

# Trombosis arterial tras la infusión intravenosa de bacterias orales en un modelo murino

Toshiya Kubota<sup>1</sup>, Yoshinori Inoue<sup>1</sup>, Takehisa Iwai<sup>1</sup>, Nobuhisa Kurihara<sup>1</sup>, Yi Huang<sup>2</sup>  
y Makoto Umeda<sup>2</sup>, Tokio, Japón

Se han detectado bacterias orales en las placas ateroscleróticas, aneurismas y arterias trombosadas en la enfermedad de Buerger. Examinamos la posible relación entre la bacteria oral *Porphyromonas gingivalis* y la trombosis arterial en localizaciones proximales y distales en ratas. Se colocó una bomba de infusión subcutánea conectada a la vena yugular en 18 ratas. El grupo de infusión Pg recibió una administración continua de *P. gingivalis* durante 2 semanas, y el grupo control recibió una solución salina normal. Se obtuvieron muestras de las arterias ilíaca, femoral superficial, y de las arterias infrapoplíteas a las 2 y 4 semanas, y se realizó su estudio patológico y mediante el análisis de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para detectar ADN específico de *P. gingivalis*. El grupo que recibió la infusión Pg presentó trombosis en un 33,3% a las 2 semanas y en un 55,6% a las 4 semanas, pero la estructura de la pared arterial se conservó sin ninguna característica de infección. Se obtuvieron resultados positivos a la PCR en un 73,3 y 22,2% a las 2 y 4 semanas, respectivamente. A las 4 semanas, se observó trombosis en un porcentaje más elevado, siendo las muestras procedentes de la zona infrapoplítea las que presentaron una tasa de trombos especialmente elevada (83,3%). Ninguna muestra control presentó trombosis ni resultados positivos a la PCR. La bacteriemia producida por el patógeno oral *P. gingivalis* puede dar lugar a la formación de trombos en las arterias periféricas, especialmente en las arterias de menor calibre.

## INTRODUCCIÓN

*Porphyromonas gingivalis*, un importante patógeno periodontal, también se ha asociado con algunas lesiones vasculares, como la placa aterosclerótica<sup>1-3</sup> y el aneurisma aórtico abdominal<sup>4</sup>. Con anterioridad habíamos observado patógenos periodontales en muestras de arterias ocluidas obtenidas de pacientes con enfermedad de Buerger<sup>5</sup>. *P. gingivalis* es un microorganismo anaerobio obligado y

gramnegativo que invade el endotelio vascular y las células de la musculatura lisa<sup>3,6-8</sup>. Posee varios factores virulentos, como fimbrias, lipopolisacáridos, hemaglutinina, productos tóxicos del metabolismo, vesículas en la membrana externa, y muchas enzimas dañinas. Las fimbrias activan las citocinas inflamatorias así como la colonización de los microorganismos, y son necesarias para que tenga lugar el proceso invasivo de *P. gingivalis* en las células endoteliales aórticas y cardíacas<sup>8</sup>. Las vesículas de la membrana externa de los microorganismos tienen actividad agregante plaquetaria<sup>9</sup>. Las gingipaínas son importantes proteasas que se han detectado a través de su actividad semejante a la tripsina, la característica principal de *P. gingivalis*. Se ha descrito que las gingipaínas R de los microorganismos activan la protrombina humana<sup>10</sup>. En pacientes con periodontitis, este patógeno y otras bacterias orales pueden introducirse en el torrente circulatorio durante la masticación o el cepillado de los dientes; sin embargo, no aparecieron signos ni síntomas de sepsis en estos pacientes<sup>2,11,12</sup>. Varios investigadores han observado que la infección por *P. gingivalis* en

DOI of original article: 10.1016/j.avsg.2008.01.005.

<sup>1</sup>Department of Vascular and Applied Surgery, Tokyo Medical and Dental University, Graduate School of Medicine and Dentistry, Tokio, Japón.

<sup>2</sup>Department of Periodontology, Tokyo Medical and Dental University, Graduate School of Medicine and Dentistry, Tokio, Japón.

Correspondencia: Yoshinori Inoue, MD, PhD, Department of Vascular and Applied Surgery, Tokyo Medical and Dental University, Graduate School of Medicine and Dentistry, 1-5-45 Yushima, Bunkyo-ku, Tokio 113-8519, Japón. Correo electrónico: [yoshi.inoue.srg1@tmd.ac.jp](mailto:yoshi.inoue.srg1@tmd.ac.jp)

Ann Vasc Surg 2008; 22: 412-416

DOI: 10.1016/j.avsp.2008.07.022

© Annals of Vascular Surgery Inc.

Publicado en la red: 14 de abril de 2008

modelos animales provoca el desarrollo acelerado de lesiones ateroscleróticas<sup>13-16</sup>.

Con el objeto de explorar la posible relación entre *P. gingivalis* y la formación de trombos vasculares, utilizamos un modelo murino para determinar si se desarrollaba trombosis confirmada patológicamente en las arterias periféricas tras la infusión continuada del microorganismo durante 2 semanas. Las muestras arteriales resecadas también fueron sometidas a un análisis de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para detectar ADN específico de *P. gingivalis*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Dieciocho ratas Wistar macho de entre 9 y 10 semanas de edad y con un peso de 200-300 g se dividieron en dos grupos: el grupo infusión Pg (n = 11) y el grupo control (n = 7). Todas las ratas fueron sometidas a anestesia general con dietiléter y una inyección intraperitoneal de pentobarbital. Se insertó una bomba de infusión continua (Alzet Osmotic Pump; Durect, Cupertino, CA) a través del tejido subcutáneo del cuello y se conectó a la vena yugular. La bomba del grupo de infusión Pg contenía 200 µl de una solución de *P. gingivalis* (cultivo puro, ATCC 33277), que se liberó de forma continuada durante 14 días en condiciones de presión osmótica y a una velocidad constante de 14,3 ml/día. En el grupo infusión Pg, la concentración bacteriana utilizada osciló entre 7,36 x 10<sup>9</sup> y 1,43 x 10<sup>11</sup> unidades formadoras de colonias (UFC)/ml. Las ratas del grupo control recibieron el mismo volumen de una infusión continua de solución salina administrada a la misma velocidad y durante el mismo tiempo que la solución de *P. gingivalis* administrada en los grupos experimentales.

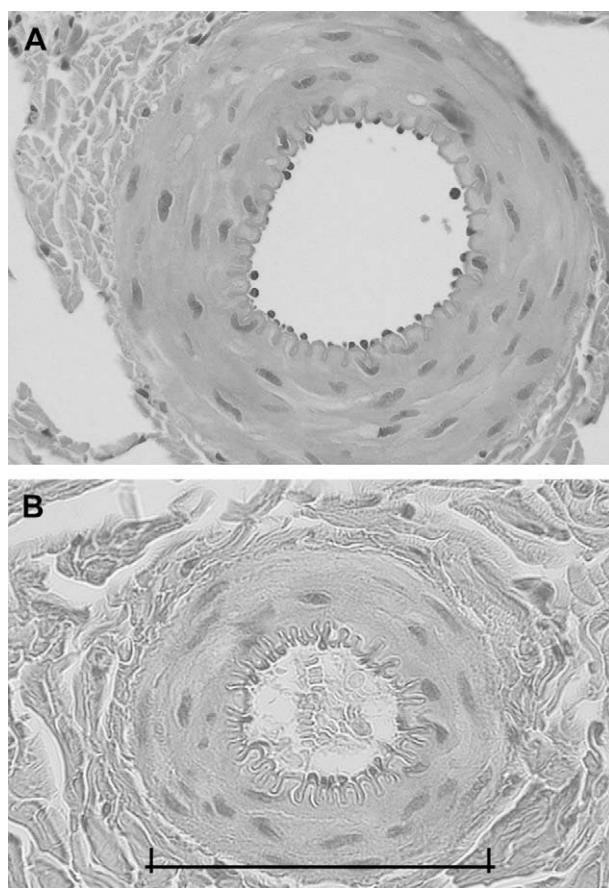
Dos semanas (al final de la infusión) o 4 semanas después de empezar la infusión de *P. gingivalis*, las ratas fueron sometidas a anestesia general y se obtuvieron muestras de las arterias y venas periféricas con tejido circundante de la región pélvica y las extremidades posteriores. Las muestras obtenidas correspondieron a la arteria ilíaca común (AIC), la arteria femoral superficial (AFS), y las arterias infrapoplíteas (AIP) de los humanos. Posteriormente, las ratas fueron sacrificadas con una sobredosis de pentobarbital intravenoso. La mitad de las muestras arteriales se fijaron mediante inmersión en formalina neutra tamponada al 10% y se incluyeron en parafina. Las muestras se tiñeron con hematoxilina-eosina y se realizó su estudio patológico. El patólogo desconocía el lugar de obtención de la muestra, el grupo de estudio y los resultados de la PCR.

Se utilizó un método de PCR basado en el ADN ribosómico 16S<sup>17</sup> para detectar la presencia de ADN específico de *P. gingivalis* en las muestras restantes de tejido arterial. El análisis de PCR se realizó por un técnico que desconocía el lugar de donde se obtuvo la muestra, el grupo de estudio al que pertenecía y el momento en el que se obtuvo. Los segmentos arteriales que iban a ser analizados mediante PCR se congelaron inmediatamente tras su resección y se conservaron a -80°C en condiciones estériles. Antes de su análisis, las muestras se descongelaron rápidamente en un baño con agua a 37°C durante 5 min y se homogeneizaron. El ADN se extrajo utilizando el kit High Pure PCR Template Preparation (Roche, Mannheim, Alemania). Los cebadores específicos para la especie y las condiciones de la reacción utilizados para detectar *P. gingivalis* se habían descrito con anterioridad<sup>17</sup>. Brevemente, 50 µl de mezcla de PCR para *P. gingivalis* contenían 5 µl de muestra, 5 µl de 10 x PCR buffer (Promega, Madison, WI), 2,0 unidades de Taq ADN polimerasa (Promega), 0,2 mm de cada uno de los desoxirribonucleótidos (Promega), 1,0 mm de cada cebador, y 1,5 mm de MgCl<sub>2</sub>. Los perfiles de temperatura incluyeron un paso inicial de desnaturización a 95°C durante 2 min, seguido de 36 ciclos a 95°C durante 30 s (desnaturalización), 60°C durante 1 min (hibridación), 72°C durante 1 min (extensión), y un paso final de extensión a 72°C durante 2 min.

El estudio estuvo autorizado por el *Institutional Animal Care and Use Committee* de la *Tokyo Medical and Dental University*. Los análisis estadísticos se realizaron con la ayuda del programa Excel (Microsoft, Redmond, WA). Las variables categóricas se compararon con el test de  $\chi^2$ .

## RESULTADOS

Una rata del grupo infusión Pg murió antes de recibir toda la infusión de 14 días de *P. gingivalis* y se excluyó del estudio. Los estudios patológicos mostraron que las estructuras de la pared arterial estuvieron bien conservadas en todas las muestras arteriales obtenidas de la AIC, AFS, y AIP. La formación de trombos se produjo en las AIP (fig. 1). Además, en las muestras arteriales no se observaron características de infección, como microabscesos, infiltración de linfocitos, o neutrófilos; ni bacterias; ni macrófagos conteniendo microorganismos. Sin embargo, se observó trombosis en la luz arterial en 5 de las muestras arteriales (33.3%) obtenidas 2 semanas después de empezar la infusión de bacterias (tabla I). No se observaron diferencias entre los tipos



**Fig. 1.** El estudio patológico muestra la presencia de trombosis en la luz de las arterias de rata resecadas correspondientes a las arterias humanas infrapoplíteas obtenidas 2 semanas después de empezar la infusión de *P. gingivalis* (**B**), mientras que no se identificó la formación de trombos en ninguna arteria del grupo control (**A**) (hematoxilina-eosina, 100 µm).

de arterias con respecto a la aparición de trombosis. A las 4 semanas, se observó trombosis en un porcentaje más alto de todas las muestras (55,6%, 10 de 18 muestras, **tabla I**), siendo las muestras de AIP las que presentaron una tasa de trombosis especialmente alta (83,3%, 5 de 6 muestras). Ninguna de las 21 muestras arteriales del grupo control (obtenidas a las 2 o 4 semanas) presentó trombosis.

Los resultados de los análisis de PCR se muestran en la **figura 2** y la **tabla II**. Las bandas 1 (P) y 2 (N) de la figura 2 muestran los resultados de los controles positivo y negativo de un análisis de PCR con bandas amplificadas de ADN ribosómico 16S específico de *P. gingivalis*. Las bandas 3-9 de la figura 2 muestran los resultados con muestras de la pared arterial extraídas del grupo infusión Pg. Dos semanas después de que empezase la infusión de bacterias, se detectó ADN específico de *P. gingivalis* en 11 de las 15

muestras arteriales (73,3%). La tasa de detección fue significativamente más elevada que la obtenida a las 4 semanas (22,2%, 4 de 18 muestras). Ninguna de las 21 muestras arteriales del grupo control (obtenidas a las 2 o 4 semanas) mostraron la presencia de ADN específico de *P. gingivalis*.

## DISCUSIÓN

Varios estudios han observado la progresión de la aterosclerosis en ratones heterocigotos y homocigotos para la deficiencia de apolipoproteína E alimentados con una dieta rica en grasas e infectados por vía oral o intravenosa con cepas invasivas de *P. gingivalis*<sup>13-15,18</sup>. Además, una investigación reciente mostró que se desarrollaron lesiones en la arteria coronaria y en la aorta en cerdos normcolesterolémicos tras administrarles inyecciones intravenosas de *P. gingivalis*<sup>16</sup>. Todos estos experimentos estudiaron el aumento de la aterogénesis con la infección por *P. gingivalis* a través de diferentes vías en animales alimentados con dietas ricas o pobres en grasa. Desconocemos la existencia de estudios previos que se hayan centrado en los efectos de la infección por *P. gingivalis* en la aparición de trombosis en arterias de pequeño calibre, hecho que se ha sugerido que constituye un suceso primario en trastornos tromboembólicos, como la oclusión arterial aguda, la oclusión de injertos, y la enfermedad de Buerger. Por tanto, evaluamos los cambios trombóticos y de otra naturaleza en las arterias de ratas correspondientes a las arterias humanas AIC, AFS y AIP en dos fases tras la infusión intravenosa continua de una cepa invasiva de *P. gingivalis*. Dado que en la actualidad se desconoce la dosis clínicamente adecuada y probablemente varía mucho<sup>19-21</sup>, la solución de *P. gingivalis* se administró a la concentración más alta con la que la infección por *P. gingivalis* indujo fenómenos tromboembólicos.

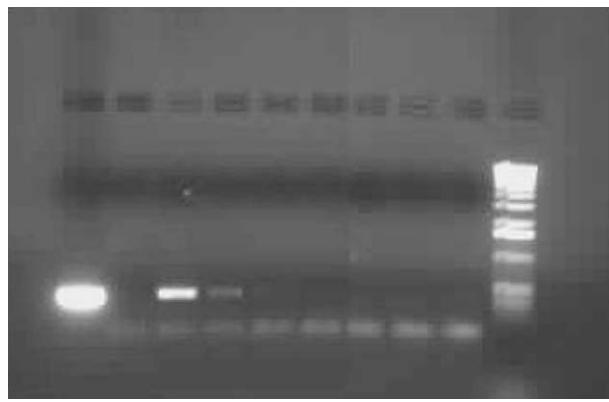
Con anterioridad habíamos observado que la infección oral crónica con un patógeno periodontal podría ser un factor etiológico en la enfermedad de Buerger, que se caracteriza patológicamente por la formación de trombos en estructuras de la pared arterial relativamente intactas<sup>5</sup>. *Treponema denticola* fue el patógeno periodontal detectado con mayor frecuencia en las lesiones arteriales, pero *P. gingivalis* también se observó con una frecuencia notable (36% de las lesiones). Dado que *T. denticola* fue difícil de cultivar, se eligió *P. gingivalis* como bacteria patógena para este estudio en un modelo murino.

El estudio detectó una asociación entre la infusión intravenosa continua de *P. gingivalis* y la posterior formación de trombos arteriales en

**Tabla I.** Índice de trombosis en muestras arteriales obtenidas de los grupos infusión Pg y control 2 y 4 semanas después de empezar la infusión intravenosa

Muestra arterial	Grupo infusión Pg (n = 11 ratas)		Grupo control (n = 7 ratas)	
	2 semanas (n = 5 ratas)	4 semanas (n = 6 ratas)	2 semanas (n = 5 ratas)	4 semanas (n = 2 ratas)
Ilíaca común	2/5	2/6	0/5	0/2
Femoral superficial	1/5	3/6	0/5	0/2
Infrapoplíteas	2/5	5/6	0/5	0/2
Todas las muestras arteriales	5/15	10/18	0/15	0/6

Los valores representan el número de muestras arteriales con trombosis por cada tipo de arteria examinada patológicamente en cada momento en los grupos infusión Pg y control. Ninguna de las muestras arteriales de los controles (n = 21 muestras de 7 ratas) presentó trombosis.



**Fig. 2.** Análisis PCR con bandas amplificadas de ADN ribosómico 16S específico de *P. gingivalis*. Las bandas 1 (P) y 2 (N) muestran los resultados del control positivo y negativo, respectivamente. Las bandas 3 y 4 muestran resultados positivos, y las bandas 5-9 muestran resultados negativos.

ausencia de lesiones o cambios ateroscleróticos en la pared arterial. Además, se detectó ADN específico de *P. gingivalis* con una frecuencia relativamente elevada en los tejidos arteriales obtenidos 2 semanas después de comenzar a administrar la infusión. No se observaron diferencias entre los tipos de arterias obtenidas al mismo tiempo con respecto a la frecuencia de la detección de ADN específico de *P. gingivalis*, pero la trombosis se observó con mayor frecuencia en muestras de arterias distales, especialmente de muestras de AIP obtenidas del grupo de infusión Pg 4 semanas después de iniciar la infusión. Así pues, el desarrollo de trombosis en el modelo de ratas podría haber dependido en parte de la muestra arterial examinada, con una mayor formación de trombos en las arterias de menor calibre; sin embargo, este hallazgo podría no ser específico de *P. gingivalis* dado que no existieron grupos control que utilizasen otras cepas bacterianas. Se consideró que

la causa de la trombosis estuvo relacionada con la tríada de Virchow, que consistió en una alteración en la luz del vaso, estasis sanguíneo, y una alteración en los componentes sanguíneos. Las investigaciones previas indicaron que la infección por patógenos periodontales trombogénicos como *P. gingivalis* indujo una alteración en las células endoteliales, un aumento de la permeabilidad vascular, y una activación de la coagulación sanguínea<sup>8,11,13,14</sup>, todo lo cual pudo haber contribuido al desarrollo de trombosis arterial en este modelo. Se sabe que *P. gingivalis* exuda gingipañas de forma específica, lo que estimula la coagulación sanguínea<sup>22</sup>, y las fimbrias de *P. gingivalis* demostraron acelerar la adhesión de los monocitos a la capa de células endoteliales<sup>23</sup>. Uno de los mecanismos sugeridos para la formación de trombos es que *P. gingivalis* aumenta la coagulación por el atrapamiento de plaquetas y la disfunción endotelial por efecto de las fimbrias, incluso en presencia de microorganismos inactivos o muertos<sup>8</sup>. La bacteriemia por *P. gingivalis* puede causar una alteración en los componentes sanguíneos que contribuya a la formación de trombos. Sin embargo, en este estudio no se ha intentado evaluar el mecanismo de la formación de trombos, y se desconocen los mediadores del proceso porque no se determinaron las concentraciones de toxinas de *P. gingivalis*. Los efectos de la bacteriemia pudieron estar relacionados con el estado sanitario del animal, y no necesariamente con las toxinas bacterianas.

Es interesante destacar que nuestras evaluaciones patológicas revelaron que las estructuras de la pared arterial en las muestras obtenidas de las ratas a las que se administró *P. gingivalis* estuvieron bien conservadas, y que ninguna de las arterias trombosadas presentó cambios inflamatorios obvios. Estas características fueron similares a las observadas en pacientes con oclusión arterial aguda u oclusión del injerto, que parecieron estar estrechamente

**Tabla II.** . ADN específico de *P. gingivalis* en muestras arteriales obtenidas de los grupos infusión Pg y control 2 y 4 semanas después de empezar la infusión intravenosa

Muestra arterial	Grupo infusión Pg (n = 11 ratas)		Grupo control (n = 7 ratas)	
	2 semanas (n = 5 ratas)	4 semanas (n = 6 ratas)	2 semanas (n = 5 ratas)	4 semanas (n = 2 ratas)
Ilíaca común	4/5	2/6	0/5	0/2
Femoral superficial	4/5	1/6	0/5	0/2
Infrapoplíteas	3/5	1/6	0/5	0/2
Todas las muestras arteriales	11/15	4/18	0/15	0/6

Los valores representan el número de muestras arteriales con ADN específico de *P. gingivalis* por cada tipo de arteria examinada con PCR en cada momento en los grupos infusión Pg y control. Ninguna de las muestras arteriales de los controles (n = 21 muestras de 7 ratas) presentó ADN específico de *P. gingivalis*.

relacionadas con la formación de trombos. Así pues, nuestros resultados podrían proporcionar cierta perspectiva sobre los mecanismos de estos trastornos, que afectan solamente a la luz arterial. En pacientes con periodontitis, los microorganismos de la placa invadieron el torrente sanguíneo durante el sondaje periodontal, la masticación, o el cepillado de dientes<sup>2</sup>, y raramente indujeron un proceso séptico o una coagulación intravascular diseminada<sup>24-26</sup>. En este modelo, la infusión continua de un patógeno periodontal indujo la trombosis en arterias de pequeño calibre sin producir la destrucción o la inflamación de la pared. Los resultados indican una asociación entre los trastornos tromboembólicos y la periodontitis.

## CONCLUSIÓN

Varios estudios han descrito la progresión aterosclerótica en ratones con deficiencia de apolipoproteína E alimentados con dietas ricas en grasas e infectados por vía oral o intravenosa con cepas invasivas de *P. gingivalis*, o en cerdos normocolesterolémicos tras administrar inyecciones intravenosas de *P. gingivalis*. Sin embargo, ningún estudio anterior se ha centrado en los efectos de la infección por *P. gingivalis* en la formación de trombos en arterias de pequeño calibre. La bacteriemia causada por el patógeno oral *P. gingivalis* puede dar lugar a la formación de trombos en las arterias periféricas, especialmente en las de pequeño calibre. Una alteración de las células endoteliales, el aumento de la permeabilidad vascular, y la activación de la coagulación sanguínea podrían haber contribuido a la aparición de trombosis arterial en el modelo murino. La estructura de la pared arterial obtenida de las ratas a las que se administró *P. gingivalis* estaba bien conservada, y ninguna de las arterias trombosadas presentó cambios inflamatorios obvios. Los

hallazgos fueron similares a los observados en pacientes con oclusión arterial aguda u oclusión del injerto, lo que indicó una asociación entre los trastornos tromboembólicos y la periodontitis.

*Este estudio fue financiado por una beca de ayuda a la investigación científica del Ministerio de Educación, Ciencias, Deportes y Cultura de Japón.*

## BIBLIOGRAFÍA

- Chiu B. Multiple infections in carotid atherosclerotic plaques. Am Heart J 1999;138:S534-S536.
- Dorn BR, Dunn WA, Jr, Progulske-Fox A. Invasion of human coronary artery cells by periodontal pathogens. Infect Immun 1999;67:5792-5798.
- Haraszthy VI, Zambon JJ, Trevisan M, Zeid M, Genco RJ. Identification of periodontal pathogens in atheromatous plaques. J Periodontol 2000;71:1554-1560.
- Kurihara N, Inoue Y, Iwai T, Umeda M, Huang Y, Ishikawa I. Detection and localization of periodontopathic bacteria in abdominal aortic aneurysms. Eur J Vasc Endovasc Surg 2004;28:553-558.
- Iwai T, Inoue Y, Umeda M, et al. Oral bacteria in the occluded arteries of patients with Buerger disease. J Vasc Surg 2005;42:107-115.
- Rudney JD, Chen R, Sedgewick GJ. Intracellular *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in buccal epithelial cells collected from human subjects. Infect Immun 2001;69:2700-2707.
- Haffajee AD, Socransky SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. Periodontol 2000;1994(5):78-111.
- Deshpande RG, Khan MB, Genco CA. Invasion of aortic and heart endothelial cells by *Porphyromonas gingivalis*. Infect Immun 1998;66:5337-5343.
- Sharma A, Novak EK, Sojar HT, Swank RT, Kuramitsu HK, Genco RJ. *Porphyromonas gingivalis* platelet aggregation activity: outer membrane vesicles are potent activators of murine platelets. Oral Microbiol Immunol 2000;15:393-396.
- Imamura T, Banbula A, Pereira PJ, Travis J. Activation of human prothrombin by arginine-specific cysteine proteases (gingipains R) from *Porphyromonas gingivalis*. J Biol Chem 2001;276:18984-18991.

11. Geerts SO, Nys M, De MP, et al. Systemic release of endotoxins induced by gentle mastication: association with periodontitis severity. *J Periodontol* 2002;73:73-78.
12. Loesche WJ. Periodontal disease: link to cardiovascular disease. *Compend Contin Educ Dent* 2000;21:463-466.
13. Li L, Messas E, Batista EL, Jr, Levine RA, Amar S. *Porphyromonas gingivalis* infection accelerates the progression of atherosclerosis in a heterozygous apolipoprotein E-deficient murine model. *Circulation* 2002;105:861-867.
14. Lalla E, Lamster IB, Hofmann MA, et al. Oral infection with a periodontal pathogen accelerates early atherosclerosis in apolipoprotein E-null mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:1405-1411.
15. Chi H, Messas E, Levine RA, Graves DT, Amar S. Interleukin-1 receptor signaling mediates atherosclerosis associated with bacterial exposure and/or a high-fat diet in a murine apolipoprotein E heterozygote model: pharmacotherapeutic implications. *Circulation* 2004;110:1678-1685.
16. Brodala N, Merricks EP, Bellinger DA, et al. *Porphyromonas gingivalis* bacteremia induces coronary and aortic atherosclerosis in normocholesterolemic and hypercholesterolemic pigs. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:1446-1451.
17. Ashimoto A, Chen C, Bakker I, Slots J. Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. *Oral Microbiol Immunol* 1996;11:266-273.
18. Gibson FC, 3rd, Hong C, Chou HH, et al. Innate immune recognition of invasive bacteria accelerates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 2004;109:2801-2806.
19. Daly CG, Mitchell DH, Highfield JE, Grossberg DE, Stewart D. Bacteremia due to periodontal probing: a clinical and microbiological investigation. *J Periodontol* 2001;72:210-214.
20. Haynes WG, Stanford C. Periodontal disease and atherosclerosis: from dental to arterial plaque. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:1309-1311.
21. Ide M, Jagdev D, Coward PY, Crook M, Barclay GR, Wilson RF. The short-term effects of treatment of chronic periodontitis on circulating levels of endotoxin, C-reactive protein, tumor necrosis factor-alpha, and interleukin-6. *J Periodontol* 2004;75:420-428.
22. Imamura T, Banbula A, Pereira PJ, Travis J, Potempa J. Activation of human prothrombin by arginine-specific cysteine proteinases (gingipains R) from *Porphyromonas gingivalis*. *J Biol Chem* 2001;276:18984-18991.
23. Hirose K, Isogai E, Ueda I. *Porphyromonas gingivalis* fimbriae induce adhesion of monocytic cell line U937 to endothelial cells. *Microbiol Immunol* 2000;44:17-22.
24. Syrjanen J, Peltola J, Valtonen V, Iivanainen M, Kaste M, Huttunen JK. Dental infections in association with cerebral infarction in young and middle-aged men. *J Intern Med* 1989;225:179-184.
25. Christensen PJ, Kutty K, Adlam RT, Taft TA, Kampschroer BH. Septic pulmonary embolism due to periodontal disease. *Chest* 1993;104:1927-1929.
26. Shiota Y, Arikita H, Horita N, et al. Septic pulmonary embolism associated with periodontal disease: reports of two cases and review of the literature. *Chest* 2002;121:652-654.