Misericórdia de Cuiabá, Cuiabá-MT. Os pacientes foram informados sobre os objetivos do estudo assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido. A coleta dos espécimes clínicos foi realizada entre janeiro de 2008 a março de 2009. Os integrantes desse estudo não utilizaram antimicrobianos nos três meses que precederam a coleta dos espécimes clínicos ou apresentaram diabetes, doenças autoimunes ou outras enfermidades sistêmicas não associadas ao sistema cardiovascular.

A história médica dos pacientes e das patologias coronarianas foram obtidas e a seguir realizaram-se os exames clínico-radiográficos periodontais, os quais foram feitos uma semana antes dos procedimentos relativos às endarterectomias das coronárias, como previamente descrito por Cairo et al., (2004). Os pacientes foram divididos de acordo com suas condições periodontais e segundo seu hábito de fumar (DALY et al., 2001).

O exame clínico periodontal foi realizado por um único examinador, o qual avaliava o índice de placa do paciente (O'LEARY et al., 1972), índice de sangramento gengival (AINAMO e BAY, 1975), profundidade clínica de sondagem e nível clínico de inserção (RAMFJORD, 1959), os quais foram avaliados em seis sítios periodontais em cada elemento dental (mesial, central, distal da superfície vestibular e da superfície palatina ou lingual).

Todos os pacientes apresentavam um mínimo de 10 elementos dentais e não requeriam profilaxia antibiótica para o exame clínico periodontal, não tendo sido submetidos a tratamento periodontal nos seis meses que precederam o estudo. Os pacientes foram considerados portadores de periodontite quando apresentavam perda de inserção conjuntiva superior ou igual a 5mm e inflamação nos tecidos periodontais em, pelo menos, 30% dos sítios periodontais presentes (TONETTI e CLAFFEY, 2005). Os pacientes com gengivite apresentaram inflamação gengival,

mas sem evidências clínicas e radiográficas de perda óssea e de inserção conjuntiva periodontal, enquanto os indivíduos periodontalmente sadios não evidenciaram presença de inflamação gengival e perda de inserção conjuntiva. (TONETTI e CLAFFEY, 2005). Quarenta pacientes eram portadores de periodontite crônica e sete indivíduos eram periodontalmente sadios.

O exame radiográfico foi realizado por um único examinador previamente treinado, com filmes periapicais *Kodak Ekta Plus* e uso de posicionadores tipo Hanshin, para avaliar quantidade de osso remanescente e padrão de distribuição óssea. O exame foi realizado com o paciente protegido com colete de chumbo e protetor de tireóide. O filme radiográfico sofreu processamento manual padronizado. O aparelho radiográfico utilizado foi do modelo Spectro II, 50 Kvp (*Dabi-atlante*).

3.2. Coleta das amostras do biofilme subgengival e das placas ateromatosas.

Optou-se pela coleta do sítio periodontal com maior profundidade clínica de sondagem de cada paciente, que também apresentava evidências clínicas de inflamação (para os pacientes com gengivite ou periodontite). A coleta dos espécimes do biofilme subgengival foi realizada após a remoção do biofilme supragengival.

A coleta foi realizada por meio de cones de papel absorvente esterilizados, que eram introduzidos no interior dos sulcos gengivais (ou bolsas periodontais), onde permaneciam por 60 segundos (GAETTI-JARDIM JR. et al., 2008). Todos os espécimes coletados foram transferidos imediatamente para tubos Eppendorf contendo água ultrapura Milli-Q e submetidos ao processamento laboratorial para extração do DNA microbiano. Quando não era possível a extração imediata do DNA, as amostras clínicas eram mantidas em nitrogênio líquido a -196^{o}C.

Na cirurgia de endarterectomia, aproximadamente 100 mg de tecido foram removidas, assepticamente, das placas ateromatosas e transferidas para microtubos contendo 1ml de água ultrapura MilliQ e armazenado a -196^{o}C. O DNA das amostras clínicas nos criotubos com água Milli Q foi extraído através do "kit" QIAamp DNA Tissue Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Alemanha), segundo as especificações do fabricante.

3.3. Detecção dos principais periodontopatógenos através de real-time PCR.

Foram utilizadas seqüências baseadas nos genes da região 16SrRNA do genoma, específicas para os organismos em estudo (MAEDA et al., 2003; KUBONIWA et al., 2004; NONNENMACHER et al., 2004; JERVOE-STORM et al., 2005; SUZUKI et al., 2005; PRICE et al., 2007), como apresentado na Tabela 1.

A emissão fluorescente desse sistema depende de uma sonda (equivalente a um terceiro iniciador) que anela especificamente entre os dois iniciadores utilizados, o que torna o processo mais preciso e específico. Além desse aspecto, só há a detecção da amplificação quando existem sítios de anelamento tanto para o par de iniciadores como para a sonda. As sondas fluorescentes utilizadas no sistema TaqMan foram marcadas no sentido 5′ com 6-carboxifluoresceína (*reporter dye*) e no sentido 3′ com 6-carboxitetrametilrodamina (*quencher dye*).

As reações de amplificação estão sendo realizadas em volumes finais de 25 µl, contendo 1X Master Mixture TaqMan Universal (tampão PCR, dNTP, AmpliTaq Gold, sinal de referência interno, [6-carboxi-′*x*′-rodamina], uracil *N*-glicosidase-UNG, $MgCl_2$; Applied Biosystem, Foster City, Calif), 900 nM de cada iniciador, 200 nM da sonda e 5 µl do DNA.

Essas reações de amplificação foram realizadas em aparelho Rotorgene 600 (Corbett Life Science, Mortlake, New South Wales, Australia). As condições dos ensaios consistiam de uma etapa inicial de desnaturação a 95^{o}C por 10 minutos, seguida de 40 ciclos de 95^{o}C por 15s e temperatura de anelamento específicas para cada iniciador, por 60 s. A curva-padrão para cada microrganismo alvo foi construída a partir de diluições conhecidas de DNA de cepas de referência. A curva "threshold" (C_T) foi definida como o ciclo no qual a fluorescência torna-se detectável acima da fluorescência de fundo e inversamente proporcional ao logaritmo do número inicial de cópias empregado.

Como controle positivo dos testes de amplificação do DNA, amostras de DNA purificado de *A. actinomycetemcomitans* ATCC 29523, *E. corrodens* ATCC 51724, *F. nucleatum* ATCC 10953, *P. gingivalis* ATCC 33277, *P. intermedia* ATCC 25611, *P. nigrescens* ATCC 33563, e *T. forsythia* ATCC 43037 foram utilizadas. Como controle negativo, empregou-se o próprio TaqMan Mix sem amostra de DNA externo.

Tabela 1. Iniciadores e sondas específicos para as reações envolvendo o real-time PCR.

Microrganismos	Seqüências dos oligonucleotídeos (5'→3')	Referência
A. actinomycetemcomitans		
Forward	CTT ACC TA CTC TTG ACA TCC GAA	Maeda *et al.*, 2003
Reverse	ATG CAG CAC CTG TCT CAA AGC	
sonda	AGA ACT CAG AGA TGG GTT TGT GCC TTA G	
E. corrodens		
Forward	AGG CGA CGA AGG ACG TGT AA	Price *et al.*, 2007
Reverse	ATC ACC GGA TCA AAG CTC TAT TG	
sonda	CCT GCG AAA AGC	
grupo *Fusobacterium nucleatum-periodonticum-simiae*		
Forward	CGC AGA AGG TGA AAG TCC TGT AT	Suzuki *et al.*, 2005
Reverse	TGG TCC TCA CTG ATT CAC ACA GA	
sonda	ACT TTG CTC CCA AGT AAC ATG GAA CAC GAG	
P. gingivalis		
Forward	TGC AAC TTG CCT TAC AGA GGG	Nonnenmacher *et al.*, 2004
Reverse	ACT CGT ATC GCC CGT TAT TC	
sonda	AGC TGT AAG ATA GGC ATG CGT CCC ATT AGC TA	
P. intermedia		
Forward	CCA CAT ATG GCA TCT GAC GTG	Nonnenmacher *et al.*, 2004
Reverse	TCA ATC TGC ACG CTA CTT GG	
sonda	ACC AAA GAT TCT ACG GTG GAG GAT GGG	
P. nigrescens		
Forward	CCG TTG AAA GAC GGC CTA A	Kuboniwa *et al.*, 2004
Reverse	CCC ATC CCT TAC CGG RA	
sonda	CCC GAT GTG TTT CAT TGA CGG CAT C	
T. forsythia		
Forward	AGC GAT GGT AGC AAT ACC TGT C	Kuboniwa *et al.*, 2004
Reverse	TTC GCC GGG TTA TCC CTC	
sonda	CCT CTG TAT ACG CCA TTG TAG CAC GTG TGT	
Universal		
Forward	TGG AGC ATG TGG TTT AAT TCG A	Nonnenmacher *et al.*, 2004
Reverse	TGC GGG ACT TAA CCC AAC A	
sonda	CAC GAG CTG ACG ACA (AG)C CAT GCA	

3.4. Distribuição de diferentes genótipos de *P. gingivalis* e de genótipos sorotipo- específicos de *A. actinomycetemcomitans* nas amostras periodontais e de placas ateromatosas.

Para avaliar a existência de vínculos entre as amostras dos principais microrganismos detectados das placas ateromatosas e no biofilme dos pacientes estudados, optou-se por realizar a genotipagem de *P. gingivalis* e a detecção dos diferentes genótipos sorotipo específicos de *A.*

actinomycetemcomitans nas amostras de ateromas e periodontais em que esses microrganismos estavam presentes.

Os testes foram realizados de acordo com a metodologia previamente descrita para *P. gingivalis* (AMANO et al., 1999; NAKAGAWA et al., 2000; NAKAGAWA et al., 2002) e *A. actinomycetemcomitans* (KAPLAN et al., 2001; SUZUKI et al., 2001). A Tabela 2 apresenta os iniciadores que foram utilizados com esse objetivo. As amostras que se mostraram positivas para cada um dos dois microrganismos alvos acima mencionados foram submetidas a testes para avaliar a presença dos diferentes genótipos desses microrganismos empregando-se iniciadores específicos através de PCR convencional.

As reações de amplificação do DNA foram realizadas em volumes de 25 μL contendo 1X PCR/Mg^{++} buffer (Boehring Mannheim, Indianapolis, IN, USA), 0,2 mM de cada dNTP (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA), 0,5 U *Taq* DNA polimerase (Invitrogen do Brasil, São Paulo, SP, Brasil), 0,4 μM de cada par de iniciadores (Invitrogen) e 10 ng of DNA. As reações relativas a *P. gingivalis* foram realizadas em termociclador programado para: 94^{o}C (5 min), seguido de 35 ciclos a 94^{o}C por 30 s, 58^{o}C por 30 s., 72^{o}C por 1 min.; e 72^{o}C por 7 min., para permitir a extensão final das cadeias de DNA. Para *A. actinomycetemcomitans*, as reações consistiram de 94^{o}C (5 min), seguido de 36 ciclos a 94^{o}C por 30 s, 52^{o}C por 30 s., 72^{o}C por 1 min.; e 72^{o}C por 5 min.

A seguir, os amplicons eram observados após eletroforese em gel contendo agarose (1%), em tampão 1x TBE (1 M Tris, 0,9 M ácido bórico acid, 0,01 M EDTA, pH 8.4) buffer (Invitrogen, SP, Brazil), e impregnação por brometo de etídio (0,5 mg/mL), em transiluminador de luz UV.

Tabela 2. Iniciadores utilizados na genotipagem do gene *fimA* de *P. gingivalis* e detecção dos genótipos sorotipo-específicos de *A. actinomycetemcomitans*.

Iniciadores	Seqüência (5′ →3′)	Amplicon (pb)
P. gingivalis		
Pg fimA Tipo I	CTG TGT GTT TAT GGC AAA CTT C AAC CCC GCT CCC TGT ATT CCG A	392
fimA Tipo Ib	CAG CAG AGC CAA AAA CAA TCG TGT CAG ATA ATT AGC GTC TGC	271
fimA Tipo II	ACA ACT ATA CTT ATG ACA ATG G AAC CCC GCT CCC TGT ATT CCG A	257
fimA Tipo III	ATT ACA CCT ACA CAG GTG AGG C AAC CCC GCT CCC TGT ATT CCG A	247
fimA Tipo IV	CTA TTC AGG TGC TAT TAC CCA A AAC CCC GCT CCC TGT ATT CCG A	251
fimA Tipo V	AAC AAC AGT CTC CTT GAC AGT G TAT TGG GGG TCG AAC GTT ACT GTC	462
A. actinomycetemcomitans		
sorotipo a	5’-GCA ATG ATG TAT TGT CTT CTT TTG GA-3’ 5’-CTT CAG TTG AAT GGG GAT TGA CTA AAA C-3’	428
sorotipo b	5’-CGG AAA TGG AAT GCT TGC-3’ 5’-CTG AGG AAG CCT AGC AAT-3’	298
sorotipo c	5’-AAT GAC TGC TGT CGG AGT-3’ CGC TGA AGG TAA TGT CAG-3’	559
sorotipo d	5’-TTA CCA GGT GTC TAG TCG GA-3’ 5’-GGC TCC TGA CAA CAT TGG AT-3’	690
sorotipo e	5’-CGT AAG CAG AAG AAT AGT AAA CGT-3’ 5’-AAT AAC GAT GGC ACA TCA GAC TTT-3’	211
sorotipo f	5’-ARA AYT TYT CWT CGG GAA TG-3’ 5’-CCT TTA TCA ATC CAG ACA GC-3’	232

4. Análise estatística

Os valores médios e desvio padrão para as populações dos diferentes microrganismos alvos presentes nas placas ateromatosas e no biofilme subgengival foram calculados. A análise estatística foi realizada empregando-se o “software” “Statistical Package for the Social Sciences” (SPSS Incs v.13, Chicago, IL, USA). Inter-relações entre os parâmetros clínicos e microbiológicos foram avaliadas por regressão logística multivariada, sendo que diferenças entre os parâmetros clínicos e microbiológicos entre os pacientes examinados foram avaliadas segundo

o teste de Mann-Whitney, Qui-quadrado e teste exato de Fisher. Adotou-se o nível de significância de 5%.

5. Resultados

As condições periodontais dos pacientes estudados podem ser observadas na Tabela 3. Verifica-se, pelos dados apresentados, que as condições periodontais dos pacientes com periodontite eram extremamente precárias, denotando uma condição infecciosa bastante avançada e generalizada.

Tabela 3. Parâmetros clínicos periodontais dos pacientes (47) submetidos à endarterectomia das coronárias.

Parâmetros Clínicos	Pacientes com periodontite (N= 40)	Indivíduos saudáveis (N=7)
Índice de Placa (%)	58,5 ± 17,8*	41,8 ± 10,3
Índice de sangramento (%)	52,3 ± 22,1	17,5 ± 11,4
Profundidade Clínica de Sondagem (mm)	5,2 ± 21	1,8 ± 0.6
Número de dentes	11,5 ± 3.8	14,5 ± 5.1

*Médias ± desvio padrão

Nas amostras de ateromas removidas de pacientes com periodontite, presença de microrganismos foi observada em 94,9% das amostras. Dados iniciais evidenciam que na maioria dos ateromas coletados, observa-se uma associação de diferentes microrganismos, com destaque para *P. gingivalis* e *P. intermedia*.

A presença dos diferentes microrganismos no sulco gengival e bolsas periodontais é apresentada na **Tabela 4**. Com exceção das fusobactérias, a prevalência de todos os microrganismos alvo foi estatisticamente mais elevada nos pacientes com periodontite.

Nas placas ateroscleróticas, DNA microbiano foi detectado em 91,5% das amostras, enquanto DNA dos microrganismos alvo foi observado em 87,2% das amostras (**Tabela 5**). Deve-se ressaltar que, na maioria das placas ateromatosas, observou-se a presença de DNA de vários microrganismos estudados, juntamente com DNA de patógenos não identificados. Dentre os microrganismos capazes de estabelecer infecções mistas nos ateromas, destacam-se *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia* e *T. forsythia*. A detecção de duas espécies

ou mais espécies microbianas alvo nas amostras ateroscleróticas foi observada em 61,7% dos espécimes, sendo que em 25,5% dos casos observou-se monoinfecção (**Tabela 5**).

Tabela 4. Ocorrência dos diferentes microrganismos periodontopatogênicos na microbiota subgengival de pacientes com periodontite (PP) ou periodontalmente sadios (PS), segundo dados obtidos por amplificação do DNA microbiano por real-Time PCR.

Microrganismo	**Condição de saúde periodontal N(%)**	
	PS N=7	**PP N=40**
A. actinomycetemcomitans	0 (0,0)	19 (47,5)
E. corrodens	2 (28,6)	28 (70,0)
F. nucleatum	4 (57,1)	31 (77,5)
P. gingivalis	2 (28,6)	31 (77,5)
P. intermedia	2 (28,6)	29 (72,5)
P. nigrescens	1 (14,3)	15 (37,5)
T. forsythia	0 (0,0)	25 (62,5)

Dentre os microrganismos avaliados, *P. gingivalis* foi o mais prevalente, tendo sido detectado de 68,1% dos espécimes, seguido de *P. intermedia* (51,1%), *A. actinomycetemcomitans* (34,0%), *T. forsythia* (34,0%), *E. corrodens* (6,4%) e *P. nigrescens* (4,3%). Dentre os microrganismos mais prevalentes, apenas *T. forsythia* não foi detectado em monoinfecções.

Tabela 5. Associações microbianas em amostras de 47 ateromas das artérias coronárias.

Combinações de microrganismos	Prevalência N (%)
Aa + Pg + Pi + Tf	4 (8,5)
Aa + Pg + Pi	6 (12,8)
Pg+ Pi+ Tf	5 (10,6)
Aa + Pg + Tf	2 (4,3)
Aa +Pn+ Tf	2 (4,3)
Pg + Pi	4 (8,5)
Pi + Tf	3 (6,4)
Pg + Ec	3 (6,4)
Aa	2 (4,3)
Pg	8 (17,0)
Pi	2 (4,3)
Total de amostras positivas para algum microrganismo alvo	41 (87,2)
Amostras com DNA de eubactérias	43 (91,5)

Aa: A. actinomycetemcomitans;Ec: E. corrodens; Pg: P. gingivalis; Pi: P. intermedia; Pn: P. nigrescens; Tf: T. forsythia.

A presença dos microrganismos nas placas ateromatosas não mostrou relação com a idade dos pacientes (teste exato de Fisher, $P = 0.201$), gênero (teste exato de Fisher, $P = 0.618$), número médio de dentes (teste exato de Fisher, $P = 0.377$), ou tabagismo (teste exato de Fisher, $P = 0.108$).

As populações desses microrganismos, tanto nas placas ateromatosas, quanto nos sítios periodontais são apresentadas nas **Figuras 1** e **2**, respectivamente. Em termos médios, o DNA dos microrganismos periodontais aqui estudados representou 45,9% de todo DNA de eubactérias nas placas ateromatosas, sendo que *P. gingivalis* isoladamente representou 18,2% do DNA presente, enquanto as fusobactérias não foram detectadas.

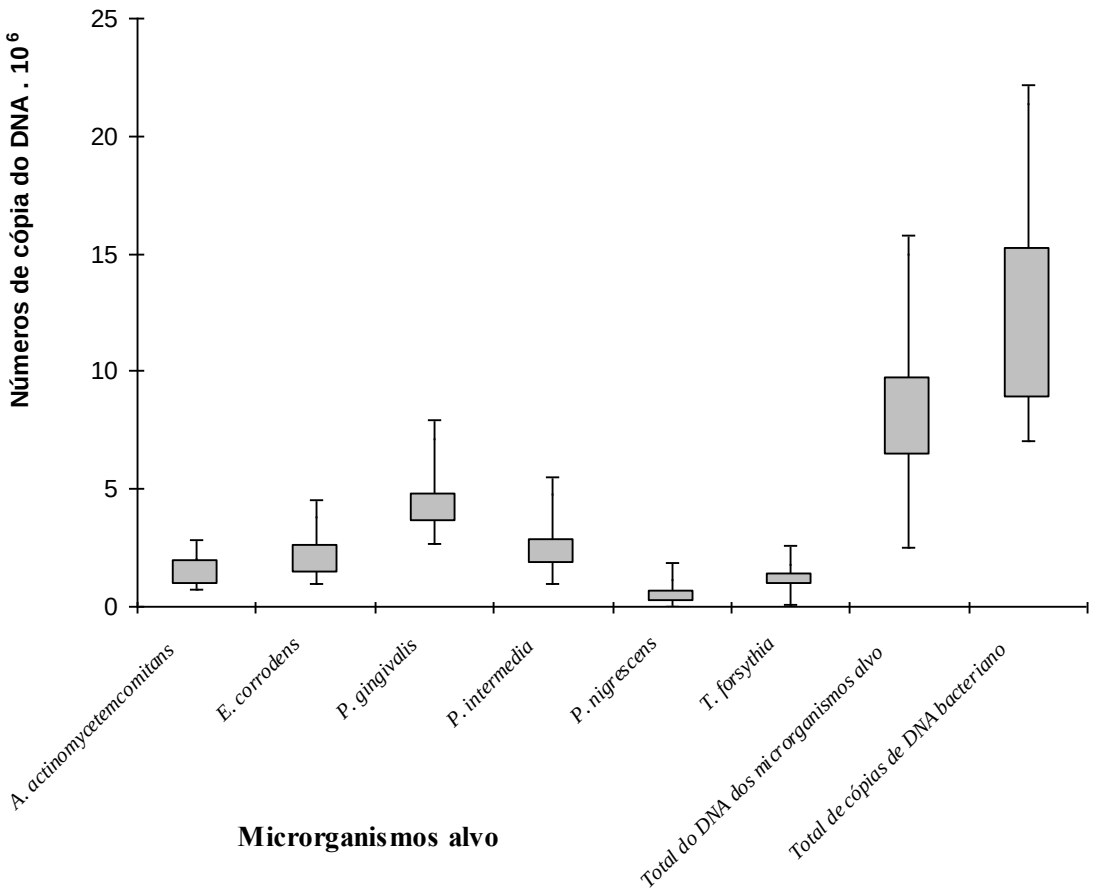

Figura 1. Avaliação quantitativa da presença de microrganismos periodontopatogênicos em placas ateromatosas obtidas de 47 pacientes submetidos à endarterectomia e com diferentes condições de saúde periodontal.

A participação dos diferentes microrganismos alvo na microbiota detectada nos ateromas mostrou correlação estatística com as populações dos microrganismos alvo nos sítios periodontais dos mesmos pacientes, com exceção das fusobactérias, que forma prevalentes e numerosas no sulco gengival e bolsas periodontais, mas não foram detectas nos ateromas. Dentre os microrganismos estudados, observou-se maior correlação entre níveis periodontais e e ateromatosos para *P. gingivalis* e *P. intermedia* (ANOVA, P=0.012 e P=0.034, respectivamente).

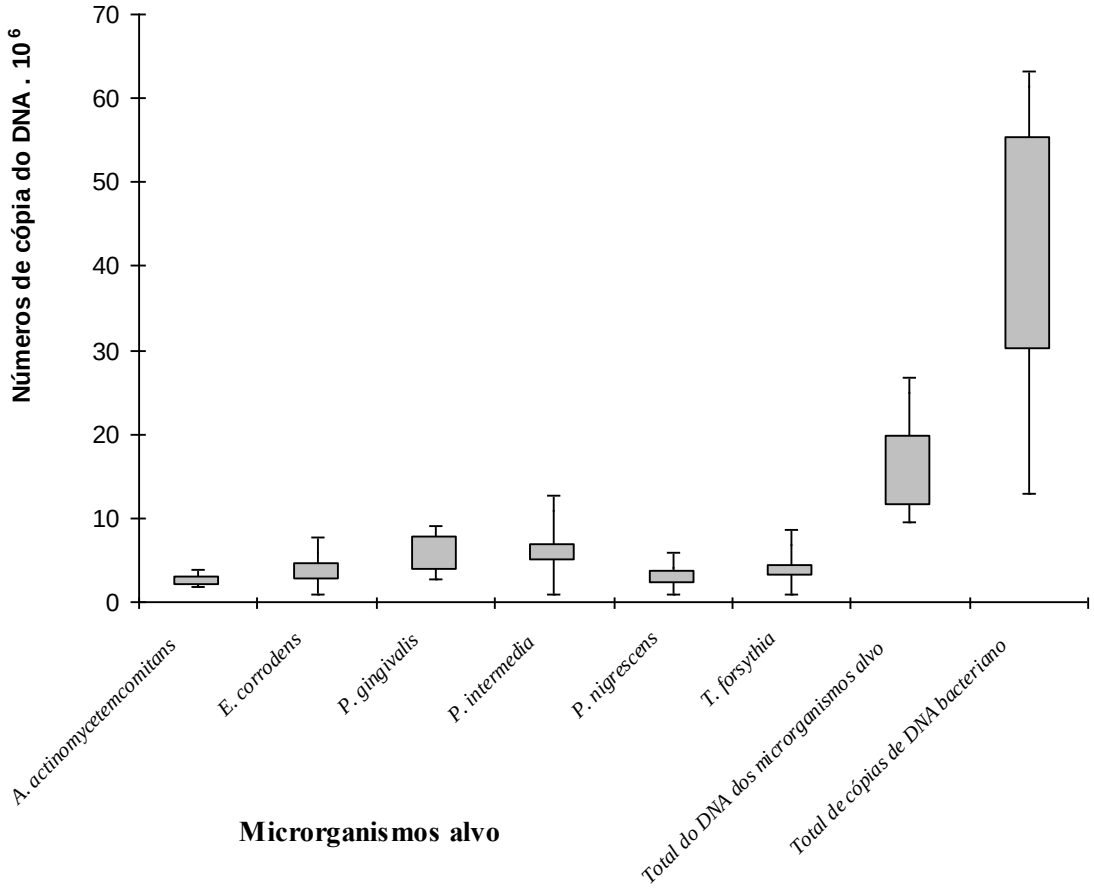

Figura 2. Avaliação quantitativa da presença de microrganismos periodontopatogênicos no sulco gengival ou bolsa periodontal 47 pacientes submetidos à endarterectomia e com diferentes condições de saúde periodontal.

Quanto aos genótipos fimbriais de *P. gingivalis*, nas amostras de biofilme subgengival positivas (N=33), 19 (57,6% das amostras positivas) apresentavam o tipo II, 14 o tipo IV (42,4%), três o tipo V (9,1%), enquanto quatro amostras (12,1%) que foram amplificadas com os iniciadores voltados o gene 16S rDNA não puderam ser genotipadas pelas seqüências utilizadas no presente estudo. Observou-se a presença de mais de um tipo fimbrial em uma mesma amostra periodontal em 21,2% dos espécimes coletados.

De forma geral, as 32 amostras de ateromas positivas para esse anaeróbio apresentavam os mesmos genótipos fimbriais observados no periodonto; 20 (62,5%) apresentavam o tipo II, 11

apresentavam o tipo IV (34,4%), 5 tinham o tipo V (15,6%) e outras 9 amostras não puderam ser genotipadas (28,1%). Da mesma forma que os dados obtidos do periodonto, 31,3% das amostras apresentavam mais do que um genótipo de *P. gingivalis*. Em apenas 6 pacientes as amostras de genótipos observadas nas placas ateromatosas não foram observadas no periodonto do paciente (18,8%), enquanto em 15,2% das amostras o genótipo observado no periodonto não correspondia ao detectado nas placas ateromatosas.

Quanto aos genótipos sorotipo-específicos de *A. actinomycetemcomitans*, detectados nos sítios periodontais, observou-se a presença de 9 (47,4%) amostras sorotipo a, 7 sorotipo c (36,8%), 3 amostras sorotipo b (15,8%) e 4 (21,1%) amostras que não puderam ser tipadas. Nas placas ateromatosas, todos as 16 amostras positivas eram dos genótipos sorotipos específicos a (sorotipo a: 10 amostras, 62,5%) ou c (sorotipo c: 6 amostras, 37,5%). Em dois pacientes com periodontite a ocorrência de A. actinomycetemcomitans no periodonto não esteve associado à presença desse microrganismo nas placas ateromatosas, sendo que três pacientes albergando o sorotipo a nas placas ateromatosas não apresentavam esse microrganismo na cavidade bucal, nos testes realizados.

6. Discussão

A presença de bactérias ligadas às doenças periodontais, particularmente as periodontites, é associada ao conceito de que esses microrganismos, como *A. actinomycetemcomitans* e *P. gingivalis* podem invadir as células endoteliais e induzir uma reação inflamatória crônica, persistente (YUAN *et al.,* 2008). Além disso, *A. actinomycetemcomitans, F. nucleatum, P. gingivalis, P. intermedia*, *P. nigrescens* e outros anaeróbios obrigatórios e facultativos da microbiota bucal podem degradar imunoglobulinas, prevenindo a instalação do complexo lítico do sistema complemento, além de produzirem endo e exotoxinas capazes de exacerbar o dano tecidual e manter o quadro inflamatório (FIVES-TAYLOR, 1999; BROOK, 2007). Esses fatores de virulência podem colaborar para manter a viabilidade microbiana durante quadros bacterêmicos, como os que ocorrem em procedimentos cirúrgicos, na escovação dental e no tratamento odontológico (DORN *et al.,* 1999; DALY *et al.,* 2001)

A literatura tem relacionado a presença de *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, *T. forsythia* e *P. intermedia* em placas ateromatosas com a severidade da doença periodontal e a

idade dos pacientes (HARASZTHY *et al.,* 2000; PUCAR *et al.,* 2007). No presente estudo, a prevalência de DNA bacteriano nas placas ateromatosas foi mais elevada do que a descrita por Ishihara *et al.* (2004) e Padilla *et al.* (2006), aproximando-se dos dados de Lehtiniemi *et al.* (2005) e Kozarov *et al.* (2006), sendo que esses últimos autores utilizaram o PCR em tempo real com a metodologia do "SYBR® Green PCR". A elevada frequênia de DNA microbiano nas placas ateroscleróticas também está de acordo com os dados de Fiehn *et al.* (2005) e Aimetti *et al.* (2007), os quais observaram a presença de DNA bacteriano em entre 90-100% das lesões ateromatosas estudadas. Outro aspecto que merece destaque é o percentual ocupado pelo DNA dos microrganismos periodontopatogênicos estudados no total de DNA microbiano nas amostras.

Por outro lado, devido à elevada sensibilidade dos métodos moleculares baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR), questionamentos sempre existiram a possibilidade do DNA detectado ter origem na manipulação do tecido e não representar de fato uma verdadeira contaminação das placas ateromatosas (SANZ *et al.*, 2004). Contudo, a elevada quantidade de DNA bacteriano observada na maioria das amostras de tecido aterosclerótico torna muito pouco provável a possibilidade de contaminação acidental durante a manipulação tecidual e, juntamente com a correlação entre os genótipos fimbriais de P. gingivalis e sorotipos de A. actinomycetemcomitans, sugerem uma colonização estável e duradoura das placas ateromatosas por esses microrganismos bucais.

Nesse sentido, a reconhecida capacidade de microrganismos anaeróbios Gram-negativos bucais em evadir o sistema imunológico e apresentar atividade proteolítica, freqüentemente associadas à infecções agudas e supurativas na região de cabeça e pescoço, (BROOK, 2008), podem colaborar para a manutenção do microrganismo no tecido, embora esse fenômeno seja hipotético e ainda não confirmado.

A elevada prevalência dos microrganismos alvo, como *P. gingivalis*, *P. intermedia*, T. forsythia e *A. actinomycetemcomitans*, nas placas ateromatosas, pode refletir as precárias condições periodontais dos pacientes, as quais mostram o quão deterioradas se encontravam por ocasião da endarterectomia, com bolsas periodontais profundas e de longo histórico de periodontite, sendo que tais microrganismos são quase universalmente associados a quadros de perda de inserção conjuntiva, destruição óssea e inflamação (EBERSOLE *et al.,* 2008;

HERRERA *et al*., 2008).

O predomínio desses microrganismos também pode ter relação com sua capacidade de persistir na parede do tecido vascular e se manter no interior de células do hospedeiro (LI *et al.,* 2008). A existência de possíveis correlações entre a infecção por esses organismos e o sistema cardiovascular se aprofunda quando se verifica que pacientes infectados por *P. gingivalis* apresentam maior lipidemia, com níveis significativamente mais elevados de LDL e colesterol, sendo que esses fatores também parecem colaborar para o desenvolvimento de ateromas (CUTLER *et al.,* 1999; CAIRO *et al.,* 2008).

A deposição de colesterol e lipoproteínas na parede vascular durante o desenvolvimento de lesões ateromatosas, bem como a subsequente fibrose, acabam por reduzir o potencial redox no interior do ateroma em formação, o que facilitaria a proliferação dos microrganismos alvo do presente estudo, em particular *P. gingivalis*, *T. forsythia* e *P. intermedia*, os quais são considerados os microrganismos mais prevalentes em placas ateromatosas (FIEHN *et al.,* 2005). Além desse aspecto, a elevada prevalência de microrganismos Gram-negativos, no interior dessas lesões, deve, em função da quantidade de endotoxina, facilitar a liberação de citocinas ligadas ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares (FIEHN *et al.,* 2005).

Embora a freqüência de detecção desses microrganismos pareça, a primeira vista, muito elevada, ela se assemelha a outros estudos com pacientes portadores de periodontite crônica avançada, uma vez que tais doenças têm caráter acumulativo e podem funcionar como fonte de microrganismos em quadros bacterêmicos freqüentes, permitindo a disseminação dos mesmos para órgãos distantes. Por outro lado, esses microrganismos são significativamente mais raros em pacientes mais jovens, como evidenciado por Kozarov *et al.* (2006).

Deve-se ressaltar que a presença de infecções mistas nas placas ateromatosas pode ser de relevância no desenvolvimento das mesmas, desde que dados imunológicos suportam o conceito de que associações entre 3 ou mais microrganismos estariam epidemiologicamente implicadas com a patogênese das enfermidades cardiovasculares como a aterosclerose e o infarto do miocárdio (HAHEIM *et al.,* 2008). Os resultados do presente estudo reforçam essa posição, visto que a ocorrência de infecções mistas representou fenômeno muito mais freqüente do que as monoinfecções, o que pode refletir a existência das complexas interações ecológicas que se

desenvolvem na cavidade bucal entre os membros do biofilme dental (KOLENBRANDER, 2000; BROOK, 2007).

7. Conclusões

Os resultados do presente estudo permitem as seguintes conclusões:

a) a presença de microrganismos associados com as periodontites e outras infecções bucais foi bastante freqüente no interior de placas ateromatosas;

b) *P. gingivalis, P. intermedia, T. forsythia* e A. actinomycetemcomitans foram os microrganismos periodontopatogênicos mais freqüentemente detectados nas placas ateromatosas, dentre os microrganismos estudados e representam parcela bastante significativa do conteúdo séptico dessas lesões vasculares;

c) A grande quantidade de DNA desses microrganismos no interior dos ateromas, associado com o padrão de genotipagem de duas das mais importantes espécies detectadas sugerem que a contaminação observada não é acidental e as infecções bucais podem, de fato, se comportar como fonte de infecção do sistema cardiovascular.

Referências

AIMETTI, M.; ROMANO, F.; NESSI, F. Microbiologic analysis of periodontal pockets and carotid atheromatous plaques in advanced chronic periodontitis patients. **J. Periodontol.**, v.78, p.1718-23, 2007.

AMANO, A. et al. Distribution of *Porphyromonas gingivalis* strains with *fimA* genotypes in periodontitis patients. **J. Clin. Microbiol**. v. 37, p.1426-30, 1999.

AINAMO, J.; BAY, I. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. **Int. Dent. J.**, v. 25, n. 4, p. 229-35, 1975.

BROOK, I. The role of anaerobic bacteria in upper respiratory tract and other head and neck infections. **Cur. Infect. Dis. Reports,** v. 9, p. 208-1, 2007.

BROOK, I. Microbiology and management of joint and bone infections due to anaerobic bacteria. **J. Orthop. Sci**. v.13, p.160-9, 2008.

CAIRO, F. et al. Severe periodontitis in young adults is associated with sub-clinical atherosclerosis. **J. Clin. Periodontol**,, v. 35, p. 465-72, 2008.

CAIRO, F. Periodontal pathogens in atheromatous plaques. A controlled clinical and laboratory trial. **J. Periodontal Res**., v.39, p. 442-6, 2004.

CHUN Y-H. P. et al. Biological foundation for periodontitis as a potential risk factor for atherosclerosis. **J. Periodont. Res**., v. 40, p. 87-95, 2005

CUTLER C.W. et al. Association between periodontitis and hyperlipidemia: cause or effect? **J. Periodont**., v. 70, p. 1429-34, 1999.

DALY, C. G. et al. Bacteremia due to periodontal probing: a clinical and microbiological investigation. **J. Periodontol**., v. 72, p. 210-4, 2001.

DORN, B. R.; LEUNG, K.-P.; PROGULSKE-FOX, A. Invasion of human oral epithelial cells by *Prevotella intermedia*. **Infect. Immun.**, v. 66, p. 6054-7, 1998.

DORN, B. R.; DUNN Jr, W. A.; PROGULSKE-FOX, A. The invasion of human coronary artery cells by periodontal pathogens. **Infect. Immun**., v.67, p.5792-8, 1999.

EBERSOLE, J. L. et al. Microbiologic and immunologic characteristics of periodontal disease in Hispanic Americans with type 2 diabetes. **J. Periodontol**., v. 79, p. 637-46, 2008.

FIEHN N.-E. et al. Identification of periodontal pathogens in atherosclerotic vessels. **J. Periodontol**., v. 76, p. 731-736, 2005.

FIVES-TAYLOR, P.M. et al. Virulence factors of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **Periodontol 2000**, v. 20, p. 136-67, 1999.

GAETTI-JARDIM Jr E. et al. Occurrence of yeasts, enterococci and other enteric bacteria in subgingival biofilm of HIV-positive patients with chronic gingivitis and necrotizing periodontitis. **Braz. J. Microbiol**., v. 39, p. 257-261, 2008.

HAHEIM, L. et al. Antibody levels to single bacteria or in combination evaluated against myocardial infarction. **J. Clin. Periodontol**., v. 35, p. 473-8, 2008.

HARASZTHY, V. I. et al. Identification of periodontal pathogens in atheromatous plaques. **J. Periodontol.**, v. 71, p. 1554-1560, 2000.

HERRERA, D. et a. Subgingival microbial profiles in chronic periodontitis patients from Chile, Colombia and Spain. J Clin Periodontol., v. 35, p. 106-13, 2008.

ISHIHARA, K. et al. Correlation between detection rates of periodontopathic bacterial DNA in coronary stenotic artery plaque and in dental plaque samples, **J. Clin. Microbiol**., v. 42, p. 1313-15, 2004.

JERVOE-STORM, P. M. et al. Comparison of culture and real-time PCR for detection and quantification of five putative periodontopathogenic bacteria in subgingival plaque samples. **J. Clin. Periodontol**., v.32, n. 7, p.778-83, 2005.

JOHANSSON, C. S. et al. Periodontal conditions in patients with coronary heart disease: a case control study. **J. Clin. Periodontol.**, v. 35, p.199-205, 2008.

KAPLAN, J.B. et al. Structural and genetic analyses of O polysaccharide from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotype f. **Infect. Immun.**, v. 69**,** p. 5375-84, 2001.

KOZAROV, E. et al. Detection, of bacterial DNA in atheromatous plaques by quantitative PCR. **Microb. Infect**., v. 8, p. 687-93, 2006.

KOLENBRANDER, P. E. Oral microbial communities: biofilms, interactions, and genetic systems. **Annu Rev Microbiol**, v.54, p.413-437, 2000.

KUBONIWA, M. et al. Quantitative detections of periodontal pathogens using real-time polymerase chain reaction with TaqMan probes. **Oral Microbiol. Immunol.,** v. 19, n. 3, p. 168-76, 2004.

LEHTINIEMI, J. et al. Identification of different bacterial DNAs in human coronary arteries. **Eur. J. Clin. Invest**., v. 35, p. 13-16, 2005.

LI L. et al. Intracellular survival and vascular cell-to-cell transmission of *Porphyromonas gingivalis*. **BMC Microbiol**., v. 8, p. 26-37, 2008.

LI, X. et al. Systemic diseases caused by oral infection. **Clin. Microbiol. Rev**., v. 13, p. 547-58, 2000.

LIBBY, P. Atheroma: more than mush. **Lancet**, v. 348 (suppl. 1), s4-s7, 1996.

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

MAEDA, H. et al. Quantitative real-time PCR using TaqMan and SYBR Green for *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *tet*Q and total bacteria. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.** , v. 39, p. 81-6, 2003.

NAKAGAWA, I. et al. Distribution and molecular characterization of *Porphyromonas gingivalis* carrying a new type of *fimA* gene. **J. Clin. Microbiol**., v. 38, p. 1909-1914, 2000.

NAKAGAWA, I. et al. Functional differences among *fimA* variants of *Porphyromonas gingivalis* and their effects on adhesion to and invasion of human epithelial cells. **Infect Immun**., v. 70, p. 277-285, 2002.

NOACK, B. et al. Periodontal infections contribute to elevated systemic C-reactive protein level. **J. Periodontol.**, v. 72, p. 1221-1227, 2001.

NONNENMACHER, C. et al. Quantitative detection of periodontopathogens by real-time PCR. **J. Microbiol. Methods**, v. 59, p.117-25, 2004.

O'LEARY, T. J.; DRAKE, R. B.; NAYLOR, J. E. The plaque control record. **J. Periodontol.**, v. 43, p. 38-56, 1972.

OGAWA, A. T. et al. Characterization of proteolytic activities of *Fusobacterium nucleatum*. **J. Endod.**, v. 32, p. 521-523, 2006.

PADILLA, C. Periodontal pathogens in atheromatous plaques isolated from patients with chronic periodontitis. **J. Periodont. Res**., v. 41, p. 350-3, 2006.

PRICE, R. R. et al. Targeted profiling of oral bacteria in human saliva and in vitro biofilms with quantitative real-time PCR. **Biofouling**, v. 23, p. 203-221, 2007.

PUCAR A. et al. Correlation between atherosclerotic and periodontal putative pathogenic bacterial infections in coronary and internal mammary arteries. **J. Periodontol.**, v. 78, p. 677-682, 2007.

RAMFJORD, S. P. Indices for prevalence and incidence of periodontal disease. **J. Periodontol**., v. 30, p. 51-9, 1959.

RIDKER, P. M. et al. Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease in apparently

healthy men**. N. Engl. J. Med**., v. 336, p. 973-979, 1997.

ROTH, G. A. et al. Infection with a periodontal pathogen increases mononuclear cell adhesion to human aortic endothelial cells. **Atherosclerosis**, v. 190, p. 271-281, 2007.

RUDNEY, J. D.; CHEN, R.; SEDGEWICK, G. J. *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, and *Tannerella forsythensis* are components of a polymicrobial intracellular flora within human buccal cells. **J. Dent. Res.**, v. 84, p. 59–63, 2005.

SANZ, M. et al. Methods of detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythensis* in periodontal microbiology, with special emphasis on advanced molecular techniques: a review. **J. Clin. Periodontol.,** v. 31, p. 1034-47, 2004.

SHARMA, A. et al. *Porphyromonas gingivalis* platelet aggregation activity: outer membrane vesicles are potent activators of murine platelets. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 15, p. 393-6, 2000.

SHEETS, S. M. et al. Gingipains from *Porphyromonas gingivalis* W83 synergistically disrupt endothelial cell adhesion and can induce caspase-independent apoptosis. **Infect. Immun**., v. 74, p. 5667-5678, 2006.

STELZEL, M. et al. Detection of *Porphyromonas gingivalis* DNA in the aorta tissue by PCR. **J. Periodontol**., v. 73, p. 868-70, 2002.

SUZUKI, N. et a. Identification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes by multiplex PCR. **J. Clin. Microbiol.**, v. 39, p. 2002-5, 2001.

SUZUKI, N.; YOSHIDA, A.; NAKANO, Y. Quantitative analysis of multi-species oral biofilms by TaqMan real-time PCR. **Clin. Med. Res**., v. 3, p. 176-185, 2005.

TAYLOR-ROBINSON, D. et al. Oro-dental bacteria in various atherosclerotic arteries. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis**., v.21, p. 755-757, 2002.

TONETTI, M. S.; CLAFFEY, N. Advances in the progression of periodontitis and proposal of definitions of a periodontitis case and disease progression for use in risk factor research. **J. Clin. Periodontol**., v.32, p. 210-213, 2005.

YUAN, L. et al. *Porphyromonas gingivalis htr*A is involved in cellular invasion and in vivo survival. **Microbiology**, v. 154, p. 1161-1169, 2008.

ZHANG, M.-Z. et al. *Porphyromonas gingivalis* infection accelerates intimal thickening in iliac arteries in a balloon-injured rabbit model. **J. Periodontol**., v. 79, p.1192-1199, 2008.