

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Odontologia
Programa de Pós-Graduação em Odontologia
Área de Concentração em Clínica Odontológica – Ênfase em Periodontia



Dissertação

**Influência da hipertensão arterial sistêmica na ocorrência de
periodontopatógenos: resultados preliminares de um estudo transversal.**

Taciane Menezes da Silveira

Pelotas, 2021

Taciane Menezes da Silveira

**Influência da hipertensão arterial sistêmica na ocorrência de
periodontopatógenos: resultados preliminares de um estudo transversal.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Odontologia, área de concentração em Clínica Odontológica/Periodontia.

Orientador (a): Profa. Dra. Natália Marcumini Pola

Coorientador (a): Profa. Dra. Máisa Casarin

Pelotas, 2021

Taciane Menezes da Silveira

Influência da hipertensão arterial sistêmica na ocorrência de periodontopatógenos:
resultados preliminares de um estudo transversal.

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Odontologia, área de concentração em Clínica Odontológica/Periodontia, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 30/03/2021

Banca examinadora:

Profa. Dra. Natália Marcumini Pola

Doutora em Odontologia – Periodontia - pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP/Araçatuba. (Orientadora)

Prof. Dr. Francisco Wilker Mustafa Gomes Muniz

Doutor em Odontologia – Clínica Odontológica/Periodontia – pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS/Porto Alegre.

Profa. Dra. Flávia Aparecida Chaves Furlanetto

Doutora em Odontologia – Periodontia - pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP/Araçatuba.

Profa. Dra. Natalia de Campos Kajimoto

Doutora em Odontologia – Periodontia - pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP/Araçatuba. (Suplente)

Prof. Dr. Rafael Guerra Lund

Doutor em Ciências Odontológicas - Dentística - pela Universidade Federal de Pelotas, UFPel/Pelotas. (Suplente)

**Dedico este trabalho aos que escolhem acreditar na ciência e
seguir o caminho de propaga-la e enriquecê-la.**

Agradecimentos

Tantas pessoas vêm à minha mente, e principalmente aquecem meu coração, no momento em que me proponho a escrever estes agradecimentos, e só por causa destas pessoas que agora estou aqui, prestes a alcançar mais esse objetivo que há tanto tempo tracei.

Começo pelos responsáveis por me trazer a este mundo, por me guiarem nos primeiros passos e inspirarem os demais, meu pais, **Tatiana e Laurício**. Obrigada pelo amor imensurável, obrigada pela confiança, pela preocupação, pela liberdade, pelo carinho e acolhimento, afinal, o que dá coragem para os nossos voos, é saber que teremos sempre um lugar para chamar de nosso, um colo e um abraço apertado quando tudo parecer desabar e com quem comemorar as conquistas, porque sei que as minhas vitórias são de vocês também. Amo-os muito!

À minha orientadora, **Natália**. Não à toa estou contigo hoje, desde quando, ainda na graduação, entrei na sala do PET e pedi ajuda à Carol para encontrar uma orientação, estava muito ansiosa para começar meu TCC, ela me apresentou a você e desde este dia, não deixei de aprender e crescer junto desta minha orientadora tão querida. Você sempre soube ensinar muito além do que está nos textos dos artigos, nos gráficos e tabelas... porque a humildade natural com que você transmite conhecimento aproxima e nos faz acreditar que podemos muito, hoje tu és a minha maior inspiração e alimento do meu sonho em seguir na docência. O aluno que passa por uma orientação como essa, transforma e amplia a visão para as possibilidades da nossa profissão, obrigada por isso! De coração, com muita alegria que seguirei com nosso trabalho juntas!

À minha amiga e colega com quem compartilho muito em comum, **Caroline**. Obrigada por estar sempre presente, por te disponibilizar a ajudar, a escutar, a orientar e aprender junto comigo. Aquele clichê clássico de que mais vale a caminhada do que o destino em si faz total sentido sempre que penso no dia-a-dia com o nosso time perio, um convívio que torna tudo mais fácil, mais leve e prazeroso, sou muito grata por contar com isso. Deus foi muito generoso quando me permitiu estar próxima a pessoas como você. Obrigada, por tudo!

Ao meu namorado, **Fernando**. Meu parceiro em tudo e em todas, incentivador dos meus maiores e mais desafiadores sonhos. Meu colega de profissão que eu admiro a cada dia mais, que se propõe corajosamente a novos desafios e não dá menos que o seu melhor em tudo o que faz. Não por menos que és tão querido pelos teus pacientes, a paixão que tens nas coisas que faz é realmente cativante. Obrigada, meu amor, pela inspiração, apoio e pelo companheirismo sem igual!

Às minhas irmãs, **Larissa e Luísa**. Ser irmã mais velha de duas pessoas como vocês é a maior honra que nossos pais poderiam ter me dado. Obrigada pelas inúmeras lembranças cheias de afeto da infância maravilhosa que tivemos. Inevitavelmente, cada uma de nós seguirá a sua própria direção, mas é muito bom saber que sempre teremos uma a outra para contar. Obrigada, irmãs!

Aos meus colegas de mestrado, **Raquele, Mauro, Laura e Thaís**. E à **Milena**, minha parceira de laboratório. Obrigada por partilhar as angústias e alegrias desta caminhada, obrigada por toda ajuda nesses dois anos de muito crescimento para todos nós. Cada um enfrentando os seus desafios, mas encara-los junto de amigos nos enche de coragem e força! Obrigada!

À minha dupla de faculdade, colega e amiga que Deus me presenteou para a vida, **Antonielle**. Obrigada pelas longas conversas, por fazer questão de estar ou, quando não foi possível, se fazer presente de alguma forma. Tenho muito orgulho da profissional que te tornaste e me inspiro muito em ti! Obrigada por tudo, amiga!

Ao Prof. **Rodrigo**, sempre disposto em ajudar e explicar mais uma vez as reações que pareciam enigmáticas para mim! Obrigada por todo auxílio, por abrir as portas do LaPeBBioM a nós e ser incansável em mostrar uma solução para qualquer coisa que desse errado. O mundo precisa de mais pesquisadores apaixonados pelo que fazem, assim como o Sr. Obrigada por todo aprendizado e disponibilidade.

Aos professores do núcleo de periodontia da UFPel, Prof. **Maísa** e Prof. **Wilker**, que tanto admiro. Prof. Maísa, obrigada pela disponibilidade em me coorientar neste trabalho, desafiador, mas de muito aprendizado! Prof. Wilker, obrigada por toda paciência nas muitas explicações às quais sempre te disponibilizou, pela lembrança do meu nome em tantos trabalhos excelentes, onde aprendi e sigo aprendendo muito com você. E muito obrigada por aceitar estar contribuindo em mais este momento tão importante da minha formação acadêmica.

Aos demais professores que compõe a banca avaliadora deste trabalho: Prof. **Flávia**, Prof. **Natalia** e Prof. **Rafael**. Obrigada por se disponibilizarem a estar aqui hoje, a doar seu tempo e conhecimento no aperfeiçoamento imprescindível a esta pesquisa. Acredito na ciência que é feita desta forma, com a contribuição de muitos para que possa estar ao alcance de todos. Muito obrigada!

Aos **pacientes** que se disponibilizaram a participar da nossa pesquisa, deixando uma contribuição muito maior que podem imaginar. Espero que possamos tê-los ajudado a melhorar e entender a importância que a saúde bucal tem para todos.

Finalmente, agradeço à instituição responsável por minha formação acadêmica, pela qual criei um grande carinho. À **Universidade Federal de Pelotas - Faculdade de Odontologia e Programa de Pós-Graduação em Odontologia**. Estar aqui me possibilitou desenvolver tudo o que apresento no dia de hoje e muito mais.

Gratidão por tudo!

***“Não convém a gente levantar escândalo de começo,
só aos poucos é que o escuro se torna claro”.***
Guimarães Rosa

Resumo

SILVEIRA, Taciane Menezes da. **Influência da hipertensão arterial sistêmica na ocorrência de periodontopatógenos: resultados preliminares de um estudo transversal**. 2021. 64 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2021.

Periodontite e hipertensão arterial sistêmica são duas das patologias que atingem grande parte da população mundial, e evidências relatadas até o momento têm sido favoráveis a existência de uma associação entre essas condições. Este estudo transversal tem como objetivo avaliar e comparar a quantidade de espécies bacterianas periodontopatógenas de pacientes hipertensos e normotensos com periodontite. Foram coletados dados sociodemográficos, comportamentais e de saúde sistêmica dos indivíduos. Os dados clínicos periodontais foram avaliados a partir dos seguintes parâmetros: índice de placa visível (IPV), índice de sangramento gengival (ISG), fatores retentivos de placa (FRP), sangramento à sondagem (SS), profundidade de sondagem (PS) e perda de inserção clínica (PI). O desfecho microbiológico foi a contagem de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis* e *Fusobacterium nucleatum* mensuradas pela técnica de PCR em tempo real. Trinta e oito pacientes foram incluídos nesta análise preliminar, divididos em dois grupos: Grupo Normotenso (N-P) (n=14), composto por pacientes normotensos com diagnóstico de periodontite; e Grupo Hipertenso (H-P) (n=24), composto por pacientes hipertensos com diagnóstico de periodontite. Os resultados demonstraram que os indivíduos hipertensos apresentaram maiores percentagens de IPV, ISG, FRP, média de PI e PI entre 1-3mm ($p<0,05$) do que os normotensos. Os demais parâmetros periodontais não apresentaram diferenças significativas entre os grupos. Além disso, indivíduos hipertensos apresentaram maiores contagens de *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis* e *Fusobacterium nucleatum* quando comparados aos normotensos. Com estes dados preliminares, pode-se concluir que a presença da hipertensão arterial sistêmica pode estar associada com maior quantidade de determinadas espécies bacterianas periodontopatógenas em indivíduos com periodontite.

Palavras-chave: periodontite; hipertensão arterial sistêmica; bactérias; reação em cadeia da polimerase em tempo real.

Abstract

SILVEIRA, Taciane Menezes da. **Arterial hypertension influence on the occurrence of periodontopathogens: preliminary results of a cross-sectional study**. 2021. 64 f. Dissertation (Master's degree in Dentistry) – Graduate Dentistry Program, Federal University of Pelotas, Pelotas, 2021.

Periodontitis and arterial hypertension are two of the pathologies with the highest global prevalence, evidences reported so far has been favorable to an association between them. This cross-sectional study aims to evaluate and compare the amount of periodontopathogenic bacterial species in hypertensive and normotensive patients with periodontitis. Sociodemographic, behavioral, and systemic health data were collected. Periodontal clinical data were assessed using the following parameters: visible plaque index (VPI), marginal bleeding index (MBI), plaque retentive factors (PRF), bleeding on probing (BOP), probing pocket depth (PPD), and clinical attachment loss (CAL). The microbiological outcome was the count of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis*, and *Fusobacterium nucleatum* measured by the real-time PCR. Thirty-eight patients were included in this preliminary analysis, divided into two groups: Normotensive Group (NG) (n = 14), composed of normotensive patients diagnosed with periodontitis; and Hypertensive Group (HG) (n = 24), composed of hypertensive patients diagnosed with periodontitis. The results showed that hypertensive individuals had higher percentages of VPI, MBI, PRF, CAL mean, and CAL 1-3mm ($p < 0.05$) than NG. The other periodontal parameters did not show any statistical difference between groups. Also, hypertensive individuals had higher *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis*, and *Fusobacterium nucleatum* counts when compared to normotensive individuals. With these preliminary data, it can be concluded that the presence of arterial hypertension may be associated with a greater quantity of periodontopathogenic bacterial of some species in individuals with periodontitis.

Keywords: periodontitis; hypertension; blood pressure; bacteria; real-time polymerase chain reaction.

Lista de Abreviaturas e siglas

DP	Doença periodontal
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
H-P	Grupo hipertensos com periodontite
N-P	Grupo normotenso com periodontite
PA	Pressão arterial
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
FCG	Fluido crevicular gengival
IPV	Índice de placa visível
ISG	Índice de sangramento gengival
JCE	Junção cimento-esmalte
PS	Profundidade de sondagem
SS	Sangramento à sondagem
PI	Perda de inserção clínica
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase

Sumário

1. Introdução.....	13
2. Projeto de pesquisa	17
3. Relatório do trabalho de campo.....	27
4. Artigo.....	29
5. Considerações finais.....	48
Referências.....	49
Apêndices.....	54
Anexos.....	60

1. Introdução

A doença periodontal (DP) é uma inflamação crônica multifatorial dos tecidos periodontais associada à disbiose do biofilme e relacionada com a perda óssea alveolar progressiva (CATON et al., 2018). Tem sido relatada estar presente em mais de 50% da população em geral (TSIOUFIS et al., 2011), sendo considerada um problema de saúde pública principalmente nos países em desenvolvimento e subdesenvolvidos (BOTERO et al., 2015; PETERSEN; BAEHNI, 2012). De acordo com o estudo *Global Burden of Disease*, a prevalência de periodontite severa em 2015 atingiu 616 milhões de indivíduos, sendo a sexta doença crônica mais prevalente no mundo (KASSEBAUM et al., 2014; ZHAO et al., 2019b).

Os complexos bacterianos Gram-negativos (*Treponema*, *Bacteroides*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Capnocytophaga*, *Peptostreptococcus*, *Fusobacterium*, *Actinobacillus* e *Eikenella*) estão citados entre os mais comuns da cavidade oral relacionados a etiopatogenia da doença periodontal (LARJAVA et al., 2011; PASTER et al., 2001; SOCRANSKY et al., 1998). Esta comunidade microbiana é conhecida como microbiota oral, microflora oral ou microbioma oral (DEWHIRST et al., 2010; ZAMBON, 1996), que está presente na saliva, epitélio gengival, em outras superfícies internas da cavidade bucal e concentrada na placa dental (BUI et al., 2019). À medida que o biofilme amadurece, a disbiose microbiana ocorre, causando uma mudança progressiva de espécies anaeróbias Gram-positivas para predominantemente Gram-negativas, resultando na formação de biofilme patogênico sob a superfície dental (RUDNEY et al., 2015).

É importante relatar que a periodontite pode ser influenciada por uma série de fatores de risco, incluindo condições sistêmicas como diabetes, imunodeficiência, estresse, hipertensão e osteoporose (ALBANDAR; SUSIN; HUGHES, 2018; DHIR; KUMAR, 2018; GARCIA; HENSHAW; KRALL, 2001; JEPSEN et al., 2018; KORNMAN; PAGE; TONETTI, 1997; PAGE, 1998). Da mesma forma, pesquisas têm demonstrado potencial ação da periodontite na iniciação e/ou progressão de diversas doenças sistêmicas (KIM; AMAR, 2006; WHITMORE; LAMONT, 2014). A DP atualmente é considerada a sexta principal complicação do diabetes mellitus e estudos epidemiológicos reportam o diabetes como um fator de risco para periodontite (KOCHER et al., 2018; LÖE, 1993; MORRAN et al., 2009; ROBERT et al., 2010; SANTOS et al., 2014). Associações significativas entre a DP e a obesidade também

são reportadas (CHAFFEE; WESTON, 2010), apontando que indivíduos com sobrepeso e obesos apresentaram respectivamente 27 e 81% maior predisposição à periodontite quando comparados a indivíduos com peso normal (NASCIMENTO et al., 2016; SUVAN et al., 2020).

Evidências relatadas até o momento têm sido favoráveis a existência de uma associação entre a DP, pressão arterial (PA) e a hipertensão arterial sistêmica (HAS) (ANGELI et al., 2003; DESVARIEUX et al., 2010; HUJOEL, 2000; MARTIN-CABEZAS et al., 2016; TSAKOS et al., 2010). A HAS é uma doença clínica multifatorial caracterizada pela PA elevada, onde a pressão sistólica é igual ou superior a 130 mmHg ou a pressão diastólica é igual ou superior a 80 mmHg, que envolve fatores ambientais, genéticos e comportamentais (ROSSIER; BOCHUD; DEVUYST, 2017). A HAS é considerada um problema de saúde pública devido à alta prevalência e baixa taxa de adesão ao tratamento, sendo um dos principais fatores de risco modificáveis para Doenças Cardiovasculares (DCV) (VANCINI-CAMPANHARO et al., 2015). Estima-se que 30 a 45% da população mundial seja afetada pela hipertensão, e um aumento da prevalência desta condição é observado conforme o envelhecimento do indivíduo (CHRISTIAENS & NILSSON, 2013). Segundo a Organização Mundial da Saúde, em 2008 cerca de 40% da população adulta com 25 anos ou mais apresentava HAS. Uma revisão das tendências atuais mostra que o número de adultos com hipertensão aumentou de 594 milhões em 1975 para 1,13 bilhão em 2015, com o aumento visto em grande parte em países de baixa e média renda (OMS, 2019).

No Brasil, um estudo realizado pelo Ministério da Saúde revelou que a prevalência da HAS aumentou de 21,5% em 2006 para 24,3% em 2012 (BRASIL, 2012). A etiologia da hipertensão arterial sistêmica é considerada em grande parte indefinida, multifatorial e complexa. Cerca de 90% dos pacientes são hipertensos primários ou essenciais, enquanto que os demais apresentam hipertensão secundária, resultante de doenças do parênquima renal, doenças vasculares e lesões das glândulas adrenais (YE et al., 2000). Além disso, fatores relacionados aos hábitos diários como fumo, consumo de álcool e má alimentação também podem contribuir para a ocorrência da hipertensão (KAWABATA et al., 2016). Estudos têm relatado a contribuição de mecanismos inflamatórios e substâncias vasoativas relacionadas ao endotélio na elevação crônica da PA, sugerindo que estados inflamatórios crônicos também possam atuar no desenvolvimento da hipertensão (ANDROULAKIS et al., 2009; BOOS; LIP, 2006; KAWABATA et al., 2016).

Assim, alguns autores reportam uma via de associação bidirecional entre hipertensão e DP (MARTIN-CABEZAS et al., 2016). O mecanismo fisiológico da interação entre estas condições pode ser explicado por vias indiretas, como o compartilhamento de fatores de risco, e também por vias diretas através de ramificações sistêmicas adversas (NAKAJIMA; YAMAZAKI, 2009; SANZ et al., 2010). Um dos mecanismos sugeridos é de que a elevação da PA possa afetar a membrana dos vasos sanguíneos periodontais, induzindo o mal funcionamento de pequenas artérias e promovendo sangramento gengival e alteração no suporte alveolar (FORD; YAMAZAKI; SEYMOUR, 2007; LEITE et al., 2005; TSIΟΥFIS et al., 2011). Um estudo recente demonstrou que indivíduos hipertensos apresentam maiores níveis de perda óssea quando comparados a pacientes sistemicamente saudáveis (ZHAO et al., 2019a). Também é relatado que a profundidade de sondagem média de pacientes idosos com hipertensão apresenta-se significativamente maior quando comparada a pacientes normotensos (AOYAMA et al., 2018).

Por outro lado, sugere-se que a disseminação de componentes infecciosos e inflamatórios do periodonto através da corrente sanguínea, sistema imunológico ou metabolismo de glicose e lipídeos poderia contribuir para um estado de inflamação generalizada (ANDROULAKIS et al., 2009; BOOS; LIP, 2006; KAWABATA et al., 2016; TSIΟΥFIS et al., 2011). Sendo assim, a DP poderia desempenhar um importante papel como um possível fator desencadeador da elevação da PA (MARTIN-CABEZAS et al., 2016).

No contexto da microbiologia periodontal, é reportado que a proliferação bacteriana que ocorre durante a progressão da doença poderia desencadear consequências sistêmicas por permear células epiteliais do periodonto através de mecanismos transcelulares (TAKEUCHI et al., 2011). Essas bactérias seriam capazes de alcançar a circulação através do tecido gengival em locais com doença periodontal ativa, onde a barreira epitelial é ulcerada e descontínua, permitindo a disseminação de microorganismos para o tecido conjuntivo subjacente e capilares e, eventualmente, para a circulação sistêmica (OLSEN, 2008, 2015). Estudos *in vitro* reportam que algumas bactérias periodontais têm a capacidade de invadir células cardiovasculares humanas (HERTZÉN et al., 2010; REYES et al., 2013) e que após a invasão, várias formas de disfunção endotelial podem ser induzidas.

Armingohar et al. (2014), investigou a diversidade bacteriana em biópsias de placa aterosclerótica e parede aneurismática de pacientes com doença cardiovascular

com e sem periodontite. A diversidade média bacteriana detectada nas biópsias vasculares foi significativamente maior nos pacientes com periodontite, incluindo algumas bactérias orais conhecidas (*Streptococcus spp.*, *Prevotella sp.* e *Capnocytophaga sp.*), comparados àqueles sem periodontite (ARMINGOHAR et al., 2014). Ainda, Gaetti-Jardim et al. (2009) demonstraram que o DNA bacteriano periodontal representou 47,3% do DNA bacteriano encontrado em amostras ateromatosas de pacientes com periodontite e 7,2% do DNA bacteriano detectado em ateroma de indivíduos periodontalmente saudáveis (GAETTI-JARDIM et al., 2009), reforçando a plausibilidade de associação dessas condições. Recentemente, um estudo envolvendo 611 pacientes idosos com doença cardiovascular encontrou casos de periodontite mais severa em indivíduos com hipertensão, em comparação a indivíduos sem hipertensão. Os autores relataram maiores perdas de inserção em pacientes hipertensos do sexo masculino, na faixa etária entre 71-80 anos (AOYAMA et al., 2018). Bactérias periodontopatogênicas específicas como o *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Prevotella intermedia*, foram altamente detectadas em indivíduos com hipertensão em comparação aos indivíduos sem hipertensão (AOYAMA et al., 2018).

A identificação de indivíduos com o maior risco para a severidade e progressão da doença periodontal bem como para a hipertensão arterial é essencial para o uso de medidas clínicas preventivas e terapêuticas adequadas. Reconhecendo a possível via de mão dupla da associação destas doenças, a avaliação de indicadores sistêmicos e microbiológicos relacionados à hipertensão poderia facilitar a compreensão de todo este processo. Estudos experimentais e clínicos que avaliem a ocorrência de organismos periodontopatógenos são de extrema importância na literatura (PAIZAN; VILELA-MARTIN, 2014). Desta forma, as questões críticas relacionadas a fisiologia das interações hospedeiro-parasita nas doenças periodontais, podem propor novos achados referentes a patogenia dos distúrbios sistêmicos e vice-versa. Sendo assim, o objetivo deste estudo é avaliar as possíveis associações biológicas entre DP e HAS, através da análise microbiológica e exames clínicos periodontais de pacientes hipertensos e normotensos com periodontite, por meio de identificação e quantificação de espécies bacterianas específicas.

1.1 Objetivo Geral

Avaliar a ocorrência de determinados organismos periodontopatógenos de pacientes com hipertensão arterial sistêmica e normotensos, com periodontite.

1.2 Objetivos Específicos

- Isolar as cepas *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermédia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis* de pacientes normotensos e hipertensos com periodontite, por meio de PCR em tempo real;
- Quantificar e comparar as cepas *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermédia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis* de pacientes normotensos e hipertensos com periodontite, por meio PCR em tempo real;

1.3 Hipótese

A hipótese testada é de que a quantidade dos periodontopatógenos isolados seja significativamente maior nos pacientes com HAS e periodontite. A hipótese nula é a de que não haja diferenças estatisticamente significativas relacionadas aos periodontopatógenos em pacientes normotensos e hipertensos com periodontite.

2. Projeto de pesquisa

2.1 Tipo de estudo

Este estudo será conduzido como um estudo transversal com grupo comparação. As diretrizes propostas no STrengthening the Reporting of OBservational studies in Epidemiology checklist STROBE (VON ELM et al., 2008) servem como referência para o reporte deste estudo.

2.2 Aspectos éticos

O estudo será realizado em indivíduos que buscarem por atendimento na Faculdade de Odontologia e no Centro de Pesquisa em Saúde Dr. Amilcar Gigante, da Universidade Federal de Pelotas (UFPel). Todos os indivíduos serão convidados a participar e informados sobre os objetivos do estudo, riscos e benefícios, e como se dará a sua participação. Concordando em participar, o sujeito deverá assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE – Anexo 1). O protocolo de pesquisa que

contempla este projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FAMED-UFPEL (1.043.441 – Anexo 2).

2.3 Seleção da amostra

2.3.1 Cálculo amostral

O tamanho da amostra foi estimado com base em uma média e desvio padrão da contagem de bactérias de $6,48 \pm 0,84$ em indivíduos com diabetes e periodontite, e média e desvio padrão da contagem de bactérias de $7,13 \pm 1,01$ em indivíduos não diabéticos com periodontite (FIELD et al., 2012). Além disso, foram considerados 80% de poder do teste e nível de significância de 5%, resultando em um tamanho amostral de 33 indivíduos em cada grupo. Levando-se em consideração recusa e possíveis desistências, o tamanho da amostra foi aumentado em 20%, resultando em um total de 78 indivíduos (39 hipertensos e 39 normotensos).

2.3.2 Grupo Experimental e Critérios de Inclusão

Os pacientes selecionados e que concordarem em participar do estudo, passarão por uma breve entrevista dialogada (Apêndice 1) e exame físico de aferição da pressão arterial, peso (balança digital – G-Life Slim, G-Life Ltda., São Paulo, SP, Brasil), circunferência abdominal (fita métrica) e altura, a fim de confirmar sua elegibilidade à pesquisa. Os participantes selecionados serão divididos em dois grupos: Grupo H-P (Hipertensos com periodontite) (n=39), e Grupo N-P (Normotensos com periodontite) (n=39).

Os critérios adotados para o diagnóstico de periodontite terão com base os valores médios estimados de PS e PI, de acordo com os critérios do Centro de Controle e Prevenção de Doenças em associação com os critérios da Academia Americana de Periodontologia (CCPD/AAP) a classificação das doenças periodontais (EKE et al., 2012).

Os critérios adotados para inclusão dos pacientes H-P neste estudo serão:

- Apresentar idade entre 35 e 75 anos, sem distinção de gênero;
- Apresentar, no mínimo, 8 dentes permanentes, possibilitando a aferição de 4 a 6 sítios de coleta de fluido crevicular gengival (FCG);
- Ter diagnóstico de hipertensão arterial sistêmica compensada, segundo (WHELTON et al., 2018) (Tabela 1) e fazer uso de medicamentos anti-

hipertensivos sem alterações/trocas de medicação por pelo menos 6 meses.

Tabela 1. Critérios para o diagnóstico de Hipertensão Arterial.

Classificação	Pressão arterial sistólica		Pressão arterial diastólica
Normal	< 120 mmHg	E	< 80 mmHg
Pré-hipertensão	120 – 129 mmHg	OU	> 80 mmHg
Hipertensão			
Estágio 1	130 – 139 mmHg	OU	80 – 89 mmHg
Estágio 2	≥ 140 mmHg	OU	≥ 90 mmHg

Fonte: Whelton, P. K. et al. Guideline for the Prevention, Detection, Evaluation, and Management of High Blood Pressure in Adults: Executive Summary. Journal of the American Society of Hypertension, v. 12, n. 8, p. 579.e1-579.e73, 2018.

Não serão incluídos os pacientes que apresentarem os seguintes critérios:

- Pacientes autodeclarados hipertensos, que apresentarem pressão arterial (PA) aferida acima de 140/90 mmHg e que relatarem não fazer uso de medicamentos para o controle da PA;
- Pacientes que apresentarem quadro de pré-hipertensão e/ou histórico de acidente vascular cerebral ou infarto do miocárdio;
- Pacientes tabagistas, obesos, diabéticos, com síndrome metabólica ou doenças autoimunes;
- Pacientes gestantes;
- Pacientes que tenham feito uso de antibióticos, anti-inflamatórios, imunoestimuladores ou imunossupressores nos últimos 6 meses;
- Pacientes que receberam tratamento periodontal nos últimos 6 meses;
- Pacientes que fazem uso de aparelho ortodôntico fixo.

Os pacientes do grupo N-P deverão obedecer aos mesmos critérios de elegibilidade, à exceção do diagnóstico de hipertensão.

2.4 Coleta de dados

A sequência das coletas de dados se dará da seguinte forma:

- 1º. Visita: Convite ao estudo, confirmação da elegibilidade (breve entrevista

confidencial e exames físicos – aferição da PA, peso, circunferência abdominal e altura), assinatura do TCLE, anamnese completa, exame clínico periodontal e instruções sobre o retorno (agendamento da 2ª visita, e instruções para os exames hematológicos - necessidade de jejum de 12 horas).

- 2º. Visita: Coleta das amostras do FCG seguida de profilaxia e instrução de higiene oral.

2.4.1 Avaliação da pressão arterial (PA)

A PA será aferida no braço esquerdo com os pacientes na posição sentada, após 5 minutos de repouso por três vezes, com intervalo de dois minutos entre cada aferição – o valor registrado será correspondente a média das três aferições. Será utilizado para aferição um medidor digital (HEM-7113, OMRON, São Paulo, SP, Brasil). Os pacientes normotensos serão considerados aqueles que apresentarem pressão sistólica ≤ 120 mmHg e diastólica ≤ 80 mmHg. Os pacientes hipertensos serão considerados aqueles que apresentarem pressão sistólica ≥ 130 mmHg e diastólica > 80 mmHg. Pacientes hipertensos descompensados serão considerados aqueles que se autodeclararem hipertensos e/ou que apresentarem PA aferida acima de 140/90 mmHg. Os pacientes identificados com PA elevada que não tenham apresentado histórico prévio e os pacientes hipertensos descompensados serão encaminhados para uma referência médica para avaliação cardiológica e não serão incluídos na pesquisa neste momento.

2.4.2 Anamnese

Será aplicado um questionário para investigação das condições de saúde odontológica e geral dos indivíduos selecionados, bem como levantamento de dados demográficos, comportamentais e socioeconômicos (Apêndice 2). Nesta etapa também, serão coletadas informações detalhadas sobre a condição sistêmica dos pacientes hipertensos, bem como sobre os medicamentos utilizados. Caso necessário, exames médicos anteriores serão solicitados aos pacientes.

2.4.3 Exame clínico periodontal

O exame periodontal compreenderá os seguintes indicadores:

- O Índice de Placa Visível (IPV): será avaliado de forma dicotômica, como ausente ou presente;

- O Índice de Sangramento Gengival (ISG): será avaliado após inserção de 1mm da sonda periodontal no sulco gengival percorrendo toda a superfície dental, de forma dicotômica, como ausente ou presente;
- Profundidade de sondagem (PS): correspondente à distância da margem gengival até o ponto mais apical sondável do sulco/bolsa, arredondando para o milímetro inteiro mais próximo;
- Sangramento à sondagem (SS): o sangramento será avaliado após 60s da inserção da sonda periodontal para medida da profundidade de sondagem, de forma dicotômica, como ausente ou presente;
- Perda de inserção clínica (PI): correspondente à distância entre a junção cimento-esmalte (JCE) até o ponto mais apical sondável do sulco/bolsa, arredondando para o milímetro inteiro mais próximo;
- Fator retentivo de placa (FRP): será avaliado de forma dicotômica, como presente ou ausente.

Os indicadores clínicos serão avaliados em 6 sítios por dente (mésio-vestibular, vestibular, disto-vestibular, mésio-palatino/lingual, palatino/lingual e disto-palatino/lingual), em todos os dentes erupcionados, utilizando-se sonda periodontal milimetrada (UNC 15, Trinity, Trinity-odontologia, São Paulo, SP, Brasil) e espelho plano. Todos os dados serão registrados em fichas clínicas próprias (Apêndice 3).

2.5 Treinamento e calibragem dos examinadores

Os exames clínicos periodontais serão conduzidos por dois examinadores treinados (para aferições de IPV, ISG, SS e FRP) e calibrados (para aferições da PS e PI). A calibragem será realizada previamente ao início do estudo, em aproximadamente 10% da amostra, por meio de exames repetidos de PS e PI, com intervalos de no mínimo 1 hora entre os exames. Os pacientes avaliados na calibragem não serão inseridos na amostra final do estudo. Durante o estudo, também estará prevista a calibragem, em 5% da amostra. A reprodutibilidade dos exames será verificada pelo teste do coeficiente de Kappa ponderado (+-1mm) e Coeficiente de Correlação Intra-Classe. Os examinadores também serão capacitados para aferição da PA, avaliação de peso, circunferência abdominal e realização de anamnese não tendenciosa.

2.6 Coleta do fluido crevicular gengival (FCG)

Para coleta das amostras do FCG serão selecionados seis sítios, em dentes diferentes e em sítios não vizinhos, com as maiores medidas de PS. A placa supragengival desses elementos será removida cuidadosamente com auxílio de gaze e os sítios serão secos com jatos de ar, sendo posteriormente isolados com roletes de algodão estéreis. As amostras do FCG serão obtidas com a utilização de cones de papel absorvente estéreis número 35 (AllPrime, Meta Biomed Co. Ltd., Heungdeok-gu, Coréia do Sul). As pontas serão inseridas delicadamente junto à margem do sulco gengival até a porção mais apical da bolsa, permanecendo por um período de 30 segundos. Posteriormente, as mesmas serão colocadas em microtubos esterilizados, os quais permanecerão armazenados a uma temperatura de -70°C até o processamento das amostras.

2.7 Avaliação microbiológica

2.7.1 Microrganismos

O DNA das cepas padrão de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (ATCC 33384), *Prevotella intermédia* (ATCC 25611), *Fusobacterium nucleatum* (ATCC 49256) e *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277) serão utilizadas para padronização da técnica de PCR em Tempo Real.

2.7.2 Extração do DNA

Após descongelar os microtubos, a extração de DNA bacteriano das amostras será realizada através de Kit de purificação de DNA genômico em sangue (Ludwig biotecnologia, Porto Alegre, Brasil), conforme o protocolo descrito pelo fabricante. O processo de extração será realizado em cabine asséptica de fluxo laminar. Será adicionado em cada amostra 200µl de solução de ressuspensão (Tampão fosfato-salino ou Phosphate Buffered Saline - PBS) e os microtubos serão inseridos no vórtex por aproximadamente 5 segundos para homogeneizar a mistura. Posteriormente, serão incluídos 20µl de proteinase e 200µl de reagente de lise (Buffer CB), inserido no vórtex novamente por aproximadamente 5 segundos. Na sequência, os microtubos serão colocados em banho-maria a 60°C por 30 minutos. Após, serão incluídos 100µl de isopropanol (propan-2-ol), colocados no vórtex novamente, ficando em repouso por 1 minuto, e as amostras serão transferidas para as colunas do Kit de purificação de

DNA genômico em sangue (Ludwig biotecnologia, Porto Alegre, Brasil). Todo o volume lisado será transferido de um frasco para outro. Os microtubos serão colocados na centrífuga a 10.200 RPM, a 4°C por 1 minuto. Após, o DNA conservado nas colunas será lavado em três etapas, iniciando com 500µL de buffer de lavagem genômica (buffer IR), e as amostras serão centrifugadas a 10.200 RPM, a 4°C por 1 minuto novamente, mais uma vez o DNA será lavado com 600µL de buffer de lavagem genômica (buffer WB), sendo centrifugados com 10.200 RPM a 4°C por 1 minutos, finalizando a lavagem com a repetição da última etapa citada. Toda a solução será removida e o tubo centrifugado mais uma vez com 10.200 RPM a 4°C por 1 minuto. A partir disso, a amostra será diluída com 50µL de água para injeção inserida bem no meio da coluna. Após 1 minuto em temperatura ambiente, serão centrifugados a 10.000 RPM por 1 minuto para diluir as amostras.

2.7.3 PCR em tempo real

As amostras serão analisadas por meio do PCR em tempo real utilizando SYBER Green Mix/ROX. Os DNAs extraídos serão amplificados e marcados com o reagente Syber Green Mix/ROX (Sigma-Aldrich, Foster City, California, USA). O mesmo é um marcador fluorescente que possui ligação altamente específica ao DNA dupla-fita e detecta o produto da reação em tempo real, conforme ele se acumula durante os ciclos da reação.

As reações do PCR em tempo real serão realizadas utilizando o aparelho Step One™ Real Time PCR System (Image Quant 100 – GE Healthcare®, Piscataway, New Jersey, USA). Todas as reações serão realizadas em volume total de 15µL contendo 7,65µL Sybr Green mix/ROX (Sigma-Aldrich, Foster City, California, USA), 0,30µL de cada oligonucleotídeo IDT® (Integrated DNA technologies, Iowa, USA) e 6,75 µL DNA extraído da amostra. Todas as reações serão realizadas na presença de controle positivo, contendo DNA genômico específico da bactéria em análise, e controle negativo, sem DNA. Após a reação de PCR ter sido concretizada, será realizada uma curva de dissociação (curva de melting) com temperatura entre 60°C e 95°C para determinar a especificidade da reação de PCR. Todas as reações serão realizadas em tubos MicroAmp™ Fast Optical 48-Well Reaction Plate (Applied Biosystems®, Concord, Ontario, Canada). Os dados serão analisados utilizando o programa Step One™ (Applied Biosystems®, Concord, Ontario, Canada).

Seguindo o protocolo utilizado por Casarin et al., (2017), as seguintes etapas para amplificação serão utilizadas em um termociclador (ESCO®, Hatboro, Pensilvânia, USA): desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguidos de 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 45 segundos, anelamento a 55,4°C (*Porphyromonas gingivalis*), 55°C (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*), 58°C (*Fusobacterium nucleatum* e *Prevotella intermédia*) por 1 minuto, extensão a 72°C por 1 minuto e uma extensão final a 72°C por 10 minutos (CASARIN et al., 2017). As seguintes sequências de primers serão utilizados: *Porphyromonas gingivalis* direto TGCAACTTGCCTTACAGAGGG e reverso ACTCGTATCGCCCGTTATTC; *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* direto CAAGTGTGATTAGGTAGTTGGTGGG e reverso CCTTCCTCATCACCGAAAGAA; *Prevotella intermédia* direto CCACATATGGCATCTGAGGTG e reverso TCAATCTGCACGCTACTTGG; e *Fusobacterium nucleatum* direto GAAGAAACAAATGACGGTAACAAC e reverso GTCATCCCCACCTTCCTCCT (IDT Integrated DNA Technologies, Iowa, USA).

Serão realizadas 4 diluições do DNA de cada bactéria, onde a concentração já é previamente conhecida, essas diluições serão utilizadas para confecção da curva padrão, com DNA extraído da cultura da bactéria pura. A curva padrão (a qual possuirá concentração conhecida) será utilizada para converter os scores de Ct (Cycle Threshold) obtidos com as amostras em números exatos de concentração de DNA.

2.8 Análise dos resultados

Os dados serão agrupados e submetidos à análise estatística para verificar diferenças entre os grupos. A normalidade dos dados será analisada e os mesmos serão submetidos ao teste paramétrico ou não paramétrico mais adequado. Para todos os testes, o indivíduo será a unidade de análise, e um nível de significância de 5% será adotado. Os dados serão analisados utilizando-se o programa de computador Stata Release 16 (StataCorp. 2019. Stata Statistical Software: Release 16. College Station, TX: StataCorp LLC).

2.10 Orçamento

Material	Descrição	Quantidade	Valor	Total
Biossegurança e consumo				
	Barreiras	03 rolos	R\$ 15,94 (100m)	R\$ 47,82
	Campos descartáveis	03 pacotes	R\$ 17,90 (100 un.)	R\$ 53,70
	Saquinho de sacolé	04 pacotes	R\$ 3,50 (100 un.)	R\$ 14,00
	Canudo plástico	02 pacotes	R\$ 2,50 (80 un.)	R\$ 5,00
	Luvas de procedimento	04 pacotes	R\$ 21,90 (100 un.)	R\$ 87,60
	Sugador	04 pacotes	R\$ 2,89 (40 un.)	R\$ 11,56
Sub-total				R\$ 219,68
Exame periodontal (custeio)				
	Espelho bucal	20 unidades	R\$ 10,85 (un.)	R\$ 217,00
	Pinça	20 unidades	R\$ 11,45 (un.)	R\$ 229,00
	Sonda Milimetrada	20 unidades	R\$ 25,00 (un.)	R\$ 500,00
Sub-total				R\$ 946,00
Escritório				
	Canetas esferográficas	10 unidades	R\$ 2,00 (un.)	R\$ 20,00
	Cópias (fichas)	2000 unidades	R\$ 00,15 (un.)	R\$ 300,00
Sub-total				R\$ 320,00
Coleta sanguínea e Análise laboratorial (custeio)				
	Kit 20 selos ópticos	2 unidades	R\$ 340,00 (un.)	R\$ 680,00
	Ponteiras	4 sacos	R\$ 50,00 (1000 un.)	R\$ 200,00
Sub-total				R\$ 4.346,36
Materiais para avaliação microbiológica				
Kit de purificação de produtos de PCR em coluna				R\$ 460,00
q-PCR-SYBR-Green mix/ROX 200 reações				R\$ 515,00
Materiais para coleta de amostra do fluido gengival				R\$ 1.398,64
Sub-total				R\$ 2.373,64
TOTAL				R\$ 8.205,68

3. Relatório do trabalho de campo

O projeto descrito acima foi contemplado com financiamento pelo edital Programa Primeiros Projetos da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e está registrado sobre o número de processo: 16/2551-0000 186-3. O estudo clínico deste projeto ainda se encontra em fase de inclusão de pacientes e terá continuidade. Atualmente, já foram entrevistados 146 pacientes, sendo que foram incluídos 24 pacientes no grupo caso e 14 pacientes no grupo comparação. Todos os pacientes incluídos já realizaram exame de sangue e coleta fluido gengival. É importante relatar que este projeto está sendo desenvolvido em conjunto com o Centro de Diabetes e Hipertensão da Faculdade de Medicina da UFPel, estrutura localizada no Centro de Pesquisas em Saúde Dr. Amílcar Gigante, e tem atendido a demanda das necessidades curativas e preventivas periodontais dos pacientes atendidos neste centro de referência, e que não tinham até então acesso a este serviço. No início do desenvolvimento deste projeto (Janeiro/2018) supunha-se que a parceria com o Centro fosse contribuir com a inclusão da maioria dos pacientes casos. Contudo, após realização de levantamento dos prontuários e de entrevistas, foi possível observar que grande parte dos pacientes que realizavam acompanhamento clínico no Centro não preenchiam os requisitos dos critérios de inclusão propostos no projeto. Isto se deu principalmente pelo fato de que estes pacientes apresentam outros comprometimentos sistêmicos além da hipertensão, sendo os mais comuns o diabetes mellitus tipo 2, obesidade, insuficiência cardíaca, doença pulmonar obstrutiva crônica e doença renal crônica. Ao todo, foram avaliados 175 prontuários de pacientes hipertensos possivelmente elegíveis. Destes, 62 pacientes possuíam Diabetes Mellitus tipo II, 26 apresentavam algum tipo de comprometimento cardíaco, como insuficiência cardíaca e histórico recente de infarto agudo do miocárdio, e 9 pacientes com insuficiência renal crônica. Ao todo, 65,14% dos prontuários avaliados não puderam ser incluídos por apresentarem algum comprometimento importante além da hipertensão. Dos 61 prontuários que foram contatados via telefone e convidados a participar da pesquisa, 32 relataram não ter interesse em participar, 7 informaram não possuir mais dentes e o restante aceitou participar da entrevista. A partir disto, entendeu-se a necessidade de buscar outras formas de incluir os participantes a fim de obter o total da amostra. Com a intenção de controlar o risco de viés de seleção e amostra de conveniência, optou-se por não incluir pacientes do serviço de triagem da Faculdade de Odontologia visto que o fato

destes pacientes estarem procurando por tratamento já indica a presença de algum problema odontológico. Como opção alternativa para a inclusão de novos pacientes, o projeto de pesquisa foi divulgado em redes sociais com algumas informações básicas relacionadas aos critérios de inclusão, e esta ferramenta acabou por auxiliar a inclusão de novos pacientes.

Contudo, as limitações enfrentadas no recrutamento de novos pacientes persistiram e, em 2020, foram somadas ao cenário de pandemia, o que impossibilitou a coleta de novos dados. Dessa forma, este estudo traz dados parciais, referentes à análise laboratorial microbiológica do FCG, parâmetros periodontais, dados socioeconômicos e sistêmicos do total de 38 pacientes, sendo 24 hipertensos e 14 normotensos com periodontite.

4 Artigo¹

Taciane Menezes da Silveira¹, Caroline Fernandes e Silva², Rodrigo de Almeida Voucher³, Máisa Casarin⁴, Natália Marcumini Pola⁵.

Influence of systemic arterial hypertension on the occurrence of periodontopathogens: preliminary results of a cross-sectional study.

¹MSC student, Graduation Program in Dentistry, Federal University of Pelotas. *tacianesvs@hotmail.com*

²PhD student, Graduation Program in Dentistry, Federal University of Pelotas. *caroline.fs@outlook.com*

³PhD, Center of Chemical, Pharmaceutical and Food Sciences, Federal University of Pelotas. *rodvaucher@hotmail.com*

⁴PhD, Semiology and Clinic Department, Federal University of Pelotas *maisa.66@hotmail.com*

⁵PhD, Semiology and Clinic Department, Federal University of Pelotas. *nataliampola@gmail.com*

Corresponding author:

Natália Marcumini Pola.

Gonçalves Chaves St, 457 Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil. Zip Code: 96015-560. Phone: +55 53 98114-4334.

¹Artigo formatado segundo as normas do periódico *Clinical Oral Investigations*

Abstract

Objectives: This study aims to evaluate and compare the clinical and microbiological aspects of hypertensive and normotensive patients with periodontitis. **Materials and Methods:** Sociodemographic, behavioral, and systemic health data were collected. Periodontal clinical data were assessed using the following parameters: visible plaque index (VPI), marginal bleeding index (MBI), plaque retentive factors (PRF), bleeding on probing (BOP), probing pocket depth (PPD), and clinical attachment loss (CAL). The microbiological outcome was the count of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis*, and *Fusobacterium nucleatum*, measured by the real-time PCR through gingival crevicular fluid samples. Data analysis was performed with a level of significance of 5%. **Results:** Thirty-eight patients were included in this preliminary analysis, divided into two groups: Normotensive Group (NG) (n = 14), composed of normotensive patients diagnosed with periodontitis; and Hypertensive Group (HG) (n = 24), composed of hypertensive patients diagnosed with periodontitis. The hypertensive individuals had higher *P. intermedia*, *P. gingivalis*, and *F. nucleatum* counts when compared to normotensive individuals ($p < 0.05$). Also, HG group presented higher percentages of VPI, MBI, PRF, CAL mean, and CAL 1-3mm ($p < 0.05$) than NG. The other periodontal parameters and *A. actinomycetemcomitans* count did not presented statistical differences between groups. **Conclusions:** With these preliminary data, it can be concluded that the presence of arterial hypertension may be associated with a greater quantity of periodontopathogenic bacterial of some species in individuals with periodontitis. **Clinical Relevance:** This research presents preliminary evidence to support the possible associated mechanisms between arterial hypertension and periodontitis, two extremely prevalent worldwide conditions.

Keywords: periodontitis; hypertension; blood pressure; bacteria; real-time polymerase chain reaction.

Introduction

Periodontitis is a complex polymicrobial inflammatory pathology associated with dysbiotic plaque biofilms and identified by the gradual tooth support loss [1]. The prevalence of severe chronic periodontitis in 2015 has reached 616 million, and it is estimated that the worldwide prevalence of periodontitis ranges between 20 and 50% of the population [2, 3]. Considering its high occurrence, the identification of periodontitis as a potential risk factor of various systemic diseases is extensively investigated. In this scenario, previously published studies and reviews have shown that periodontitis could increase the risk of cardiovascular diseases (CVD) [4–6]. The Consensus Report of the Joint EFP/AAP Workshop on Periodontitis and Systemic Diseases explains the biological plausibility of this association, once periodontitis affects the entry of bacteria into the bloodstream. Then, the host immune response is activated by multiple mechanisms, which favors atheroma formation, maturation, and exacerbation [7].

Regarding modifiable risk factors for CVDs, arterial hypertension is one of the most important and prevalent, affecting 30 to 45% of the adult population. It is also estimated that by 2025 a third of the world's population could be hypertensive [8]. Moreover, it has been described that periodontal disease could have effects on blood pressure (BP) [9]. Mean systemic BP can be higher among patients with moderate and severe periodontitis compared to those with a mild form of the disease, despite age [10]. Besides, the literature has reported a significant association between periodontal diseases and hypertension (HT) [11, 12]. Several studies included in a systematic review performed by Martin-Cabezas et al. [11] analyzed the relation between periodontitis and HT and reported odds ratio values ranging from 0.039 (95% CI 0.02-0.09) to 7.24 (95% CI 1.6-38.36), with an influence on periodontitis severity.

Some association mechanisms between periodontal disease and hypertension are reported. The periodontal bacterial load and transient bacteremia, the subsequent immune response, a systemic inflammatory generalization and glucose - lipid metabolism are pathologic pathways related to periodontitis that can contribute to a state of generalized inflammation, acting as a substrate for an increase in BP [13, 14]. On the other hand, BP elevation could affect the membrane of periodontal blood vessels, inducing the rupture of small arteries and promoting gingival bleeding and alteration in alveolar support [13].

However, the evidence of the interrelationships between the conditions is still conflicting [15], which justifies the necessity to investigate the mechanisms and factors that could strengthen or weaken this association. Therefore, this study aimed to evaluate and compare the clinical and microbiological aspects of hypertensive and

normotensive patients with periodontitis, to understand possible associations between periodontal diseases and arterial hypertension.

Material and methods

Study design and ethical considerations

This study presents the preliminary results from a cross-sectional investigation and is reported according to the guidelines proposed in the STROBE statements [16]. Individuals invited to participate in the study were informed about the objectives, risks and benefits. Informed consent was obtained from all individual participants included in the study. The research protocol was approved by the Ethics Committee in Research of the Medicine School of Federal University of Pelotas (1,043,441).

Patient recruitment

The study was conducted with individuals from Pelotas/RS, Brazil. The sample was partially recruited at Amilcar Gigante Health Research Center, a public hospital from the Federal University of Pelotas (UFPel), and also by publicity on medical clinics and at social media on the Internet (e.g. Instagram and Facebook), to contemplate the hypertensive group (HG) and normotensive group (NG). The recruitment period comprised of April 2018 to July 2019. The examinations and data collection were performed in a dental office in the Amilcar Gigante Health Research Center or in the School of Dentistry of UFPel.

The sample size was estimated based on a mean and standard deviation of the bacteria count of 6.48 ± 0.84 in individuals with diabetes and periodontitis, and mean and standard deviation of the bacteria count of 7.13 ± 1.01 in individuals nondiabetic with periodontitis [17]. Besides, were considered 80% test power and 5% significance level, yielding a sample size of 33 individuals in each group. Taking into account recuses and possible dropouts, the sample size was increased by 20%, resulting in a total of 78 individuals (39 hypertensive and 39 normotensive).

Eligibility criteria

Patients aged between 35 and 75 years, without distinction of sex, and presenting at least 8 permanent teeth were included in this research. It was adopted specific inclusion criteria for hypertension diagnoses according to arterial pressure gauging [18]. Hypertensive patients presented systolic pressure ≥ 130 mmHg and diastolic pressure ≥ 80 mmHg, with hypertension status established more than 6 months previously the study beginning and in current use of anti-hypertensive medicines; Normotensive patients presented a negative history of arterial

hypertension and with systolic pressure <130 mmHg and diastolic pressure <80 mmHg. Patients that were identified with high blood pressure during the screening, which had not presented a previous history of hypertension, were forwarded to a medical cardiological evaluation and were not included in the study.

The exclusion criteria were: smoking habit; obesity; diabetes mellitus; metabolic syndrome; autoimmune diseases; pregnancy; use of antibiotics, anti-inflammatory or immunosuppressive medications in the last 6 months; history of periodontal treatment in the last 6 months; current use of a fixed orthodontic appliance. Self-declared hypertensive patients, who had blood pressure (BP) measured up to 140/90 mmHg and do not reported using medication to control BP; and/or who had prehypertension, history of stroke, or myocardial infarction, were furthered to a cardiologic evaluation and were not included in the study.

Data collection

The data collection was performed in two sessions. In the first one, a questionnaire to investigate the dental and general health, as well as demographic, behavioral, and socioeconomic data of the individuals were applied by trained examiners. Systemic conditions report and the medications used by normotensive and hypertensive patients were also requested. Patients underwent physical and periodontal examinations. In the second moment, a blood test was performed by a private laboratory (Sancti Laboratory of Clinical Analysis, Pelotas, RS, Brazil) to evaluate plasma levels of glucose, triglycerides, cholesterol (HDL and LDL), C-reactive protein (CRP), and fibrinogen. The collection of gingival crevicular fluid (GCF) samples, prophylaxis, and oral hygiene guidance were also performed.

For physical exam, the weight, height, and waist circumference of all participants were collected. BP was measured using a calibrated digital device (HEM-7113, OMRON, São Paulo, SP, Brazil), in the patient's left arm while in the sitting position, after 5 minutes of rest. The measurement was performed three times, with an interval of two minutes between each measurement, and the recorded value corresponded to the average of the three values.

Periodontal condition

To evaluate the periodontal condition, the Visible Plaque Index (VPI), Marginal Bleeding Index (MBI), Plaque Retentive Factor (PRF), Probing Pocket Depth (PPD), Bleeding on Probing (BOP), and Clinical Attachment Loss (CAL) were performed by two calibrate dentists. The Intra-class Correlation Coefficient (ICC) was used to verify the intra and inter-examiners agreement. The ICC values were 0.952 (PPD), 0.984 (CAL) and 0.939 (PPD), 0.981 (CAL) for the examiners 1 and 2, respectively. The inter-examiner ICC value was 0.911 (PPD)

and 0.976 (CAL). The values were assessed on six sites of all present teeth (except to 3rd molars) using a periodontal probe (UNC 15, Trinity, Trinity-odontologia, São Paulo, SP, Brazil). The periodontitis diagnosis based on the full-mouth estimated PPD and CAL values, according to the Center for Disease Control and Prevention in association with the American Academy of Periodontology (CDC/AAP) criteria [19].

Microbiological analysis

The GCF samples were collected from six sites non-adjacent of different teeth with the greatest probing depths in each subject using sterile absorbent paper strips number 35 (AllPrime, Meta Biomed Co. Ltd., Heungdeok-gu, South Korea). The supragingival plaque of dental surface was removed and the sites were carefully dried with air spray, and isolated from saliva with sterile cotton rolls for the sampling collection. The point was gently inserted along the gingival margin sulcus to the most apical portion of the pocket per 30s, all the cones were then immediately transferred to a single microtube (Eppendorf do Brasil, São Paulo, SP, Brazil). The samples were placed in a polystyrene box containing ice and stored at -70 °C until processing.

The DNA were extracted using a commercial kit for detection of bacterial colonization (Ludwig biotecnologia, Porto Alegre, Brasil) following the manufacturer's protocol. All samples were analysed for DNA quantity and purity based on optical density in a spectrophotometer (Pharmacia Biotech, DE, USA). Sufficient samples had an absorbance reading of 260 nm and an initial concentration between 0.5 and 0.6 µg/µl⁻¹ for the relationship between absorbances at 260/280 nm.

Microbiological analysis of the periodontal pathogens with DNA of the standard strains of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (ATCC 33384), *Prevotella intermedia* (ATCC 25611), *Fusobacterium nucleatum* (ATCC 49256), and *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277) were carried out using real time polymerase chain reaction analysis (RT-PCR) in the Laboratory of Microbiological Research - Biochemistry, Molecular Biology and Cell Culture, UFPel. The following were the primer sequences: *P. gingivalis* forward TGCAACT TGCCTTACAGAGGG and reverse ACTCGTATCGCCCGTTATTC; *A. actinomycetemcomitans* forward CAAGTGTGATTAGGTAGTTGGTGGG and reverse CCTTC CTCATCACCGAAAGAA; *P. intermedia* forward CCACATATGGCATCTGAG GTG and reverse TCAATCTGCACGCTACTTGG; and *F. nucleatum* forward GAAGAAACAAATGACGGTAACAAC and reverse GTCATCCCCAC CTCCTCCT (IDT", Integrated DNA Technologies, Iowa, USA).

The oral samples' DNAs were amplified and marked with the Syber Green Mix/ROX reagent (Sigma-Aldrich, Foster City, California, USA) in RT-PCR reactions conducted using the Step One™ Real-Time PCR

System (Image Quant 100 - GE Healthcare®, Piscataway, New Jersey, USA) following the protocol used by Casarin et al. [20], . All reactions were performed in a total volume of 15µL containing 7.65µL Syber Green mix/ROX (Sigma-Aldrich, Foster City, California, USA), 0.30µl of each pair IDT® oligonucleotide primers (Integrated DNA technologies, Iowa, USA) and 6.75µl DNA extracted from the sample. All reactions were carried out in the presence of positive control, containing genomic DNA specific to the bacteria under analysis, and negative control, without DNA. Thermocycling was conducted as follows: 94°C for 5 min, followed by 40 cycles of denaturation at 94°C for 45 s, annealing at 55.4°C (*P. gingivalis*), 55°C (*A. actinomycetemcomitans*) and 58°C (*F. nucleatum* and *P. intermedia*) for 1 min, extension at 72°C for 1 min and a final extension at 72°C for 10 min. After the PCR reaction was carried out, a dissociation curve (melting curve) with a temperature between 60°C and 95°C was performed to determine the specificity of the PCR reaction. All reactions were accomplished in MicroAmp™ Fast Optical 48-Well Reaction Plate tubes (Applied Biosystems®, Concord, Ontario, Canada). After optimization, four dilutions were selected for the standard curve with DNA extracted from the pure bacterial culture. This standard curve of known concentration was used to convert the cycle threshold score obtained from the samples into exact numbers of DNA concentrations [21]. The data were analyzed using the Step One™ program (Applied Biosystems®, Concord, Ontario, Canada).

Statistical analysis

The data were expressed as mean, standard deviation, and median values. The Shapiro–Wilk test was used to determine the distribution (normal or non-normal) of the data. As non-normal distribution was determined, the characteristics of the sample were compared using the Mann-Whitney and Chi-square test for clinical comparison. The total count of which bacterial species were the outcome. The independent variables were age in years (median ≤ 55 / > 55), gender (female/males), self-reported ethnicity (caucasian/non-caucasian), education level ($>8/\leq 8$ completed years of study – corresponding to a primary school education in Brazil), household income based on the Brazilian monthly minimum wage (BMMW), which was R\$954.00 (equivalent to approximately US\$250 during the study period); >1 BMMW / ≤ 1 BMMW and cigarette smoking status (never smoker/former smoker). Data analysis was performed with the software STATA 14 (Stata Corporation; College Station, TX, USA). The level of significance was 5%.

Results

Patients

From 156 individuals evaluated for eligibility, 38 patients were included until this moment. The reasons for not inclusion were: smoking habit (n = 27), diabetes (n = 20), absence of teeth (n = 29), self-reported pregnancy (n = 1), use of antibiotics at last 3 months (n = 9) and non-diagnostic of periodontitis (n = 32). Among the 38 patients, 24 were hypertensive and 14 were normotensive patients.

Table 1 presented the demographic, socioeconomic, and behavioral characteristics of hypertensive and normotensive patients. The normotensive group was mostly ≤ 55 (n=11), while the hypertensive group was mainly >55 (n=14). Both groups were composed, mostly, by white (NG: 13; HG: 18), female (NG: 10; HG: 15), and never smokers (NG: 9; HG: 15) components. Regarding education, it was observed that the majority of normotensive patients had >8 years of schooling (n=12), while the hypertensive group was divided in half between ≤ 8 years and >8 years. Although some patients did not answer about income, most of the responses were in the range of around one Brazilian minimum wage.

Systemic conditions and inflammatory markers were assessed as independent variables according to establish cut-off points as increased levels, and a similar distribution could be observed in both groups. Triglycerides ≥ 150 mg/dL (NG:4; HG:5); glycaemia >99 mg/dL (NG:1; HG:2); fibrinogen ≥ 300 mg/dL (NG:5; HG:9); C-reactive protein ≥ 6 mg/L (NG:2; HG:2); obesity – Body Mass Index (BMI) >30 (NG:1; HG:3); HDL cholesterol ≥ 50 mg/dL (NG:10; HG:16) and LDL cholesterol >130 mg/dL (NG:6; HG:9); and total cholesterol ≥ 200 mg/dL (NG:7; HG:10). The use of medication was mainly reported by the hypertensive group for antihypertensive drugs: p=0.001; for antidepressant drugs: p=0.041, and for diuretic drugs: p=0.003). Also, the blood pressure was slightly higher in the hypertensive group ($128.2\text{mmHg} \pm 12.78 / 80.7\text{mmHg} \pm 8.63$) compared to the normotensive group ($118.5\text{mmHg} \pm 12.17 / 70.21\text{mmHg} \pm 9.29$) (Table 2).

Periodontal condition

Comparing the periodontal parameters of the two groups, hypertensive individuals demonstrated higher percentage of VPI (p=0.048), MBI (p=0.019), PRF (p=0.023), and sites with 1-3 mm CAL (p=0.031). Besides, statistical difference was observed between the groups regarding the mean CAL value at all evaluated sites (p=0.022). Concerning PPD, BOP and diagnosis of moderate or severe periodontitis, there were no statistical differences between groups (Table 3). It was previously established that the six sites with the highest PPD of each individual should be selected for the GCF sample collection for PCR. The PPD averages of the collection sites were compared and did not show statistical differences between groups for any of the sites (p>0.05).

Microbiological analysis

Table 4 and Figure 1 exposes the comparison of each bacterial species in normotensive and hypertensive individuals. The comparison was carried out through the bacterial species counting means. There was a statistical difference among groups for the following species: *P. gingivalis* ($p=0.014$), *P. intermedia* ($p=0.005$) and *F. nucleatum* ($p=0.009$). Nonetheless, *A. actinomycetemcomitans* did not differ between groups ($p=0.127$).

Discussion

This study aimed to explore the association between periodontitis and arterial hypertension through the evaluation and comparison of clinical and microbiological aspects of hypertensive and normotensive patients, both with periodontitis. Our preliminary results revealed a significant association between arterial hypertension and a greater quantity of the periodontopathogenic bacterial species *P. gingivalis*, *P. intermedia*, and *F. nucleatum* ($p<0.05$) compared to a normotensive group. As well, a worse scenario in the periodontal parameters VPI, MBI, PRF, CAL mean, and CAL 1-3mm was observed in the hypertension group ($p<0.05$). Likewise, no differences in *A. actinomycetemcomitans* count, PPD, BOP, periodontitis diagnostic (moderate/severe), or the general health and systemic inflammatory markers could be observed between hypertensive and normotensive patients.

The microbiological data observed in the present study corroborates with the existing evidence. A recent literature review reported that among the main oral pathogens related to systemic diseases, the *A. actinomycetemcomitans*, *P. intermedia* and *P. gingivalis* species can possibly affect the cardiovascular system [12]. Moreover, information from a cross-sectional study using data from 7928 participants of the Third National Health and Nutrition Examination Survey - NHANES III [22], demonstrated that the participants with high blood pressure status ($BP\geq 130/80$ mmHg) presented higher serum antibodies against all periodontal microorganisms included in the present analyses (*A. actinomycetemcomitans*, *P. intermedia*, *F. nucleatum* and *P. gingivalis*) when compared to individuals with $BP<130/80$ mmHg.

The results of a more expressive number of *P. gingivalis* in hypertension patients agrees with other studies, where *P. gingivalis* shows a potential to evade innate immune detection via Toll-like receptor (TLR)-4, facilitating chronic vascular inflammation [23]. A case-control study involving hypertensive and normotensive pregnant women evaluated placental biopsies through PCR technique, and found an association between the presence of *P. gingivalis* in placental tissues and hypertensive disorders (OR: 7.59, $p = 0.019$, CI 95% 1.39-41.51) [24]. Besides, *P. gingivalis* can spread through the upper layers of gingival epithelial cells and penetrate the basement membrane in connective tissues, contributing to the periodontal attachment loss [25]. Even though our

results did not demonstrate statistical differences referred to PPD measurements between groups, it was observed a statistical difference in *P. gingivalis* count, which could be associated to the presence of arterial hypertension condition.

It is approached that the red-complex bacteria (*Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, and *Treponema denticola*), accompanied by the *Prevotella* and *Fusomonile* groups are mainly present in deeper periodontal pockets, involved in the onset and progression of the periodontitis [26, 27]. Considering that the GCF samples collected for the RT-PCR technique were obtained from sites with deeper pockets and that there was no significant difference between the PPD of these sites between groups, the differences found in bacterial load between the hypertensive and normotensive groups may adopt other mechanisms. It's possible to consider that the higher rates of plaque (VPI), marginal bleeding (MBI), and dental calculus (PRF) observed in the hypertensive group would be the factors related to a higher bacterial count [28]. Moreover, these factors may be contributing to the intervention of the systemic condition concerning these patients, an inference that converges with findings of other studies [5, 13, 29, 30].

Regarding the absence of significant differences with respect to *A. actinomycetemcomitans*, some appointments can be discussed. These periodontopathogens were commonly more related to periodontal infections in young individuals and, for many years, were associated with the prevalence of juvenile / aggressive periodontitis [31]. Besides the more pronounced expression of *A. actinomycetemcomitans* in adolescents and young adults, it is also reported that the proportion of the population that harbor *A. actinomycetemcomitans* may vary between different geographical areas, different clinical presentations of periodontitis, and according to the patient's susceptibility [31–33]. Another fact to be considered is related to the colonization and behavior of these periodontopathogens. More recently studies have reported that *A. actinomycetemcomitans* can promote early colonization in periodontal sites and still play a role in the nutrition of other periodontopathogens [34–36]. The non-statistical difference between groups for *A. actinomycetemcomitans* count may be due to the variable colonization pattern of this bacteria [37].

The use of several types of drugs reported in this study, especially by hypertensive patients, should be considered, given the effects that these drugs may have on the periodontium. Various medications can cause specific changes in periodontal tissues, influencing the clinical presentation or the progression of periodontal diseases [38]. To understand the association of periodontal diseases with systemic diseases, it should be considered that the frequency of medication intake, in addition to reflecting on the severity of the systemic disease, may indirectly represent the systemic inflammatory burden in chronic-inflammatory diseases [39]. In the present study,

the use of β -blockers (atenolol, carvedilol), β -adrenoceptor antagonists (propranolol), calcium channel blockers (amlodipine), angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitors (lisinopril, losartan, enalapril) were reported by hypertensive patients, which agrees with the current literature, that describes these classes of drugs as the most used for the control of hypertension, along with diuretics [38, 39]. Besides, the effect of antihypertensives on periodontal tissues has already been reported in experimental studies [40]. Rodrigues et al. [41] observed that the use of low doses of propranolol suppresses bone resorption by inhibiting RANKL-mediated osteoclastogenesis, as well inflammatory markers in experimental periodontitis in rats. Furthermore, rats treated with carvedilol with induced periodontitis had reduced levels of pro-inflammatory cytokines (IL-1 β TNF- α), as well as MMP-2, MMP-9, RANK, RANKL, COX-2 and OPG, demonstrating that the medication can influence bone formation / destruction and anti-inflammatory activity in periodontitis [40]. This could explain the differences observed in the CAL values of hypertensive patients, mainly related to the sites with mild attachment loss (1-3mm).

Above all, it is important to highlight that this study shows preliminary data from an incomplete sample, which presents a disparity in size between groups, and consequently an unfinished analysis. This investigation is also limited by its cross-sectional design, which limits the extrapolation of the results. However, it is important to consider that this study was developed with data of full-mouth periodontal examination in six sites of all present teeth, and the analysis of the exact number of bacteria were performed using a highly sensitive technique. Within the limits of this study, it can be concluded that periodontitis is possibly associated with hypertension, once a higher periodontopathogens count accompanied by worse periodontal conditions was found in hypertensive individuals. Nevertheless, longitudinal studies investigating other bacteria should be conducted to determine the impact of hypertension on the oral microbiota and periodontal status, as well as clinical trials are needed to determine whether periodontal treatment could benefit the clinical and oral microbiology in hypertensive patients.

Acknowledgments

This study was financed by the Research Support Foundation of Rio Grande do Sul - FAPERGS (16/2551-0000186-3), and received the support of the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel - Brasil (CAPES) - Finance Code 001. We acknowledge the University of Guarulhos, on behalf of Professors Magda Feres and Bruno Bueno Silva, who provided the bacterial strains for the development of this research.

Table 1 Demographic, socio-economic and behavioral characteristics of normotensive and hypertensive patients (n=38).

	Normotensive (n=14) n (%)	Hypertensive (n=24) n (%)
Age (years)		
≤55	11 (78.6)	10 (41.7)
>55	3 (21.4)	14 (58.3)
Sex		
Female	10 (71.4)	15 (62.5)
Male	4 (28.6)	9 (37.5)
Smoking abstinence		
Never smoker	9 (64.3)	15 (62.5)
Former smoker	5 (53.7)	6 (25)
Ethnicity		
White	13 (92.9)	18 (75)
Black	1 (7.1)	4 (16.7)
Schooling (years)		
>8	12 (85.7)	12 (50)
≤8	2 (14.3)	12 (50)
Income (BMMW) ^a		
>1	12 (85.7)	12 (70.8)
≤1	2 (14.3)	7 (29.2)

#There was missing data regarding smoking abstinence (three hypertensive patients), ethnicity (two hypertensive patients) and income (five hypertensive patients); ^aBMMW: Brazilian monthly minimum wage ≈ R\$ 954 during the study period.

Table 2 Systemic conditions and medication use by normotensive and hypertensive patients (n=38).

	Normotensive (n=14) n (%)	Hypertensive (n=24) n (%)	P value
Depression	3 (21.4)	4 (16.7)	0.761
Triglycerides (≥ 150 mg/dL)	4 (28.5)	5 (20.8)	0.588
Glycaemia (>99 mg/dL)	1 (7.1)	2 (8.3)	0.806
Fibrinogen (≥ 300 mg/dL)	5 (35.7)	9 (37.5)	0.912
C-reactive protein (≥ 6 mg/dL)	2 (14.3)	2 (8.3)	0.414
Obesity (BMI ^a >30)	1 (7.1)	3 (12.5)	0.604
HDL Cholesterol (≥ 50 mg/dL)	10 (71.4)	16 (66.7)	0.761
LDL Cholesterol (>130 mg/dL)	6 (42.9)	9 (37.5)	0.744
Total Cholesterol (≥ 200 mg/dL)	7 (50)	10 (41.7)	0.618
Medication			
Antihypertensive ^b	0	23 (95.8)	0.001
Antidepressant ^c	0	6 (25)	0.041
Diuretics ^d	0	11 (45.8)	0.003
Anticoagulant ^e	0	2 (8.3)	0.267
Cholesterol ^f	1 (7.1)	5 (20.8)	0.264
Blood pressure (mmHg), <i>mean $\pm$ sd</i>			
Systolic	118.5 $\pm$ 12.17	128.2 $\pm$ 12.78	0.024
Diastolic	70.21 $\pm$ 9.29	80.7 $\pm$ 8.63	0.001

^aBMI: Body mass index; ^bLosartan, Atenolol, Amlodipine, Enalapril, Captopril, Carvedilol, Digoxin, Propanolol, Lisinopril, Metoprolol succinate, Diovan, Ablok; ^cClonazepam, Paroxetine, Nortriptyline, Bupropion, Sertraline, Tolrest; ^dHydrochlorothiazide, Furosemide, Spironolactone; ^eWarfarin, AAS; ^fSimvastatin; Trezor.

Table 3 Comparisons of periodontal clinical variables among normotensive and hypertensive patients (n=38).

	Normotensive (mean $\pm$ s.d.) (n = 14)	Hypertensive (mean $\pm$ s.d.) (n = 24)	P value
VPI (%)*	30.89 $\pm$ 19.24	40.64 $\pm$ 18.38	0.048
MBI (%)*	5.75 $\pm$ 6.84	11.2 $\pm$ 8.67	0.019
PRF (%)*	22.89 $\pm$ 17.19	32.31 $\pm$ 11.84	0.023
BOP (%)*	10.54 $\pm$ 10.33	12.52 $\pm$ 8.02	0.184
PPD 1-3 mm (%)*	92.94 $\pm$ 11.65	95.3 $\pm$ 5.06	0.536
PPD 4-5 mm (%)*	10.16 $\pm$ 9.87	5.91 $\pm$ 4.68	0.505
PPD $\geq$ 6 mm (%)*	3.91 $\pm$ 5.2	1.37 $\pm$ 0.59	0.723
PPD (mm)*	2.10 $\pm$ 0.47	2.05 $\pm$ 0.33	0.963
CAL 1-3 mm (%)*	27.27 $\pm$ 16.31	44.47 $\pm$ 22.28	0.031
CAL 4-5 mm (%)*	12.19 $\pm$ 15.06	19.75 $\pm$ 17.7	0.154
CAL $\geq$ 6 mm (%)*	7.71 $\pm$ 13.62	4.54 $\pm$ 5.44	0.826
CAL (mm)*	1.37 $\pm$ 1.32	2.11 $\pm$ 1.14	0.022
Periodontitis, n (%) [#]			
Moderate/Severe	12 (85.71)	22 (91.67)	0.616

VPI, visible plaque index; MBI, marginal bleeding index; PRF, plaque retention factors; BOP, bleeding on probing; PPD, probing pocket depth; CAL, clinical attachment loss. *Mann-whitney test; # Chi-square test

Table 4 Comparison of each bacterial species in normotensive and hypertensive.

Bacterial species (CFU/ μ L)	Normotensive (mean $\pm$ sd) (n = 14)	Hypertensive (mean $\pm$ sd) (n = 24)	P value*
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	$1.55 \times 10^{10} \pm 4.45 \times 10^9$	$1.76 \times 10^{10} \pm 3.71 \times 10^9$	0.127
<i>P. gingivalis</i>	$4.11 \times 10^9 \pm 2.24 \times 10^9$	$5.87 \times 10^9 \pm 1.99 \times 10^9$	0.014
<i>P. intermedia</i>	$1.69 \times 10^{10} \pm 4.41 \times 10^9$	$2.05 \times 10^{10} \pm 4.07 \times 10^9$	0.005
<i>F. nucleatum</i>	$1.14 \times 10^{10} \pm 2.16 \times 10^9$	$1.33 \times 10^{10} \pm 2.13 \times 10^9$	0.009

*Mann-whitney test

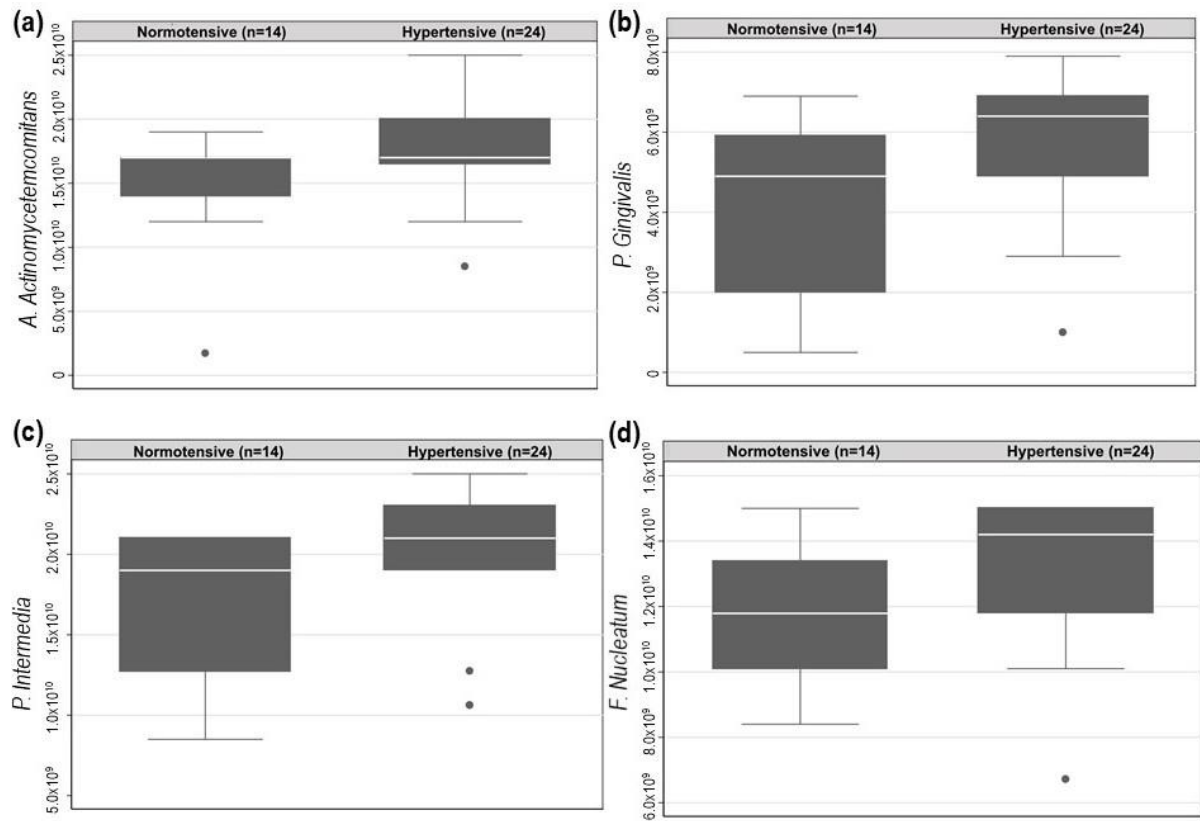


Figure 1. Bacteria distribution count in normotensive and hypertensive individuals. (a) *A. actinomycetemcomitans* (b) *P. gingivalis* (c) *P. intermedia* (d) *F. nucleatum* (CFU/μL)

References

- [1] Papapanou PN, Sanz M, Buduneli N, et al. (2018) Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Periodontol* 89: S173–S182.
- [2] Kassebaum NJ, Smith AGC, Bernabé E, et al. (2015) Global, Regional, and National Prevalence, Incidence, and Disability-Adjusted Life Years for Oral Conditions for 195 Countries, 1990–2015: A Systematic Analysis for the Global Burden of Diseases, Injuries, and Risk Factors. *J Dent Res* 96: 380–387.
- [3] Sanz M, D’aiuto F, Deanfield J, et al. (2010) European workshop in periodontal health and cardiovascular disease-scientific evidence on the association between periodontal and cardiovascular diseases: a review of the literature. *Eur Hear J Suppl* 3–12.
- [4] Xian-Tao Zeng, Na Li, Li-Jun Zhang, Rong Rong M-YL. (2017) Periodontal Disease and Cardiovascular Disease: A Native Review. *J Hear Mind* 1: 78-83.
- [5] Zhao M-J, Qiao Y-X, Wu L, et al. (2019) Periodontal Disease Is Associated With Increased Risk of Hypertension: A Cross-Sectional Study. *Front Physiol* 10: 1–8.
- [6] Mustapha IZ, Debrey S, Oladubu M, et al. (2007) Markers of Systemic Bacterial Exposure in Periodontal Disease and Cardiovascular Disease Risk: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Periodontol* 78: 2289–2302.
- [7] Tonetti MS, Van Dyke TE. (2013) Periodontitis and atherosclerotic cardiovascular disease: consensus report of the Joint EFP/AAPWorkshop on Periodontitis and Systemic Diseases. *J Periodontol* 84: S24–S29.
- [8] Williams B, Mancia G, Spiering W, et al. (2018) 2018 ESC/ESH Guidelines for the management of arterial hypertension. *European Heart Journal* 39: 3021–3104.
- [9] Rivas-Tumanyan S, Campos M, Zevallos JC, et al. (2013) Periodontal Disease, Hypertension, and Blood Pressure Among Older Adults in Puerto Rico. *J Periodontol* 84: 203–211.
- [10] Tsakos G, Sabbah W, Hingorani AD, et al. (2010) Is periodontal inflammation associated with raised blood pressure? Evidence from a National US survey. *Journal of Hypertension* 28: 2386–2393.
- [11] Martin-Cabezas R, Seelam N, Petit C, et al. (2016) Association between periodontitis and arterial hypertension: A systematic review and meta-analysis. *American Heart Journal* 180: 98–112.
- [12] Bui FQ, Almeida-da-Silva CLC, Huynh B, et al. (2019) Association between periodontal pathogens and systemic disease. *Biomed J* 42: 27–35.
- [13] Tsioufis C, Kasiakogias A, Thomopoulos C, et al. (2011) Periodontitis and blood pressure: The concept of dental hypertension. *Atherosclerosis* 219: 1–9.
- [14] Androulakis ES, Tousoulis D, Papageorgiou N, et al. (2009) Essential hypertension: is there a role for inflammatory mechanisms? *Cardiol Rev* 17: 216–21.
- [15] Brignardello-Petersen R. (2020) There is still no high-quality evidence that periodontitis is a risk factor for hypertension or that periodontal treatment has beneficial effects on blood pressure. *Journal of the American Dental Association* 151: e31.
- [16] von Elm E, Altman DG, Egger M, et al. (2008) The Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology (STROBE) statement: guidelines for reporting observational studies. *J Clin Epidemiol* 61: 344–349.
- [17] Field CA, Gidley MD, Preshaw PM, et al. (2012) Investigation and quantification of key periodontal pathogens in patients with type 2 diabetes. *J Periodontal Res* 47: 470–478.
- [18] Whelton PK, Carey RM, Aronow WS, et al. (2018) 2017 ACC/AHA/AAPA/ABC/ACPM/AGS/APhA/ASH/ASPC/NMA/PCNA Guideline for the Prevention, Detection, Evaluation, and Management of High Blood Pressure in Adults: Executive Summary. *J Am Soc Hypertens* 12: 579.e1-579.e73.

- [19] Eke PI, Page RC, Wei L, et al. (2012) Update of the Case Definitions for Population-Based Surveillance of Periodontitis. *J Periodontol* 83: 1449–1454.
- [20] Casarin M, Antoniazzi RP, Vaucher RA, et al. (2017) RT-PCR quantification of periodontal pathogens in crack users and non-users. *Oral Dis* 23: 324–330.
- [21] Morillo JM, Lau L, Sanz M, et al. (2004) Quantitative real-time polymerase chain reaction based on single copy gene sequence for detection of periodontal pathogens. *J Clin Periodontol* 31: 1054–60.
- [22] Pietropaoli D, Del Pinto R, Ferri C, et al. (2019) Definition of hypertension-associated oral pathogens in NHANES. *J Periodontol*. Epub ahead of print. DOI: 10.1002/jper.19-0046.
- [23] Slocum C, Coats SR, Hua N, et al. (2014) Distinct Lipid A Moieties Contribute to Pathogen-Induced Site-Specific Vascular Inflammation. *PLoS Pathog* 10: e1004215.
- [24] Chaparro A, Blanlot C, Ramírez V, et al. (2013) *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* and toll-like receptor 2 are associated with hypertensive disorders in placental tissue: A case-control study. *J Periodontal Res* 48: 802–809.
- [25] Ji S, Choi YS, Choi Y. (2015) Bacterial invasion and persistence: Critical events in the pathogenesis of periodontitis? *J Periodontal Res* 50: 570–585.
- [26] Andrukhov O, Ulm C, Reischl H, et al. (2011) Serum Cytokine Levels in Periodontitis Patients in Relation to the Bacterial Load. *J Periodontol* 82: 885–892.
- [27] Kageyama S, Takeshita T, Asakawa M, et al. (2017) Relative abundance of total subgingival plaque-specific bacteria in salivary microbiota reflects the overall periodontal condition in patients with periodontitis. *PLoS One* 12: 1–12.
- [28] Gomes SC, Nonnenmacher C, Susin C, et al. (2008) The effect of a supragingival plaque-control regimen on the subgingival microbiota in smokers and never-smokers: evaluation by real-time polymerase chain reaction. *J Periodontol* 79: 2297–304.
- [29] Kawabata Y, Ekuni D, Miyai H, et al. (2016) Relationship between Prehypertension/Hypertension and Periodontal Disease: A Prospective Cohort Study. *Am J Hypertens* 29: 388–396.
- [30] Martin-Cabezas R, Seelam N, Petit C, et al. (2016) Association between periodontitis and arterial hypertension: A systematic review and meta-analysis. *Am Heart J* 180: 98–112.
- [31] Henderson B, Ward JM, Ready D. (2010) *Aggregatibacter* (*Actinobacillus*) *actinomycetemcomitans*: A triple A* periodontopathogen? *Periodontol* 2000 54: 78–105.
- [32] Nibali L, Ready DR, Parkar M, et al. (2007) Gene polymorphisms and the prevalence of key periodontal pathogens. *J Dent Res* 86: 416–420.
- [33] Rylev M, Kilian M. (2008) Prevalence and distribution of principal periodontal pathogens worldwide. In: *Journal of Clinical Periodontology*. *J Clin Periodontol*, pp. 346–361.
- [34] Fine DH, Patil AG, Velusamy SK. (2019) *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa) under the Radar: Myths and misunderstandings of AA and its role in aggressive periodontitis. *Frontiers in Immunology* 10: 728.
- [35] Gholizadeh P, Pormohammad A, Eslami H, et al. (2017) Oral pathogenesis of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Microbial Pathogenesis* 113: 303–311.
- [36] Herbert BA, Novince CM, Kirkwood KL. (2016) *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, a potent immunoregulator of the periodontal host defense system and alveolar bone homeostasis. *Molecular Oral Microbiology* 31: 207–227.
- [37] Socransky SS, Haffajee AD. (2005) Periodontal microbial ecology. *Periodontology* 2000 38: 135–187.
- [38] Hughes FJ, Bartold PM. (2018) Periodontal complications of prescription and recreational drugs. *Periodontology* 2000 78: 47–58.
- [39] Wang IC, Askar H, Ghassib I, et al. (2020) Association between periodontitis and systemic medication intake: A case-control study. *J Periodontol* 91: 1245–1255.

- [40] de Araújo Júnior RF, Souza TO, de Medeiros CAX, et al. (2013) Carvedilol Decrease IL-1 β and TNF- α , Inhibits MMP-2, MMP-9, COX-2, and RANKL Expression, and Up-Regulates OPG in a Rat Model of Periodontitis. PLoS One 8: e66391.
- [41] Rodrigues WF, Madeira MFM, Da Silva TA, et al. (2012) Low dose of propranolol down-modulates bone resorption by inhibiting inflammation and osteoclast differentiation. Br J Pharmacol; 165: 2140–2151.

5. Considerações finais

É importante destacar que este estudo apresenta dados preliminares de uma amostra incompleta, com disparidade de tamanho entre os grupos e, consequentemente, uma análise não finalizada. Esta investigação também é limitada pelo seu desenho transversal, o que impede extrapolar os resultados. No entanto, é relevante considerar que os resultados reportados foram obtidos a partir de exame periodontal completo, em seis sítios de todos os dentes presentes em boca. Além disso, a análise do número exato de bactérias foi realizada por meio de uma técnica altamente sensível.

Diante do exposto, pode-se concluir que a periodontite pode estar associada à hipertensão, uma vez que foi encontrada maior contagem de periodontopatógenos específicos e piores condições periodontais em indivíduos hipertensos, quando comparados a normotensos. No entanto, estudos longitudinais investigando outras bactérias devem ser realizados para determinar o impacto da hipertensão na microbiota oral e estado periodontal, bem como ensaios clínicos são necessários para determinar se o tratamento periodontal pode beneficiar a microbiologia clínica e oral em pacientes hipertensos.

Referências

- ALBANDAR, J. M.; SUSIN, C.; HUGHES, F. J. Manifestations of systemic diseases and conditions that affect the periodontal attachment apparatus: Case definitions and diagnostic considerations. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 45, n. July 2016, p. S171–S189, 2018.
- ANDROULAKIS, E. S. et al. Essential hypertension: is there a role for inflammatory mechanisms? **Cardiology in review**, v. 17, n. 5, p. 216–21, 2009.
- ANGELI, F. et al. Association Between Periodontal Disease and Left Ventricle Mass in Essential Hypertension. **Hypertension**, v. 41, n. 3, p. 488–492, mar. 2003.
- AOYAMA, N. et al. Specific periodontopathic bacterial infection affects hypertension in male cardiovascular disease patients. **Heart and Vessels**, v. 33, n. 2, p. 198–204, 2018.
- ARMINGOHAR, Z. et al. Bacteria and bacterial DNA in atherosclerotic plaque and aneurysmal wall biopsies from patients with and without periodontitis. **Journal of Oral Microbiology**, v. 6, n. 1, 2014.
- BOOS, C.; LIP, G. Is Hypertension an Inflammatory Process? **Current Pharmaceutical Design**, v. 12, n. 13, p. 1623–1635, 1 maio 2006.
- BOTERO, J. E. et al. Periodontal disease in children and adolescents of Latin America. **Periodontology 2000**, v. 67, n. 1, p. 34–57, fev. 2015.
- BRASIL. **Hipertensão atinge 24,3% da população adulta — Governo do Brasil**. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/noticias/saude/2013/11/hipertensao-atinge-24-3-da-populacao-adulta/pressao-arterial-dados-ms.jpg/view>>. Acesso em: 11 jul. 2019.
- BUI, F. Q. et al. Association between periodontal pathogens and systemic disease. **Biomedical journal**, v. 42, n. 1, p. 27–35, 2019.
- CASARIN, M. et al. RT-PCR quantification of periodontal pathogens in crack users and non-users. **Oral Diseases**, v. 23, n. 3, p. 324–330, 1 abr. 2017.
- CHAFFEE, B. W.; WESTON, S. J. Association between chronic periodontal disease and obesity: a systematic review and meta-analysis. **Journal of periodontology**, v. 81, n. 12, p. 1708–24, dez. 2010.
- CHRISTIAENS, T.; NILSSON, P. M. APPENDIX : 2013 ESH / ESC GUIDELINES FOR THE MANAGEMENT OF. 2013.

- DESVARIEUX, M. et al. Periodontal bacteria and hypertension: the oral infections and vascular disease epidemiology study (INVEST). **Journal of Hypertension**, v. 28, n. 7, p. 1413–1421, jul. 2010.
- DEWHIRST, F. E. et al. The human oral microbiome. **Journal of bacteriology**, v. 192, n. 19, p. 5002–17, 1 out. 2010.
- DHIR, S.; KUMAR, V. Are cardiovascular risk parameters and glycemic levels associated with periodontitis in type 2 diabetes patients? A clinical study. **Indian Heart Journal**, v. 70, n. 3, p. 430–432, 2018.
- EKE, P. I. et al. Update of the Case Definitions for Population-Based Surveillance of Periodontitis. **Journal of Periodontology**, v. 83, n. 12, p. 1449–1454, dez. 2012.
- FIELD, C. A. et al. Investigation and quantification of key periodontal pathogens in patients with type 2 diabetes. **Journal of Periodontal Research**, v. 47, n. 4, p. 470–478, 2012.
- FORD, P. J.; YAMAZAKI, K.; SEYMOUR, G. J. Cardiovascular and Oral Disease Interactions: What is the Evidence? **Primary Dental Care**, v. 14, n. 2, p. 59–66, 1 abr. 2007.
- G. CATON, J. et al. A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions – Introduction and key changes from the 1999 classification. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 45, n. March, p. S1–S8, 2018.
- GAETTI-JARDIM, E. et al. Quantitative detection of periodontopathic bacteria in atherosclerotic plaques from coronary arteries. **Journal of medical microbiology**, v. 58, n. Pt 12, p. 1568–75, 1 dez. 2009.
- GARCIA, R. I.; HENSHAW, M. M.; KRALL, E. A. Relationship between periodontal disease and systemic health. **Periodontology 2000**, v. 25, p. 21–36, 2001.
- HERTZÉN, E. et al. M1 protein-dependent intracellular trafficking promotes persistence and replication of *Streptococcus pyogenes* in macrophages. **Journal of innate immunity**, v. 2, n. 6, p. 534–45, 2010.
- HUJOEL, P. P. Periodontal Disease and Coronary Heart Disease Risk. **JAMA**, v. 284, n. 11, p. 1406, 20 set. 2000.
- JEPSEN, S. et al. Periodontal manifestations of systemic diseases and developmental and acquired conditions: Consensus report of workgroup 3 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 45, n. February, p. S219–S229, 2018.

- KASSEBAUM, N. J. et al. Global Burden of Severe Periodontitis in 1990-2010. **Journal of Dental Research**, v. 93, n. 11, p. 1045–1053, 2014.
- KAWABATA, Y. et al. Relationship between Prehypertension/Hypertension and Periodontal Disease: A Prospective Cohort Study. **American Journal of Hypertension**, v. 29, n. 3, p. 388–396, 2016.
- KIM, J.; AMAR, S. Periodontal disease and systemic conditions: a bidirectional relationship. **Odontology**, v. 94, n. 1, p. 10–21, 25 set. 2006.
- KOCHER, T. et al. Periodontal complications of hyperglycemia/diabetes mellitus: Epidemiologic complexity and clinical challenge. **Periodontology 2000**, v. 78, n. 1, p. 59–97, out. 2018.
- KORNMAN, K. S.; PAGE, R. C.; TONETTI, M. S. The host response to the microbial challenge in periodontitis: assembling the players. **Periodontology 2000**, v. 14, p. 33–53, jun. 1997.
- LARJAVA, H. et al. Epithelial Integrins with Special Reference to Oral Epithelia. **Journal of Dental Research**, v. 90, n. 12, p. 1367–1376, 25 dez. 2011.
- LEITE, C. L. A. et al. Experimental-Induced Periodontitis is Exacerbated in Spontaneously Hypertensive Rats. **Clinical and Experimental Hypertension**, v. 27, n. 6, p. 523–531, 3 jan. 2005.
- LÖE, H. Periodontal disease. The sixth complication of diabetes mellitus. **Diabetes care**, v. 16, n. 1, p. 329–34, jan. 1993.
- MARTIN-CABEZAS, R. et al. Association between periodontitis and arterial hypertension: A systematic review and meta-analysis. **American Heart Journal**, v. 180, p. 98–112, 2016.
- MORRAN, M. P. et al. Dysfunctional innate immune responsiveness to *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide in diabetes. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 24, n. 4, p. 331–339, ago. 2009.
- NAKAJIMA, T.; YAMAZAKI, K. Periodontal disease and risk of atherosclerotic coronary heart disease. **Odontology**, v. 97, n. 2, p. 84–91, 29 jul. 2009.
- NASCIMENTO, G. G. et al. Is there a relationship between obesity and tooth loss and edentulism? A systematic review and meta-analysis. **Obesity Reviews**, v. 17, n. 7, p. 587–598, jul. 2016.
- OLSEN, I. Update on bacteraemia related to dental procedures. **Transfusion and Apheresis Science**, v. 39, n. 2, p. 173–178, out. 2008.
- OLSEN, I. From the acta prize lecture 2014: The periodontalsystemic connection seen

from a microbiological standpoint. **Acta Odontologica Scandinavica**, v. 73, n. 8, p. 563–568, 2015.

OMS. **Dados da Organização Mundial da Saúde**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hypertension>>. Acesso em: 24 jul. 2019.

PAGE, R. C. The Pathobiology of Periodontal Diseases May Affect Systemic Diseases: Inversion of a Paradigm. **Annals of Periodontology**, v. 3, n. 1, p. 108–120, jul. 1998.

PAIZAN, M.; VILELA-MARTIN, J. Is There an Association between Periodontitis and Hypertension? **Current Cardiology Reviews**, v. 10, n. 4, p. 355–361, 2014.

PASTER, B. J. et al. Bacterial Diversity in Human Subgingival Plaque. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 12, p. 3770–3783, 15 jun. 2001.

PETERSEN, P. E.; BAEHNI, P. C. Periodontal health and global public health. **Periodontology 2000**, v. 60, n. 1, p. 7–14, out. 2012.

REYES, L. et al. Periodontal bacterial invasion and infection: contribution to atherosclerotic pathology. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 40, p. S30–S50, 2013.

ROBERT, A. A. et al. Monitoring of Diabetic Patients With Periodontitis. v. 966, n. May, 2010.

ROSSIER, B. C.; BOCHUD, M.; DEVUYST, O. The hypertension pandemic: An evolutionary perspective. **Physiology**, v. 32, n. 2, p. 112–125, 2017.

RUDNEY, J. D. et al. Protein relative abundance patterns associated with sucrose-induced dysbiosis are conserved across taxonomically diverse oral microcosm biofilm models of dental caries. **Microbiome**, v. 3, n. 1, p. 69, 19 dez. 2015.

SANTOS, R. C. V. et al. Antimicrobial activity of tea tree oil nanoparticles against American and European foulbrood diseases agents. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, 2014.

SANZ, M. et al. European workshop in periodontal health and cardiovascular disease—scientific evidence on the association between periodontal and cardiovascular diseases: a review of the literature. **European Heart Journal Supplements**, p. 3–12, 2010.

SOCRANSKY, S. S. et al. Microbial complexes in subgingival plaque. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 25, n. 2, p. 134–144, 1 fev. 1998.

SUVAN, J. et al. Obesity as predictive factor of periodontal therapy clinical outcomes: A cohort study. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 47, n. 5, p. 594–601, 1 maio

2020.

TAKEUCHI, H. et al. Exit of intracellular *Porphyromonas gingivalis* from gingival epithelial cells is mediated by endocytic recycling pathway. **Cellular microbiology**, v. 13, n. 5, p. 677–91, maio 2011.

TSAKOS, G. et al. **Is periodontal inflammation associated with raised blood pressure? Evidence from a National US survey** *Journal of Hypertension*, ago. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20706132>>. Acesso em: 11 jul. 2019

TSIOUFIS, C. et al. Periodontitis and blood pressure: The concept of dental hypertension. **Atherosclerosis**, v. 219, n. 1, p. 1–9, nov. 2011.

VANCINI-CAMPANHARO, C. R. et al. Systemic arterial hypertension in the emergency service: Medication adherence and understanding of this disease. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, v. 23, n. 6, p. 1149–1156, 1 nov. 2015.

VON ELM, E. et al. The Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology (STROBE) statement: guidelines for reporting observational studies. **Journal of Clinical Epidemiology**, v. 61, n. 4, p. 344–349, abr. 2008.

WHELTON, P. K. et al. 2017 ACC/AHA/AAPA/ABC/ACPM/AGS/APhA/ASH/ASPC/NMA/PCNA Guideline for the Prevention, Detection, Evaluation, and Management of High Blood Pressure in Adults: Executive Summary. **Journal of the American Society of Hypertension**, v. 12, n. 8, p. 579.e1-579.e73, 2018.

WHITMORE, S. E.; LAMONT, R. J. Oral Bacteria and Cancer. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 3, p. e1003933, 27 mar. 2014.

YE, S. et al. Interleukin-1 and neurogenic control of blood pressure in normal rats and rats with chronic renal failure Downloaded from. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 279, p. 2786–2796, 2000.

ZAMBON, J. J. Periodontal Diseases: Microbial Factors. **Annals of Periodontology**, v. 1, n. 1, p. 879–925, 1 nov. 1996.

ZHAO, D. et al. Periodontal disease increases the risk for onset of systemic comorbidities in dental hospital attendees: An 18-year retrospective cohort study. **Journal of Periodontology**, v. 90, n. 3, p. 225–233, 2019a.

ZHAO, M.-J. et al. Periodontal Disease Is Associated With Increased Risk of Hypertension: A Cross-Sectional Study. **Frontiers in Physiology**, v. 10, n. April, p. 1–8, 2019b.

Apêndices

Apêndice 1

Breve Entrevista Confidencial

Iniciais: _____ Data de Nasc. _____ Masc./Fem. _____ Data: _____/_____/_____

Antes do início de qualquer etapa do estudo, precisamos que você preencha e devolva esse formulário.

Marque com um X a sua resposta.

A resposta SIM não significa, necessariamente, que você não estará habilitado para o estudo.

1. Você está recebendo tratamento de um médico? __SIM __NÃO
2. Está tomando remédios, comprimidos, cápsulas, injeções, hormônios, anticoncepcionais ou qualquer outra droga, prescrita por médico ou por sua vontade? __SIM __NÃO
3. Fez _____ uso _____ de antibióticos/antiinflamatórios/anticonvulsivamente/antidepressivo/imunossupressor nos últimos três meses? __SIM __NÃO
4. Você é alérgico(a) ou já teve alguma reação de desconforto a algum medicamento, alimento ou outra substância? __SIM __NÃO
5. Você tem ou já teve algum problema cardíaco ou de pressão? __SIM __NÃO
6. Você é diabético(a)? __SIM __NÃO
7. Você é portador do vírus do HIV? __SIM __NÃO
8. Você já teve febre reumática? __SIM __NÃO
9. Você está ou esteve em tratamento com algum dentista no último ano? __SIM __NÃO
10. Faz uso de algum bochecho prescrito por algum dentista? __SIM __NÃO
11. Você sofre de desmaios, ataques súbitos ou convulsões? __SIM __NÃO
12. Existe alguma coisa a respeito da sua saúde que nós não perguntamos, mas você acha que nós deveríamos saber? __SIM __NÃO
13. Você fuma? __SIM __NÃO
Quantos cigarros por dia? _____ Há quantos anos? _____
14. Está grávida ou amamentando? __SIM __NÃO

Dados antropométricos:

Peso: _____ kg Altura: _____ cm Largura cintura: _____ cm

Pressão arterial: _____ mmHg

Glicose ao acaso: _____

Apêndice 2

Paciente: _____ Prontuário na
pesquisa: _____ Data: _____/_____/_____

Entrevista Dialogada

Dados pessoais

Nome: _____ Identidade: _____

Endereço: _____

Cidade: _____

Telefones:

(____) _____

Sexo: ()F ()M Data de Nascimento: ____/____/19____ Qual é a sua idade hoje? _____ anos

A sua raça ou cor é: ()Branca ()Negra ()Parda/Mulata ()Amarela ()Indígena

Você é: ()Solteiro ()Casado/Vivendo com alguém ()Divorciado ()Viúvo

()Outro _____

Você é alfabetizado: ()Sim ()Não Você estudou até:

Hábitos de Higiene Bucal

Com qual frequência você escova seus dentes: _____

Você divide a escova de dente com outras pessoas? ()Sim ()Não

Você costuma limpar entre os dentes? ()Sim ()Não

Se sim: - O que você usa? ()Nada ()Fio dental ()Palito ()Escova interdental ()

Outro: _____

- Com qual frequência? _____

Você usa algum produto para bochecho? ()Não ()Sim, qual? _____

Frequência: _____

Alguém já te ensinou a escovar os dentes? ()nunca ()familiar ()professora ()dentista ()outro

Quando foi a última vez que você visitou um dentista? ()meses ()anos ()não lembra ()nunca

Você tem ido ao dentista nos últimos 5 anos? ()quando tem dor, um dente quebrado ou outra urgência ()tem ido regularmente para manutenção (De quanto em quanto tempo? _____) () não tem ido

Fatores comportamentais

Você fuma atualmente? ()Não ()Sim

Se sim: - Quantos cigarros por dia? _____

- Há quantos anos? _____

Se não: - Você fumou anteriormente? ()Não ()Sim

Se sim: - Quantos cigarros por dia? _____

- Por quantos anos? _____

- Quanto tempo faz que você parou de fumar? _____

Você ingere bebidas alcoólicas? ()frequentemente ()às vezes ()raramente ()nunca

Se sim: - Qual tipo? ()cerveja ()vinho ()cachaça

()outros _____

- Quantas doses/copos você, em geral, ingere por semana? _____

Nível socioeconômico

Quanto você recebe por

mês: _____

Quanto _____ você possui?	Não tem	1	2	3	4 ou mais
TVs coloridas					
Rádios					
Banheiros					
Automóveis					
Empregadas (pagas mensalmente)					
Aspiradores de pó					
Máquinas de lavar roupa					
Dvds/Videocassetes					
Refrigeradores					
Freezer (considerar refrigerador duplex)					

História médica

Você tem:	Sim	Não	Não sei
Diabetes?			
Asma, alergia a alimento, pós, medicação, etc?			
Infecções respiratórias recorrentes (3 ou + por ano)?			
Doença cardíaca ou arterial?			
Artrite reumatoide?			
Osteoporose?			
Depressão?			

Você tem algum outro problema de saúde? _____

Você está usando alguma medicação no momento? ()Não ()Sim

Se sim: -

Qual? _____

Para participantes mulheres, você está na menopausa? ()Não ()Sim

Se sim: - Você está realizando reposição hormonal? ()Não ()Sim

Dados antropométricos:

Peso: _____ kg Altura: _____ cm Largura cintura: _____ cm

Pressão arterial 1: _____ mmHg

Pressão arterial 2: _____ mmHg

Pressão arterial 3: _____ mmHg

Pressão arterial média: _____ mmHg

Glicose ao acaso: _____

Anexos

Anexo 1

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do Projeto: **“Caracterização do fenótipo inflamatório de pacientes normotensos e hipertensos com doença periodontal crônica”**

Pesquisador Responsável: **Natália Marcumini Pola**

Instituição a que pertence o Pesquisador Responsável: **FO/UFPEL**

Telefones para contato: (53) 8114-4334

Contato eletrônico: nataliampola@gmail.com

Nome: _____

Idade: ____anos

Ficha Número: ____

O (A) senhor (a) está sendo convidado (a) a participar do projeto de pesquisa *“Caracterização do fenótipo inflamatório de pacientes normotensos e hipertensos com doença periodontal crônica”* de responsabilidade da pesquisadora **Natália Marcumini Pola**.

Objetivo: Caracterizar a produção de citocinas pró e anti-inflamatórias em pacientes normotensos e hipertensos com doença periodontal (DP).

Riscos: Os possíveis riscos desta pesquisa estão relacionados ao procedimento de coleta de sangue, o qual será realizado em ambiente laboratorial especializado, e também a exposição à radiação durante os exames radiográficos. No entanto, todos os cuidados relacionados à radiação serão realizados para a proteção dos pacientes.

Benefícios: Os benefícios do presente estudo estão relacionados à importância do diagnóstico e tratamento da doença periodontal em pacientes hipertensos.

Para participar desta pesquisa, nenhum valor será cobrado e também não haverá ônus para a manutenção dos tratamentos realizados. Os voluntários serão submetidos a uma entrevista através de questionário e devem se enquadrar nos seguintes critérios de inclusão:

- Apresentar idade entre 35 e 70 anos, sem distinção de gênero;
- Apresentar, no mínimo, 14 dentes permanentes;
- Ter diagnóstico de hipertensão arterial (140-159 mmHg/90-99 mHg) e fazer uso de medicamentos anti-hipertensivos.

Qualquer dúvida durante o tratamento poderá ser questionada com o pesquisador através de

telefone de contato e ou correio eletrônico (e-mail).

Todas as informações aqui geradas serão confidenciais garantindo a privacidade ao sujeito da pesquisa.

Eu, _____, declaro ter sido informado e concordo em participar, como voluntário, do projeto de pesquisa acima descrito.

Pelotas, _____ de _____ de 201__.

Assinatura do paciente

Responsável pelo estudo

Anexo 2

FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Caracterização dos fenótipos inflamatório e microbiológico de pacientes normotensos e hipertensos com doença periodontal crônica

Pesquisador: Natália Marcumini Pola

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 41088814.4.0000.5317

Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Pelotas/ FO-UFPel

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.043.441

Data da Relatoria: 26/02/2015

Apresentação do Projeto:

A doença periodontal (DP) é uma inflamação crônica dos tecidos periodontais associada à perda óssea alveolar progressiva (Yuan et al., 2011), que tem sido relatada estar presente em mais de 50% da população em geral (Tsioufis et al., 2011). A severidade e consequente destruição dos tecidos periodontais é dependente de interações dinâmicas entre o desafio microbiano e a resposta imune-inflamatória do hospedeiro, tais como citocinas e quimiocinas, incluindo as interleucinas (IL), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e metaloproteinases (MMPs) presentes na circulação sanguínea e nos tecidos distantes do sítio de inflamação periodontal (Gemmell et al., 1997; Page et al., 1997; Bartold et al., 2010). Dentro do contexto de etiopatogênese da doença, torna-se importante relatar que a DP pode ser influenciada por uma série de fatores de risco, incluindo condições sistêmicas, como diabetes, imunodeficiência, estresse, hipertensão e osteoporose (Kornman et al., 1997; Page, 1998; Garcia et al., 2001; Jin et al., 2004; Pihlstrom et al., 2005; Ebersole et al., 2013). Evidências relatadas até o momento têm sido geralmente, mas não globalmente favoráveis a existência de uma associação entre a DP, pressão arterial e a hipertensão.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Endereço: Rua Prof Araújo, 465 sala 301

Bairro: Centro

CEP: 96.020-360

UF: RS

Município: PELOTAS

Telefone: (53)3284-4960

Fax: (53)3221-3554

E-mail: cep.famed@gmail.com

FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE
PELOTAS



Continuação do Parecer: 1.043.441

Caracterizar a produção de citocinas pró e anti-inflamatórias e a presença de bactérias periodontopatogênicas em pacientes normotensos e hipertensos com doença periodontal (DP).

Objetivo Secundário:

- Investigar a influência da condição de hipertensão arterial como fator de risco para DP, por meio da avaliação dos parâmetros clínicos e radiográficos dos tecidos periodontais;
- Investigar os níveis plasmáticos de IL-1, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17, TNF-, Proteína C-reativa (PCR) e fibrinogênio de pacientes normotensos e hipertensos com DP, bem como o efeito do tratamento periodontal sobre estes níveis;
- Investigar o perfil de produção de IL-1, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17 e TNF- no fluido gengival de pacientes normotensos e hipertensos com DP, bem como o efeito do tratamento periodontal sobre estes parâmetros, por meio de ensaio imunoenzimático;
- Investigar os níveis de microrganismos periodontopatogênicos no biofilme de pacientes normotensos e hipertensos com DP, bem como o efeito do tratamento periodontal sobre estes parâmetros.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Os possíveis riscos estão relacionados ao procedimento de coleta de sangue, o qual será realizado em ambiente laboratorial especializado, e também a exposição à radiação durante os exames radiográficos. No entanto, todos os cuidados com a proteção dos pacientes relacionados à radiação serão realizados no presente estudo.

Benefícios:

Os benefícios do presente estudo estão relacionados à importância do diagnóstico da doença periodontal em pacientes hipertensos, bem como seu tratamento, já que existe a possibilidade de influência desta condição sistêmica na patogênese da doença periodontal.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa é de relevância por abordar a relação da saúde bucal com a saúde sistêmica.

60 pacientes serão selecionados e divididos em dois grupos: Grupo N-DP (Normotenso) (n=30) – que será composto por pacientes normotensos com diagnóstico de periodontite crônica; e Grupo H-DP (Hipertenso) (n=30) – que será composto por pacientes hipertensos com diagnóstico de periodontite crônica. Parâmetros clínicos (presença de biofilme, sangramento a sondagem, profundidade de sondagem e nível clínico de inserção) serão utilizados para diagnóstico do quadro clínico. Os pacientes selecionados serão submetidos ao exame periodontal completo, à coleta das amostras e ao tratamento periodontal. Avaliações dos níveis plasmáticos de IL-6, Proteína C-

Endereço: Rua Prof Araujo, 465 sala 301

Bairro: Centro

CEP: 96.020-360

UF: RS

Município: PELOTAS

Telefone: (53)3284-4960

Fax: (53)3221-3554

E-mail: cep.famed@gmail.com

**FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE
PELOTAS**



Continuação do Parecer: 1.043.441

reativa e fibrinogênio serão realizadas através de coleta de sangue. As amostras de fluido gengival serão analisadas através do ensaio imunoenzimático (ELISA) para determinar a expressão de proteínas relacionadas aos processos inflamatório, imune-regulador, destruição de colágeno, perda óssea e cicatrização. A avaliação dos periodontopatógenos presentes no biofilme também será realizada. Todos os parâmetros

clínicos registrados no início do estudo serão novamente avaliados aos 30, 60 e 90 dias após a realização do tratamento periodontal, bem como a coleta das amostras de sangue, fluido gengival e biofilme. Os dados serão agrupados e submetidos à análise estatística e, diferenças entre os grupos N-DP e H-DP serão avaliadas.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

OK

Recomendações:

OK

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

OK

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PELOTAS, 30 de Abril de 2015

**Assinado por:
Patricia Abrantes Duval
(Coordenador)**

Endereço: Rua Prof Araujo, 465 sala 301
Bairro: Centro **CEP:** 96.020-360
UF: RS **Município:** PELOTAS
Telefone: (53)3284-4960 **Fax:** (53)3221-3554 **E-mail:** cep.farmed@gmail.com