

MARCELA DE FARIA MOURA

**ASSOCIAÇÃO ENTRE PERIODONTITE E DISFUNÇÃO ENDOTELIAL:
PARÂMETROS CLÍNICOS PERIODONTAIS E NÍVEIS DOS MARCADORES
INFLAMATÓRIOS IL-1 β , TNF- α , MMP2 E ÓXIDO NÍTRICO**

BELO HORIZONTE
2016

MARCELA DE FARIA MOURA

**ASSOCIAÇÃO ENTRE PERIODONTITE E DISFUNÇÃO ENDOTELIAL:
PARÂMETROS CLÍNICOS PERIODONTAIS E NÍVEIS DOS MARCADORES
INFLAMATÓRIOS IL-1 β , TNF- α , MMP2 E ÓXIDO NÍTRICO**

Dissertação de Mestrado apresentado à Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais-UFMG, como um dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Periodontia.

Orientador: Prof. Dr. Fernando de Oliveira Costa.

BELO HORIZONTE
2016

FICHA CATALOGRÁFICA

M929a
2016
T

Moura, Marcela de Faria

Associação entre periodontite e disfunção endotelial : parâmetros clínicos periodontais e níveis dos marcadores inflamatórios IL-1 β , TNF- α , MMP2 e óxido nítrico / Marcela de Faria Moura. – 2016.

76 f.: il.

Orientador (a): Fernando de Oliveira Costa

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Odontologia.

1. Periodontite. 2. Endotélio vascular. 3. Doenças cardiovasculares. 4. Mediadores da inflamação. I. Costa, Fernando de Oliveira. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Odontologia. III. Título.

BLACK D047

Agradecimentos

Após quatro anos da minha graduação em Odontologia e ter realizado especialização em Implantodontia, comecei a perceber que somente a atuação no consultório não atendia mais aos anseios e propósitos, surgindo, assim, o interesse pelo mestrado. Naquela oportunidade, procurei pelo Dr. Fernando Oliveira Costa, uma das maiores referências em minha área, para que pudesse me orientar em um futuro mestrado. A partir daí ele me alertou sobre a importância de uma especialização em Periodontia. Ingressei, então, na especialização, e, logo após, no processo de seleção para o mestrado. Neste momento, o Dr. Fernando conjuntamente com o Dr. Luís Otávio de Miranda Cota decidiram de maneira generosa me dar a oportunidade que eu buscava. O Dr. Fernando foi um orientador exigente quanto à qualidade do nosso trabalho, porém compreensivo com minhas limitações, teve extrema paciência na correção dos textos, sempre me motivando a melhorar. A cada dia ele ainda me surpreende com sua capacidade e inteligência para pesquisa. O Dr. Luís também sempre esteve presente nestes dois anos, me apoiando e disposto a ajudar com tudo que eu precisasse. Além de admirar o Dr. Fernando e Dr. Luís, gosto da maneira como trabalham e conduzem o programa da pós-graduação.

Para viabilizar nosso estudo, precisamos contar, ainda, com a colaboração e confiança da Dra. Tarcília Aparecida Silva. Ela foi fundamental na melhoria da metodologia do estudo como parecerista, sempre me incentiva em todas as questões, além de ter sido a responsável pela execução de todas as nossas análises laboratoriais, com o auxílio das alunas Joice e Janina que me acompanharam durante todo o trabalho. Os momentos no laboratório foram agradáveis e não posso deixar de mencionar a parceria da Soraia, sempre com uma conversa amiga, além de me ajudar a olhar os freezers.

Outra pessoa fundamental para a execução da pesquisa foi o Dr. Túlio Pinho Navarro, que desde o início se dispôs a colaborar, realizou todos os exames no hospital, teve a paciência de adequar suas atividades com o nosso estudo e foi sempre paciente e ponderado em todos os momentos.

Além disto, para que a pesquisa ocorresse precisávamos dos pacientes, contudo a UFMG estava em greve. Neste momento a Dra. Alcione Maria Soares

Dutra Oliveira, professora da PUC, decidiu gentilmente, atuar conjuntamente na busca pelos pacientes elegíveis. Ela e o Dr. Peterson Antônio Dutra foram grandes colaboradores em todo o processo de captação dos pacientes e coleta dos dados, bem como demonstraram imensa compreensão com o dia a dia da pesquisa; foi muito bom poder contar com eles.

Além destes, os colegas da pós-graduação, em especial Rafael Storino, Andres Cruz, Bernardo Dutra, Lidiane Machado, Bárbara Romualdo também foram fundamentais durante todo o processo. Nestes 2 anos tive muito apoio e compressão dos meus amigos, irmãos e família pela minha ausência. Minha mãe sempre esteve orando e torcendo para que tudo corresse bem. A Luciana, que além de minha irmã é uma grande amiga, sempre me apoia e incentiva, talvez a pessoa mais importante em minha vida e carreira. Foi tolerante com minhas ausências tanto no trabalho quanto nas questões pessoais. E tudo isto não seria possível sem a Ana Carolina que me incentivou desde o começo, no estudo para as provas de seleção, colaborou muito em todo o processo de execução da pesquisa no hospital, ajudou também nas infinitas leituras e correções de textos, cartas e apresentações, paciente nas dificuldades da rotina diária, nas infinitas horas que passei em frente o computador, além do carinho e força para que eu conseguisse finalizar o que havia me proposto fazer.

CNPQ - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

Obrigada a todos!

“Há escolas que são gaiolas e há escolas que são asas.

Escolas que são gaiolas existem para que os pássaros desaprendam a arte do vôo.

Pássaros engaiolados são pássaros sob controle. Engaiolados, o seu dono pode levá-los para onde quiser. Pássaros engaiolados sempre têm um dono. Deixaram de ser pássaros. Porque a essência dos pássaros é o vôo.

Escolas que são asas não amam pássaros engaiolados. O que elas amam são pássaros em vôo. Existem para dar aos pássaros coragem para voar. Ensinar o vôo, isso elas não podem fazer, porque o vôo já nasce dentro dos pássaros. O vôo não pode ser ensinado. Só pode ser encorajado.”

[Rubem Alves](#)

RESUMO

Objetivos: A periodontite aumenta o risco das doenças cardiovasculares ateroscleróticas (DCA) e ambas doenças apresentam mecanismos fisiopatológicos semelhantes. A disfunção endotelial (DE) é um parâmetro precoce das DCA e sua associação com a periodontite foi pouco investigada até o presente momento. Neste contexto o objetivo geral deste estudo foi avaliar a associação entre a periodontite e a disfunção endotelial por meio de parâmetros clínicos periodontais e a presença dos marcadores inflamatórios IL-1 β , TNF- α , MMP2/TIMP2 e óxido nítrico.

Métodos: A amostra foi constituída por 47 indivíduos de ambos os gêneros, sem alterações sistêmicas conhecidas, divididos em dois grupos: um grupo com 24 indivíduos com periodontite crônica e outro com 23 indivíduos sem periodontite crônica. Foram realizados exames periodontais de sangramento a sondagem (SS), profundidade de sondagem (PS), nível de inserção clínica (NIC) e avaliada a DE por meio da dilatação mediada por fluxo (DMF) da artéria braquial. A concentração dos mediadores inflamatórios IL-1 β , TNF- α , MMP2/TIMP2 foi avaliada pelo método ELISA e o óxido nítrico (ON) pela reação de Griess na saliva.

Resultados: Os indivíduos com periodontite apresentaram significativamente maior DE quando comparados com indivíduos sem periodontite ($p= 0,034$ após hiperemia reativa e $p= 0,049$ após nitrato sublingual). Em relação aos mediadores inflamatórios avaliados, houve uma associação significativa entre a produção de MMP2/TIMP2 com a presença de periodontite ($p=0,008$) além de uma correlação positiva com todos parâmetros clínicos de gravidade da inflamação periodontal avaliados (PS, NIC, SS). Para os demais marcadores (IL-1 β , TNF- α e ON) os grupos com e sem periodontite apresentaram resultados similares. Foi identificada também uma correlação positiva significativa entre a produção de ON e uma menor DE (após hiperemia reativa $p= 0,027$ e após nitrato sublingual $p=0,016$). .

Conclusão: Indivíduos com periodontite apresentaram maior DE, expressa por menor % de DMF da artéria braquial e maiores níveis de MMP2/TIMP2 que indivíduos sem periodontite. O ON foi significativamente associado com uma menor DE.

Palavras-chave: periodontite, endotélio vascular, doença cardiovascular mediadores inflamatórios.

ABSTRACT

Background: The periodontitis and atherosclerotic cardiovascular diseases (ACD) are chronic diseases which have a large number of risk factors and inflammatory mediators in common. The ACD has endothelial dysfunction (ED) with an important role in the initiation and progression of atherosclerosis. However, few investigations were conducted on a possible association between periodontitis and higher ED. In this context the general aim of this study is to evaluate the association between the endothelial function and the periodontitis using periodontal clinical parameters and the presence of inflammatory markers IL-1 β , TNF- α , MMP2 and nitric oxide.

Methods: This study consisted of 47 subjects of both genders, systemically healthy divided into two groups: a group with 24 subjects with chronic periodontitis and another with 23 subjects without chronic periodontitis. Were done complete periodontal examination and evaluated ED by the flow-mediated dilatation (FMD) of the brachial artery and measured the levels of systemic inflammation mediators IL-1 β , TNF- α , MMP2 and the nitric oxide (NO) in the saliva.

Results: The subjects with periodontitis showed % DMF significantly worse when compared with subjects without periodontitis ($p= 0.034$ after reactive hyperemia and $p= 0.049$ after sublingual nitrate), thus subjects with periodontitis showed significantly higher ED. In relation to inflammatory mediators evaluated, there was a significant association between MMP2 with the presence of periodontitis ($p=0.008$) and a positive correlation with all clinical parameters of periodontal variation. For the other markers (IL-1 β , TNF- α , and nitric oxide) the groups with and without periodontitis showed similar results. It was also identified a significant positive correlation between the nitric oxide and a better endothelial function.

Conclusion: subjects with periodontitis showed higher ED, expressed by smaller % of DMF brachial artery and higher levels of MMP2 that subjects without periodontitis.

Keywords: periodontitis, vascular endothelium, cardiovascular disease, inflammatory mediators.

LISTA DE ABREVIATURAS

AVC -	Acidente vascular cerebral
TRAB-	Teste de reatividade da artéria braquial
CML-	Células musculares lisas
DE-	Disfunção endotelial
DMF-	Dilatação mediada por fluxo
DCA-	Doenças cardiovasculares ateroscleróticas
% DMF-	Porcentagem de variação da dilatação mediada por fluxo
IL-	Interleucina
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IM-	Infarto do miocárdio
IMC-	Índice de massa corporal
LPS-	Lipopolissacarídeos
mmHg-	Milímetros de mercúrio
MMPs	Matrix de metaloproteinases
MMP2-	Metaloproteinase 2
NIC-	Nível de inserção clínica
NTG-	Nitroglicerina
ON-	Óxido nítrico
ONS-	Óxido nítrico- sintase
ONSe-	Óxido nítrico- sintase endotelial
PCR-	Proteína C reativa

PS-	Profundidade de sondagem
SS-	Sangramento à sondagem
SCA-	Síndrome coronária aguda
TNF- α -	Fator de necrose tumoral alfa
UFMG-	Universidade Federal de Minas Gerais

TABELAS

Tabela 01. Caracterização da amostra de acordo com variáveis demográficas e comportamentais de interesse.

Tabela 02. Condição periodontal da amostra estudada.

Tabela 03. Associação entre marcadores da inflamação sistêmica (IL-1 β , MMP2, TNF e óxido nítrico) e % DMF com o diagnóstico, gravidade e extensão da periodontite.

Tabela 04. Correlação entre os parâmetros clínicos periodontais, os marcadores da inflamação sistêmica (IL-1 β , MMP2/TIMP2, TNF e óxido nítrico) e a disfunção endotelial.

FIGURAS

Figura 1: Medidas de % DMF e dos marcadores da inflamação sistêmica (IL-1 β , MMP2/TIMP2, TNF- α e ON considerando o diagnóstico de periodontite.

SUMÁRIO

1) INTRODUÇÃO

2) LITERATURA CONSULTADA

2.1) Periodontite

2.2) O endotélio vascular e a aterosclerose

2.3) Evidências científicas da associação entre a periodontite e as doenças cardiovasculares: baseado em revisões sistemáticas e meta-análise

2.4) Medidas da disfunção endotelial

2.5) Periodontite e a disfunção endotelial: mediadores inflamatórios de interesse

2.6) Evidências científicas da associação entre periodontite e a disfunção endotelial

3) OBJETIVOS

3.1) Objetivos gerais

3.2) Objetivos específicos

4) JUSTIFICATIVA

5) ARTIGO CIENTÍFICO

Introdução, metodologia, resultados, discussão, conclusão, referências, tabelas e figuras

6) REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS

7) ANEXOS

Anexo I: Aprovação do comitê de ética

Anexo II: Termo de consentimento livre e esclarecido

Anexo III: Questionário sócio- econômico

Anexo IV: Periodontograma

INTRODUÇÃO

As doenças periodontais reúnem um grupo de doenças infecciosas, caracterizadas principalmente pela gengivite e periodontite, que resultam da interação entre os biofilmes supra e subgengival e a resposta imuno-inflamatória gerada pelo hospedeiro. As periodontites, como doenças destrutivas do periodonto, são caracterizadas por uma infecção com predomínio de microrganismos anaeróbios e Gram negativos, presentes no biofilme subgengival, e que representam uma fonte constante de agressão ao periodonto (Page, Kornman, 1997). Na década de 90, a abordagem da doença periodontal como uma doença restrita à cavidade bucal sofreu um impacto quando estudos epidemiológicos começaram a associar a periodontite às doenças sistêmicas, surgindo assim, o termo Medicina Periodontal. Estudos começaram a apontar a periodontite como fator que predispõe ou que exacerba problemas de ordem sistêmica dentre eles as DCA, sendo esta, a maior causa de mortalidade em todo o mundo (Williams, Offenbacher, 2000; Lockhart *et al.*, 2012).

A periodontite e as DCA apresentam um várias características em comum, sendo mais prevalente em pessoas acima de 40 anos, homens, fumantes, hipertensos, diabéticos, com baixo nível de escolaridade, baixo nível socioeconômico, isolados socialmente e com nível alto de estresse (Beck *et al.*, 2000). Além disto, alguns mediadores inflamatórios expressos pela destruição dos tecidos periodontais de proteção e sustentação como as interleucinas (IL) -1 α , IL-1 β , IL-6, fator de necrose tumoral (FNT - α), prostaglandina (PGE2) e as metaloproteinases de matriz (MMPs), também tem sido estudados nas diversas fases do processo aterosclerótico (Ren *et al.*, 2009; Naghavi *et al.*, 2003a, b).

Adicionalmente, o mecanismo pelo qual a DE pode promover a aterosclerose parece estar relacionado à menor biodisponibilidade do óxido nítrico (ON). Esta redução nas concentrações intravasculares de ON pode ser um dos elos biológicos entre o dano endotelial e a aterosclerose e está relacionada a uma alteração na via da L-arginina-óxido nítrico. O ON apresenta efeito anti-proliferativo, anti-inflamatório e anti-trombótico, portanto anti-aterosclerótico (Ghiadoni *et al.*, 1998). Machado *et al.* (2014) observaram que os ratos com periodontite apresentavam uma redução da vasodilatação endotélio-dependente devido à biodisponibilidade diminuída de ON ou

outros mediadores de relaxamento derivado do endotélio. Porém em uma meta-análise onde foram incluídos 4 estudos da associação entre a periodontite e o ON, verificou-se maiores níveis de ON no grupo com periodontite do que no grupo saúde periodontal(Liu et al., 2014).

Atualmente, acredita-se que a periodontite está associada à doença cardiovascular aterosclerótica como uma infecção oral crônica que conduz à entrada de bactérias (ou os seus produtos) para a corrente sanguínea. Estas bactérias ativam a resposta inflamatória do hospedeiro por vários mecanismos, que pode diretamente ou indiretamente induzir a inflamação sistêmica sendo que a resposta imune favorece a formação da placa de ateroma, maturação e exacerbação; podendo ser a disfunção endotelial um elo de ligação entre estas duas patologias (Tonetti *et al.*, 2013; Schenkein, Loos, 2013).

O estudo da doença aterosclerótica em suas fases iniciais é motivo de interesse crescente, e tem como objetivo identificar alterações no endotélio precocemente, pois a disfunção endotelial (DE) pode constituir a primeira etapa da aterosclerose e resume a influência de todos os fatores de risco das doenças cardiovasculares (Reriani *et al.*, 2010; Di Corleto, Gimbrone, 1996).

Revisões sistemáticas e meta-análises de estudos da associação entre as DCAe a periodontite têm sido reportados(Mustapha *et al.*, 2007; Lafon *et al.*, 2014; Leng *et al.*, 2015). A maioria deles reportam associações positivas do risco aumentado entre as duas doenças, com evidências moderadas, concluindo em consenso uma grande necessidade de estudos adicionais. Por outro lado, poucos estudos foram reportados da associação entre a periodontite e a DE (Amar *et al.*, 2003; Mercanoglu *et al.*, 2004; Seinost *et al.*, 2005; Elter *et al.*, 2006; Blum *et al.*, 2007; Tonetti *et al.*, 2007; Holtfreter *et al.*, 2013).

Desta forma, é de grande interesse estudos de fatores que influenciam nas alterações do endotélio, pois a DE constitui uma das primeiras etapas da aterosclerose e resume a influência de todos os fatores de risco das doenças cardiovasculares (Reriani *et al.*, 2010; Di Corleto, Gimbrone, 1996).

Neste sentido, este estudo é pontual e se justifica pelas seguintes questões: altas taxas de prevalência da periodontite avançada em todo o mundo, sendo a 6ª

doença mais prevalente de humanidade (Kassebaum *et al.*, 2014); as DCA são a maior causa de morte em todo o mundo, sendo responsável por aproximadamente 30% de todas as mortes do planeta (Lockhart *et al.*, 2012); grande número de marcadores e mediadores da inflamação que estão presentes em altas concentrações na circulação sistêmica de indivíduos com periodontite também estão associadas com um maior risco da doença cardiovascular aterosclerótica (Schenkein e Loos, 2013); o estudo dos “gatilhos” que ativam a DE é de extrema importância, pois ela é considerada a primeira etapa da aterosclerose (Reriani *et al.*, 2010), ausência de estudos associando IL-1 β , TNF- α , MMP2 e óxido nítrico e a disfunção endotelial por meio da dilatação mediada por fluxo (DMF) da artéria braquial e necessidade de estudos adicionais da influência da periodontite na função do endotélio vascular e do entendimento dos possíveis mecanismos patogênicos desta associação.

Neste contexto, o objetivo geral deste estudo foi avaliar a associação entre a DE e a periodontite pelo exame da dilatação mediada por fluxo DME da artéria braquial por meio de parâmetros clínicos periodontais e níveis dos marcadores inflamatórios IL-1 β , TNF- α , MMP2 e óxido nítrico.

LITERATURA CONSULTADA

Periodontite

A periodontite é uma reação inflamatória dos tecidos de suporte do dente, incluindo ligamento periodontal, cemento e osso alveolar à infecções causadas por bactérias anaeróbias gram-negativas. Ela é caracterizada por uma destruição tecidual não reversível, que resulta numa perda progressiva de inserção, e eventualmente pode levar à perda do dente (Beck *et al.*, 2000). A Periodontite avançada é a 6ª doença mais prevalente de humanidade (Kassebaum *et al.*, 2014).

O acúmulo de bactérias ao redor dos dentes é essencial para o início e a progressão da periodontite. As células que medeiam a imunidade, tais como os neutrófilos, desempenham um papel fundamental na resposta do hospedeiro contra a invasão de microrganismos periodontopatogênicos. Quando o biofilme dental não é removido numa base regular, mudanças ecológicas levam ao surgimento de um pequeno conjunto de espécies de bactérias anaeróbias gram-negativas, incluindo *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* e *Tannerella forsythia*, que particularmente, são fortemente associadas à periodontite. Estas bactérias ativam muitos processos imunoinflamatórios do hospedeiro que são considerados os agentes patogênicos da periodontite. O envolvimento de fatores genéticos e ambientais, bem como outros fatores de risco tais como diabetes e tabagismo podem acelerar o processo inflamatório da periodontite. Embora as bactérias sejam as responsáveis pelo início da periodontite, fatores de risco que são modificáveis pelo hospedeiro influenciam na gravidade e extensão da doença (Friedewald *et al.*, 2009).

Algumas espécies de bactérias podem produzir enzimas (protease, collagenase, fosfolipase-A e fibrinolizina) que degradam os tecidos das camadas superficiais do periodonto. O aumento da destruição das lesões periodontais é o resultado da ação indireta das bactérias. Os tecidos do hospedeiro promovem ativação de leucócitos (polimorfonucleares- PMNs), monócitos, linfócitos, fibroblastos, entre outras células, que em conjunto com os componentes bacterianos estimulam a produção de citocinas e mediadores inflamatórios, incluindo as prostaglandinas E2 (PGE2) (AAP, 1999).

Esta destruição de tecidos moles e duros que suportam os dentes é provocada por microorganismos orais anaeróbios e facultativos que liberam principalmente enzimas proteolíticas. Com alto poder de virulência o lipopolissacarídeo (LPS) das bactérias gram-negativas resulta na expressão induzida de fatores pró- inflamatórios do hospedeiro tais como as interleucinas IL-1 α , IL-1 β , IL-6, fator de necrose tumoral (TNF α), prostaglandina (PGE2) e as metaloproteinases de matriz (MMPs) que desencadeiam a destruição dos tecidos periodontais de proteção e sustentação (Ren *et al.*, 2009).

Por sua vez, as citocinas e os mediadores inflamatórios promovem a liberação de enzimas teciduais, recruta células inflamatórias, facilita a degranulação de PMNs, aumenta a síntese de MMP, inibem a síntese de colágeno, e ativam os linfócitos B e T (Birkedal-Hansen *et al.*, 1993; Offenbacher *et al.*, 1996, , Iacopin, Cutler, 2000). O TNF- α é o principal marcador para apoptose celular, reabsorção óssea, secreção de MMP, expressão da molécula de adesão intercelular (ICAM) e produção de IL-6 (Iacopin, Cutler, 2000).

Todas as estratégias de tratamento adequadas para periodontite concentram na resolução da inflamação gengival e na cicatrização dos tecidos mole e duro de inserção dos dentes. Assim, deve ser realizada a remoção do biofilme bacteriano que fica aderido às raízes dos dentes e a orientação ao paciente sobre a importância da higiene bucal na redução de um novo crescimento bacteriano (Friedewald *et al.*, 2009).

Três parâmetros clínicos são tipicamente utilizados nos estudos epidemiológicos para avaliar a prevalência da periodontite: (1) sangramento à sondagem (SS), o que reflete a presença de um infiltrado inflamatório nos tecidos gengivais, com perda da integridade do epitélio sulcular; (2) profundidade de sondagem da bolsa periodontal (PS), que descreve o aprofundamento do sulco gengival a partir do qual, o biofilme pode propagar apicalmente ao longo da superfície da raiz; e (3) nível de inserção clínica (NIC), o que reflete a quantidade de perda do tecido periodontal. Assim, sangramento à sondagem e profundidade de sondagem da bolsa periodontal são mais indicativos de uma patologia atual, enquanto que o nível de inserção clínica proporciona uma medida acumulativa de

perda de suporte do dente causada pelos efeitos agregados de fatores patogênicos, tais como periodontite e trauma (Lockhart *et al.*, 2012).

Uma série de critérios para a definição de periodontite vem sendo utilizado nas pesquisas e relatados na literatura, porém, ainda sem um consenso sobre a melhor definição para os estudos epidemiológicos. O fato é que aparentemente os diferentes tipos de critérios de definição podem levar a diferentes resultados de associação da periodontite com condições sistêmicas. Isso tem feito com que os pesquisadores utilizem nos estudos diversos critérios de definição de periodontite ao descrever o estado periodontal e associá-lo com os fatores e condições em estudo (Costa *et al.*, 2009).

O endotélio vascular e a aterosclerose

As doenças cardiovasculares ateroscleróticas (DCA) são a maior causa de morte em todo o mundo, sendo responsável por aproximadamente 30% de todas as mortes do planeta e principal causa de incapacidade nos Estados Unidos (Roger *et al.*, 2012). As DCA é um processo crônico, com um curso progressivo ao longo de muitos anos, afetam o coração e os vasos sanguíneos e pode causar eventos clínicos agudos, incluindo síndrome coronária aguda (SCA), infarto do miocárdio (IM) e acidente vascular cerebral (AVC) (Lockhart *et al.*, 2012).

A aterosclerose é uma doença vascular progressiva e pode ser observada pelo espessamento da camada sub-íntima e pela formação de ateroma na parede de artérias de médio e grande calibre. Estas alterações foram observadas há muito tempo por Von Rokitansky, (1852) e Virchow, (1856) em autópsias de adultos jovens e assim, foi proposta a hipótese que a aterosclerose seria uma resposta inflamatória crônica leve a uma injúria vascular.

Nos últimos anos, a patogênese da aterosclerose tem se associado à ativação da imunidade inata e à inflamação. A imunidade inata é uma resposta relativamente não específica frente a uma ameaça à integridade corporal, constituída pelas barreiras físicas, fatores solúveis como a cascata complemento, quimiocinas e citocinas, células brancas como monócitos, macrófagos e neutrófilos (Fearon, Locksley, 1996). Todos os componentes da resposta inflamatória e da

disfunção endotelial que estão ligados à DCV, síndrome metabólica e diabetes, de alguma forma estão relacionados à imunidade inata que, além de ser controlada por citocinas e polipeptídeos, agem basicamente como antimicrobianos e hemostáticos, levando à ativação deste sistema e a alterações metabólicas do organismo. A maioria das citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral α (TNF- α) e interleucina-6 (IL-6), produzidas por monócitos, macrófagos e também por outras células, podem apresentar a função de sinalização na própria célula, em células vizinhas ou em células distantes (Memon *et al.*, 1997).

Uma grande variedade destes marcadores ou possíveis fatores de risco têm sido estudados em cada fase do processo aterosclerótico. No estágio inicial em que ocorre a formação da placa aterosclerótica, os marcadores mais relacionados são as moléculas de LDL-colesterol, LDLox, proteína C-reativa (PCR), interleucinas IL-6, IL10, IL-18, fibrinogênio e TNF- α ; no estágio de instabilidade da placa aterosclerótica (ateroma), as enzimas como a matrix metaloproteinase (MMP-9) e mieloperoxidase (MPO), as moléculas de adesão intercelular (ICAM) e as moléculas de adesão de célula vascular (VCAM) estão relacionadas. Na fase em que ocorre a ruptura da placa, marcadores como: ligante solúvel CD40 (sCD40L), fator de crescimento placentário (PIGF), proteína-A plasmática associada à gravidez (PAPP-A) e VCAM estão envolvidos. No processo aterosclerótico, ainda ocorre a fase de trombose, onde marcadores como: inibidor do ativador do fibrinogênio (PAI-1), sCD40L, fator de von Willebrand (fvW), D-dímer são citados e ainda muitos outros marcadores estão envolvidos na fase de isquemia, de necrose e por fim de disfunção do miocárdio. A PCR também está presente numa fase de resposta aguda após a ruptura da capa fibrosa da placa ateromatosa (Naghavi *et al.*, 2003a, b).

Os primeiros trabalhos que buscavam esclarecer a importância do endotélio vascular foram de Moncada, (1977) e Furchgott, (1980), eles permitiram a atual compreensão das funções homeostáticas vitais do endotélio como o controle sobre a coagulação, a regulação do tônus vascular e a interação com as plaquetas e leucócitos.

O endotélio vascular é formado por células endoteliais vasculares (CEs) que revestem as paredes internas de todo o sistema vascular. As funções fisiológicas habituais de CEs incluem a regulação de processos fisiológicos como resposta à

infecção e sepse, coagulação e fibrinólise, controle da luz do vaso, controle da alteração do fluxo sanguíneo através da expressão de óxido nítrico (ON), cicatrização de feridas, recrutamento de neutrófilos, geração de citocinas e adesão celular (Munzel *et al.*, 2008).

A doença cardiovascular aterosclerótica tem como um dos seus primeiros sinais reconhecíveis a disfunção endotelial (DE) que está presente muito antes das consequências devastadoras da aterosclerose aparecerem. A DE ocorre quando o endotélio vascular sofre alterações na sua função causada por alguns fatores de risco como colesterol alto, hipertensão arterial sistêmica (HAS), tabagismo e hiperglicemia. Esta disfunção pode provocar maior tendência à vasoconstrição, vasoespasmos, trombogenicidade e proliferação celular anormal. Estas alterações são fundamentais no processo de formação e instabilização da placa de ateroma, com influência direta no curso clínico da doença aterosclerótica e de outras doenças cardiovasculares como HAS e insuficiência cardíaca. Em razão disto, foi proposto que a disfunção endotelial resume a influência de todos os fatores de risco das doenças cardiovasculares por constituir a primeira etapa da aterosclerose, podendo ser, por si só, a causa desses eventos (Reriani *et al.*, 2010; Di Corleto, Gimbrone, 1996).

Evidências científicas da associação entre a periodontite e as doenças cardiovasculares: baseado em revisões sistemáticas e meta-análise.

Janket *et al.* (2003) realizaram uma meta-análise, com o objetivo de avaliar estudos que associavam a doença periodontal como fator de risco para as doenças cardiovasculares e explorar as possíveis causas para resultados conflitantes na literatura. Nove estudos de coorte foram incluídos na meta-análise (8 prospectivos e 1 retrospectivo). Os resultados sugerem que a periodontite pode estar significativamente associada com a doença cardiovascular, embora o incremento do risco entre indivíduos com ou sem periodontite, na população em geral, seja modesto, cerca de 20%. Contudo, como aproximadamente 40% da população apresenta periodontite, este modesto aumento pode efetivamente ter um profundo impacto na saúde pública. Foi ainda observado que indivíduos com periodontite têm um risco relativo (RR) de 1,19, indicando um maior risco de eventos

cardiovasculares futuros. Por outro lado, é importante observar que, quando analisados apenas os indivíduos com idade menor ou igual a 65 anos, verificou-se que o RR para a doença cardiovascular aumentou para 1,44. Além do mais, quando restrito apenas ao acidente vascular cerebral (AVC), o RR neste subgrupo etário de doentes foi de 2,85.

Na revisão sistemática de Scannapieco *et al.* (2003), foi conduzida com o objetivo de verificar a associação entre a doença periodontal crônica inflamatória e à aterosclerose. Foram incluídos 31 estudos nas análises. Os resultados mostraram que 4 estudos caso-controle reportaram uma associação positiva entre indicadores de pobre saúde oral e aterosclerose e 11 estudos transversais suportam uma modesta associação entre a periodontite e a doença cardiovascular, depois de controlados outros fatores de risco, particularmente, o tabaco. Concluiu-se que quanto tomados em conjunto, a maior parte da literatura indicou uma modesta associação entre a periodontite e a aterosclerose, infarto do miocárdio e a doença cardiovascular. Porém vários outros estudos não mostraram esta associação. Por isto, não haveria disponíveis evidências significativas para justificar uma intervenção periodontal como maneira de prevenir o início ou a progressão da aterosclerose.

Nos sete estudos observacionais incluídos na meta-análise de Khader *et al.* (2004), o objetivo foi avaliar a relação entre a doença periodontal e a doença cardíaca coronária (DCC) e a doença cerebrovascular. Os resultados mostraram o aumento do risco relativo de doença cardíaca coronária entre indivíduos com periodontite, comparados com os indivíduos saudáveis, demonstrando um risco 1,15 vezes superior. Adicionalmente, os indivíduos com periodontite, comparados com os indivíduos saudáveis, têm um risco relativo global ajustado 1,13 vezes superior para as doenças cerebrovasculares. Como conclusão desta meta-análise, verificou-se que a periodontite aumenta o risco da doença cardíaca coronária e da doença cerebrovascular. Entretanto, não há evidências de uma forte associação entre elas.

Bahekar *et al.* (2007) realizaram uma meta-análise na qual foram incluídos 15 estudos (5 coortes prospectivos, 5 caso-controle e 5 transversais), o que resultou numa amostra total de 105.239 indivíduos. De acordo com os resultados desta meta-análise foi possível verificar que é estaticamente significativa a correlação positiva encontrada entre a periodontite e a doença coronária, uma vez que, tanto a

incidência como a prevalência da doença coronária mostrou-se aumentada em pacientes com periodontite. Os estudos incluídos nesta meta-análise foram ajustados para os fatores de confusão, idade, gênero, história familiar de doença coronária, tabagismo, entre outros. Os estudos de coortes prospectivos observaram que indivíduos com periodontite apresentam um risco 1,14 vezes superior de apresentarem a doença cardiovascular. Por outro lado, os estudos de caso controle observaram que indivíduos com periodontite apresentaram um risco 2,22 vezes superior de apresentar a doença cardiovascular. Em relação aos estudos transversais, os indivíduos com periodontite apresentaram um risco de apresentar a doença cardiovascular 1,59 vezes superior, em relação aos controles. Vale ressaltar que, no que concerne aos estudos de coorte incluídos, quando a análise recaiu em pacientes edêntulos (com menos 10 dentes), o risco de doença coronária aumentou para 1,24 vezes.

Mustapha *et al.* (2007) em sua revisão sistemática e meta-análise avaliaram a associação entre doença periodontal com exposição bacteriana sistêmica elevada e a doença cardiovascular. Foram incluídos 12 estudos na revisão sistemática (5 coorte e 7 transversais) e 11 estudos na meta-análise. Para as análises estratificadas, os desfechos considerados foram doença cardíaca coronária (DCC) (n = 7), acidente vascular cerebral (AVC) (n = 4), e espessamento médio da carótida (n = 3) como uma medida da aterosclerose precoce. Os resultados mostraram que a doença periodontal com marcadores elevados da exposição bacteriana sistêmica foi fortemente associada com a DCC em comparação com indivíduos sem doença periodontal. Este grupo não foi associado com eventos cardiovasculares ou AVC, mas foi associado com um aumento significativo do espessamento médio da carótida. Foi concluído que a doença periodontal com exposição bacteriana elevada está associada com doença cardíaca coronária e a aterosclerose precoce, sugerindo que o nível de exposição bacteriana sistêmica da periodontite é uma exposição biologicamente pertinente em relação ao risco da aterosclerose.

Em sua revisão sistemática e meta-análise, Humphrey *et al.* (2008) avaliaram se a doença periodontal seria um novo fator de risco independente para um incidente da doença cardíaca coronária (DCC). A partir de 7 estudos de boa ou razoável qualidade, os resultados mostraram que a periodontite pode ser independentemente

associada a um aumento no risco para a doença cardíaca coronária. Concluiu-se que a doença periodontal é um fator de risco ou marcador para doença cardíaca coronária, independente dos fatores de risco tradicionais das doenças cardiovasculares como tabagismo, diabetes, fator socioeconômico entre outros.

Blaizot *et al.* (2009) realizaram uma meta- análise para avaliar a associação entre a exposição à periodontite e doenças cardiovasculares. Os artigos incluídos relataram os resultados de estudos observacionais (coorte, transversais e caso-controle) os quais avaliaram a ligação entre a exposição às duas doenças. Estas deveriam ter sido diagnosticadas por um dos seguintes critérios: doença da artéria coronária, angina de peito, enfarto agudo do miocárdio, morte causada por doenças cardíacas. 29 artigos foram selecionados para a meta- análise, a odds ratio (OR) calculadas a partir de 22 estudos caso-controle e transversais foi de 2,35. Verificou-se que o risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares foi significativamente mais elevado (34%) em pacientes com doença periodontal em comparação àqueles sem doença periodontal. Em relação aos 7 estudos de coorte selecionados o RR foi de 1,34. Em suma, a partir de estudos observacionais, parece que indivíduos com doenças periodontais têm um maior risco de desenvolvimento das doenças cardiovasculares. Porém, a redução do risco de eventos cardiovasculares associados com o tratamento da periodontite, ou seja, em estudos de intervenção, ainda precisa ser investigada.

Na revisão sistemática de Lam *et al.* (2011) foram incluídos 8 estudos que realizaram atividades de promoção da saúde bucal em indivíduos com doença cardíaca coronária, hipertensão, transplante cardíaco e acidente vascular cerebral. Foi realizado tratamento periodontal e intervenções de higiene bucal nestes indivíduos que obtiveram melhorias na saúde periodontal e modificações de marcadores inflamatórios sistêmicos. Foi possível verificar que as atividades de promoção de saúde bucal parecem produzir melhorias não só na saúde periodontal, mas também ao nível dos marcadores inflamatórios sistêmicos e ainda na função endotelial. Os estudos existentes são, no entanto, limitados no que diz respeito à eficácia que as atividades de promoção de saúde bucal possam ter em pacientes com doença cardiovascular, particularmente em indivíduos com acidente vascular cerebral.

D'Aiuto *et al.* (2013) realizaram uma revisão sistemática com o objetivo de avaliar criticamente as evidências do impacto do tratamento periodontal nos biomarcadores das doenças cardiovasculares. Os resultados da sua busca resultaram em: (a) nenhuma evidência sobre os efeitos da terapia periodontal sobre a aterosclerose subclínica, os níveis séricos de CD40 ligante, soro amilóide A, Proteína quimiotática de monócitos 1; (b) evidência limitada sobre os efeitos da terapia periodontal na pressão arterial, na contagem de leucócitos, fibrinogênio, fator de necrose tumoral α , E-selectina, fatores de von Willebrand, D-dímeros, metaloproteinases da matriz, estresse oxidativo de eventos cardiovasculares; e (c) moderada evidências sugerindo um efeito insignificante da terapia periodontal na redução interleucina-6 e nos níveis de lipídios, enquanto um efeito positivo na redução dos níveis da proteína C-reativa, além da melhora na função endotelial. Por isto, concluiu-se que a periodontite é um gatilho para uma resposta inflamatória de curto prazo, e seu tratamento acarretaria redução progressiva e consistente de inflamação sistêmica e uma melhora na função endotelial. Porém, há limitadas evidências de que essas mudanças vão aumentar ou reduzir as doenças cardiovasculares em indivíduos que sofrem de periodontite ao longo do tempo.

Dietrich *et al.* (2013) realizaram uma revisão sistemática de estudos de coorte e caso-controle com o objetivo de investigar a evidência epidemiológica de uma associação entre a periodontite e incidentes DCA, incluindo doença cardíaca coronária (DCC), doença cerebrovascular e doença arterial periférica. Foram incluídos 12 estudos na revisão. Todos os estudos, com exceção de um, relataram associações positivas entre periodontite e a incidência de doenças cardiovasculares, em pelo menos um subgrupo específico. A associação foi mais forte em adultos jovens e não houve evidência de uma associação entre periodontite e a incidência de DCC em indivíduos com mais de 65 anos. A partir desta revisão, pode-se concluir que existem evidências para um risco aumentado da doença cardiovascular em indivíduos com periodontite, em comparação a indivíduos sem a doença. No entanto, isso pode não se aplicar a todos os grupos da população, pois ainda não há evidências suficientes para uma associação entre periodontite e a incidência de eventos cardiovasculares.

Lafon *et al.* (2014) avaliaram a associação entre a doença periodontal e incidência de acidentes cardiovasculares (fatal ou não fatal, isquêmico ou

hemorrágico) por meio de uma meta-análise de estudos de coorte. As análises foram realizadas separadamente para três desfechos: periodontite, gengivite e perda de dentes. Nove estudos de coorte foram incluídos nesta avaliação. Três estudos prospectivos, os quais utilizaram indicadores confiáveis do diagnóstico da doença periodontal, obteve as maiores pontuações. Por outro lado, três estudos que utilizaram a avaliação subjetiva da incidência dos acidentes cardiovasculares ou foram diagnosticados sem a obtenção de imagens recebeu uma pontuação mais baixa. Os resultados da meta-análises variaram dependendo do desfecho considerado e do tipo de acidente cardiovascular ocorrido. O risco de acidente cardiovascular foi significativamente aumentado pela presença de periodontite [risco relativo 1,63 (1,25 - 2,00)]. A perda do dente também foi um fator de risco [risco relativo 1,39 (1,13 - 1,65)]. A gengivite não obteve resultados significantes como fator de risco. Esta meta-análise concluiu que a periodontite e perda de dentes estão associados com a ocorrência de AVC.

Teeuw *et al.* (2014) realizaram uma revisão sistemática e meta-análise para avaliar como o tratamento da periodontite pode melhorar o perfil da doença aterosclerótica. A partir de 3928 estudos selecionados, 25 estudos preencheram os critérios de elegibilidade e 1748 indivíduos com periodontite foram incluídos. Sete ensaios clínicos incluíram indivíduos com periodontite que eram sistemicamente saudáveis, 18 ensaios recrutaram indivíduos com periodontite e que possuíam outras comorbidades, tal como doenças cardiovasculares ou diabetes. Os resultados da meta-análise demonstraram uma melhora significativa dos valores de proteína C reativa, IL-6, TNF- α , fibrinogênio, colesterol total e HDL-C após a intervenção periodontal. Importante salientar que os indivíduos com periodontite que apresentavam outras comorbidades sistêmicas foram os que mais se beneficiaram após terapia periodontal e a melhoria da função endotelial foi consistentemente relatada. Esta revisão sistemática e meta-análise concluiu que o tratamento periodontal melhora a função endotelial e reduz biomarcadores da doença aterosclerótica, especialmente, os que já sofrem de doenças cardiovasculares e / ou diabetes.

Leng *et al.* (2015) realizaram uma meta-análise de 15 estudos de coorte prospectivo para quantificar a associação entre a doença periodontal e o risco da doença cardíaca coronária. As medidas de resultado de interesse foram morbidade

por doença cardíaca coronária (fatal ou não fatal) e mortalidade avaliada utilizando o risco relativo ou taxa de risco e seus intervalos de confiança correspondentes a 95%. Os resultados apresentaram que indivíduos com doença periodontal apresentam um aumento significativo, e de forma independente, no risco de desenvolvimento da doença cardíaca coronária. Por isto em uma avaliação de indivíduos com doença cardíaca coronária é sempre necessário indicar frequentes check-up odontológicos.

Como a rigidez arterial é considerada um marcador da arteriosclerose e um fator de risco para doenças cardiovasculares. Schmitt *et al.* (2015) realizaram uma revisão sistemática com meta-análise sobre estudos clínicos que avaliaram a rigidez arterial em indivíduos com periodontite usando velocidade da onda de pulso (VOP). Foi avaliado se indivíduos com periodontite têm a rigidez arterial prejudicada em comparação aos não-periodontalmente doentes e se o tratamento periodontal é eficaz como um meio para melhorar a rigidez arterial, em indivíduos com periodontite. Um total de 10 estudos foram incluídos na revisão sistemática e 7 na meta-análise. Os resultados demonstraram que indivíduos com periodontite têm maior rigidez arterial em comparação aos controles (VOP diferença média de 0,85 m / s; 95% intervalo de confiança: 0,53-1,16; $p < 0,00001$). Somente dois estudos de intervenção mostraram resultados contraditórios sobre os efeitos do tratamento periodontal na VOP.

Assim pode ser observado que a maioria das revisões sistemáticas e meta-análises apontam para uma evidência moderada da associação entre doenças cardiovasculares e periodontite, sugerindo ainda que estudos com maior rigor metodológico sejam conduzidos para confirmar a variabilidade da força desta associação

Medidas da disfunção endotelial

Com o objetivo de mensurar valores para a disfunção endotelial, Celermajer *et al.* (1992) descreveram uma técnica de diagnóstico não invasivo da disfunção endotelial (DE) através do ultra-som da artéria braquial. Posteriormente, Corretti *et al.* (2002) publicaram diretrizes para a realização do teste da dilatação mediada

por fluxo da artéria braquial (DMF), padronizando a metodologia adequada. A DMF é comumente expressa na porcentagem de mudança do diâmetro da artéria.

O exame da DMF tem como vantagens ser uma ferramenta acessível, é um método de diagnóstico preciso da disfunção endotelial não invasivo e que pode ser realizado em indivíduos jovens sem manifestações clínicas da doença cardiovascular aterosclerótica. Além disto, tem apresentado um bom valor prognóstico como preditor independente de eventos cardiovasculares futuros, como o infarto agudo do miocárdio e acidente vascular cerebral (Siasos *et al.*, 2015).

Periodontite e a disfunção endotelial: mediadores inflamatórios de interesse

A principal teoria que descreve a correlação entre a periodontite e a DE trata-se da teoria inflamatória ao propor o envolvimento dos produtos inflamatórios (IL, TNF- α , proteína C-reativa [PCR], metaloproteinases [MMPs] e prostaglandinas) expressos pelas células periodontais que são liberadas na circulação sistêmica estimulam as células endoteliais a produzir outros mediadores inflamatórios induzindo então a DE (Gurav, 2014). Por isto, alguns marcadores inflamatórios estão sendo atualmente investigados para aprofundar o entendimento do papel da inflamação sistêmica como um mediador potencial da ligação entre a periodontite e DE.

Na periodontite, o LPS das bactérias gram-negativas, com alto poder de virulência, resulta na expressão induzida de fatores pró- inflamatórios do hospedeiro tais como a IL -1 α , IL-1 β , IL-6, TNF - α , PGE2 e MMPs. Estes fatores desencadeiam a destruição dos tecidos periodontais de proteção e sustentação (Ren *et al.*, 2009). Esses marcadores inflamatórios presentes em altas concentrações nos indivíduos com periodontite também estão envolvidos no processo aterosclerótico, pois a DE promove uma inflamação da parede vascular e isto faz com que ela expresse moléculas de adesão e citocinas (Huang, Vita, 2006).

Dentre os mediadores da inflamação sistêmica, o fator de necrose tumoral α (TNF- α) tem sido estudado como um marcador da inflamação precoce, que desempenha um papel-chave na iniciação da resposta inflamatória (Bazzoni, Beutler, 1996) e induz destruição tecidual e reabsorção óssea (Shapira *et al.*, 2005).

O TNF- α é um dos componentes na indução da DE e está associado aos fatores de risco cardiovasculares (Memon *et al.*, 1997; Skoog *et al.*, 2002). Este mediador está presente no estágio inicial da aterosclerose na formação da placa de ateroma, no estágio de instabilidade da placa e é o principal marcador para apoptose celular e reabsorção óssea (Iacopin, Cutler, 2000). Desempenha papel importante também na expressão da molécula de adesão intercelular (ICAM), produção de IL-6, redução da produção de síntese de Óxido Nítrico endotelial (eNOS), diminui a meia-vida do RNAm e SONE em células endoteliais e na secreção de MMP (Iacopin, Cutler, 2000; Huang, Vita, 2006). Uma recente meta-análise demonstrou resultados controversos na associação entre a periodontite e o TNF- α em diferentes etnias e nos resultados com o controle de fatores de confundimento, como o tabagismo e idade (Ding *et al.* 2014). Há dois relatos na literatura de estudos que investigaram a associação entre a periodontite à valores de TNF no diagnóstico precoce da aterosclerose. Joshipura *et al.* (2004) avaliaram biomarcadores da função endotelial em indivíduos com e sem periodontite e não encontraram diferenças significativas nos valores de TNF- α entre os dois grupos. D'Aiuto *et al.* (2007) mostraram aumento significativo na liberação de TNF- α 24 horas após a terapia periodontal, que retornou aos níveis normais depois de 1 semana e 1 mês.

Outro mediador estudado foi a citocina IL-1 β extracelular, que é produzida e liberada principalmente por macrófagos e fibroblastos quando ativados (Dinarelli, 2002). Ela é um componente significativo e integra a resposta do hospedeiro frente à infecção periodontal, sendo importante mediador fisiológico do periodonto. Assim, grande parte dos danos que ocorre durante a destruição do tecido periodontal pode ser atribuído à atividade de IL-1, representado por uma reação exagerada do hospedeiro causada pela produção excessiva de IL-1 (Graves, Cochran 2003). A DE pode ser resultado da expressão de citocinas pró-inflamatórias (como IL-1, IL-6 e TNF- α) e outros que são designados para interagir com as plaquetas e leucócitos, juntamente com a inflamação e com fatores pró-trombóticos (Salvador *et al.* 2016). Uma correlação positiva significativa entre a IL-1 β e a periodontite foi encontrada em uma recente meta-análise (Yin *et al.*, 2016). Porém outros pesquisadores não conseguiram confirmar tal associação (Kornman *et al.*, 1997, Moreira *et al.*, 2005), por isto, a relevância da IL-1 β na patogênese da periodontite ainda permanece controverso (Shapira *et al.*, 2005).

Outro marcador inflamatório avaliado são as MMPs, elas são produzidas como uma enzima e é segregada para dentro da matriz extracelular, representando um reservatório que pode ser ativado por condições de inflamação presentes nos tecidos. Assim, a ativação de MMPs armazenadas pode contribuir para a degradação do colágeno durante os períodos de atividade da periodontite e da perda de inserção periodontal. A ativação de citocinas pró-inflamatórias e de outros mediadores resulta em uma matriz alterada que, por sua vez, pode afetar a função de células e remodelação de tecidos subsequente (Graves, Cochran, 2003). As MMPs nas placas de ateroma degradam o colágeno da matriz extracelular da capa fibrosa, o que sugere que as MMPs estão relacionadas com instabilidade e ruptura das placas ateroscleróticas (Naghavi *et al.*, 2003a, b). A MMP2 foi avaliada somente em 2 estudos de associação com a periodontite crônica. Estas pesquisas não encontraram associação entre a MMP2 com a susceptibilidade e a gravidade da periodontite (Holla *et al.*, 2005, Gurkan *et al.*, 2008).

O mecanismo pelo qual a DE pode promover a aterosclerose parece estar relacionado à menor biodisponibilidade do ON. Esta redução nas concentrações intravasculares de ON pode ser um dos elos biológicos entre o dano endotelial e a aterosclerose e está relacionada a uma alteração na via da L-arginina-óxido nítrico. Além de um potente vasodilatador endógeno, o ON inibe a agregação plaquetária, a proliferação e migração de CML, a expressão das moléculas de adesão celular e a adesão de leucócitos à superfície endotelial. Possui efeito antiproliferativo, anti-inflamatório e anti-trombótico, portanto anti-aterosclerótico (Ghiadoni *et al.*, 1998). Machado *et al.* (2014) observaram que animais com periodontite apresentavam uma redução da vasodilatação endotélio-dependente devido à biodisponibilidade diminuída de ON e / ou outros mediadores de relaxamento derivado do endotélio. Porém em uma meta-análise que incluiu 4 estudos da associação entre a periodontite e o ON, todos eles determinaram maiores níveis de ON no grupo com periodontite do que no grupo saúde periodontal (Liu *et al.*, 2014).

O ON é normalmente produzido por uma reação mediada pela enzima óxido nítrico sintetase (SON), que no endotélio vascular é chamada de óxido nítrico sintetase endotelial (SONe). Porém, em estados inflamatórios, a indução SON pode ser expressa em macrófagos e células musculares lisas que contribui para a produção de ON. O ON é um mediador crucial da vasodilatação endotélio-

dependente e desempenham também um papel na agregação de plaquetária e na manutenção do equilíbrio entre crescimento e diferenciação das células musculares lisas (Griendling, Fitzgerald, 2003).

Poucos estudos têm verificado a associação entre a periodontite e a disfunção endotelial por meio da técnica da DMF da artéria braquial (Mercanoglu *et al.*, 2004; Amar *et al.*, 2003; Seinost *et al.*, 2005; Elter *et al.*, 2006; Blum *et al.*, 2007; Tonetti *et al.*, 2007 e Holtfreter *et al.*, 2013).

Amar *et al.* (2003) foram os pioneiros a avaliar a DMF e proteína C-reativa (PCR) em 26 indivíduos com periodontite avançada no grupo caso e 29 indivíduos sem periodontite no grupo controle, sendo todos saudáveis sistemicamente. Indivíduos com doença periodontal avançada tiveram menores % DMF ($7.8 \pm 4.6\%$ versus $11.7 \pm 5.3\%$, $P=0.005$) e maiores níveis séricos de PCR em comparação com indivíduos sem periodontite. Foi concluído que indivíduos com periodontite avançada apresentam maior DE e evidências de inflamação sistêmica que os indivíduos sem doença periodontal.

Holtfreter *et al.* (2013) avaliaram DMF e PCR em 1234 indivíduos na população geral da Pomerânia. A análise de regressão linear multivariada totalmente ajustado revelou associação significativa entre a DE e a porcentagem de sítios com PS ≥ 6 mm (%DFM 0,74%, $p = 0,048$), em comparação aos indivíduos com menores valores de PS. Consistentemente, os valores de DFM aumentou significativamente com NIC ≥ 6 mm ($p= 0,01$) e na definição de caso de periodontite ($p = 0,006$). Restrições aos indivíduos sem medicação anti-hipertensiva ou estatina e não fumantes confirmou os resultados anteriores. A PCR não foi significativamente relacionada DFM, sugerindo que a inflamação sistêmica não parece mediar esta relação. Os resultados obtidos estão em contraste com outros estudos que relacionam a doença periodontal e valores baixos da DFM. Altos níveis de doença periodontal foram significativamente associados com valores elevados da DFM da artéria braquial.

Em outro estudo, Mercanoglu *et al.* (2004) avaliaram a DE em indivíduos com periodontite crônica e sua avaliação após a terapia periodontal inicial. Os grupos de estudo consistiram de 28 indivíduos com periodontite crônica e sem qualquer doença vascular aterosclerótica, e 26 controles saudáveis. Em ambos os grupos,

foram realizadas medidas da DMF no início do estudo e repetidas 6 semanas após a conclusão da terapia periodontal. Os resultados não encontraram diferença significativa na % de DMF na linha de base entre os grupos com periodontite e o grupo controle. Porém a % de DMF melhorou significativamente após a terapia periodontal, (de $8,4\% \pm 4,0\%$ para $17,7\% \pm 5,7\%$, $P < 0,000$). O estudo mostrou que as funções endoteliais foram prejudicadas em indivíduos com periodontite crônica e que melhoram após a terapia periodontal inicial.

Em outro estudo semelhante, Seinost *et al.* (2005) testaram a função endotelial em 30 indivíduos com periodontite avançada e 31 indivíduos com saúde periodontal no grupo controle, todos sistemicamente saudáveis. As medidas de DMF foram realizadas no início do estudo e depois de 3 meses do tratamento periodontal. A %DMF foi significativamente menor nos indivíduos com periodontite do que nos controles no exame inicial ($6,1\% \pm 4,4$ vs $8,5\% \pm 3,4$, $p = 0,002$) e o tratamento periodontal resultou em uma melhoria significativa na %DFM ($9,8\%$ vs $5,7\%$, $p = 0,003$) acompanhada por uma diminuição nas concentrações de proteína C-reativa. Estes resultados indicam que o tratamento da periodontite avançada melhora a disfunção endotelial.

Elter *et al.* (2006) em um ensaio clínico sobre os efeitos da terapia periodontal na função do endotélio vascular avaliou 22 voluntários acima de 30 anos, sistemicamente saudáveis e com periodontite crônica. Foi realizada mediadas da DMF, PCR e IL-6 em 2 medidas iniciais, com intervalo de 1 mês entre elas, e novas medidas 1 mês após a terapia periodontal. Houve melhora em todos os parâmetros avaliados após a terapia periodontal. Os valores da % de DMF melhoraram de $8,6\%$ ($\pm 4,7$) para $10,2\%$ ($\pm 3,9$) ($p = 0,034$), os níveis séricos de PCR ($2,4$ vs $1,4$, $p = 0,123$) e IL-6 ($1,6$ vs $1,5$, $p = 0,277$) diminuíram após tratamento. O estudo concluiu que o tratamento da infecção periodontal pode levar a uma diminuição dos marcadores inflamatórios (apesar da não significância estatística de acordo com os valores de p para os níveis de PCR e IL-6) e função melhorada do endotélio vascular.

Em um ensaio clínico, Tonetti *et al.* (2007) avaliaram o efeito do tratamento periodontal sobre a função endotelial durante 6 meses. 120 indivíduos foram aleatoriamente distribuídos em dois grupos: 59 indivíduos com saúde periodontal no grupo controle que receberam limpeza dental supragengival e 61 no grupo caso que

foram submetidos ao tratamento periodontal. A função endotelial foi avaliada por meio da DMF e níveis séricos de alguns marcadores inflamatórios e da coagulação que foram mensurados antes do tratamento e 1, 7, 30, 60, e 180 dias após o tratamento. Os resultados mostraram que vinte e quatro horas após o tratamento periodontal a % de DFM foi menor no grupo caso do que no grupo controle (1,4% [de 0.5 a 2.3], $p = 0.002$), além disto, os níveis de PCR, IL-6, fator de Von Willebrand e E-selectina foram significativamente maiores no grupo caso. No entanto, a % de DMF foi maior no grupo caso do que no grupo de controle após 60 dias (0.9%; 0.1 a 1.7; $P = 0.02$) e 180 dias (2.0%; 1.2 a 2.8; $p < 0.001$) da terapia periodontal. Medidas repetidas mostraram uma interação significativa entre tratamento e tempo para a maioria dos biomarcadores: PCR, IL-6, fator de von Willebrand e E-selectina. Este estudo mostrou que o tratamento periodontal é uma potencial fonte comum de redução da inflamação de baixo grau e resulta em uma melhora na função endotelial.

Em outro ensaio clínico, Blum *et al.* (2007) avaliaram 22 indivíduos com periodontite avançada no grupo caso e 10 indivíduos no grupo controle sem periodontite, ambos sistemicamente saudáveis. Foram realizadas medidas da DMF antes do tratamento periodontal e após 3 meses de tratamento. 13 indivíduos retornaram para uma segunda visita, após 3 meses. No início do estudo, houve uma diferença estatisticamente significativa entre o grupo caso e o grupo controle (% de DFM $4,12\% \pm 3,96\%$ vs $16,6\% \pm 7,86\%$, $p = 0,0000$). Nos 13 indivíduos que voltaram houve uma melhora na função endotelial (% de DFM $4,12 \pm 3,96\%$ vs $11,12 \pm 7,22\%$, $p = 0,007$). Eles concluíram que o tratamento periodontal melhorou a função endotelial.

OBJETIVOS

Objetivos gerais

Avaliar a associação entre a disfunção endotelial e condição periodontal por meio de parâmetros clínicos periodontais, exame da DMF da artéria braquial e níveis dos marcadores inflamatórios IL-1 β , TNF- α , MMP2 e ON.

Objetivos específicos

1) Descrever a condição clínica periodontal por meio de parâmetros clínicos de sangramento à sondagem, profundidade de sondagem e nível clínico de inserção.

2) Determinar a associação entre presença de periodontite com variáveis de risco sociais, comportamentais e biológicas de interesse

3) Verificar a associação entre periodontite e DE por meio do exame da DMF da artéria braquial.

4) Avaliar os níveis de mediadores da inflamação sistêmica IL-1 β , TNF- α , ON, MMP2/TIMP2 entre indivíduos com periodontite e sem periodontite.

5) Correlacionar os níveis de mediadores da inflamação sistêmica IL-1 β , TNF, ON e MMP2/TIMP2 em relação a gravidade e extensão da periodontite.

6) Correlacionar os níveis de mediadores inflamatórios IL-1 β , TNF- α , ON e MMP2/TIMP2 com a disfunção do endotélio vascular mediada pela DMF.

HIPÓTESES

Indivíduos com periodontite apresentam uma maior disfunção endotelial que indivíduos sem periodontite.

Indivíduos com periodontite apresentam maiores níveis de mediadores inflamatórios IL-1 β , TNF- α e MMP2/TIMP2. Indivíduos com periodontite apresentam menores níveis de ON.

Níveis de mediadores inflamatórios IL-1 β , TNF- α e MMP2/TIMP2 se correlacionam negativamente com a disfunção endotelial.

Níveis de ON se correlacionam positivamente com uma a disfunção endotelial.

ARTIGO CIENTÍFICO

ASSOCIAÇÃO ENTRE PERIODONTITE E DISFUNÇÃO ENDOTELIAL: PARÂMETROS CLÍNICOS PERIODONTAIS E NÍVEIS DOS MARCADORES INFLAMATÓRIOS IL-1 β , TNF- α , MMP2 E ÓXIDO NÍTRICO.

Resumo

Objetivos: A periodontite aumenta o risco das doenças cardiovasculares ateroscleróticas (DCA) e ambas doenças apresentam mecanismos fisiopatológicos semelhantes. A disfunção endotelial (DE) é um parâmetro precoce das DCA e sua associação com a periodontite foi pouco investigada até o presente momento. Neste contexto o objetivo geral deste estudo foi avaliar a associação entre a periodontite e a disfunção endotelial por meio de parâmetros clínicos periodontais e a presença dos marcadores inflamatórios IL-1 β , TNF- α , MMP2/TIMP2 e óxido nítrico.

Métodos: A amostra foi constituída por 47 indivíduos de ambos os gêneros, sem alterações sistêmicas conhecidas, divididos em dois grupos: um grupo com 24 indivíduos com periodontite crônica e outro com 23 indivíduos sem periodontite crônica. Foram realizados exames periodontais de sangramento a sondagem (SS), profundidade de sondagem (PS), nível de inserção clínica (NIC) e avaliada a DE por meio da dilatação mediada por fluxo (DMF) da artéria braquial. A concentração dos mediadores inflamatórios IL-1 β , TNF- α , MMP2/TIMP2 foi avaliada pelo método ELISA e o óxido nítrico (ON) pela reação de Griess na saliva.

Resultados: Os indivíduos com periodontite apresentaram significativamente maior DE quando comparados com indivíduos sem periodontite ($p= 0,034$ após hiperemia reativa e $p= 0,049$ após nitrato sublingual). Em relação aos mediadores inflamatórios avaliados, houve uma associação significativa entre a produção de MMP2/TIMP2 com a presença de periodontite ($p=0,008$) além de uma correlação positiva com todos parâmetros clínicos de gravidade da inflamação periodontal avaliados (PS, NIC, SS). Para os demais marcadores (IL-1 β , TNF- α e ON) os grupos com e sem periodontite apresentaram resultados similares. Foi identificada também uma correlação positiva significativa entre a produção de ON e uma menor DE (após hiperemia reativa $p= 0,027$ e após nitrato sublingual $p=0,016$). .

Conclusão: Indivíduos com periodontite apresentaram maior DE, expressa por menor % de DMF da artéria braquial e maiores níveis de MMP2/TIMP2 que indivíduos sem periodontite. O ON foi significativamente associado com uma menor DE.

Palavras-chave: periodontite, endotélio vascular, doença cardiovascular mediadores inflamatórios.

Título corrido: Periodontite e disfunção endotelial.

Introdução

A periodontite é uma doença inflamatória crônica, multifatorial, caracteriza-se pela destruição progressiva dos tecidos de suporte dos dentes e sua evolução pode levar a perda dental. Esta destruição de tecidos presente na periodontite é provocada por microorganismos orais anaeróbios e facultativos que liberam principalmente enzimas proteolíticas. Com alto poder de virulência o lipopolissacarídeo (LPS) das bactérias gram-negativas resulta na expressão induzida de fatores pró- inflamatórios do hospedeiro tais como a interleucina (IL) -1 α , IL-1 β , IL-6, fator de necrose tumoral (TNF - α), prostaglandina (PGE2) e as metaloproteinases de matriz (MMPs) que desencadeiam a destruição dos tecidos periodontais de proteção e sustentação (Ren et al. 2009).

Atualmente, acredita-se que a infecção bucal crônica da periodontite está associada à doença cardiovascular aterosclerótica (DCA) devido à entrada de bactérias (ou os seus produtos) para a corrente sanguínea (bacteremia). Estas bactérias ativam a resposta inflamatória do hospedeiro por vários mecanismos, sendo que a resposta imune favorece a formação da placa de ateroma, maturação e exacerbação (Tonetti et al. 2013). O risco aumentado das DCA em indivíduos com periodontite está evidenciada em revisões sistemáticas e meta-análises com evidências moderadas de associação (Mustapha *et al.*, 2007; Lafon *et al.*, 2014; Leng *et al.*, 2015).

A DCA tem como um dos seus primeiros sinais reconhecíveis a disfunção endotelial (DE) que está presente muito antes das consequências devastadoras da aterosclerose aparecer. Em razão disto, foi proposto que a DE resume a influência de todos os fatores de risco das doenças cardiovasculares por constituir a primeira etapa da aterosclerose, podendo ser, por si só, a causa desses eventos (Reriani et al. 2010).

A DE afeta o endotélio vascular e promove uma inflamação da parede vascular, o que faz com que ela expresse moléculas de adesão e citocinas (Huang et al. 2006). O óxido nítrico desempenha um papel crucial na atividade biológica e na função do endotélio por meio da regulação do tônus vascular, da inflamação, proliferação celular e da trombose (Landmesser et al. 2004). O endotélio vascular é formado por células endoteliais vasculares (CEs), ele reveste as paredes internas de todos os vasos sanguíneos e desempenha um papel essencial tanto na fisiologia normal do indivíduo quanto em condições de doença como a aterosclerose, diabetes, doenças vasculares e em condições inflamatórias (Munzel et al. 2008).

O lúmen dos vasos sanguíneos tem a capacidade de responder à estímulos físicos e químicos, isto confere a eles a capacidade de auto regulação do seu tônus vascular e ajuste do fluxo sanguíneo em resposta às alterações no ambiente local. Muitos vasos sanguíneos respondem ao aumento no fluxo sanguíneo, ou mais precisamente, ao estresse de cisalhamento, dilatando-se. Este fenômeno é designado Dilatação Mediada por Fluxo (DMF), sendo seu principal mediador um derivado endotelial, o óxido nítrico (Corretti et al. 2002).

Poucos estudos associam a periodontite à disfunção endotelial (Amar et al., 2003; Mercanoglu et al., 2004; Seinost et al., 2005; Elter et al., 2006; Blum et al., 2007; Tonetti et al., 2007; Holtfreter et al., 2013). Acredita-se que os produtos inflamatórios interleucinas (ILs), TNF- α , proteína C-reativa (PCR), metaloproteinases [MMPs] e prostaglandinas expressos na periodontite crônica são liberadas na circulação sistêmica e estimulam as células endoteliais a produzir outros mediadores inflamatórios induzindo, então, a disfunção endotelial (Gurav et al. 2014). Isto quer dizer que a baixa quantidade de inflamação sistêmica causada pela periodontite está intimamente ligada à alterações no endotélio vascular (Huang et al. 2006). Dentre os mecanismos que associam a periodontite com a DE, acredita-se também que os mediadores inflamatórios tais como TNF- α e IL-6 expresso na periodontite, reduzem a produção e biodisponibilidade de Óxido Nítrico (ON), com consequente impacto na função do endotélio vascular, com uma piora na vasodilatação dependente do endotélio (Huang et al. 2006). Além disto, o TNF- α é notável por diminuir a meia-vida do RNAm e a síntese de ON em células endoteliais(Huang et al. 2006).

Desta forma, é de grande interesse estudos de fatores que influenciam nas alterações do endotélio, pois a DE constitui uma das primeiras etapas da aterosclerose e reúne a influência de todos os fatores de risco das doenças cardiovasculares (Reriani *et al.*, 2010; Di Corleto, Gimbrone, 1996).

Assim, o objetivo deste estudo é avaliar a associação entre função endotelial medida pela dilatação mediada por fluxo (DMF) da artéria braquial e a periodontite por meio de parâmetros clínicos periodontais e níveis dos marcadores inflamatórios IL-1 β , TNF- α , MMP2/TIMP2 e ON.

Metodologia

Amostra

Este estudo transversal paralelo avaliou uma amostra de conveniência de 262 indivíduos nas Faculdades de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais no período compreendido entre Julho à Dezembro de 2015. Desta amostra, foram selecionados 47 indivíduos de ambos os gêneros, sistemicamente saudáveis compondo dois grupos: um grupo com 24 indivíduos com periodontite crônica e um grupo com 23 indivíduos sem periodontite crônica. Os seguintes critérios de exclusão e seus motivos foram: indivíduos com menos de 14 dentes (n=14), uso de quaisquer medicamentos de uso contínuo (n= 67); tratamento periodontal nos últimos 3 meses (n= 13); relato de histórico ou presença de alterações sistêmicas que comprometem a função endotelial (doenças cardiovasculares, câncer, doença renal, hepática ou pulmonar, infecções agudas, hipertensão, diabetes, hipercolesterolemia e discrasias sanguíneas; n=47); grávidas (n=2); fumantes e ex-fumantes (n=39); indivíduos com auto-relato de consumo de álcool superior a 4 vezes por semana (n=5);obesos (IMC maior/igual a 30 kg/m²; n= 11) e não compareceram para realizar o exame de DMF (n=17).

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais e os participantes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

Coleta de dados

Primeiramente foi realizada uma entrevista por meio de um questionário estruturado, contendo dados sócio-demográficos, condição geral de saúde, cuidados com a saúde bucal e histórico de doença periodontal .

Em seguida foi realizada a coleta de saliva para dosagem de IL 1- β , TNF- α , MMP2 e ON. A coleta foi realizada com os indivíduos assentados e com a cabeça levemente inclinada (cerca de 45°). Imediatamente antes do procedimento de coleta, os indivíduos bochecharam com água e foi coletada saliva total não estimulada em tubos Falcon estéreis durante 5 minutos. A amostra de salivar foi congelada no freezer - 80°C para posterior processamento e análise.

Após a coleta salivar, foram realizados os os exames periodontais. Eles foram realizados por uma única especialista em periodontia (M.M.F.) devidamente treinada com concordância intra-examinadora e respectivos valores Kappa não ponderado para PS de 0,90 e 0,88 para NCI. Foi realizado com a sondagem circunferencial manual na boca toda (exceto terceiros molares), em 4 sítios por dente utilizando sonda periodontal milimetrada modelo UNC-15 Carolina do Norte (Hu-Friedy, USA). Os seguintes parâmetros clínicos periodontais foram registrados: sangramento à sondagem (SS), profundidade de sondagem (PS) e nível clínico de inserção (NCI). O critério utilizado para o diagnóstico de periodontite foi definido como a presença de quatro ou mais dentes com no mínimo um sítio com PS \geq 4 mm e NCI \geq 3 mm associada a sangramento à sondagem no mesmo sítio (Gomes-Filho *et al.* 2007). A extensão da periodontite foi definida como localizada na presença de < 30% dos sítios afetados e generalizada na presença \geq 30% dos sítios afetados. Quanto à gravidade da periodontite a presença de pelo menos um sítio com PS de 4 a 6 mm foi estabelecido como ponto de corte para a periodontite moderada e PS \geq 7mm para a forma de periodontite avançada (AAP, 2000).

Exame da função endotelial vascular por meio da dilatação mediada por fluxo (DMF) da artéria braquial

Os indivíduos foram agendados no Hospital das Clínicas da UFMG, onde foi feito o exame da DMF. O exame foi realizado por meio do ultrasson de Doppler (Ecodoppler- Aplio 400, Toshiba Medical Systems Corporation- Otawara-shi, Japão), executado por um único médico, experiente e treinado (T.P.N.), que não tinha

nenhuma informação sobre qual grupo o indivíduo estava inserido. Os exames seguiram a técnica da DMF descrita anteriormente por Celermajer et al. (1992) e as diretrizes para sua avaliação proposta por (Corretti et al.,2002).

As medidas vasculares foram realizadas à temperatura controlada de 19-24 °C, sempre no mesmo horário, depois de 8 horas de jejum a partir da digitalização do diâmetro da artéria braquial, 2 a 15 centímetros acima da fossa antecubital no plano longitudinal. Um manguito foi colocado no antebraço e inflado para 230-250 mmHg durante 5 minutos e, em seguida, libertado. Após a desinsuflação do manguito há hiperemia reativa, com estímulo à produção de ON pelo endotélio. Assim a DE dependente do endotélio foi mensurada (%DMF após hiperemia reativa). Depois de 10 minutos em repouso, um spray de 400 mg de Nitroglicerina (NTG) foi aplicado na região sublingual, para demonstrar se o processo de vasodilatação independente do endotélio encontra-se íntegro, obtendo o valor final de DE independente do endotélio (%DMF após nitrato sublingual). Por fim, as imagens gravadas foram analisadas pelo examinador e reportados os resultados de DMF após hiperemia ativa e DMF após nitrato sublingual.

Dosagem dos mediadores da inflamação sistêmica IL-1B, TNF- α , MMP2/TIMP2, ON e proteína total.

A partir das amostras salivares, foi realizada a dosagem de IL-1 β , TNF- α , MMP2/TIMP2, ON e proteína total. Estes experimentos foram realizados no Laboratório de Patologia Bucal (Departamento de Clínica, Patologia e Cirurgia Odontológica – Faculdade de Odontologia/UFMG) coordenado por uma única dentista treinada e experiente (S.T.A.).

As amostras salivares foram descongeladas e centrifugadas a 3000 rpm por 15 minutos, logo após a centrifugação a saliva foi diluída na proporção 1:1 em uma solução de PBS (0,4 mM de NaCl e 10 mM de NaPO₄) contendo inibidores de proteases (0,1 mM de Fluoreto de Fenil metil sulfonil, 0,1 mM de cloreto de benzetônio, 10 mM de EDTA e 0,01 mg/ml de aprotinina A) e 0,05% de Tween-20, sendo, então, homogeneizadas.

As concentrações das IL- 1, TNF- α , MMP2/TIMP2 foram determinadas pela técnica ELISAsanduiche, utilizando o Kit DuoSet (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) de acordo com as especificações do fabricante. As concentrações de IL-1, TNF- α , MMP2 tiveram suas concentrações expressas em pg/ml.

As concentrações de proteína total também foram dosadas pela técnica ELISA e foram expressas em mg/ml, sendo utilizados para corrigir os valores de cada mediador, para cada amostra. Os valores corrigidos forma expressos em pg/mg de proteína.

Os níveis de ON foram medidos por um ensaio colorimétrico baseado na reação de Griess(Green *et al.*, 1982). Neste método, uma alíquota de 50 μ L foi misturada com 50 μ L do reagent de Griess [volume de 1% (w/v) com sulfanilamida em 5% de ácido ortofosfórico e um volume de 0.1% (w/v) de N-(1-naftil) dicloridrato etilenodiamina]. A mistura foi mantida à temperatura ambiente durante 15 minutos. A absorbância foi medida a 540 nm usando o leitor de microplacas (Perlong médica, DNM-9602, Nanjing, China). A curva padrão foi gerada com nitrito de sódio em concentrações μ mol/L

Análise estatística

As análises foram realizadas utilizando-se o teste qui-quadrado, teste exato de Fisher, Mann-Whitney ou Correlação de Spearman, de acordo com suas indicações. O gráfico do *BOXPLOT* foi utilizado como uma medida para avaliar a variabilidade de % DMF e dos marcadores da inflamação sistêmica (IL-1 β , MMP2, TNF e ON) considerando o diagnóstico de periodontite.

As análises foram realizadas usando o software estatístico SPSS (SPSS In., Version 14.0 for Windows, Chicago, IL, USA). Todos os resultados foram considerados significativos para uma probabilidade de significância inferior a 5% ($p < 0,05$), tendo, portanto, pelo menos 95% de confiança nas conclusões apresentadas.

Resultados

A Tabela 1 apresenta a caracterização da amostra de acordo com variáveis demográficas e comportamentais de interesse. Não houve diferenças

estatisticamente significativas entre os dois grupos em relação ao gênero e frequência de escovação. Indivíduos do grupo periodontite, apresentaram significativamente menor renda familiar, escolaridade, frequência do uso de fio dental e maior tempo da última visita ao dentista que os indivíduos do grupo sem periodontite (Tabela 1).

Em relação aos parâmetros periodontais avaliados, como esperado, o grupo com periodontite apresentou todos os parâmetros clínicos significativamente piores do que o grupo sem periodontite. Ou seja, um menor número de dentes, um maior percentual de superfícies com PS de 4-6 mm e ≥ 7 mm, um maior percentual de superfícies com NCI de 4-6 mm e ≥ 7 mm e um maior percentual de superfícies com SS (Tabela 2).

Descritivamente, o grupo periodontite apresentou 25% de periodontite crônica na forma moderada e 75% na forma avançada. Quanto a extensão 45,8% apresentaram periodontite localizada e 54,2% periodontite generalizada.

Na análise da função endotelial relacionada com o diagnóstico da periodontite, os indivíduos com periodontite apresentaram resultados significativamente piores quando comparados com indivíduos sem periodontite (% de DMF 8,8 vs 6,3; $p= 0,034$ após hiperemia reativa e % de DMF 11,8 vs 9,5; $p= 0,049$ após nitrato sublingual), assim indivíduos com periodontite apresentaram significativamente maior DE quando comparados com indivíduos sem periodontite. Na avaliação da DE considerando a gravidade e a extensão da periodontite, não houve diferenças significativas na % de DMF entre os indivíduos que apresentaram periodontite moderada/avançada e localizada/generalizada (Tabela 3). A presença de periodontite foi associada significativamente a maiores níveis de MMP2 (0,008). Não houve diferença significativa entre presença, gravidade e extensão de periodontite com IL-1 β , TNF e ON (Tabela 3).

Adicionalmente, observou-se uma correlação positiva entre os todos os parâmetros clínicos periodontais indicadores de alteração periodontal e MMP2. Ou seja, o aumento dos valores de PS, NCI e SS vêm acompanhados de um aumento de MMP-2. Para os demais marcadores (IL-1 β , TNF e ON) os grupos com e sem periodontite apresentaram resultados similares. Foi identificada também uma

correlação positiva significativa entre o ON e a DE, ou seja, o aumento do ON vem acompanhado de uma melhor função do endotélio vascular após a hiperemia reativa ($p=0,027$) e após o nitrato sublingual (0.016) (Tabela 4).

Gráficos Boxplot ilustram as medidas da % de DMF e dos marcadores da inflamação sistêmicas estudados em relação a presença de periodontite (Figura 1).

Discussão

Na literatura atual, há poucos estudos investigando uma associação entre a periodontite e a DE, sendo que 6 estudos reportaram uma associação positiva (Mercanoglu *et al.*, 2004; Amar *et al.*, 2003; Seinost *et al.*, 2005; Elter *et al.*, 2006; Blum *et al.*, 2007 e Tonetti *et al.*, 2007). Apenas um deles reportou ausência de associação (Holtfreter *et al.*, 2013). Nosso estudo demonstrou que a presença de periodontite está associada a uma maior DE, entretanto diversas heterogeneidades nas questões metodológicas entre os estudos devem ser discutidas. Inicialmente, apenas dois estudos são observacionais (Amar *et al.*, 2003 e Holtfreter *et al.*, 2013) e os demais, são estudos de intervenção.

Entre as técnicas não invasivas para o diagnóstico da DE, a DMF da artéria braquial é considerada padrão de ouro de diagnóstico na epidemiologia vascular (Joannides *et al.*, 1995), além de ser relacionada com um bom valor prognóstico para eventos cardiovasculares (Ras *et al.*, 2013).

Este estudo adotou rigorosos critérios de exclusão, uma vez que a DE é extremamente afetada por diferentes fatores e condições sistêmicas como colesterol alto, hipertensão arterial sistêmica (HAS), tabagismo e hiperglicemia (Di Corleto, Gimbrone, 1996). Além disto, diversos tipos de medicações, principalmente os anti-hipertensivos e anti-inflamatórios podem afetar a disfunção endotelial (Tousoulis *et al.*, 2014). Assim, adotando corretamente estes fatores de exclusão, em nosso estudo 215 indivíduos foram inelegíveis, o que demonstra a dificuldade de obter grandes amostras em estudos com esta característica metodológica, fato também presente em estudos prévios (Mercanoglu *et al.*, 2004; Amar *et al.*, 2003; Seinost *et al.*, 2005; Elter *et al.*, 2006; Blum *et al.*, 2007 e Tonetti *et al.*, 2007). Outra questão a considerar é o equipamento de alto custo necessário para a realização do exame,

com a necessidade de um operador extensamente treinado para a padronização e execução da técnica (Leeson *et al.*, 1997; Tousoulis *et al.*, 2014).

Ressalta-se que somente o estudo de Holtfreter *et al.*, (2013) reportou ausência de associação entre periodontite e DE. As discrepâncias entre este e os demais estudos podem ser explicada por alguns fatores, entre eles o uso de diversos critérios para definir periodontite, sendo que a avaliação inicial ocorreu em três sítios por dente, avaliados em meia boca, uso de valores médios de PS o que pode ter subestimado a presença e gravidade da periodontite. Outra questão foi a seleção inadequada da amostra, pois os participantes eram comprometidos por diversas comorbidades como diabetes mellitus, doença cardiovascular e doença renal crônica. É sabido que a função endotelial é reduzida na presença destes fatores de risco para as doenças cardiovasculares (Hamburg *et al.*, 2008).

Em relação à extensão e a gravidade da periodontite, o presente estudo não encontrou diferenças significativas para a ocorrência de DE, ao contrário dos achados de Amar *et al.* (2003), em que os indivíduos com periodontite avançada apresentam maior DE.

Os estudos de intervenção realizados em indivíduos sistemicamente saudáveis demonstraram que as funções endoteliais foram prejudicadas em indivíduos com periodontite crônica e que melhoram após a terapia periodontal (Elter *et al.*, 2006; Seinost *et al.*, 2005; Mercanoglu *et al.*, 2004; Tonetti *et al.*, 2007, Blum *et al.*, 2007). Porém estes valores da DE nos estudos de Mercanoglu *et al.* (2004), Seinost *et al.* (2005), Elter *et al.* (2006), e Tonetti *et al.* (2007), podem ter apresentado super-estimativas nos resultados da DE pela presença do tabagismo, tendo em vista esse fator de confundimento ser um dos principais fatores de risco para as doenças cardiovasculares e também para a periodontite, além de interferir fortemente na função do endotélio vascular (Salvador *et al.* 2016). Somente os estudos de Amar *et al.* (2003) e Blum *et al.* (2007), em concordância com o presente estudo, excluíram os indivíduos fumantes e ex-fumantes.

Outra consideração metodológica é a falta de uma padronização no critério de definição de periodontite utilizados nos estudos. O presente estudo utilizou o critério de Gomes *et al.* (2007) considerado rigoroso para evitar subestimativas de periodontite. Os estudos de Amar *et al.* (2003) e Seinost *et al.* (2005) utilizaram um

critério semelhante, pelo menos 6 dentes com PS > 5 mm e NIC \geq 3 mm em 3 sítios de cada dente envolvido. Todos os outros estudos [Blum *et al.* (2007); Elter *et al.* (2006), Tonetti *et al.* (2007) Mercanoglu *et al.* (2004)] utilizaram critérios e parâmetros divergentes. O fato é que aparentemente os diferentes tipos de critérios de definição de periodontite podem impactar fortemente os resultados dos estudos de associação da periodontite com doenças sistêmicas (Costa *et al.*, 2009).

Uma das principais teorias da plausibilidade biológica entre a DE e periodontite, é a teoria inflamatória ao propor o envolvimento dos produtos inflamatórios (IL, TNF- α , proteína C-reativa [PCR], metaloproteinases [MMPs] e prostaglandinas) expressos pelas células periodontais que são liberadas na circulação sistêmica estimulando as células endoteliais a produzir outros mediadores inflamatórios induzindo então a DE (Gurav, 2014). Além disto, estes mediadores inflamatórios desencadeiam a destruição dos tecidos periodontais de proteção e sustentação (Ren *et al.*, 2009). Assim, de forma comum estes marcadores presentes em altas concentrações nos indivíduos com periodontite também estão envolvidos no processo aterosclerótico, além disso a DE promove uma inflamação da parede vascular e isto faz com que ela expresse moléculas de adesão e citocinas (Huang, Vita, 2006).

Dentre os mediadores da inflamação sistêmica avaliados neste estudo, está o TNF- α , um marcador da inflamação precoce, que desempenha um papel-chave na iniciação da resposta inflamatória (Bazzoni, Beutler, 1996) e induz destruição tecidual e reabsorção óssea (Shapira *et al.*, 2005). O TNF- α influencia a DE e está associado aos fatores de risco cardiovasculares (Memon *et al.*, 1997, Skoog *et al.*, 2002). Este mediador está presente no estágio inicial da aterosclerose onde ocorre a formação da placa de ateroma e é um potente marcador para apoptose celular e reabsorção óssea (Iacopin, Cutler, 2000). No nosso conhecimento, este é o primeiro estudo a correlacionar valores de TNF- α à DE por meio da DMF da artéria braquial em indivíduos com e sem periodontite. Os resultados não mostraram diferenças significativas da correlação entre TNF- α , com periodontite e DE. Estes achados podem ser parcialmente explicados por uma recente meta-análise, que demonstrou resultados controversos na associação entre a periodontite e o TNF- α em diferentes etnias e nos resultados apresentados, quando ocorreu o controle de fatores de confusão como idade e o tabagismo (Ding *et al.*, 2014).

Até o presente momento, somente dois estudos investigaram associação entre a periodontite e níveis de TNF- α no diagnóstico precoce da aterosclerose. Joshipura *et al.* (2004), avaliaram biomarcadores da função endotelial em indivíduos com e sem periodontite e não encontrou diferenças significativas nos valores de TNF- α entre os dois grupos, em concordância com o presente estudo. D'Aiuto *et al.* (2007) mostraram um aumento significativo na liberação de TNF- α 24 h após a terapia periodontal, que retornou aos níveis normais depois de 1 semana e 1 mês.

Outro mediador avaliado neste estudo foi IL-1 β , que é produzida e liberada principalmente por macrófagos e fibroblastos quando ativados (Dinarello, 2002). Grande parte dos danos que ocorre durante destruição do tecido periodontal pode ser atribuído à atividade de IL-1, representado por uma reação exagerada do hospedeiro causada pela produção excessiva de IL-1 (Graves, Cochran, 2003). A DE resulta da expressão de citocinas pro-inflamatórias (entre elas a IL-1, IL-6 e TNF- α) e outros de fatores que são designados para interagir com as plaquetas e leucócitos, juntamente com a inflamação e com fatores pró-trombóticos (Salvador *et al.*, 2016). Uma correlação positiva significativa entre a IL-1 β e a periodontite foi encontrada em uma atual meta-análise (Yin *et al.*, 2016).

No entanto, no presente estudo, apesar dos valores de IL-1 β terem sido maiores nos indivíduos com periodontite, não se observou diferenças estatisticamente significativas entre os indivíduos com e sem periodontite e, também sem correlação com extensão e gravidade de periodontite. Outros estudos também não conseguiram confirmar tal associação (Kornman *et al.*, 1997, Moreira *et al.*, 2005), por isto, a relevância da IL-1 β na patogênese da periodontite ainda permanece controverso (Shapira *et al.*, 2005). Este é o primeiro estudo que avalia a correlação entre os valores de IL-1 β , a periodontite e a DE por meio da DMF da artéria braquial.

Outro marcador inflamatório avaliado foi as MMPs, que contribuem para a degradação do colágeno durante os períodos de atividade da periodontite e da perda de inserção (Graves, Cochran, 2003). A ativação de citocinas pró-inflamatórias e de outros mediadores resulta em uma matriz alterada que, por sua vez, pode afetar a função de células e remodelação de tecidos subsequente (Graves, Cochran, 2003). As MMPs nas placas de ateroma degradam o colágeno da

matriz extracelular da capa fibrosa, o que sugere que as MMPs estão relacionadas com instabilidade e ruptura das placas ateroscleróticas (Naghavi *et al.*, 2003a, b). A MMP-2 foi avaliada somente em 2 estudos que buscaram sua verificar sua associação com a periodontite crônica, sendo que estes estudos não encontraram associação entre a MMP2 e a susceptibilidade e a gravidade da periodontite (Holla *et al.* 2005, Gurkan *et al.* 2008). Estes resultados estão em contraste com os achados deste presente estudo que encontrou uma correlação positiva significativa entre o marcador MMP2 para ocorrência e todos os parâmetros clínicos periodontais indicativos da periodontite crônica. Ou seja, o aumento dos valores de PS, NCI e SS vêm acompanhados de um aumento dos valores de MMP2. Devido à ausência de estudos na literatura a discussão do papel conjunto entre MMP2, DE e periodontite foram limitadas.

O mecanismo pelo qual a DE pode promover a aterosclerose parece estar relacionado à menor biodisponibilidade do ON. Esta redução nas concentrações intravasculares de ON pode ser um dos elos biológicos entre o dano endotelial e a aterosclerose e está relacionada a uma alteração na via da L-arginina-óxido nítrico. Apresentando efeito anti-proliferativo, anti-inflamatório e anti-trombótico, portanto anti-aterosclerótico (Ghiadoni *et al.*, 1998). Machado *et al.* (2014) observaram que os ratos com periodontite apresentavam uma redução da vasodilatação endotélio-dependente devido à biodisponibilidade diminuída de ON ou outros mediadores de relaxamento derivado do endotélio. Porém em uma meta-análise onde foram incluídos 4 estudos da associação entre a periodontite e o ON, todos eles determinaram maiores níveis de ON no grupo com periodontite do que no grupo saúde periodontal, e a meta-análise mostrou os mesmos resultados (Liu *et al.*, 2014). Neste presente estudo foi identificada uma correlação positiva significativa entre o ON e a DE, ou seja, o aumento do ON vem acompanhado de uma melhor função do endotélio vascular após a hiperemia reativa e após o nitrato sublingual. Entretanto, em contraste com os demais estudos, os indivíduos com periodontite e sem periodontite não apresentaram diferenças nos níveis de ON entre os dois grupos.

Sumarizando, nossos resultados mostraram que a periodontite foi associada a uma maior DE em indivíduos sistemicamente saudáveis, após controle de fatores que influenciam na função endotelial como condições sistêmicas, uso de

medicamentos e tabagismo. Esta associação poderia estar relacionada à altas concentrações de ON na circulação sistêmica que tem papel fundamental para uma melhor função do endotélio vascular e das altas concentrações de MMP2 presentes nos indivíduos com periodontite. Os níveis de IL-1 e TNF- α neste estudo não apresentaram associação com periodontite, e não impactaram em uma maior DE. Assim, estudos adicionais devem ser conduzidos principalmente os de delineamento prospectivo para melhor força de evidência das associações entre periodontite, marcadores inflamatórios e DE.

Conclusões

Indivíduos com periodontite apresentaram maior DE, expressa por menor % de DMF da artéria braquial e maiores níveis de MMP2/TIMP2 que indivíduos sem periodontite. O ON foi significativamente associado com uma menor DE.

Referências bibliográficas

1. Amar S, Gokce N, Morgan S, et al. Periodontal disease is associated with brachial artery endothelial dysfunction and systemic inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23:1245-1249.
2. Atkinson G, Batterham AM. The percentage flow-mediated dilation index: a large-sample investigation of its appropriateness, potential for bias and causal nexus in vascular medicine. *Vasc Med* 2013; 18: 354-65.
3. Bazzoni F, Beutler B. The tumor necrosis factor ligand and receptor families. *N Engl J Med* 1996; 334:1717-1725.
4. Blum A, Kryuger K, Eizenberg MM, et al. Periodontal care may improve endothelial function. *Eur J Intern Med* 2007; 18: 295-298.
5. Celermajer DS, Sorensen KE, Gooch VM, et al. Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. *Lancet* 1992; 340: 1111-1115.

6. Corretti MC, Anderson TJ, Benjamin EJ et al. Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery. *J Am Coll Cardiol* 2002; 39:257-65.
7. Costa FO, Guimarães AN, Cota LOM, et al. Impact of different periodontitis case definitions on periodontal research. *J Oral Sci* 2009; 51: 199-206.
8. D'Aiuto F, Parkar M, Tonetti MS. Acute effects of periodontal therapy on biomarkers of vascular health. *J Clin Periodontol* 2007; 34: 124-129.
9. Di Corleto PE, Gimbrone MA Jr . Vascular Endothelium, In Fuster V, Ross R, Topol EJ. ed. *Atherosclerosis and Coronary Artery Disease*. Lippincott-Raven, Philadelphia, New York; 1996: 387-399.
10. Ding C, Ji X, Chen X, et al. TNF- α gene promoter polymorphisms contribute to periodontitis susceptibility: evidence from 46 studies. *J Clin Periodontol* 2014; 41: 748-759.
11. Dinarello CA. The IL-1 family and inflammatory diseases. *Clin Exp Rheumatol* 2002; 20: 1-13.
12. Elter JR, Hinderliter AL, Offenbacher S, Et al. The effects of periodontal therapy on vascular endothelial function. A pilot trial. *Am Heart J* 2006; 151: 47.
13. Ghiadoni L, Taddei S, Virdis A et al. Endothelial function and common carotid artery wall thickening in patients with essential hypertension. *Hypertension* 1998; 32: 25-32.
14. Gomes-Filho IS, [Cruz SS](#), [Rezende EJ](#), et al. Exposure measurement in the association between periodontal disease and prematurity/low birth weight. *J Clin Periodontol* 2007;34:957-963.
15. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, et al. Analysis of nitrate, nitrite, and nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 1982; 126: 131-138.
16. Graves DT, Cochran D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. *J Periodontol* 2003; 74: 391-401.

17. Gurav AN. The implication of periodontitis in vascular endothelial dysfunction. *Eur J Clin Invest* 2014; 44: 1000-1009.
18. Gurkan A, Emingil G, Saygan BH, et al. Gene polymorphisms of matrix metalloproteinase-2,-9 and-12 in periodontal health and severe chronic periodontitis. *Arch Oral Biol* 2008; 53: 337-345.
19. Hamburg NM, Keyes MJ, Larson MG, et al. Cross-sectional relations of digital vascular function to cardiovascular risk factors in the Framingham Heart Study. *Circulation* 2008; 117: 2467-2474.
20. Holtfreter B, Empen K, Gläser S, et al. Periodontitis Is Associated with Endothelial Dysfunction in a General Population: A Cross-Sectional Study. *PLoS ONE* 2013; 8: e84603.
21. Huang AL, Vita JA. Effects of systemic inflammation on endothelium dependent vasodilation. *Trends Cardiovasc Med* 2006; 16: 15-20.
22. Iacopino AM, Cutler CW. Pathophysiological relationships between periodontitis and systemic disease: recent concepts involving serum lipids. *J Periodont* 2000; 71: 1375-1380.
23. Joannides R, Haefeli WE, Linder L, et al. Nitric oxide is responsible for flow-dependent dilatation of human peripheral conduit arteries in vivo. *Circulation* 2005; 91: 1314-1319.
24. Joshipura KJ, Wand HC, Merchant AT, et al. Periodontal disease and biomarkers related to cardiovascular disease. *J Dent Res* 2004; 83: 151-5.
25. Kornman KS, Crane A, Wang HY, et al. The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease. *J. Clin. Periodontol* 1997; 24: 72-77.
26. Lafon A, Pereira B, Dufour T, et al. Periodontal disease and stroke: a meta-analysis of cohort studies. *Eur J Neurol* 2014; 21: 1155-61.
27. Leng WD, Zeng XT, Kwong JSW, et al. . Periodontal disease and risk of coronary heart disease: An updated meta-analysis of prospective cohort studies. *Int J Cardiol* 2015; 201: 469-72.

28. Leeson P, Thorne S, Donald A, et al. Non-invasive measurement of endothelial function: effect on brachial artery dilatation of graded endothelial dependent and independent stimuli. *Heart* 1997; 78: 22.
29. Liu Z, Liu Y, Song Y, et al. Systemic oxidative stress biomarkers in chronic periodontitis: a meta-analysis. *Dis Markers* 2014; 2014: 931083.
30. Lockhart PB, Bolger AF, Papapanou PN, et al. Periodontal disease and atherosclerotic vascular disease: does the evidence support an independent association? A scientific statement from the American Heart Association. *Circulation* 2012; 125: 2520-2544.
31. Holla LI, Fassmann A, Vasku et al. Genetic variations in the human gelatinase A (matrix metalloproteinase-2) promoter are not associated with susceptibility to, and severity of, chronic periodontitis. *J Periodontol* 2005; 76: 1056-1060.
32. Mercanoglu F, Oflaz H, Öz O, et al. Endothelial Dysfunction in Patients With Chronic Periodontitis and Its Improvement After Initial Periodontal Therapy. *J Periodontol* 2004; 75: 1694-1700.
33. Machado WM, Prestes AP, Costa TP, et al. The effect of simvastatin on systemic inflammation and endothelial dysfunction induced by periodontitis. *J Periodontal Res* 2014; 49: 634-641.
34. Memon RA, Feingold KR, Grunfeld C. Cytokines and intermediary metabolism. In: Remick DG, Friedland JS editors. *Cytokines in health and disease*. 2nd ed. New York: Marcel Dekker. 1997; 381-399.
35. Moreira PR, de Sá AR, Xavier GM, et al. A functional interleukin-1 beta gene polymorphism is associated with chronic periodontitis in a sample of Brazilian individuals. *J Periodontal Res* 2005; 40: 306-311.
36. Mustapha Iz, Debrey S, Oladubu M, et al. Markers of systemic bacterial exposure in periodontal disease and cardiovascular disease risk: A systematic review and meta-analysis. *J Periodontol* 2007; 78: 2289-2302.

37. Naghavi M, Libby P, Falk E, et al. From vulnerable plaque to vulnerable patient: a call for new definitions and risk assessment strategies: part II. *Circulation* 2003b; 108: 1772-1778.
38. Page RC, Kornman KS. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontol 2000* 1997; 14: 9-11.
39. Ren L, Jiang ZQ, Fu Y, et al. The interplay of lipopolysaccharide-binding protein and cytokines in periodontal health and disease. *J Clin Periodontol* 2009; 36: 619-26.
40. Reriani MK, Lerman LO, Lerman A. Endothelial function as a functional expression of cardiovascular risk factors. *Biomark Med* 2010; 4: 351-360.
41. Ras RT, Streppel MT, Draijer R, et al. Flow-mediated dilation and cardiovascular risk prediction: a systematic review with meta-analysis. *Int J Cardiol* 2013; 168: 344-351.
42. Salvador B, Arranz A, Francisco S, et al. Modulation of endothelial function by Toll like receptors. *Pharmacol Res* 2016; 108: 46-56.
43. Seinost G, Wimmer G, Skerget M, et al. Periodontal treatment improves endothelial dysfunction in patients with severe periodontitis. *Am Heart J* 2005; 149: 1050-105.
44. Shapira L, Wilensky A, Kinane DF. Effect of genetic variability on the inflammatory response to periodontal infection. *J Clin Periodontol* 2005; 32: 72-86.
45. Skoog T, Dichtl W, Boquist S, et al. Plasma tumour necrosis factor-alpha and early carotid atherosclerosis in healthy middle-aged men. *Eur Heart J* 2002; 23: 376-383.
46. Schenkein HA, Loos BG. Inflammatory mechanisms linking periodontal diseases to cardiovascular diseases. *J Clin Periodontol* 2013; 40: 51-69.
47. Tonetti MS, D'Aiuto F, Nibali L, Donald A, Storry C, Parkar M, et al. Treatment of periodontitis and endothelial function. *N Engl J Med* 2007; 356: 911-920.

48. Tonetti MS, Van Dyke TE and on behalf of working group 1 of the joint EFP/AAP workshop. Periodontitis and atherosclerotic cardiovascular disease: consensus report of the Joint EFP/AAP Workshop on Periodontitis and Systemic Diseases. *J Clin Periodontol* 2013; 40: 24-29.
49. Tousoulis D, Simopoulou C, Papageorgiou N, et al. Endothelial dysfunction in conduit arteries and in microcirculation. Novel therapeutic approaches. *Pharmacol Ther* 2014; 144: 253-267.
50. Yin WT, Pan YP, Lin L. Association between IL-1 α rs17561 and IL-1 β rs1143634 polymorphisms and periodontitis: a meta-analysis. *Genet Mol Res* 2016; 15: 15017325.

Tabela 01. Caracterização da amostra de acordo com variáveis demográficas e comportamentais de interesse.

Variáveis	Periodontite		P
	Presente (n=24)	Ausente (n=23)	
Gênero			
Feminino	13 (54,2%)	15 (65,2%)	0,440**
Masculino	11 (45,8%)	8 (36,4%)	
Idade	46,1 ± 8,7	32,0 ± 7,1	< 0,001*
Tempo de Escolaridade			
≤8 anos	7 (29,2%)	0 (0,0%)	< 0,001***
9 -11 anos	14 (58,3%)	4 (17,4%)	
12 – 16 anos	3 (12,5%)	3 (13,0%)	
> 16 anos	0 (0,0%)	16 (69,6%)	
Renda familiar			
1 a 3 SMB	18 (75,0%)	5 (21,7%)	< 0,001***
3 a 5 SMB	5 (20,8%)	2 (8,7%)	
Mais de 5 SMB	1 (4,2%)	16 (69,6%)	
Frequência do uso do fio dental			
Nunca	6 (25,0%)	1 (4,4%)	0,017***
Para retirar alimentos	9 (37,5%)	3 (13,0%)	
2 a 3 vezes por semana	2 (8,3%)	4 (17,4%)	
Diariamente	7 (29,2%)	15 (65,2%)	
Frequência da escovação			
1 vez ao dia	2 (8,3%)	0 (0,0%)	0,114***
2 vezes ao dia	7 (29,2%)	3 (13,0%)	
3 vezes ao dia ou mais	15 (62,5%)	20 (87,0%)	
Tempo da última visita ao dentista			
Até 6 meses	2 (8,3%)	9 (39,1%)	0,014***
1 ano	13 (54,2%)	9 (39,1%)	
De 2 a 3 anos	4 (16,7%)	5 (21,8%)	
Mais de 3 anos	5 (20,8%)	0 (0,0%)	

Teste t de Student (*), Teste Qui-quadrado (**) ou Teste exato de Fisher (***); SMB= Salário Mínimo Brasileiro (R\$ 880,00)

Tabela 02. Condição periodontal da amostra estudada

Variáveis	Periodontite		P
	Presente (n=24)	Ausente (n=23)	
Nº de dentes presentes	23,8 ± 4,3	27,4 ± 1,2	< 0,001
% de superfícies com PS ≤ 3 mm	66,6 ± 16,6	99,5 ± 1,9	< 0,001
% de superfícies com PS de 4 a 6 mm	27,2 ± 13,5	0,4 ± 1,7	< 0,001
% de superfícies com PS ≥ 7 mm	6,0 ± 7,2	0,1 ± 0,3	< 0,001
% de superfícies com NCI ≤ 3 mm	63,1 ± 25,4	99,7 ± 1,3	< 0,001
% de superfícies com NCI de 4 a 6 mm	28,9 ± 19,6	0,3 ± 1,3	< 0,001
% de superfícies com NCI ≥ 7 mm	7,8 ± 8,6	0,0 ± 0,0	< 0,001
% de superfícies com sangramento	65,3 ± 21,8	8,3 ± 5,5	< 0,001

Teste Mann-Whitney

Tabela 03:

Associação entre marcadores da inflamação sistêmica (IL-1 β , MMP2, TNF e óxido nítrico) e % DMF com o diagnóstico, gravidade e extensão da periodontite

Grupo de avaliação	Marcadores de inflamação sistêmica				Disfunção endotelial	
	IL-1 β pg/ml / proteína	MMP2 pg/ml / proteína	TNF pg/ml / proteína	Óxido nítrico	% DMF hipere mia reativa	% DMF nitrato sublingual
Periodontite						
Ausente (n=23)	46,1 \pm 30,2	49,4 \pm 56,1	13,3 \pm 48,1	294,2 \pm 116,7	8,8 \pm 4,3	11,8 \pm 4,5
Presente (n=24)	57,4 \pm 47,3	221,4 \pm 347,8	16,5 \pm 74,5	275,5 \pm 90,1	6,3 \pm 4,8	9,5 \pm 3,7
P	0,551	0,008	0,232	0,782	0,034	0,049
Gravidade						
Moderada (n=6)	38,1 \pm 14,9	47,8 \pm 28,4	1,1 \pm 2,7	297,2 \pm 39,2	4,7 \pm 3,2	9,1 \pm 3,6
Avançada (n=18)	63,8 \pm 52,8	279,3 \pm 386,3	21,7 \pm 86,0	268,3 \pm 101,5	6,9 \pm 5,2	9,6 \pm 3,8
p	0,182	0,072	0,878	0,162	0,473	0,919
Extensão						
Localizada (n=11)	54,3 \pm 63,7	279,2 \pm 442,7	34,4 \pm 110,0	266,1 \pm 92,3	5,3 \pm 4,1	10,0 \pm 4,2
Generalizada (n=13)	60,0 \pm 29,8	172,5 \pm 250,7	1,4 \pm 3,6	283,5 \pm 91,2	7,2 \pm 5,4	9,0 \pm 3,3
p	0,119	0,664	0,721	0,885	0,525	0,695

Teste Mann-Whitney

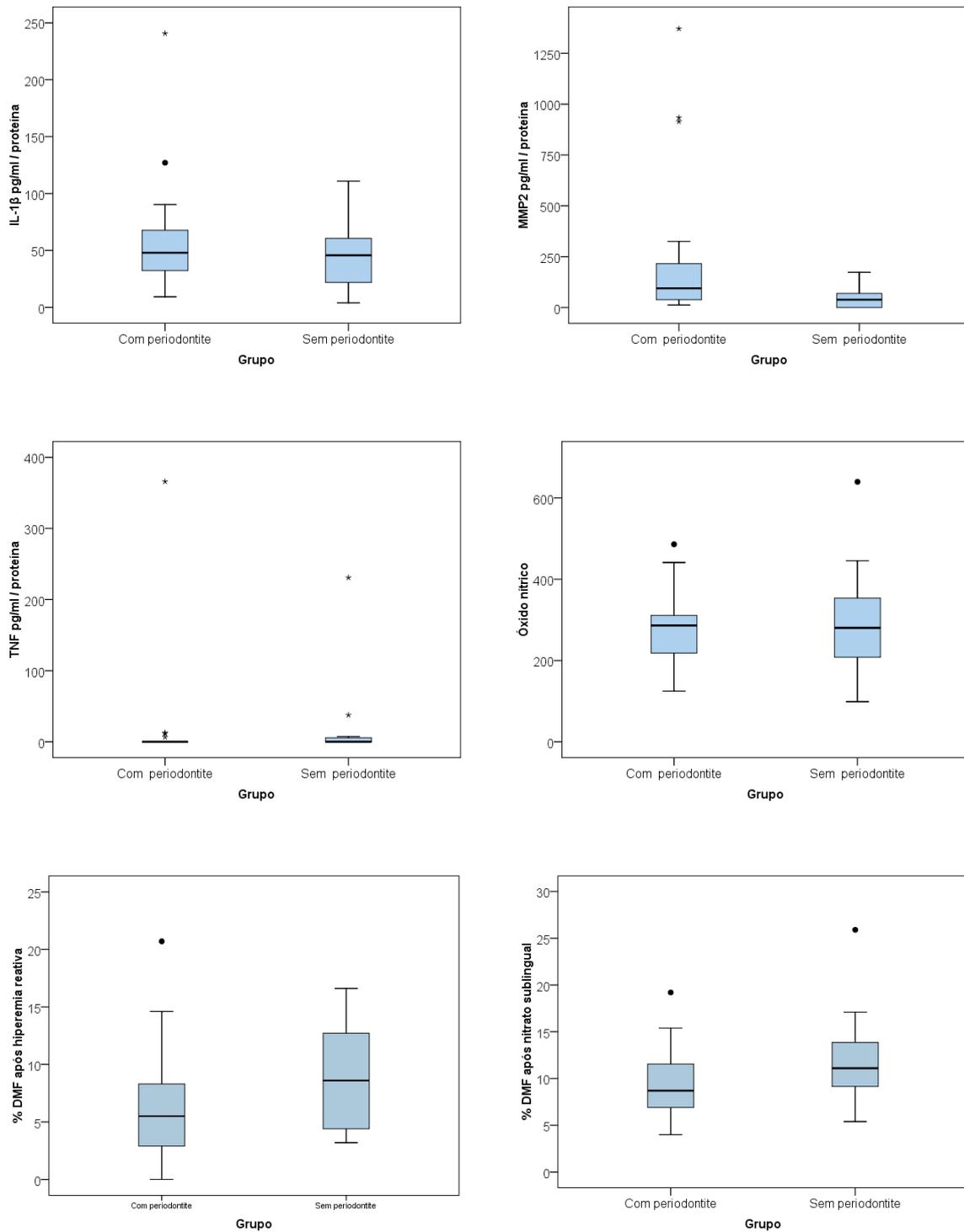
Tabela 04.

Correlação entre os parâmetros clínicos periodontais, os marcadores da inflamação sistêmica (IL-1 β , MMP2, TNF e óxido nítrico) e a disfunção endotelial

Parâmetros clínicos periodontais	Marcadores de inflamação sistêmica					
	IL-1 β pg/ml / proteína	MMP2 pg/ml / proteína	TNF pg/ml / proteína	Óxido nítrico	% DMF após hiperemia reativa	% DMF após nitrato sublingual
% de superfícies com PS \leq 3 mm	-0,10 (0,514)	-0,27 (0,064)	0,22 (0,132)	0,09 (0,538)	0,15 (0,308)	0,17 (0,260)
% de superfícies com PS de 4 a 6 mm	0,12 (0,439)	0,32 (0,029)	-0,19 (0,198)	-0,06 (0,677)	-0,16 (0,276)	-0,21 (0,156)
% de superfícies com PS \geq 7 mm	0,16 (0,294)	0,31 (0,035)	-0,22 (0,139)	-0,14 (0,331)	-0,05 (0,744)	-0,09 (0,542)
% de superfícies com NCI \leq 3 mm	-0,15 (0,317)	-0,36 (0,014)	0,12 (0,412)	0,03 (0,817)	0,18 (0,237)	0,15 (0,305)
% de superfícies com NCI de 4 a 6 mm	0,14 (0,331)	0,36 (0,014)	-0,12 (0,418)	-0,01 (0,937)	-0,16 (0,282)	-0,14 (0,350)
% de superfícies com NCI \geq 7 mm	0,24 (0,098)	0,37 (0,011)	-0,11 (0,477)	-0,14 (0,360)	-0,10 (0,497)	-0,09 (0,544)
% de superfícies com sangramento	0,09 (0,529)	0,32 (0,027)	-0,20 (0,173)	-0,05 (0,741)	-0,20 (0,167)	-0,19 (0,189)
% DMF após hiperemia reativa	0,16 (0,275)	0,14 (0,358)	0,11 (0,467)	0,32 (0,027)	-	-
% DMF após nitrato sublingual	0,23 (0,126)	0,01 (0,944)	0,18 (0,216)	0,35 (0,016)	-	-

Correlação de Spearman e probabilidade de significância \rightarrow r (p)

FIGURA 1: Boxplot das medidas de % DMF e dos marcadores da inflamação sistêmica (IL-1 β , MMP2, TNF e óxido nítrico considerando o diagnóstico de periodontite



Base de dados: com periodontite (24) e sem periodontite (23)

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo caso-controle da associação entre periodontite, marcadores inflamatórios e DE apresentou as seguintes considerações finais:

O grupo periodontite apresentou 25% de periodontite crônica na forma moderada e 75% na forma avançada. Quanto a extensão 45,8% apresentaram periodontite localizada e 54,2% periodontite generalizada.

Os indivíduos com periodontite apresentaram % DMF significativamente piores quando comparados com indivíduos sem periodontite, tanto após hiperemia reativa quanto após nitrato sublingual, assim indivíduos com periodontite apresentaram significativamente maior DE.

Na avaliação da DE considerando a gravidade e a extensão da periodontite, não houve diferenças significativas na % de DMF entre os indivíduos que apresentaram periodontite moderada/avançada e localizada/generalizada.

Em relação aos mediadores inflamatórios avaliados, houve uma associação significativa entre MMP2 com a presença de periodontite ($p=0,008$). Para os demais marcadores (IL-1 β , TNF e óxido nítrico) os grupos com e sem periodontite apresentaram resultados similares.

Observou-se uma correlação positiva entre MMP2 com todos parâmetros clínicos de alteração periodontal, isto é, o aumento dos valores de PS, NIC e SS vêm acompanhados de um aumento de MMP-2.

Reportou-se uma correlação positiva significativa entre o óxido nítrico e uma melhor função endotelial.

Neste sentido, nossos resultados mostraram que a periodontite foi associada a uma maior DE em indivíduos sistemicamente saudáveis, após controle de fatores que influenciam na função endotelial como condições sistêmicas, uso de medicamentos e tabagismo. Entretanto, estudos adicionais devem ser conduzidos principalmente os de delineamento prospectivo para melhor força de evidência das associações entre periodontite, marcadores inflamatórios e DE. Adicionalmente, estratégias de prevenção para doenças cardiovasculares também baseadas em uma

melhor saúde periodontal devem ser implementadas visando reduzir as morbidades e mortalidades associada às doenças cardiovasculares.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS

1. Amar S, Gokce N, Morgan S, Loukideli M, Van Dyke TE, Vita JA. Periodontal disease is associated with brachial artery endothelial dysfunction and systemic inflammation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2003; 23(7): 1245-1249.
2. Atkinson G, Batterham AM. The percentage flow-mediated dilation index: a large-sample investigation of its appropriateness, potential for bias and causal nexus in vascular medicine. *Vasc Med*. 2013; 18(6):354-65.
3. Bahekar AA, Singh S, Saha S, Molnar J, Arora R. The prevalence and incidence of coronary heart disease is significantly increased in periodontitis: a meta-analysis. *American Heart Journal*. 2007; 154(5): 830-837.
4. Bazzoni F, Beutler B (1996). The tumor necrosis factor ligand and receptor families. *N Engl J Med* 334:1717-1725.
5. Beck JD, Slade G, Offenbacher S. Oral disease, cardiovascular disease and systemic inflammation. *Periodontology 2000*. 2000; 23: 110-120.
6. Birkedal-Hansen H, Moore WG.I, Bodden MK, et al. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 1993;4:197–250.
7. Celermajer DS, Sorensen KE, Gooch VM, Spiegelhalter DJ, Miller OI, Sullivan ID, et al. Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. *Lancet*. 1992; 340:1111-1115.
8. Corretti MC, Anderson TJ, Benjamin EJ et al. Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery. *J Am Coll Cardiol*. 2002;39:257–65.
9. Costa FO, Guimarães AN, Cota LOM, Pataro AL, Segundo TK, Cortelli SC, Costa JE. Impact of different periodontitis case definitions on periodontal research. *Journal of Oral Science*. 2009; 51(2): 199-206.

10. D'Aiuto F, Orlandi M, Gunsolley JC. Evidence that periodontal treatment improves biomarkers and CVD outcomes. *J Clin Periodontol*. 2013; 40(14): 85-105.
11. Di Corleto PE, Gimbrone MA Jr. Vascular Endothelium, In Fuster V, Ross R, Topol EJ. ed. *Atherosclerosis and Coronary Artery Disease*. Lippincott-Raven, Philadelphia, New York; 1996: 387-399.
12. Ding C, Ji X, Chen X, Xu Y, Zhong L. TNF- α gene promoter polymorphisms contribute to periodontitis susceptibility: evidence from 46 studies. *J Clin Periodontol* 2014; 41: 748–759
13. Dinarello CA. The IL-1 family and inflammatory diseases. *Clin. Exp. Rheumatol*. 2002; 20 (27): 1-13.
14. Elter JR, Hinderliter AL, Offenbacher S, Beck JD, Caughey M, Brodala N, Madianos PN. The effects of periodontal therapy on vascular endothelial function. A pilot trial. *American Heart Journal*. 2006; 151(1).
15. Fearon DT, Locksley RM. The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science*. 1996; 272: 50-53.
16. Friedewald VE, Kornman KS, Beck JD, Genco R, Goldfine A, Libby P, et al..The American Journal of Cardiology and Journal of Periodontology Editors' Consensus: Periodontitis and Atherosclerotic Cardiovascular Disease. Published simultaneously in the Journal of Periodontology, the Official Journal of the American Academy of Periodontology. The American Journal of Cardiology. 2009; 104(1):59-68.
17. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288: 373-376.
18. Ghiadoni L, Taddei S, Virdis A et al. Endothelial function and common carotid artery wall thickening in patients with essential hypertension. *Hypertension*. 1998; 32: 25-32.

19. Gomes-Filho IS, [Cruz SS](#), [Rezende EJ](#), et al. Exposure measurement in the association between periodontal disease and prematurity/low birth weight. *J Clin Periodontol* 2007;34:957-963.
20. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and nitrate in biological fluids. *Anal Biochem.* 1982; 126: 131-138.
21. Graves DT & Cochran D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. *Journal of Periodontology.* 2003; 74: 391–401.
22. Griendling KK, FitzGerald GA. Oxidative stress and cardiovascular injury: Part I: Basic mechanisms and in vivo monitoring of ROS. *Circulation.* 2003; 108: 1912–1916.
23. Gurav AN. The implication of periodontitis in vascular endothelial dysfunction. *Eur J Clin Invest.* 2014; 44 (10): 1000–1009.
24. Gurkan A, Emingil G, Saygan BH et al., “Gene polymorphisms of matrixmetalloproteinase-2,-9 and-12 in periodontal health and severe chronic periodontitis,” *Archives of Oral Biology*,vol.53,no.4,pp.337–345,2008.
25. Hamburg NM, Keyes MJ, Larson MG, Vasan RS, Schnabel R et al. Cross-sectional relations of digital vascular function to cardiovascular risk factors in the Framingham Heart Study. *Circulation.* 2008; 117: 2467-2474.
26. Holtfreter B, Empen K, Gläser S, Lorbeer R, Völzke H, Ewert R, et al. Periodontitis Is Associated with Endothelial Dysfunction in a General Population: A Cross-Sectional Study. *PLoS ONE.* 2013; 8(12).
27. Huang AL, Vita JA. Effects of systemic inflammation on endothelium dependent vasodilation. *Trends Cardiovasc Med.* 2006; 16:15–20.
28. Iacopino AM, Cutler CW. Pathophysiological relationships between periodontitis and systemic disease: recent concepts involving serum lipids. *J Periodont.* 2000; 71: 1375-1380.

29. Janket SJ, Baird AE, Chuang SK, Jones JA. Meta-analysis of periodontal disease and risk of coronary heart disease and stroke. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*. 2003; 95(5): 559-569.
30. Joannides R, Haefeli WE, Linder L, Richard V, Bakkali EH, Thuillez C, et al. (1995). Nitric oxide is responsible for flow-dependent dilatation of human peripheral conduit arteries in vivo. *Circulation* 91:1314-1319.
31. Joshipura KJ, Wand HC, Merchant AT, Rimm EB. Periodontal disease and biomarkers related to cardiovascular disease. *J Dent Res* 2004;83:151-5.
32. Khader YS, Albashaireh ZS, Alomari MA. Periodontal diseases and the risk of coronary heart and cerebrovascular diseases: a meta-analysis. *Journal of Periodontology*. 2004; 75(8):1046-1053.
33. Kassebaum NJ, Bernabe E, Dahiya M, Bhandari B, Murray CJ, Marcenes W. Global burden of severe periodontitis in 1990-2010: a systematic review and meta-regression. *Journal of Dental Research*. 2014; 93: 1045–1053.
34. Kornman KS, Crane A, Wang HY, di Giovine FS, et al. (1997). The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease. *J. Clin. Periodontol.* 24: 72-77.
35. Lafon A, Pereira B, Dufour T, Rigouby V, Giroud M, Béjot Y, Tubert-Jeannin S. Periodontal disease and stroke: a meta-analysis of cohort studies. *Eur J Neurol*. 2014; 21(9):1155-61.
36. Leng WD, Zeng XT, Kwong JSW, Hua XP. Periodontal disease and risk of coronary heart disease: An updated meta-analysis of prospective cohort studies. *International journal of cardiology*. 2015; 201: 469-72.
37. Leeson P, Thorne S, Donald A, Mullen M, Clarkson P, Deanfield J. Non-invasive measurement of endothelial function: effect on brachial artery dilatation of graded endothelial dependent and independent stimuli. *Heart*. 1997;.78(1):.22.

38. Lockhart PB, Bolger AF, Papapanou PN, Osinbowale O, Trevisan M, Levison ME, et al. Periodontal disease and atherosclerotic vascular disease: does the evidence support an independent association? A scientific statement from the American Heart Association. *Circulation*. 2012; 125: 2520–2544.
39. Li X, Tse HF, Yiu KH, Jia N, Chen H, Li LSW, Jin L. Increased levels of circulating endothelial progenitor cells in subjects with moderate to severe chronic periodontitis. *J Clin Periodontol* 2009; 36: 933–939.
40. Holla LI, Fassmann A, Vasku et al. Genetic variations in the human gelatinase A (matrix metalloproteinase-2) promoter are not associated with susceptibility to, and severity of, chronic periodontitis. *Journal of Periodontology*. 2005; 76 (7): 1056–1060, 2005.
41. Mercanoglu F, Oflaz H, Öz O, Gökbuğet AY, Gençhelleç H, Sezer M, Nisanci Y, Umman S. Endothelial Dysfunction in Patients With Chronic Periodontitis and Its Improvement After Initial Periodontal Therapy. *J Periodontol* .2004; 75 (12).
42. Machado, WM, Prestes AP, Costa TP, Mendes RT, Olchanheski LR, Sordi R, et al. (2014). The effect of simvastatin on systemic inflammation and endothelial dysfunction induced by periodontitis. *Journal of Periodontal Research*. 2014; 49 (5): 634–641.
43. Memon RA, Feingold KR, Grunfeld C. Cytokines and intermediary metabolism. In: Remick DG, Friedland JS editors. *Cytokines in health and disease*. 2nd ed. New York: Marcel Dekker. 1997; 381-399.
44. Moncada S, Herman AG, Higgs EA, Vane JR. Differential formation of prostacyclin (PGI₂ or PGI₂) by layers of the arterial wall. An explanation for the anti-thrombotic properties of vascular endothelium. *Thromb Res* 1977; 11: 323-344.
45. Moreira PR, de Sá AR, Xavier GM, Costa JE, et al. A functional interleukin-1 beta gene polymorphism is associated with chronic periodontitis in a sample of Brazilian individuals. *J. Periodontal Res*. 2005; 40: 306-311.

46. Munzel T, Sinning C, Post F, Warnholtz A, Schulz E. Pathophysiology, diagnosis and prognostic implications of endothelial dysfunction. *Ann Med.* 2008;40:180–6.
47. Naghavi M, Libby P, Falk E, Casscells W, Litovsky S, Rumberger et al. From vulnerable plaque to vulnerable patient: a call for new definitions and risk assessment strategies: part II. *Circulation.* 2003b; 108: 1772-1778.
48. Offenbacher S¹, Katz V, Fertik G, Collins J, Boyd D, Maynor G, McKaig R, Beck J. Periodontal infection as a possible risk factor for preterm low birth weight. *J Periodontol.* 1996; 67(10):1103-13.
49. PAGE RC, KORNMAN KS. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontol.* 2000, v.14, p. 9-11, 1997.
50. Ren L, Jiang ZQ, Fu Y, Leung WK, Jin LJ. The interplay of lipopolysaccharidebinding protein and cytokines in periodontal health and disease. *J Clin Periodontol.* 2009; 36: 619–26.
51. Reriani MK, Lerman LO, Lerman A. Endothelial function as a functional expression of cardiovascular risk factors. *Biomark Med.* 2010; 4: 351–360.
52. Williams RC, Offenbacher S. Periodontal medicine: the emergence of a new branch of periodontology. *Periodontol* 2000. 2000; 23: 9-12.
53. Roger VL, Go AS, Lloyd-Jones DM, Benjamin EJ, Berry JD, Borden WB, Bravata DM, et al.; on behalf of the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart disease and stroke statistics: 2012 update: a report from the American Heart Association. *Circulation.* 2012;125:e2– e220.
54. Ras RT, Streppel MT, Draijer R, Zock PL. Flow-mediated dilation and cardiovascular risk prediction: a systematic review with meta-analysis. *International journal of cardiology.* 2013; 168(1): 344-351.
55. Salvador B, Arranz A, Francisco S, Córdoba L, Punzón C, Llamas MA, Fresno M. Modulation of endothelial function by Toll like receptors. *Pharmacological Research.* 2016; 108:46-56.

56. Seinost G, Wimmer G, Skerget M, Thaller E, Brodmann M, Gasser R, Bratschko RO, Pilger E. Periodontal treatment improves endothelial dysfunction in patients with severe periodontitis. *American Heart Journal*, June 2005; 149(6): 1050-105.
57. Shapira L, Wilensky A and Kinane DF (2005). Effect of genetic variability on the inflammatory response to periodontal infection. *J. Clin. Periodontol.* 32 (6): 72-86.
58. Skoog T, Dichtl W, Boquist S, Skoglund-Andersson C, Karpe F, Tang R, et al. (2002). Plasma tumour necrosis factor-alpha and early carotid atherosclerosis in healthy middle-aged men. *Eur Heart J* 23:376-383.
59. Siasos G, Zografos T, Oikonomou E, Papavassiliou AG, Stefanadis C, Tousoulis D. Flow-mediated dilation: Is it just a research tool or a useful biomarker for cardiovascular prognosis. *International journal of cardiology.* 2015; 180: 154-157.
60. Schenkein HA, Loos BG. Inflammatory mechanisms linking periodontal diseases to cardiovascular diseases. *Journal of Clinical Periodontology.* 2013; 40 (14): 51–69.
61. Schmitt A, Carra MC, Boutouyrie P, Bouchard P. Periodontitis and arterial stiffness: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Periodontol.* 2015; 42(11): 977-987.
62. Tonetti MS, D'Aiuto F, Nibali L, Donald A, Storry C, Parkar M, et al. Treatment of periodontitis and endothelial function. *New England Journal Of Medicine.* 2007; 356(9): 911-920.
63. Tonetti MS, Van Dyke TE and on behalf of working group 1 of the joint EFP/AAP workshop. Periodontitis and atherosclerotic cardiovascular disease: consensus report of the Joint EFP/AAP Workshop on Periodontitis and Systemic Diseases. *J Clin Periodontol.* 2013; 40 (14): 24-29.
64. Teeuw WJ, Slot DE, Susanto H, Gerdes VE, Abbas F, D'Aiuto F, Kastelein JJ, Loos BG. Treatment of periodontitis improves the atherosclerotic profile: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Periodontol.* 2014; 41(1):70-9.

65. Tousoulis D, Simopoulou C, Papageorgiou N, Oikonomou E, Hatzis G, Siasos G, et al. Endothelial dysfunction in conduit arteries and in microcirculation. Novel therapeutic approaches. *Pharmacology & Therapeutics*. 2014; 144: 253–267.
66. Virchow R. *Gesammelte abhandlungen zur wissenschaftlichen medicin: phlogose ung trombose in Yefussystem*. Berlim: Meidinger Sohn. 1856;.458-463.
67. Von Rokitansky CA. *Manual of pathological anatomy* London: The Sydenham Society. 1852; 4: 201-208.
68. Yin WT, Pan YP, Lin L. Association between IL-1 α rs17561 and IL-1 β rs1143634 polymorphisms and periodontitis: a meta-analysis. *Genetics and Molecular Research*. 2016; 15 (1): gmr.15017325.

Anexo I: Comitê de ética

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



COMPROVANTE DE ENVIO DO PROJETO

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Associação entre Periodontite, Peri-implantite e Disfunção endotelial: um estudo transversal paralelo

Pesquisador: Fernando de Oliveira Costa

Versão: 2

CAAE: 48355915.3.0000.5149

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

DADOS DO COMPROVANTE

Número do Comprovante: 080837/2015

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

Informamos que o projeto Associação entre Periodontite, Peri-implantite e Disfunção endotelial: um estudo transversal paralelo que tem como pesquisador responsável Fernando de Oliveira Costa, foi recebido para análise ética no CEP Universidade Federal de Minas Gerais em 18/08/2015 às 21:09.

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005

Bairro: Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901

UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3409-4592

E-mail: coep@prpq.ufmg.br

Anexo II: Termo de consentimento livre e esclarecido

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Você está sendo convidado a participar do **Projeto de Pesquisa** "Associação entre periodontite, peri-implantite e disfunção endotelial: um estudo transversal paralelo", que nada mais é que uma coleta de dados sobre a sua saúde e sobre o suas condições bucais. Esta pesquisa faz parte do estudo de Mestrado de Marcela de Faria Moura que está sendo orientada pelo Prof. Dr. Fernando Oliveira Costa.

O objetivo do estudo é obter informações a respeito de indivíduos que apresentam infecções nas gengivas dos dentes e implantes com conseqüente predisposição para doenças cardiovasculares. Será realizado um exame oral das gengivas e implantes e um ultrassom em uma artéria no braço. Também serão coletados saliva e sangue para análises. Estes exames permitirão avaliar como as condições bucais podem causar disfunções endoteliais e posterior predisposição para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares como a aterosclerose.

Antes de concordar em participar, é importante ler este termo de consentimento, bem como esclarecer qualquer dúvida ou termo que você não entenda. Um total de 60 pessoas farão parte deste estudo que terá duração inicial de 6 meses para coleta de dados. Durante o estudo, você também poderá realizar tratamento periodontal e periimplantar na clínica de Periodontia da Universidade Federal de Minas Gerais, sendo este de livre adesão. Você precisará ir ao Hospital das Clínicas da UFMG somente uma vez e não terá quaisquer custos, além disso, terá oportunidade de conhecer um pouco mais das suas condições sistêmicas.

Os riscos associados à coleta de sangue incluem formação de hematoma, infecção e desmaio. As chances destes riscos são mínimas. A coleta de sangue poderá acarretar incômodo leve de curta duração durante a punção. Ocasionalmente, pode se desenvolver um hematoma no local de punção e, mais raramente, complicações mais sérias como processos infecciosos locais. Os profissionais responsáveis pelo procedimento são experientes e treinados para a sua realização. O material é totalmente estéril e descartável. Caso algum desses eventos ocorra, você terá assistência imediata por profissionais devidamente habilitados, e será tratado com medicamento ou procedimento adequado para cada caso, sem nenhum custo para você.

No futuro, os resultados deste estudo irão beneficiar outros indivíduos como como você, sendo-lhe informado caso venham a surgir novas descobertas durante o estudo que possam beneficiar ou prejudicar a sua saúde.

O(A) Sr(a) não terá qualquer tipo de despesa para participar da pesquisa e não receberá remuneração por sua participação. As suas informações pessoais e de saúde serão mantidas em segredo, somente sendo disponibilizados para fins científicos, como congressos e artigos médicos. Entretanto, não serão revelados o seu nome, foto ou qualquer tipo de ligação dos seus dados à sua pessoa. O(A) Sr(a) pode recusar a participar ou retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa sem qualquer penalização ou prejuízo ao tratamento a que está sendo submetido na UFMG.

Caso tenha outras dúvidas posteriormente, você pode ligar para pesquisadora Marcela de Faria Moura telefone: [31-83686877](tel:31-83686877). Correo eletrônico: marcelaperioimplante@ufmg.br.

Rubrica da pesquisadora: _____

Rubrica do participante: _____

Caso tenha dúvidas ou preocupações com relação à sua condição de participante deste registro, entre em contato com: COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UFMG, COEP-UFMG - Endereço: Av. Antônio Carlos, 6627; Unidade Administrativa II - 2º andar - Sala 2005; Campus Pampulha; Belo Horizonte, MG – Brasil; Cep: [31270-901](tel:31270-901) telefone: [31-3409-4592](tel:31-3409-4592), correo eletrônico: coep@prpq.ufmg.br.

Li (ou alguém leu para mim) e entendi cada página deste consentimento referente ao estudo e estou ciente de que a minha participação é livre e voluntária.

Este termo de consentimento contem duas vias de igual teor. Uma ficará comigo e a e a outra com o pesquisador responsável. Poderei receber, posteriormente, informações sobre os resultados do estudo, caso assim deseje.

Data _____ do
consentimento: _____

31270-901 telefone: [31-3409-4592](tel:31-3409-4592), correio eletrônico: coep@prpq.ufmg.br.

Li (ou alguém leu para mim) e entendi cada página deste consentimento referente ao estudo e estou ciente de que a minha participação é livre e voluntária.

Este termo de consentimento contém duas vias de igual teor. Uma ficará comigo e a outra com o pesquisador responsável. Poderei receber, posteriormente, informações sobre os resultados do estudo, caso assim deseje.

Data _____ do
consentimento: _____

Nome _____ do
participante: _____

Assinatura _____ do participante:

CPF _____ ou Identidade: _____

Fernando Oliveira Costa (pesquisador responsável) – e-mail: focperio@uol.com.br
Telefone: [34092427](tel:34092427).

Assinatura: _____

Marcela de Faria Moura marcelaperioimplante@ufmg.br

Assinatura: _____

ANEXO III: Questionário sócio-econômico

Questionário

Nome do paciente: _____

Endereço: _____

Telefone: _____

Medidas periodontais de auto-relato:

- 1- Qual a sua idade? _____
- 2- Sexo _____ () masculino () feminino
- 3- Escolaridade : _____ () não estudei ensino fundamental () ensino médio () graduação () pós graduação ()
- 4- Qual a sua renda familiar? () 1 a 3 salários () 3 a 5 salários () mais que 5 salários
- 5- Com qual frequência você usa do fio dental? Nunca () diariamente () 2 a 3 vezes na semana () eventualmente para retirar alimentos ()
- 6- Qual a sua frequência de escovação? () 1 x ao dia () 2 x ao dia () 3 x ao dia ou mais
- 7- Você fuma? () sim () não
- 8- Qual a sua última visita ao dentista para controle ou tratamento? () até 6 meses () 1 ano () 2-3 anos () mais que 3 anos
- 9- Você tem diabetes? () sim () não
- 10- Você tem ou teve alguma doença no coração (exemplos: pressão alta, infarto, derrame, etc.) () sim () não
- 11- Você pensa que tem alguma doença de gengival? () sim () não
- 12- Algum dentista já lhe disse que você teve perda óssea ao redor dos dentes? () sim () não
- 13- Você já se fez alguma cirurgia para limpar por baixo de suas gengivas? () sim () não
- 14- Você notou nos últimos anos que o espaço entre seus dentes aumentou, que os dentes se projetaram para frente ou que triângulos negros apareceram entre os dentes? () sim () não
- 15- Você já fez raspagem, limpeza profunda ou curetagem gengival? () sim () não
- 16- Você já teve algum dente permanente que foi perdido sozinho, sem que houvesse nenhum traumatismo e sem ter ido ao dentista para fazer extração? () sim () não
- 17- Você tem algum dente bambô na boca? () sim () não
- 18- De um modo geral, como você poderia classificar a saúde de seus dentes e gengivas? Muito boa () Boa () razoável () ruim muito ruim ()
- 19- Você recebeu instruções de higiene bucal pelo seu dentista? Sim () Não ()
- 20- O dentista repetiu as recomendações de higiene mais de 1 vez? Sim () Não ()
- 21- Você acha que seu tratamento foi eficiente no controle da doença gengival? Sim () Não ()

- 22- Você acha que pode ter doença nos implantes? Sim () Não ()
- 23- Você acredita que seus problemas bucais podem influenciar na sua saúde sistêmica? Sim () Não ()
- 24- Você acha que doença de gengiva pode influenciar em problemas cardíacos? Sim () Não ()
- 25- Você acredita que as bactérias da boca podem ir para o sangue e chegar ao coração? Sim () Não ()
- 26- Uso de medicação contínua: Sim () Não () Qual? _____
- 27- Sedentarismo: Sim () Não- 3x / semana ()
- 28- Uso do álcool: nunca () até 4 vezes semanais () mais de 4 vezes na semana
- 29- Pais ou irmãos com histórico: hipertensão () diabetes () Enfartos () derrames () problemas circulatórios () Câncer () doenças infecto contagiosas ()

Sistema de valores do instrumento EQ5D de mensuração de qualidade de vida:

- 30- Como está sua **Mobilidade**?
 1. Não tenho problemas em andar
 2. Tenho alguns problemas em andar
 3. Estou limitado a ficar na cama
- 31- Como está seus **Cuidados pessoais**?
 1. Não tenho problemas com os meus cuidados pessoais
 2. Tenho alguns problemas para me lavar ou me vestir
 3. Sou incapaz de me lavar ou vestir sozinho
- 32- Como você está em suas **Atividades habituais**? (ex. trabalho, estudos, atividades domésticas, atividades em família ou de lazer)
 1. Não tenho problemas em desempenhar as minhas atividades habituais
 2. Tenho alguns problemas em desempenhar as minhas atividades habituais
 3. Sou incapaz de desempenhar as minhas atividades habituais
- 33- Como se sente em relação à **Dor/Mal-estar**?
 1. Não tenho dores ou mal-estar
 2. Tenho dores ou mal-estar moderados
 3. Tenho dores ou mal-estar extremos
- 34- Como se sente em relação à **Ansiedade/Depressão**?
 1. Não estou ansioso(a) ou deprimido(a)
 2. Estou moderadamente ansioso(a) ou deprimido(a)
 3. Estou extremamente ansioso(a) ou deprimido(a)
- 35- Faça um traço na escala tendo em vista que o melhor estado de saúde que possa imaginar é marcado por 100 e o pior estado de saúde que possa imaginar é marcado por 0.

O Melhor estado de saúde imaginável



O seu estado de saúde hoje

O Pior estado de saúde imaginável

ANEXO IV: Periodontograma



Pesquisa: associação entre a periodontite e disfunção endotelial por meio do exame da dilatação mediada por fluxo (dmf) da artéria braquial, parâmetros clínicos periodontais e níveis dos marcadores inflamatórios il-1 β , tnf- α , mmp2 e óxido nítrico: um estudo caso- controle

Pesquisadores: Fernando Oliveira Costa; Marcela de Faria Moura

Periodontograma

Dentes	Profundidade de sondagem				Perda de inserção				Sangramento à sondagem				Presença de supuração		
	V	P	M	D	V	P	M	D	V	P	M	D			
18															
17															
16															
15															
14															
13															
12															
11															
21															
22															
23															
24															
25															
26															
27															
28															
48															
47															
46															
45															
44															
43															
42															
41															
31															
32															
33															
34															
35															
36															
37															
38															

Diagnóstico:

