

PÉROLA MICHELLE VASCONCELOS CARIBÉ

**ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO – 308 G/A DO GENE *TNF- α* COM
DOENÇA ARTERIAL CORONARIANA E DOENÇA PERIODONTAL EM
BRASILEIROS**

MEMBROS TITULARES:

Profa. Dra. Adriana Vieira Gomes

Profa. Dra. Ana Paula Veras Sobral

Prof. Dr. Rodrigo Pedrosa

MEMBROS SUPLENTES

Profa. Dra. Terezinha de Jesus/ Profa. Dra. Silvia Montenegro

Associação do Polimorfismo – 308 G/A do gene *Tnf- α* . Com a Doença Arterial Coronariana e Doença Periodontal em Brasileiro. Recife, 2014.

Pérola Michelle Vasconcelos Caribé^{*a}, Gustavo Nery da Costa Azevedo^a, Isabela Stephanie Ferreira Ribas^a, Leonardo Santiago Ortigoza^a, Leonardo Viana de Brito^b, Maria Tereza Cartaxo Muniz^{a,c}, Dário Celestino Sobral Filho^{a,b}

a. Universidade de Pernambuco (UPE), Brasil.

b. Pronto Socorro Cardiológico de Pernambuco, Prof. Luiz Tavares (PROCAPE).

c. Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Pernambuco (ICB/UPE)

RESUMO

A Premissa para inter-relação entre Doença Arterial Coronariana (DAC) e a Doença Periodontal (DP) é o processo inflamatório, que promove proteção aos tecidos, restringindo os danos no local da infecção ou injúria, mas possui efeitos deletérios quando de forma exacerbada. O TNF- α participa da aceleração da aterogênese por meio da indução da expressão de VCAM-1, ICAM-1, MCP-1 e E-selectina. Também reduz a biodisponibilidade do óxido nítrico nas células endoteliais e prejudica a vasodilatação endotélio-dependente, promovendo disfunção endotelial. Além disso, provoca a apoptose nas células endoteliais, contribuindo para a injúria endotelial. O objetivo deste trabalho é verificar a existência da associação entre a gravidade da Doença Arterial Coronariana (DAC), a Doença Periodontal (PD) e o papel do polimorfismo na região promotora do gene *TNF α* (-308). Participaram do estudo 422 pacientes com DAC, submetidos a cinecoronariografia, destes 206 apresentaram DP + DAC e 216 apenas DAC. Não houve associação significativa entre a gravidade da DAC, estratificada pelo Escore SINTAX, e a DP. ($p > 0,05$). O polimorfismo na região promotora do gene *TNF α* (-308) esta fortemente associado à DP (OR = 4,01, 95% IC: 2,25 – 7,18) e não está associado a gravidade da DAC.

Descritores: Doença da Artéria Coronariana, Doenças periodontais, Polimorfismos Genético.

1. REVISÃO DE LITERATURA e JUSTIFICATIVA

1.1. Doença arterial coronariana (DAC), doença periodontal (PD) e a associação entre elas.

A Doença Arterial Coronariana (DAC), uma das principais *causa mortis* no mundo, se configura pelo comprometimento total ou parcial do suprimento sanguíneo ao miocárdio, decorrente de depósitos de colesterol na parede arterial coronária com consequente, obstrução do fluxo sanguíneo^[15,16]. No Brasil, aproximadamente 260 mil indivíduos morrem por doenças cardiovasculares, com idade igual ou superior a sessenta anos e as doenças do aparelho circulatório respondem por mais de 40% dos óbitos e quase 30% das internações hospitalares.^[17]

O estudo de Framingham (FHS)^[18], entre 1966 a 1979, identificou uma lista de fatores de risco clássicos para a DAC, tais como: hipertensão, sexo masculino, idade, tabagismo, dislipidemia e obesidade. No entanto, eles não são suficientes para explicar a etiologia deste processo patológico, onde cerca de 40% dos casos de aterosclerose não podem ser atribuídos aos fatores de risco clássicos^[18]. Geralmente o estágio inicial da aterosclerose ocorre no espaço subendotelial das artérias e é causado pelo acúmulo de macrófagos que fagocitam colesterol e lipoproteínas de baixa densidade conhecidas como LDL-C, do inglês *low density lipoprotein*. Esses macrófagos são conhecidos como células espumosas e constituem-se o elemento iniciador da placa de ateroma^[19].

O processo fisiopatológico da aterosclerose tem seu início na monocamada de células endoteliais, localizadas na superfície interna das artérias, devido a estímulos como a hipertensão arterial, dislipidemia e mediadores pró - inflamatórios que promovem a entrada de LDL-C e estes induzem a adesão de leucócitos, a endocitose (desencadeada pelos macrófagos) e a diferenciação de monócitos em macrófagos. Assim originam-se as células espumosas, que são macrófagos com grande quantidade de colesterol no interior. O aumento destas células promove a migração de células musculares lisas da camada média para a superfície interna das artérias, aumentando o tamanho e volume da placa que eventualmente se desestabiliza e se rompe expondo seu conteúdo aos componentes de

coagulação do sangue e originando o trombo, o qual entra no lúmen da artéria e provoca a obstrução da circulação sanguínea [19, 20].

Macrófagos e linfócitos produzem citocinas pró-inflamatórias, como fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), interferon-gama (IFN- γ), interleucina-6 (IL-6) e interleucina-8 (IL-8) que mantêm o estímulo quimiotático para as células do sistema imune, inibem a síntese de colágeno pelas células musculares lisas e estimulam a produção de metaloproteinases (MMPs) pelos macrófagos. Estas enzimas degradam a matriz extracelular, enfraquecendo a capa fibrosa e tornando as placas susceptíveis à ruptura [21].

Em contrapartida, citocinas antiinflamatórias como a interleucina-10 (IL-10), também são produzidas na placa aterosclerótica por macrófagos e linfócitos Th2. A IL-10 inibe a produção das MMPs, estimula a síntese de seus inibidores teciduais (TIMPs), dentre vários outros efeitos moduladores envolvidos na progressão, ruptura e trombose da placa aterosclerótica [22].

Em contrapartida, citocinas antiinflamatórias como a interleucina-10 (IL-10), também são produzidas na placa aterosclerótica por macrófagos e linfócitos Th2. A IL-10 inibe a produção das MMPs, estimula a síntese de seus inibidores teciduais (TIMPs), dentre vários outros efeitos moduladores envolvidos na progressão, ruptura e trombose da placa aterosclerótica [22].

A oclusão trombótica coronariana parcial ou completa, geralmente secundária à ruptura da placa aterosclerótica, é o principal evento fisiopatológico no desenvolvimento da síndrome coronariana aguda (SCA) [23]. Evidências sugerem que a inflamação desempenha um papel fundamental em todas as etapas do processo aterosclerótico, desde o início até a instabilidade da placa coronariana [24-27].

O evento inicial da lesão aterosclerótica é a disfunção endotelial que se acompanha da expressão de moléculas de adesão, tais como selectinas e moléculas de adesão da célula vascular (VCAMs) [28]. Estas moléculas promovem a aderência de monócitos, linfócitos e mastócitos ao endotélio e posterior migração destas células em direção à túnica íntima. Já na parede arterial, monócitos transformam-se em macrófagos que iniciam a internalização de lipoproteínas modificadas, convertendo-se em células espumosas, achados mais precoces na evolução da placa aterosclerótica [29].

Acredita-se que um desequilíbrio entre fatores inflamatórios e antiinflamatórios, com preponderância pró-inflamatória, resulte na ruptura da placa aterosclerótica [30]. Os fatores de risco cardiovascular, incluindo diabetes mellitus, tabagismo e altos níveis de lipoproteínas aterogênicas, estimulam a liberação de citocinas pelas células do sistema

imune, culminando em um processo inflamatório contínuo. Formas solúveis de várias moléculas inflamatórias no sangue periférico podem refletir o estado de ativação da placa aterosclerótica e vêm sendo úteis na identificação da doença arterial coronariana (DAC).

A fisiopatologia básica da DAC não é completamente compreendida. Evidências emergentes sugerem que variantes genéticas podem estar associadas com a susceptibilidade a doença^[37]. O polimorfismo do gene *TNF- α* (-308) tem sido associado a predisposição do indivíduo desenvolver a DAC^[38]. O este polimorfismo também tem sido associado à hipertensão arterial^[39], diabetes e obesidade^[40].

Para estratificar a gravidade da DAC, tem sido utilizado frequentemente a cinecoronariografia, que é um exame invasivo e tem o objetivo de definir a presença de lesões obstrutivas. A técnica consiste na visualização angiográfica dos vasos coronários após a injeção seletiva de substância contrastante. As imagens assim obtidas podem ser arquivadas em meios analógicos ou digitais, permitindo posteriormente a análise detalhada, qualitativa e quantitativa, servindo de auxílio para estimar o prognóstico e definir se, além do tratamento clínico da doença, há necessidade de procedimento de revascularização miocárdica como angioplastia ou mesmo a cirurgia^[45]. O escore SYNTAX[®] foi desenvolvido como ferramenta angiográfica para graduar a complexidade da doença arterial coronária (DAC) e vem sendo empregado para avaliar o grau da doença em pacientes portadores de DAC, auxiliando na decisão acerca da melhor estratégia de revascularização, percutânea ou cirúrgica^[47-50].

É descrito uma possível associação entre as doenças periodontais e a extensão e gravidade das doenças cardiovasculares. Segundo a American Academy of Periodontology (1998), considera que infecções como a doença periodontal, pode contribuir na etiopatogênese da doença cardíaca, sendo comparáveis aos fatores de risco clássicos.

A Doença Periodontal (DP), conhecida também como periodontite, acomete tecido ósseo e ligamentos periodontais. Caracteriza-se pela presença de sangramento, edema e aumento do fluido cervical, resultantes da atividade inflamatória (mediada por bactérias ou endotoxinas) e da resposta imunológica/humoral do hospedeiro (mediada por leucócitos polimorfonucleares, linfócitos, imunoglobulinas e sistema complemento)^[51].

Os conceitos sobre a etiopatogenia da doença periodontal sofreram grandes transformações ao longo do tempo. De forma empírica já se associou o cálculo como causa da doença periodontal, por uma relação simples e direta da destruição periodontal em sua presença. Posteriormente, no final dos anos de 1880 até os anos de 1960 admitiu-se que a

presença das bactérias de forma geral e exclusiva, era a causa da gengivite e da periodontite, pela ação direta de seus produtos ^[52]. Entretanto, durante os anos de 1970 e início dos anos de 1980, bactérias Gram negativas anaeróbicas ou microaerófilas foram implicadas como causadoras da periodontite e o papel da resposta imunoinflamatória protetora e destrutiva foram descritos na saúde e na doença ^[52].

Entre os anos 1985 e 1995 houve aumento do reconhecimento dos conceitos de imunologia descrevendo a relação entre agressão bacteriana e resposta imunológica, pois variações consideráveis eram observadas na resposta do hospedeiro e na expressão clínica da doença ^[52]. Estudos futuros demonstraram ainda que exposição à placa por longos períodos, caracterizando uma má higiene, não conduz necessariamente à periodontite. No estudo clássico de LÖE *et al.*(1986)^[53] por exemplo, em que eles estudaram, a taxa de progressão da doença periodontal em uma população nunca exposta a qualquer programa ou incidentes em relação à prevenção, como escovação dentária, e tratamento de doenças dentárias. O grupo consistia de 480 homens trabalhadores em duas plantações de chá no Sri Lanka. Exames subsequentes ocorreram em 1971, 1973, 1977, 1982 e 1985. Esta população não executou as medidas de higiene oral convencionais e conseqüentemente exibiram quantidade elevada de placa, cálculo e manchas em seus dentes. Foram divididos em três grupos: aproximadamente 8% apresentaram rápida progressão da doença periodontal (RP), cerca de 81% apresentaram progressão moderada (MP) e um grupo (aproximadamente 11%), não exibiu nenhuma (NP) progressão da doença periodontal além de gengivite, apesar de possuírem péssima condição de higiene dental ^[53].

A perda de dentes é frequentemente e erroneamente associada à doença periodontal em adultos mais velhos. Todavia, o envelhecimento por si só não dá origem a perda de inserção periodontal crítica em idosos saudáveis. Os efeitos do envelhecimento sobre os tecidos periodontais são baseados em alterações moleculares nas células periodontais, que intensificam a perda óssea em pacientes idosos com periodontite^[54,55].

A ação patológica direta das bactérias e de seus produtos no periodonto é significativa durante os estágios iniciais da doença. Análise de amostras de placa de pacientes com inflamação gengival grave revela uma sucessão de espécies bacterianas que promovem um aumento da capacidade de induzir respostas inflamatórias. Algumas espécies de bactérias podem também produzir enzimas (protease, colagenase, fibrinolizina, fosfolipase-A) que degradam os tecidos das camadas superficiais do periodonto^[56]. Além disso, certos componentes bacterianos, como os lipopolissacarídeos (LPS), são capazes de produzir reabsorção óssea *in vitro*^[1].

O aumento da destruição tecidual nas lesões periodontais também 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 (LPS) estimulam a produção de citocinas e mediadores inflamatórios, incluindo as prostaglandinas E₂ (PGE₂)^[56].

Por sua vez, as citocinas e os mediadores inflamatórios promovem a liberação das enzimas teciduais, recruta células inflamatórias, facilita a apoptose dos PMNs, aumenta a síntese das MMP, inibem a síntese de colágeno e ativam os linfócitos B e T ^[57]. As citocinas mais encontradas na periodontite são: IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α e a PGE₂ ^[56]. O TNF- α é a principal citocina envolvida na apoptose celular, reabsorção óssea, secreção de MMP, expressão da molécula de adesão intercelular (ICAM) e produção da IL-6. A IL-6 estimula a formação de osteoclastos, e conseqüentemente a reabsorção óssea, e facilita a diferenciação a diferenciação da célula T ^[57].

Assim, a periodontite se inicia por colonização de bactérias gram-negativas e anaeróbicas, ocasionando uma reação inflamatória, na qual macrófagos, monócitos e células endoteliais liberam na circulação os mediadores químicos como a IL-6, IL-1 beta, e TNF- α , que induzem o aumento da produção de prostaglandinas E₂ (PGE₂) e de metaloproteinases (MP), levando à destruição extracelular da gengiva e do ligamento periodontal^[12].

A doença periodontal é classificada em três estágios principais: periodontia leve, moderada e severa. Inicialmente as gengivas apresentam aspecto edemaciado, eritematoso e/ou sangrante; quando a inflamação é limitada às gengivas é chamado de gengivite e se não for tratada a gengivite acomete o osso alveolar, que é o responsável pelo suporte do dente, desencadeando o início da doença periodontal. A doença periodontal pode evoluir para os estágios moderado e grave, nesses casos, mais osso é destruído, podendo levar a perda dos dentes ^[56].

Devido à discordância nos estudos este trabalho visa estudar o papel do polimorfismo do gene do *TNF- α* no agravamento ou presença da doença periodontal.

A primeira associação descrita na literatura entre a doença periodontal e a doença cardiovascular foi realizada por MACKENZIE E MILLARD, que estudaram a relação entre diabetes e aterosclerose com a presença de cálculo e perda óssea alveolar. Foram avaliados 198 pacientes. Obtiveram como resultados que 62% do grupo com aterosclerose apresentou maior perda óssea em relação ao grupo controle (MACKENZIE,1963).

Castelli *et al* (1978)⁹ realizaram também um dos primeiros estudos relacionando Doença Periodontal (DP) e Doença Arterial Coronariana (DAC) e evidenciaram relação positiva entre perda óssea alveolar, diabetes e aterosclerose. Indivíduos com DP mais avançada apresentam risco relativo de 25% de DAC quando comparados àqueles com DP mínima^[9]. A inflamação também exerce papel importante na angina instável com elevação de IL-6 e Proteína C Reativa. As citocinas podem ativar o endotélio a produzir substâncias vasoconstritoras e promover adesão leucocitária e plaquetária, predispondo à trombogênese. Isso pode explicar a presença de trombo coronário na ausência de placa aterosclerótica, de fissura e de ruptura da placa^[10].

A associação entre periodontite, hipertensão e doença cardiovascular, também foi encontrada em 424 indivíduos acompanhados prospectivamente, independente de outras variáveis^[12].

Beck *et al* 2001, avaliaram a possibilidade de associação entre DP e aumento da espessura das camadas íntima-média da carótida (IMT), que é um indicador de aterosclerose subclínica. Foram recolhidos os dados de 6017 pessoas, com idades compreendidas entre os 52 e os 75 anos, os quais foram obtidos do “Atherosclerosis Risk in Communities Study 1996 to 1998”. A periodontite foi classificada em: nenhuma/leve, moderada, ou grave. Foram controlados fatores de risco como idade, sexo, diabetes, colesterol LDL, colesterol HDL, triglicérides, hipertensão arterial, tabagismo, IMC e nível socioeconómico. Verificaram que a IMT foi mais elevada em indivíduos com periodontite grave e moderada comparativamente aqueles sem periodontite. Estes resultados são indicativos de que a periodontite pode desempenhar um importante papel na formação da placa de ateroma, e portanto em eventos cardiovasculares (Beck *et al* (2001)).

Wu *et al* (2000) estudaram a relação entre a DP e alguns fatores de risco cardiovascular, nomeadamente o nível sérico de colesterol total, PCR e fibrinogénio sérico. A um total de 10146 participantes avaliaram os níveis de PCR e colesterol e a 4461 os níveis de fibrinogénio. A todos avaliaram a presença de DP. Não encontraram associação entre DP e o nível sérico de colesterol, mas verificaram uma associação significativa entre a DP e aumento da PCR ou do nível sérico de fibrinogénio (Wu *et al.*, 2000b).

As infecções crónicas a que o organismo é submetido ao longo da vida, como no caso da doença periodontal, têm sido postuladas como eventos inflamatórios que perpetuam o processo aterosclerótico (PAQUETTE, 2007). Estudos epidemiológicos mostraram um aumento da predominância de hipertensão nos pacientes com periodontite, principalmente naqueles com perda óssea alveolar acentuada. Porém, ainda permanece

incerta a hipótese de que a hipertensão seja um fator de risco para a periodontite. A inflamação sistêmica é uma característica da hipertensão, evidenciada por níveis plasmáticos aumentados de proteína C-reativa em pacientes com pré hipertensão e com hipertensão estabelecida (FRIEDEWALD et al, 2009).

Estudos epidemiológicos mostraram um aumento da predominância de hipertensão nos pacientes com periodontite, principalmente naqueles com perda óssea alveolar acentuada. Porém, ainda permanece incerta a hipótese de que a hipertensão seja um fator de risco para a periodontite. A inflamação sistêmica é uma característica da hipertensão, evidenciada por níveis plasmáticos aumentados de proteína C-reativa em pacientes com préhipertensão e com hipertensão estabelecida (FRIEDEWALD et al, 2009).

A etiologia da doença cardiovascular e da doença periodontal é multifatorial e, na literatura, encontramos os achados fatores de risco clássicos que em muitos casos são os mesmos como: idade avançada, gênero masculino, tabagismo, diabetes e baixa condição sócio-econômica. Alguns trabalhos epidemiológicos mostraram pacientes com doença cardiovascular que não apresentavam nenhum destes fatores considerados de risco. (HARASZTHY et al, 2000).

1.2. Processo inflamatório: premissa para inter-relação entre DP e DAC

As infecções e a injúria tecidual induzem uma cascata complexa de eventos fisiológicos conhecida como resposta inflamatória, que promove proteção aos tecidos, restringindo os danos no local da infecção ou injúria, mas podendo ter efeitos deletérios quando de forma exacerbada ^[1].

A inflamação é resposta orgânica local ou sistêmica, de magnitude variável, desencadeada por diversos fatores, tendo como fim proteger o organismo contra agressões. A reação inflamatória é o mecanismo fisiopatológico básico em resposta a diversas doenças, sendo representada por um conjunto de reações locais e gerais do organismo ^[1]. A presença de mediadores químicos no processo inflamatório faz com que a inflamação mantenha características uniformes, mesmo sendo produzida por diferentes irritantes, sendo que o aumento da permeabilidade vascular pode ser originado de mecanismos diretos, em que o próprio agente agressor atua sobre a parede vascular ou indiretos em que há ação de mediadores químicos ^[2].

À inflamação crônica atribui-se um importante papel como desencadeante da aterosclerose bem como perpetuador da mesma (Ross, 1999). O paradigma da importância

da inflamação na fisiopatologia da doença coronária estimulou pesquisas sobre a inflamação crónica causada por inúmeros microorganismos como a *Chlamydia pneumoniae*, *Helicobacter pylori*, e cito megalovírus, bem como alguns microorganismos da cavidade oral, pelo facto destas infecções crónicas poderem relacionar-se com a etiopatogenia das DCV, pela libertação de mediadores inflamatórios que favorecem o desenvolvimento da aterosclerose (Meur man, Janket & Sanz, 2004)

Por muitos anos, a fisiopatologia da Doença Arterial Coronariana (DAC) era considerada meramente um acúmulo de lipídios na parede arterial. No entanto, nas últimas duas décadas, o crescente desenvolvimento no campo da biologia vascular tem esclarecido que as lesões ateroscleróticas são de fato uma série de respostas celulares e moleculares altamente específicas e dinâmicas, essencialmente inflamatórias por natureza ^[3,4].

Quando existe uma agressão ao endotélio, as células endoteliais passam a expressar moléculas de adesão às quais os leucócitos podem aderir. Estas chamam-se: moléculas de adesão às células vasculares I (VCAM) e moléculas de adesão intracelulares I (ICAM). Selectinas e integrinas também parecem contribuir para a adesão leucocitária (Libby, Ridker & Maseri, 2002). Os leucócitos (linfócitos T activados, monócitos/macrófagos), são os responsáveis pela captação de lípidos modificados, principalmente o LDL oxidado (Ross, 1999). Assim, os monócitos aderem ao endotélio através das moléculas de adesão e posteriormente entram na íntima, onde se transformam em macrófagos e acumulam lípidos, para depois converter-se em células espumosas, contribuindo para a evolução da lesão. Os fatores libertados pelas plaquetas ativadas a nível da superfície celular causam a continuação da migração de células musculares lisas, da média para a íntima, seguida por proliferação e síntese dos componentes da matriz extracelular, o que levará à acumulação de colágeno no interior da parede arterial (Castro, Segastibelza & Martínez, 2001).

A reação inflamatória/proliferativa na parede vascular aumenta a secreção de citocinas pró-inflamatórias primárias, como a interleucina (IL1) e o fator de necrose tumoral Alfa (TNF α). Elas são responsáveis pela expressão de moléculas de adesão leucocitária, pela molécula de adesão intercelular (ICAM)-1 e P-, E-, L-selectinas e pelo aumento de substâncias quimiotáticas (proteína quimiotática de monócitos [MCP]-1 e fator estimulador de colônia de macrófagos [M-CSF], ambas amplificadoras da cascata inflamatória) ^[5,6].

O TNF α participa da aceleração da aterogênese por meio da indução da expressão de VCAM-1, ICAM-1, MCP-1 e E-selectina. Também reduz a biodisponibilidade do óxido nítrico nas células endoteliais e prejudica a vasodilatação endotélio-dependente,

promovendo disfunção endotelial. Além disso, provoca a apoptose nas células endoteliais, contribuindo para a injúria endotelial^[7].

A Doença Periodontal (DP) é uma doença de caráter infeccioso/inflamatório caracterizada pela ocorrência de amplificação de eventos celulares e bioquímicos, que conduzem finalmente a destruição do ligamento periodontal e a reabsorção óssea alveolar^[8]. A função primordial da cascata inflamatória é proteger o periodonto contra agentes estranhos; porém, quando a resposta imune não é suficiente para eliminar os microrganismos invasores, a persistência de mediadores inflamatórios pode levar a injúrias ao tecido, com conseqüente formação de bolsa periodontal, perda de tecido conjuntivo, destruição do ligamento periodontal e reabsorção de osso alveolar, culminando com a perda do elemento dentário^[8].

Taylor *et al.*, 2006^[11] realizaram um estudo de intervenção em pacientes com avançada periodontite que necessitavam de extração completa das peças dentárias. Doze semanas após a completa extração dentária observaram significativa redução da proteína-C-reativa, inibidor do ativador do plasminogênio (PAI-1), contagem de plaquetas e glóbulos brancos. Esse estudo demonstrou que a eliminação de periodontite avançada pela completa extração dentária reduz marcadores de risco inflamatórios e trombóticos, suportando a hipótese de que o tratamento da DP pode reduzir o risco cardiovascular^[11].

A Doença Periodontal conduz ao aumento de mediadores inflamatórios que promovem inflamação crônica endotelial (manifestada por meio da elevação da Proteína C Reativa - PCR), sugerindo que o processo inflamatório possa contribuir para vasoespasmos e trombose^[12]. Assim, marcadores de inflamação sistêmica estão elevados e apresentam redução após tratamento específico da DP, o que pode ser observado na melhora da disfunção endotelial associada à redução dos níveis de PCR. Dessa forma, quanto mais disseminada a infecção pelos tecidos de sustentação dentária, maior a área de exposição ao sistema vascular^[12].

Em suma, a relação da patologia da DAC e a DP é bidirecional, pois a DP representa um processo inflamatório no qual ocorre associação de bactérias, endotoxinas e citocinas pró-inflamatórias que podem contribuir para a aterogênese e eventos tromboembólicos, através da infiltração de células inflamatórias nas grandes artérias e proliferação do músculo liso vascular, os quais são importantes na história natural da aterogênese^[13]. Da mesma forma, a DAC com fatores de risco e comorbidades, podem contribuir na elevação da produção de citocinas como o TNF α e, desta forma, contribui

para o agravamento/desenvolvimento da DP estimulando a osteoclastogênese e inibindo a formação óssea^[14].

1.3. Fator de Necrose Tumoral Alfa (*TNF α*) e sua correlação com DAC e DP

O *TNF- α* é uma glicoproteína que se encontra na forma solúvel ou exposta na superfície da membrana das células, sendo biologicamente ativo participa da citotoxicidade e inflamação por interação celular, atua de forma pleiotrópica e produz efeitos sobre diversos tipos celulares e tecidos, tais como a intensificação da inflamação, da reabsorção óssea, favorecimento da coagulação, retardo no processo de fibrinogênese, adesão de lipídios e depósito de colesterol^[62,63].

O *TNF- α* , graças à sua propriedade pró-inflamatória sobre o endotélio, determina apoptose em certos tumores, produz caquexia pela lipólise estimulante, inibe a atividade da lipase lipoprotéica (LPL) nos adipócitos e estimula a lipogênese hepática^[43- 44]. Assim, quando o *TNF- α* inibe a atividade da enzima LPL, há o acúmulo de gordura no endotélio^[63].

Novos polimorfismos são descobertos nos genes que codificam citocinas e uma questão crucial é saber se estes polimorfismos têm efeito funcional. Um dos genes de citocinas mais amplamente estudados, a este respeito é o gene que codifica *TNF- α* humano. Segundo Allen (1999)^[64] o polimorfismo na região promotora do gene *TNF- α* não é aleatoriamente distribuído e, portanto, pode provavelmente ter algum efeito funcional e selecionável^[64].

O locus do gene *TNF- α* está localizado no braço curto do cromossoma 6p21.31, dentro da região do complexo maior de histocompatibilidade classe (MHC) III entre genes HLA-B e fator de complemento C^[65]. O locus do gene *TNF- α* consiste de um grupo de genes chamados linfotóxina (LT β -) e o gene *TNF- α* ^[66]. O gene *TNF- α* possui um tamanho de 3,6 kb e consiste em quatro exons, o primeiro é responsável pela codificação de uma proteína precursora de 233 aminoácidos, enquanto que os três restantes codificam cada um dos monômeros que formam a proteína ativa. Além disso, este gene tem três introns cuja função é desconhecida^[67].

A substituição de Guanina (alelo *TNF-308G* ou *TNFI*) por Adenina (alelo *TNF-308A* ou *TNF2*) na região promotora do gene *TNF- α* . foram descritas em populações

europeias, O polimorfismo -308 G/A na região promotora deste gene tem sido associado a diferentes condições inflamatórias e a presença do alelo A parece influenciar na expressão do TNF- α , sendo o genótipo AA considerado alto produtor^[68].

O TNF- α é uma citocina imunomodulatória e pró-inflamatória que age diretamente no adipócito regulando acúmulo de gordura e interferindo diretamente em diversos processos dependentes de insulina, como a homeostase glicêmica e o metabolismo de lipídios^[69]. Seu efeito mais intenso é a inibição da lipogênese (via inibição da expressão da lipase lipoproteína LLP, GLUT-4 e da AcetilCoA sintetase). Também tem recebido particular interesse seu efeito na regulação da massa de tecido adiposo, que parece estar associada com mudanças no número ou volume de adipócitos^[70].

A expressão e a secreção de TNF- α estão aumentadas em animais e humanos obesos, correlacionando positivamente com aumento do volume de adipócitos. Um estudo comparando indivíduos com peso ideal (IMC 1924 kg/m²) e obesos (IMC 3254 kg/m²) demonstrou correlação positiva entre RNAm de TNF- α e IMC, sugerindo que altos níveis de TNF- α se correlacionam com acúmulo de tecido adiposo, principalmente em obesos^[71].

Em ratos obesos, a neutralização do TNF- α causou melhora significativa na captação de glicose em resposta à insulina, revelando sua relação com resistência insulínica na obesidade^[72]. Em humanos obesos, existe uma forte correlação inversa entre TNF- α e metabolismo de glicose, devido à supressão pelo TNF- α da sinalização da insulina, reduzindo a fosforilação do substrato do receptor de insulina-1 (IRS-1) e da atividade da PI3K (fosfatidil-inositol-3-cinase), com redução da síntese e da translocação do transportador de glicose (GLUT-4) para a membrana, e consequente diminuição na captação de glicose mediada pela insulina^[73].

O TNF- α influencia em quase todos os fatores de risco cardiovasculares, como por exemplo, no diabetes^[69], na obesidade^[71], e no metabolismo dos lipídios^[70], portanto, pode-se afirmar que há possibilidade da associação entre o *TNF- α* e a possível evolução da gravidade da DAC e agravo da DP.

Tem sido demonstrado que as citocinas desempenham um papel crítico na patogênese da DAC^[31]. O TNF- α desempenha um papel central na cascata inflamatória, uma característica fundamental na aterosclerose^[32]. Estudos prospectivos sugerem que os níveis elevados de TNF- α são preditores independentes da instalação de doença cardiovascular^[33] e que é também um marcador para a recorrência de eventos coronárias após um infarto prévio do miocárdio (IM)^[34]. Os níveis de TNF- α estão correlacionados com a progressão da aterosclerose precoce na carotídea^[35]. Além disso, estudos em homens

com infarto no miocárdio precoce sugerem que o *TNF- α* também está relacionado com vários fatores de risco comuns para doença coronariana^[36].

Zhang *et al*^[38] através de uma revisão sistemática em várias bases de dados, de 1947 até 2010, identificaram 24 estudos fornecendo dados para 9.921 casos e 944 controles. A análise combinada baseada em OR ajustada por fatores de risco de DAC mostrou que portadores da variante AA do polimorfismo -308 G/A do gene *TNF- α* confere um risco 1,5 vezes maior de desenvolver doença arterial coronariana (AG + AA vs GG, OR = 1,50, IC 95%: 1,23-1,77) na população caucasiana^[38]. Contudo, afirmam que nenhuma associação significativa entre o polimorfismo do gene e o risco de doenças cardiovasculares podem ser encontrados em outros grupos étnicos como em asiáticos, índios ou africanos^[38].

A associação entre o polimorfismo -308 G/A do gene *TNF- α* com a doença arterial coronariana ou infarto agudo do miocárdio, tem apresentado disparidades nos resultados em diferentes etnias. No estudo realizado por Chu *et al.*, foi demonstrado que não há associação entre doença coronariana e infarto agudo com o polimorfismo do gene *TNF- α* -308G/A na população chinesa^[41]. Já no estudo realizado por Konenkov *et al* (2012)^[42], na Rússia, as citocinas, como por exemplo o *TNF- α* , podem ser consideradas um dos fatores genéticos de risco no desenvolvimento de distúrbios na circulação coronariana^[42].

Já o estudo realizado por Koch *et al* (2001)^[44], na Alemanha, que teve como objetivo analisar a relação entre polimorfismos dos genes da *IL -10* e *TNF- α* com o risco de doença arterial coronariana (DAC) e infarto do miocárdio (IM), concluiu que a análise genética não revelou diferenças específicas de grupo para o *TNF- α* - 863C / A e - 308G / A. Além disso, não foi encontrada relação entre as combinações específicas de alelos da *IL -10* e *TNF*, indicativos de baixa produção da *IL-10* e de alta produção de *TNF- α* . A falta de associação persistiu mesmo após o ajuste para outros fatores de risco cardiovascular^[44].

Os resultados que relacionam os polimorfismos das citocinas *TNF- α* e da *IL-10* com a presença e níveis da doença periodontal são ainda controversos na literatura. Erciyas *et al* (2010)^[58] sugerem que o polimorfismo -308 G/A pode estar associado com o desenvolvimento de periodontite agressiva generalizada. Stashenko *et al.*(1991)^[59] mostraram altos níveis de *TNF- α* em tecidos de pacientes com doença periodontal, quando comparados aos de pacientes saudáveis. Já segundo Costa *et al*, 2010^[60], o polimorfismo -308 G/A do gene *TNF- α* não está relacionado ao grau avançado da doença periodontal.

Loo *et al.*(2012)^[61], realizou um estudo utilizando 850 controles periodontalmente saudáveis e 440 pacientes com doença periodontal, e comprovou que havia diferença

estatisticamente significativa para o polimorfismo do *TNF- α* e *IL-10* entre os grupos controles e casos^[61].

HIPÓTESE

Indivíduos que possuem a substituição da Guanina pela Adenina no polimorfismo do *TNF- α* A/G (considerado alto produtor de TNF) são mais propensos a apresentarem pior apresentação da Doença Arterial Coronariana – DAC e doença periodontal mais avançada.

2. OBJETIVO GERAL

Verificar se existe associação do polimorfismo -308 G/A na região promotora do gene *TNF- α* com a gravidade da Doença Arterial Coronariana- DAC e com Doença Periodontal–DP, bem como, determinar qual a prevalência da DP em pacientes portadores da DAC.

2.1.OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.1. Descrever as características clínicas e biológicas dos pacientes com Doença Arterial Coronariana e Doença Periodontal;

2.2. Determinar a frequência da DP em pacientes portadores de DAC.

2.3. Determinar a frequência do polimorfismo -308 do gene *TNF- α* e em pacientes com DAC e DP.

2.4. Verificar se o polimorfismo -308 G/A na região promotora do gene *TNF- α* está associados com a doença periodontal e com a gravidade da doença arterial coronariana.

3. METODOLOGIA

3.1. Desenho do estudo

Estudo de corte transversal de caráter analítico, com comparação de grupos.

3.2. Local e Período de Estudo

Este estudo foi realizado no Pronto Socorro Cardiológico de Pernambuco Prof. Luiz Tavares - PROCAPE e após diagnóstico e coleta de material biológico, as amostras foram processadas e os polimorfismos identificados no Laboratório de Biologia Molecular do Centro de Oncohematologia Pediátrica (CEONHPE/HUOC), no período de outubro de 2012 a novembro de 2013.

3.3. População e Casuística

O plano de recrutamento foi consecutivo. Foram alocados pacientes atendidos no Pronto Socorro Cardiológico de PE Prof. Luiz Tavares - PROCAPE, entre 30 a 65 anos de idade, com diagnóstico de Doença Arterial Coronariana- DAC submetidos à cinecoronariografia. Participaram do estudo 422 pacientes.

3.4. Definição e categorização de variáveis

3.4.1. Variável dependente

3.4.1.1 Alterações periodontais

A determinação clínica do estado periodontal foi feita por exame objetivo em todos os dentes permanentes em oclusão, com exceção dos terceiros molares, através do Índice Periodontal Comunitário – IPC (Apêndice 2).

3.4.1.2 Doença Arterial Coronariana (DAC)

A Doença arterial Coronariana (DAC) foi diagnosticada através de exame de cinecoronariografia. A cinecoronariografia tem o objetivo de definir a presença de lesões obstrutivas e consiste na visualização angiográfica dos vasos coronários após a injeção seletiva de substância contrastante. Para a definição do grau de complexidade da (DAC) foi utilizado o escore Synergy Between PCI With Taxus and Cardiac Surgery SYNTAX[®]. Neste escore a nota final é calculada por aplicativo do software, através da soma das classificações atribuídas a cada lesão arterial presente no mesmo indivíduo.

As informações clínicas foram retiradas dos prontuários. O atendimento no PROCAPE é baseado nas diretrizes da Sociedade Brasileira de Cardiologia [74,75].

Infarto Agudo do Miocárdio (IAM) foi definido na presença de elevação e queda características de CK-MB ou troponina, com pico de, pelo menos, duas vezes o valor máximo de referência, e de sintomas isquêmicos, com duração mínima de 20 minutos e/ou alterações eletrocardiográficas típicas (supra desnivelamento do segmento ST > 0.1 mV em, pelo menos, duas derivações frontais ou > 0.2 mV em, pelo menos, duas derivações precordiais ou aparecimento de ondas Q patológicas).

Angina estável foi definida como a presença de dor retroesternal com duração e aspectos característicos, desencadeada por esforço ou emoção e aliviada com o repouso e/ou nitrato^[74,75].

Foram ainda obtidos dados como índice de massa corporal (IMC), através de informações do peso e altura dos pacientes^[76].

Tabagismo foi definido como o consumo de qualquer quantidade diária de tabaco. Os tabagistas foram excluídos do estudo. Foram alocados no estudo pacientes que cessaram o consumo de tabaco, no mínimo, por um ano antes da realização do exame clínico, tendo sido então considerados ex-fumantes.^[77,85] A OMS reconhece como ex-fumantes indivíduos que pararam de fumar por, pelo menos, seis últimos meses^[79]. Pacientes que nunca fumaram, ou que fumaram continuamente por menos de um mês, foram classificados como não-fumantes.

Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS) foi considerada presente se o paciente estivesse em tratamento farmacológico (anti-hipertensivo) ou apresentasse, pelo menos, duas de três medidas da pressão arterial $\geq 140/90$ mmHg^[80].

Foram considerados diabéticos os pacientes em tratamento medicamentoso (anti-hiperglicemiantes ou insulina) ou aqueles com, pelo menos, duas glicemias de jejum ≥ 126 mg/dl^[76].

3.4.2. Variáveis independentes

3.4.2.1. Gênero

O gênero do paciente foi utilizado como indicador epidemiológico, cada paciente foi classificado como sendo do gênero masculino ou feminino.

3.4.2.2. Perfil sócio demográfico

Foi analisado o perfil sócio demográfico dos pacientes portadores de DAC como: seu grupo étnico, a naturalidade e idade.

3.4.2.5. Polimorfismo do TNF- α

Foram contabilizados e agrupados os tipos de polimorfismos presentes no gene do *TNF α* (-308) nos pacientes estudados. E feito a correlação com as doenças estudadas.

3.5. Definição dos sujeitos/critérios de inclusão e exclusão

3.5.1. Critérios de inclusão

Foram incluídos no estudo pacientes atendidos no Pronto Socorro Cardiológico de PE Prof. Luiz Tavares - PROCAPE, com diagnóstico de Doença Arterial Coronariana-DAC, submetidos à Cinecoronariografia.

3.5.2. Critérios de exclusão

Foram excluídos do estudo:

Pacientes que estavam sendo tratados com agentes anti-fator de necrose tumoral ou com imunossupressores;

Pacientes revascularizados (por já terem removido placas de ateroma anteriormente);

Fora da faixa etária considerada de risco para DAC (entre 30 a 65 anos)

Pacientes edêntulos (por impossibilitar a aplicação do índice);

Pacientes fumantes.

Não brasileiros

3.6. Estratégia de operacionalização da pesquisa

Após admissão do paciente na pesquisa, com assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido – TCLE (Apêndice 1), e obedecendo aos critérios de inclusão supracitados, foram realizados: a) Exame Clínico Periodontal; b) Cálculo do Escore Syntax[®] c) Coleta de material biológico; d) Extração do DNA e f) Determinação do Polimorfismo *TNF- α* (308).

Os resultados dos exames de rotina foram contabilizados: glicemia de jejum para Diabetes Melitos, aferição da pressão arterial, (IMC>30) e TG, CT, HDL, LDL, VLDL, uréia.

3.6.1. Exame clínico Periodontal

O exame clínico foi realizado na enfermaria do PROCAPE, em boas condições de iluminação, com calibração prévia. Os instrumentais utilizados nos exames foram o espelho clínico e sonda periodontal de WHO (World Health Organization). Todos os procedimentos foram realizados seguindo-se as normas de biossegurança; utilização de Equipamento de Proteção Individual (EPI): avental, gorro, máscara, óculos de proteção e luvas descartáveis.

No exame físico intra-oral foi realizada a inspeção da gengiva e demais áreas da mucosa oral, bem como dos dentes, dando ênfase às alterações periodontais. A determinação clínica do estado periodontal foi feita por exame objetivo: Índice Periodontal Comunitário – IPC.

O registro da avaliação periodontal foi feita na ficha clínica (APÊNDICE 2) e foi utilizado a aplicação do seguinte índice:

3.6.1.1. Índice Periodontal Comunitário – IPC

Criado por Ainamo *et al*^[81] em 1982, é um índice periodontal que avalia os indicadores das condições atuais do periodonto: Presença de sangramento gengival, cálculo e bolsa periodontal.

Para realizar o exame foi utilizado a sonda IPC com esfera 0,5 mm na ponta a área anelada em preto situada entre 3,5 e 5,5 mm da ponta. Outras duas marcas na sonda permite identificar distâncias de 8,5 mm e 11,5 mm da ponta do instrumento.

Dentes índices: 16, 11, 26, 36, 31 e 46.

Buscando facilitar a tabulação dos dados encontrados no IPC, estabeleceu-se um critério de diagnóstico sugerido por Pinto^[82], no qual apenas a condição mais grave, ou seja, o escore mais alto do indivíduo, foi levado em consideração. Pelo menos 6 pontos foram examinados em cada um dos 10 dentes-índices, nas superfícies vestibular e lingual,

abrangendo as regiões mesial, média e distal. Os procedimentos de exame foram iniciados pela área disto - vestibular, passando pela área média e por fim, a área mésio – vestibular.

Considerações:

- a) Quando não houve no sextante pelo menos dois dentes remanescentes e não indicados para extração, o sextante foi cancelado.
- b) O tempo de resposta à sondagem da gengiva inflamada é variado. A OMS não define um período de tempo para observação do sangramento à sondagem. A Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo (FSP-USP) recomenda um tempo de observação de 10 a 30 segundos, critério utilizado na maioria dos índices com essa categoria de medida e recomendado também pelos pesquisadores que desenvolveram o IPC.

Códigos:

- 0 – sextante hígido;
- 1 – sextante com sangramento (observado diretamente ou com espelho, após sondagem);
- 2 – cálculo (qualquer quantidade, mas com toda área preta da sonda visível);
- 3 – bolsa de 4 a 5 mm (margem gengival na área preta da sonda visível);
- 4 – bolsa de 6 mm ou mais (área preta da sonda não está visível)
- X – sextante excluído
- 9 – sextante não examinado.

3.6.2. Escore de Syntax[®]

O cálculo do escore Syntax[®] foi realizado por um único hemodinamicista membro do grupo de estudo de forma cega e aleatória. Utilizando a ferramenta do Syntax[®]. Disponível no site <http://www.syntaxscore.com>. Esta ferramenta é utilizada para graduar a complexidade da doença arterial coronária (DAC) e vem sendo empregado para avaliar o grau da doença em pacientes portadores de DAC.

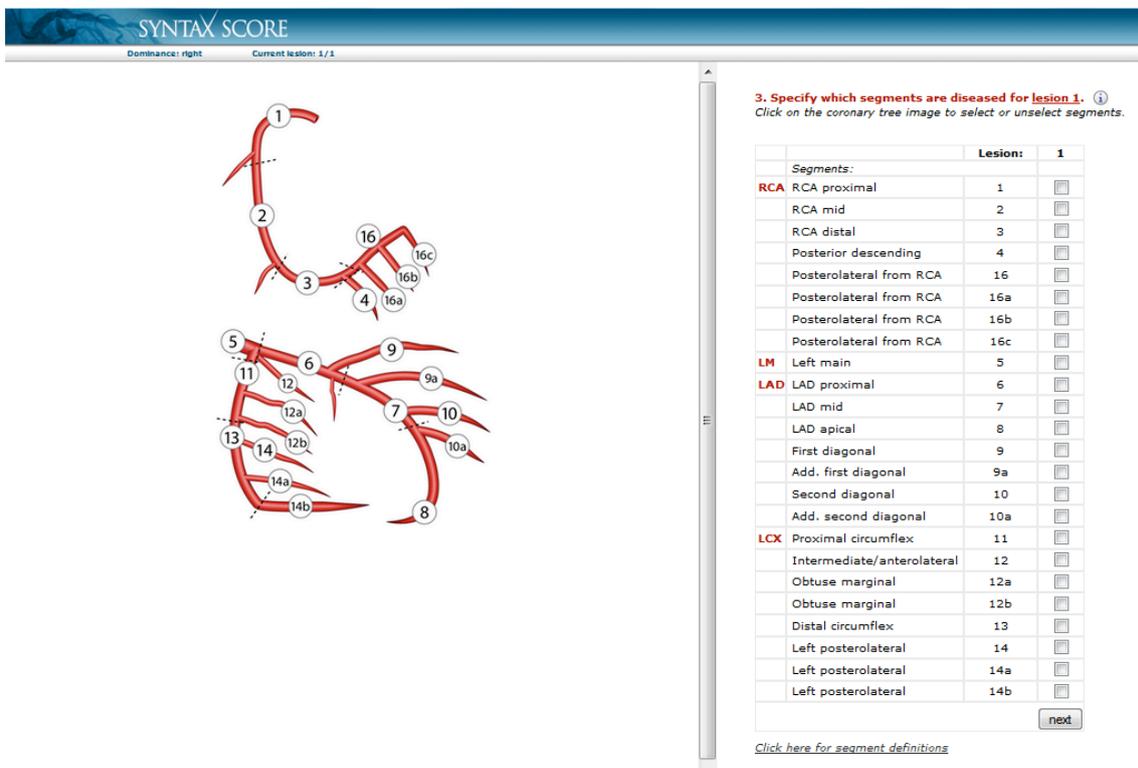


Figura 1. Demonstração da calculadora do Software Syntax Score[®].

O SYNTAX (Synergy Between PCI With Taxus and Cardiac Surgery) Score é calculado analisando 12 perguntas à respeito das características da DAC em cada paciente. As primeiras 3 perguntas determinam onde a DAC está predominantemente localizada (CE ou CD), assim como o número de lesões e de segmentos vasculares envolvidos. As nove perguntas restantes classificam a complexidade de cada lesão significativa ($\geq 50\%$ em vasos de calibre $\geq 1,5\text{mm}$). Isto inclui a informação do comprimento, posição e tortuosidade de cada lesão, e se esta ocorre em bifurcações ou trifurcações. Os fatores tais como a calcificação, trombos e presença de doença difusa ou calibre pequeno dos vasos também são considerados. A soma da classificação individual de cada lesão e seu fator de complexidade é o SYNTAX Score geral do paciente.

O estudo SYNTAX, que deu origem ao escore, comparou desfechos clínicos tardios de pacientes multiarteriais tratados com Intervenção Coronária Percutânea (ICP) com stents liberadores de paclitaxel e a cirurgia de revascularização miocárdica. Com os resultados desfavoráveis à ICP nos pacientes de mais alta complexidade anatômica, confirmou-se a limitação das técnicas intervencionistas nesse cenário [48].

Uma contagem mais elevada do SYNTAX Score indica uma maior dificuldade terapêutica e um grau potencialmente pior a curto e longo prazo. Os intervalos do escore SYNTAX baixo (0 a 22), intermediário (23 a 32) e alto (>33), foram determinados baseado na metodologia de estudos referenciais atuais: (Morice, *et al.* (2010)^[83], Farkouh *et al.* (2012)^[84], Park, *et al.* (2011)^[85], Shiomi, *et al.* (2012)^[86], Serruys, *et al.* (2009)^[87], Head, *et al.* (2012)^[88], Patrick, *et al.* (2009)^[89]).

3.72. Coleta do Material Biológico e Extração do DNA

A coleta da amostra de sangue periférico foi realizada em veia do antebraço e acondicionada em tubo de coleta hematológico, contendo EDTA K3 (ácido etileno diaminotetracético tri-potássico), para posterior extração de material genômico.

3.6.3. Extração De Dna Genômico

A extração do DNA foi realizada por kit de extração de DNA da PROMEGA[®]. De acordo com o protocolo abaixo descrito:

Lise celular: 1. Adicionar 300µl de sangue em tubo (1,5ml) contendo 900µl de Cell Lysis[®] Solution[®]. Inverter o tubo e incubar por 10 min em temperatura ambiente; Inverter uma vez em 5 min; 2. Centrifugar (13000 – 16000x) por 20s. Remover o sobrenadante com micropipeta, deixando o “pellet” com 10-20 µl de resíduo; 3. Utilizar o Vortex para suspender as células brancas; 4. Adicionar 300µl de Nuclei Lysis Solution[®] no tubo e pipetar para cima e para baixo para lisar as células.

Precipitação de proteínas: 1. Adicionar 100µl de Protein Precipitation Solution[®]; 2. Colocar no Vortex em velocidade alta por 20s; 3. Centrifugar (13000 – 16000x) por 3 min, o precipitado de proteína vai formar um pellet marrom escuro.

Precipitação do DNA: 1. Colocar o sobrenadante contendo o DNA em tubo limpo contendo 300µl de isopropanol (100%); 2. Inverter a amostra 50x até o DNA ficar visível.

3. Centrifugar (13000 – 16000x) por min. 4. Tirar o sobrenadante e limpar o tubo com papel absorvente. Adicionar 300µl de etanol (70%). Inverter o tubo para lavar o DNA pellet. 5. Limpar o tubo em papel e secar a amostra por 10-15 min.

Hidratação do DNA: 1. Adicionar 100µl de DNA Hydratation Solution[®] no DNA pellet. 2. Deixar o DNA em temperatura ambiente (alternativamente 65 graus /1hora). 3. Estocar a 2-8 graus celsius.

3.6.7. Determinação do Polimorfismo do *TNF α* (-308 A/G)

A análise do polimorfismo da região promotora do gene *TNF*, na posição -308 (G/A), foi realizada por Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) em tempo real, através da metodologia Taqman Genotyping Assays (ID:C_7514879_10). Para detecção das variáveis polimórficas, utilizou-se a metodologia do PCR em tempo real, através da detecção de mutações (*Single nucleotide polymorphism* - SNP) usando o sistema TAQMAN[®], que consiste de uma técnica que utiliza sondas marcadas com fluorocromos desenhadas especificamente para ser complementar a cadeia de DNA alvo em estudo. O sistema funciona de forma que, uma sonda desenhada é específica para a mutação e outra para o alelo selvagem. A sonda tem em sua estrutura molecular um *Quencher*, que inibe o sinal emitido pelo fluorocromo ou reporter, assim que ocorre o pareamento e hidrólise da sonda pela polimerase. Durante a PCR o composto fluorescente é liberado e a fluorescência captada pela máquina e analisada em um gráfico, sendo desta forma a detecção da mutação é observada. Este tipo de sonda possui uma tecnologia chamada de MGB (*Minor Groove Binder*) a qual tem a capacidade de se ligar na cavidade menor do DNA aumentando a especificidade. Foi utilizado o Rotor Gene 6000[®] (Corbett Research, Austrália).

4. COLETA DE DADOS PLANEJAMENTO DE ANÁLISES

A coleta de dados foi realizada por meio de análise clínica periodontal, análise laboratorial e cálculo do escore de Syntax[®]. Estes dados foram descritos em uma ficha clínica elaborada para o estudo (APÊNDICE2).

Foi explicado ao paciente como seria sua participação na pesquisa além da leitura e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (APÊNDICE 1).

Foi feita a categorização dos diferentes grupos étnicos, e a classificação utilizada foi a utilizada pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), que leva em consideração a auto declaração do indivíduo, ou seja, foi perguntado se o indivíduo considerava-se amarelo, branco, negro, pardo, ou sem registro.

4.1. Análise estatística

As frequências alélicas e genóticas foram estimadas pelo método de contagem gênica análise da hipótese do equilíbrio genético de Hardy-Weinberg e a heterogeneidade entre os pacientes. A existência de associações entre variáveis categóricas foi realizada utilizando o teste de χ^2 .

Foram apresentadas as estatísticas descritivas por meio de frequências para as variáveis categóricas e médias com suas respectivas variações para as variáveis quantitativas. Os testes utilizados na comparação entre os grupos foi o teste de Qui-Quadrado de Pearson na comparação das distribuições de frequência, e o teste t de student na comparação das médias. O teste de normalidade de Komogorov-Smirnov foi aplicado para atender o pressuposto do teste das médias.

Observadas as características que diferiram significativamente entre os grupos, esses fatores foram considerados possíveis confundidores na associação do polimorfismo com os eventos estudados, assim foi aplicado uma regressão logística multivariada para o ajuste da associação pelos fatores elegíveis. A significância adotada no estudo foi de 5% ($p < 0,05$). O software utilizado na análise foi o STATA versão 12.0.

5. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Este trabalho foi aprovado pelo comitê de Ética e Pesquisas, via plataforma Brasil, (CAAE 01721712.0.0000.5192) e esta sendo desenvolvido segundo os princípios éticos da Resolução 196/96 sobre pesquisa envolvendo seres humanos de 10/10/96, onde os pacientes, familiares e responsáveis receberão informações claras e suficientes sobre a natureza e objetivos deste estudo, e só são incluídos no mesmo após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido pelo paciente, familiar e ou responsável (APÊNDICE 1). Os materiais biológicos são utilizados especificamente para os propósitos da pesquisa

ou, quando necessário, para complementar o diagnóstico do paciente. A privacidade dos pacientes é garantida durante e depois de finalizado o estudo. Os resultados da pesquisa serão tornados públicos após a finalização dos estudos propostos.

6. VIABILIDADE FINANCEIRA

Este projeto foi aprovado nos editais: FACEPE 2012 (Pedido de Bolsa de Pós-Graduação – Processo: IBPG-0035-4.02/12) e APQ-FACEPE (edital 15/2012 – Processo: 1243-4.01/12).

7. DISCUSSÃO (ARTIGO)

Associação da Doença Arterial Coronariana com a Doença Periodontal: Papel do polimorfismo do gene *TNF - α* (-308)

Pérola Michelle Vasconcelos Caribé^{*a}, Gustavo Nery da Costa Azevedo^a, Isabela Stephanie Ferreira Ribas^a, Leonardo Santiago Ortigoza^a, Leonardo Viana de Brito^b, Maria Tereza Cartaxo Muniz^{a,c}, Dário Celestino Sobral Filho^{a,b}

a. Universidade de Pernambuco (UPE), Brasil.

b. Pronto Socorro Cardiológico de Pernambuco, Prof. Luiz Tavares (PROCAPE).

c. Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Pernambuco (ICB/UPE)

RESUMO

A Premissa para inter-relação entre Doença Arterial Coronariana (DAC) e a Doença Periodontal (DP) é o processo inflamatório, que promove proteção aos tecidos, restringindo os danos no local da infecção ou injúria, mas possui efeitos deletérios quando de forma exacerbada. O $TNF-\alpha$ participa da aceleração da aterogênese por meio da indução da expressão de VCAM-1, ICAM-1, MCP-1 e E-selectina. Também reduz a biodisponibilidade do óxido nítrico nas células endoteliais e prejudica a vasodilatação endotélio-dependente, promovendo disfunção endotelial. Além disso, provoca a apoptose nas células endoteliais, contribuindo para a injúria endotelial. O objetivo deste trabalho é verificar a existência da associação entre a gravidade da Doença Arterial Coronariana (DAC), a Doença Periodontal (PD) e o papel do polimorfismo na região promotora do gene *TNF α* (-308). Participaram do estudo 422 pacientes com DAC, submetidos a cinecoronariografia, destes 206 apresentaram DP + DAC e 216 apenas DAC. Não houve associação significativa entre a gravidade da DAC, estratificada pelo Escore SINTAX, e a DP. ($p>0,05$). O polimorfismo na região promotora do gene *TNF α* (-308) esta fortemente associado à DP (OR = 4,01, 95% IC:2,25 – 7,18) e não está associado a gravidade da DAC.

Descritores: Doença da Artéria Coronariana, Doenças periodontais, polimorfismos Genético.

1. Endereço para Correspondência:
Rua Deputado Laercio Corte, 340. 05706-290 São Paulo – SP
Email: perolamichelle@hotmail.com
Artigo Aceito em

INTRODUÇÃO

A reação inflamatória é o mecanismo fisiopatológico básico em resposta a diversas doenças, sendo representada por um conjunto de reações locais e gerais do organismo^[1]. A presença de mediadores químicos no processo inflamatório faz com que a inflamação mantenha características uniformes, mesmo sendo produzida por diferentes irritantes, sendo que o aumento da permeabilidade vascular pode ser originado de mecanismos diretos, em que o próprio agente agressor atua sobre a parede vascular ou indiretos em que há ação de mediadores químicos^[2].

Por muitos anos, a fisiopatologia da Doença Arterial Coronariana (DAC) era considerada meramente um acúmulo de lipídios na parede arterial. No entanto, nas últimas duas décadas, o crescente desenvolvimento no campo da biologia vascular tem esclarecido que as lesões ateroscleróticas são de fato uma série de respostas celulares e moleculares altamente específicas e dinâmicas, essencialmente inflamatórias por natureza^[3,4].

A reação inflamatória/proliferativa na parede vascular aumenta a secreção de citocinas pró-inflamatórias primárias, como a interleucina (IL1) e o fator de necrose tumoral Alfa (TNF α). Elas são responsáveis pela expressão de moléculas de adesão leucocitária, pela molécula de adesão intercelular (ICAM)-1 e P-, E-, L-selectinas e pelo aumento de substâncias quimiotáticas (proteína quimiotática de monócitos [MCP]-1 e fator estimulador de colônia de macrófagos [M-CSF], ambas amplificadoras da cascata inflamatória)^[5,6].

O TNF- α participa da aceleração da aterogênese por meio da indução da expressão de VCAM-1, ICAM-1, MCP-1 e E-selectina. Também reduz a biodisponibilidade do óxido nítrico nas células endoteliais e prejudica a vasodilatação endotélio-dependente, promovendo disfunção endotelial. Além disso, provoca a apoptose nas células endoteliais, contribuindo para a injúria endotelial^[7].

A Doença Periodontal conduz ao aumento de mediadores inflamatórios que promovem inflamação crônica endotelial (manifestada por meio da elevação da Proteína C Reativa - PCR), sugerindo que o processo inflamatório possa contribuir para vasoespasmo e trombose^[8]. Assim, marcadores de inflamação sistêmica estão elevados e apresentam redução após tratamento específico da DP, o que pode ser observado na melhora da disfunção endotelial associada à redução dos níveis de PCR. Dessa forma, quanto mais disseminada a infecção pelos tecidos de sustentação dentária, maior a área de exposição ao sistema vascular^[8].

METODOLOGIA

Estudo de corte transversal de caráter analítico, com comparação de grupos. O plano de recrutamento foi consecutivo. Foram alocados 422 pacientes atendidos no Pronto Socorro Cardiológico de PE Prof. Luiz Tavares - PROCAPE, com idade entre 30 a 65 anos, com diagnóstico de Doença Arterial Coronariana (DAC) submetidos à cinecoronariografia. A determinação clínica do estado periodontal foi feita por exame objetivo em todos os dentes permanentes em oclusão, com exceção dos terceiros molares através do Índice Periodontal Comunitário (IPC). Para realizar o exame periodontal foi utilizada a sonda IPC com esfera 0,5 mm na ponta e área anelada em preto situada entre 3,5 e 5,5 mm da ponta. Para definição do grau de complexidade da (DAC) foi utilizado o cálculo do escore SYNTAX realizado por um único hemodinamicista, membro do grupo de estudo, de forma cega e aleatória. Os intervalos do escore SYNTAX foram determinados baseados na metodologia de estudos referenciais, sendo considerado escore baixo de (0 a 22), intermediário de (23 a 32) e alto (>33).

Foram excluídos do estudo pacientes que estavam sendo tratados com agentes anti-fator de necrose tumoral ou com imunossupressores; pacientes revascularizados (por já terem removido placas de ateroma anteriormente); edêntulos (por impossibilitar a aplicação do índice); fumantes, não brasileiros e fora da faixa etária considerada de risco para a DAC, entre 30 e 65 anos.

A coleta da amostra de sangue periférico foi realizada em veia do antebraço e acondicionada em tubo de coleta hematológico, contendo EDTA K3 (ácido etileno diaminotetracético tri-potássico). A extração do DNA foi realizada por kit de extração de DNA da PROMEGA[®] de acordo com o protocolo estabelecido pelo fabricante. A análise do polimorfismo da região promotora do gene *TNF*, na posição -308 (G/A), foi realizada por PCR em tempo real, através da metodologia Taqman Genotyping Assays (ID: C_7514879_10).

As frequências alélicas e genóticas foram estimadas pelo método de contagem gênica, análise da hipótese do equilíbrio genético de Hardy-Weinberg e a heterogeneidade entre os pacientes. A existência de associações entre variáveis categóricas foi realizada utilizando o teste de χ^2 de Pearson na comparação das distribuições de frequência, e o teste t de student na comparação das médias. Foi aplicado o teste de normalidade de Komogorov-Smirnov. Foi aplicada uma regressão logística multivariada para o ajuste da associação pelos fatores elegíveis. A significância adotada no estudo foi de 5% ($p < 0,05$).

O software utilizado na análise foi o STATA versão 12.0. Este trabalho foi aprovado pelo comitê de Ética e Pesquisas, via plataforma Brasil, (CAAE 01721712.0.0000.5192).

RESULTADOS

A amostra encontra-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Participaram do estudo 422 pacientes com DAC, destes 206 apresentaram doença periodontal, o que corresponde a uma prevalência de 48,8% (44,0 – 53,6) (tabela 1). A média de idade dos pacientes foi de 56,3 anos, a maioria do sexo masculino (60,2%). Todos os 422 pacientes declararam-se ser brasileiros, filhos e netos de brasileiros. Quanto aos antecedentes clínicos, 23,3% eram ex-tabagistas, a frequência de diabéticos foi de 32,5%, de hipertensos foi de 70,1%, a prevalência de insuficiência renal entre os pacientes com DAC foi de 5,5%, enquanto que 1/3 dos pacientes apresentavam dislipidemia. Apenas 2,4% dos pacientes apresentavam infecções sistêmicas. 17,8% dos pacientes eram obesos, destes 12,8% apresentavam grau I e 5% apresentavam grau II e III de obesidade.

Comparando os grupos com e sem DP aos fatores biológicos, não houve diferença estatística significativa ($p > 0,05$) em nenhum dos fatores (tabela 2). Observou-se diferença significativa em relação ao tabagismo, pois, diferentemente do grupo que nunca fumou, houve uma maior frequência de ex-tabagistas (29,1%) no grupo com doença periodontal, quando comparado ao grupo sem doença periodontal (17,7%), sendo um fator que foi controlado, com análise multivariada, na associação da doença periodontal com o polimorfismo, da mesma forma com a idade, por ser um fator biológico importante a ser controlado no estudo de doenças crônicas, e o risco da doença cardiovascular que obteve uma associação limítrofe ($p < 0,20$). 64% dos pacientes tem síndrome coronariana crônica. Quanto ao score do Syntax, 91,9% apresentavam escore baixo ou mínimo (0 a 22); 7,1% apresentavam escore intermediário (23 a 33); e apenas 1% escore alto (>33). Não houve diferença estatisticamente significativa quando comparados o escore do Syntax da DAC entre os pacientes com e sem PD.

A frequência do polimorfismo na região promotora do gene *TNF- α* (- 308) está fortemente associada com a DP (OR= 4,01, IC 95%, 2,25 – 7,18, $p < 0,001$), risco esse independente da idade, condição de tabagismo e classificação de gravidade da DAC (Tabela 3). Não houve significância estatística na associação da gravidade da DAC e a

presença do polimorfismo, foi observado uma frequência semelhante do polimorfismo no grupos com Score SINTAX baixo e intermediário/alto (tabela 4). A associação foi ajustada segundo as variáveis que tiveram diferença estatística significativa quando comparados os grupos com escore SYNTAX baixo e escore SYNTAX intermediário/alto, apresentando diferença significativa a idade e sexo entre os fatores biológicos e condição de diabetes e dislipidemia entre os fatores relacionados aos antecedentes clínicos (Tabela 5).

DISCUSSÃO

As observações em nosso estudo confirmam semelhantes resultados com o trabalho de Mujapara *et al* (2009)^[9] que demonstra a prevalência do gênero masculino na doença arterial coronariana (3:1) e média de idade entre os 40-60 anos. Em nosso trabalho a média de idade foi de 56,3 anos, com (60,2%).do gênero masculino.

No presente estudo não houve diferença estatística quando comparados os escores SYNTAX da DAC entre os pacientes com e sem doença periodontal (tabela 2). Alguns autores alertam que a relação entre a doença arterial coronariana e a doença periodontal pode ser confundida com fatores de risco comuns entre ambas, tais como fatores ambientais (tabagismo, diabetes, estresse) e alterações da resposta imune^[10]. Outros pesquisadores acreditam que a doença periodontal tem ligação com as seguintes doenças sistêmicas: doenças cardiovasculares^[11-13], diabete mellitus^[14, 15], artrite reumatóide^[16, 17], obesidade^[18, 19] e a carcinogênese^[17].

Nosso estudo corrobora o de Carin, *et al* (2013)^[20] que avaliaram a condição periodontal em 161 pacientes com DAC e 162 controles, sem história de DAC. Oito anos depois, reexaminaram 126 pacientes com DAC e 121 controles e concluíram que não foram encontradas correlações significativas entre os pacientes com ou sem DAC com a DP.

Os resultados encontrados por Resh *et al* (2007)^[21] diferem do nosso, eles analisaram a relação entre a DP e Síndrome Coronariana Aguda (SCA) para averiguar a associação entre a DP e periodontite em pacientes com SCA, com uma amostra de 115 pacientes, concluíram que houve associação independente entre periodontite (forma mais grave da DP) e SCA.^[21] Da mesma forma o estudo realizado por Emingil *et al.* (2000)^[22] sugere que a presença de DP induziria uma resposta inflamatória sistêmica, resultando em níveis séricos elevados de marcadores inflamatórios como o TNF- α , as interleucinas e a PCR, creditando a esses a possibilidade de instabilização de lesões ateroscleróticas e

eventos ateroscleróticos^[23,24]. Entretanto, são limitadas e discutíveis as evidências que relacionam de maneira conclusiva esses fenômenos^[25,26].

Há que considerar que tanto a DAC quanto a DP são doenças multifatoriais, sendo a análise detalhada dos resultados obtidos, considerando a prevalência de outros fatores de riscos nos grupos de DAC, importante de ser considerada. Estudos publicados demonstram que aproximadamente 70% dos pacientes com síndrome coronariana Aguda fatais e não-fatais são tabagistas^[22,27]. Em nosso estudo, mesmo com a exclusão dos tabagistas observou-se que, entre os grupos (não fumante, e ex-tabagistas), houve diferença significativa em relação ao tabagismo, pois, diferentemente do grupo que nunca fumou, houve uma maior frequência de ex-tabagistas (29,1%) no grupo com doença periodontal, quando comparado ao grupo sem doença periodontal (17,7%).

O escore SYNTAX variou de até 52,5 pontos, houve predomínio de pacientes com escore SYNTAX baixo (0 a 22) 91,9%, enquanto que 7,1% apresentavam escore intermediário (23 a 32) e apenas 1% escore alto (>33) para a doença coronariana. Nosso resultados corroboram o estudo de Barbosa, *et al* (2012)^[28] eles avaliaram o impacto do escore SYNTAX na estratificação de risco após intervenção coronária percutânea - (IPC) em pacientes não-selecionados e encontraram que 222 (94,8%) pacientes tiveram escore baixo (0 a 22), 11 pacientes (4,7%) tiveram escore SYNTAX intermediário, e somente 1 paciente (0,4%) teve escore SYNTAX elevado, concluindo que o escore SYNTAX é útil em prever a ocorrência de eventos cardíacos adversos maiores - (ECAM) em pacientes pós-ICP tratados na prática clínica diária.

A ferramenta do Syntax foi criada para auxiliar na escolha do tipo de tratamento escolhido para tratar a DAC, mas devido a eficácia desse escore na segregação de gravidade da DAC, alguns estudos^[29, 30, 31] já o utilizam para correlacionar a gravidade da DAC com outras doenças, o estudo de Abali *et al* (2013)^[29], por exemplo, utilizou o escore SYNTAX para avaliar relação entre volume médio de plaquetas (MVP) e a severidade da aterosclerose coronária em pacientes com diabetes mellitus (DM) e CAD. Da mesma forma o estudo de Altun, *et. al* (2013)^[31] examinou a associação entre a alta troponina T sensível (hs- TNT) e de neutrófilos à relação de linfócitos (NLR) e a complexidade da síndrome coronariana aguda (SCA) avaliada por SYNTAX Score e encontrou que hs-TNT e NLR foram significativamente correlacionados com a severidade angiográfica da SCA. Nesse estudo os autores encontraram no escore Syntax alto (>32) um grande número de pacientes (n = 45), talvez porque sua amostra (n = 287) foi composta por 215 (75%) pacientes do gênero masculino.

Em nosso estudo não houve diferença significativa, estatisticamente, quando comparados o escore SYNTAX da DAC entre os pacientes com e sem Doença Periodontal. Não há na literatura estudos que relacionem a DAC com a doença periodontal utilizando o escore SYNTAX. Griva, *et. al* (2010)^[32] avaliou a associação entre o nível de alguns marcadores circulantes e a extensão da DAC, eles estudaram 128 pacientes com formas estáveis de doença coronária. Os marcadores MCP-1, MMP-3, sCD40L e sTNFR2 foram medidos por ELISA e a classificação angiografia coronária foi realizada utilizando o escore SYNTAX. A MMP-3 foi o único marcador dos estudados que obteve significância estatística quando relacionado com os resultados do SINTAX Score. É necessário observar também que nesse estudo^[32] os autores não utilizaram os intervalos do SINTAX Score preconizados na literatura e utilizados por Morice, *et. al.* (2010)^[33], Farkouh *et. al.* (2012)^[34], Park, *et al.* (2011)^[35], Shiomi, *et al* (2012)^[46], Serruys, *et. al* (2009)^[37], Head, *et. al* (2012)^[38] e Patrick, *et al* (2009)^[39]. Eles dividiram a amostra em dois grupos, um com o escore SYNTAX > 0, e outro com o escore SYNTAX = 0.

Só é possível estimar a frequência do polimorfismo da região promotora do gene *TNF- α* (-308) através do grupo controle de estudos do polimorfismo do *TNF- α* realizados em população brasileira, pois no banco de dados do NCBI não há referências da frequência desse polimorfismo em brasileiros (SPN for: rs 1800629). Sabe-se que a frequência genótipo AA na região promotora do gene *TNF- α* (308) fica em torno de 0,01 (1%) em Europeus e cerca de 0,03 (3%) em Asiáticos. Isso explica a necessidade de estudos com grande amostra populacional para fazer associações com esse polimorfismo.

Na análise da associação da gravidade da DAC e a presença do polimorfismo não houve significância estatística, onde se observa uma frequência semelhante do polimorfismo quando comparados os grupos de pacientes com SYNTAX baixo (0 a 22) e os pacientes com escore SYNTAX intermediário (23a33)/alto(>33) (tabela 5). Esses resultados não corroboram a meta análise realizada por Zhang, *et al* (2011)^[40] que mostrou que o portador do polimorfismo do gene *TNF- α* conferiu 1,5 vezes maior risco de desenvolvimento de doença arterial coronariana (+ AA AG vs GG , OR = 1,50, 95% CI: 1,23-1,77) na população caucasiana .

A presença do polimorfismo na região promotora do gene *TNF- α* (-308) é fortemente associada com a Doença Periodontal (p<0,001) (Tabela 3). Estatisticamente (OR = 4,01, 95% IC :2,25 – 7,18) a presença do polimorfismo confere uma chance 4,01 vezes maior de o indivíduo brasileiro desenvolver DP, risco esse independente da idade, condição de tabagismo e classificação da gravidade da DAC. Contudo, é necessário cautela

com essa afirmação, pois o TNF- α e a genética, no geral, são apenas partes integrantes de uma série de fatores que conduzem a DP, mas tem demonstrado ser parcela relevante.

Nossos resultados são semelhantes ao estudo de Trombone *et al* (2009) ^[41] que investigaram os efeitos do polimorfismo do gene *TNF- α* (308G/A) e de periodontopatógenos nos tecidos periodontias de pacientes com periodontite crônica (n = 127) e no controle (n = 177). Eles encontraram que o polimorfismo do *TNF- α* esta independentemente associado com aumento dos níveis de TNF- α em tecidos doentes com periodontite crônica e, por conseguinte, estão potencialmente envolvidos na determinação da doença periodontal ^[41].

Song *et al* (2013) ^[42] realizaram uma meta análise com o objetivo de determinar se o polimorfismo do *TNF- α* (-308 A/G) e da interleucina -6 (IL-6) conferem susceptibilidade a periodontite em diferentes populações, e encontraram resultados semelhantes ao do nosso estudo, ele concluíram que o alelo A no polimorfismo do *TNF- α* (-308) foi associado a periodontite em populações brasileiras, asiáticas e turcas (OR = 0,637, IC de 95% = 0,447-0,907 , p = 0,013 ; OR = 0,403 , 95 % IC = 0,204-0,707 , p = 0,009 ; OR = 1.818 , 95 , IC % = 1,036-3,189 , p = 0,037). O polimorfismo do gene *IL - 6* (-572G/C) pode estar associado com susceptibilidade à periodontite em europeus.

Já o estudo de Moreira *et al*(2009) ^[43], não corrobora o nosso estudo, eles investigaram a associação entre os polimorfismos genéticos da *IL10* (-1082) e *TNF- α* (-308) com diferentes formas clínicas ou severidade da periodontite em três grupos: com periodontite agressiva (PA, n=55), periodontite crônica (PC, n=67) e grupo controle (C, n=43). Concluíram que os polimorfismos na região promotora do gene *IL10* e *TNF* investigados não estão associadas a diferentes formas clínicas de periodontite ou com a gravidade da doença nos polimorfismos populacionais brasileiros.

TABELAS

Tabela 1. Prevalência de doença periodontal, gravidade da doença coronariana e polimorfismo na região promotora – 308 do gene TNF- α na população de pacientes com Doença Arterial Coronariana.

Variáveis	Número de pacientes (n = 422)	Prevalência (%)	Intervalo de confiança (95%)
Doença periodontal			
Presença	206	48,8	44,0 – 53,6
Ausência	216	51,2	46,4 – 56,0
Risco da doença coronariana*			
Baixo	387	91,9	89,3 – 94,5
Intermediário	30	7,1	4,7 – 9,6
Elevado	4	1,0	0,02 – 1,9
Polimorfismo gene TNF-α			
AA	3	0,7	0,0 – 1,5
AG	79	18,7	15,0 – 22,5
GG	340	80,6	76,8 – 84,3

Análise descritiva dos pacientes.

Tabela 2. Caracterização dos pacientes segundo a condição de Doença Periodontal (DP) na população de pacientes com Doença Arterial Coronariana (DAC)

Características	Todos os pacientes	Com doença periodontal	Sem doença periodontal	p-valor
Número de pacientes	422	206	216	-
Biológicas				
Idade (média \pm dp)	56,3 \pm 8,3	56,8 \pm 7,8	55,8 \pm 8,7	0,217
Sexo				
Feminino	168 (39,8%)	79 (38,3%)	89 (41,2%)	0,549
Masculino	254 (60,2%)	127 (61,7%)	127 (58,8%)	
Etnia				
Branco	211 (50,0%)	98 (47,6%)	113 (52,3%)	0,372
Pardo	132 (31,3%)	64 (31,5%)	68 (31,5%)	
Negro	79 (18,7%)	44 (21,4%)	35 (16,2%)	
Antecedentes clínicos				
Tabagismo				
Ex-tabagista	98 (23,3%)	60 (29,1%)	38 (17,7%)	0,005 [†]
Não tabagista	323 (76,7%)	146 (70,9%)	177 (82,3%)	
Diabetes				
Sim	137 (32,5%)	70 (34,0%)	67 (31,0%)	0,516
Não	285 (77,5%)	136 (66,0%)	149 (69,0%)	
Hipertensão				
Sim	296 (70,1%)	147 (71,4%)	149 (69,0%)	0,594
Não	126 (29,9%)	59 (28,6%)	67 (31,0%)	
Insuficiência renal				
Sim	23 (5,5%)	10 (4,8%)	13 (6,0%)	0,598
Não	399 (94,5%)	196 (95,2%)	203 (94,0%)	
Dislipidemia				
Sim	142 (33,6%)	73 (35,4%)	69 (31,9%)	0,448
Não	280 (66,4%)	133 (64,6%)	147 (68,1%)	
Infecções sistêmicas				

Sim	10 (2,4%)	6 (2,9%)	4 (1,8%)	0,474
Não	412 (97,6%)	200 (97,1%)	212 (98,2%)	
Obesidade				
Não	347 (82,2%)	165 (80,1%)	182 (84,3%)	0,460
Sim				
Grau I	54 (12,8%)	29 (14,1%)	25 (11,6%)	
Grau II	10 (2,4%)	7 (3,4%)	3 (1,4%)	
Grau III	11 (2,6%)	5 (2,4%)	6 (2,8%)	
Relacionada a DAC				
Síndrome coronariana				
Aguda	152 (36,0%)	70 (34,0%)	82 (38,0%)	0,394
Crônica	270 (64,0%)	136 (66,0%)	134 (62,0%)	
Risco da doença coronariana				
Baixo	387 (91,9%)	187 (91,2%)	200 (92,6%)	0,117
Intermediário	30 (7,1%)	14 (6,8%)	16 (7,4%)	
Elevado	4 (1,0%)	4 (2,0%)	0 (-)	

† Associação estatisticamente significativa ($p < 0,05$)

Tabela 3. Associação de doença periodontal com o polimorfismo na região promotora – 308 do gene TNF- α na população de pacientes com Doença Arterial Coronariana.

Polimorfismo	Com doença periodontal	Sem doença periodontal	OR (IC(95%))	OR (IC(95%))*
Região promotora – 308				
GG	145 (70,4%)	195 (90,3%)	1,0	1,0
AG	59 (28,6%)	20 (9,3%)	3,97 (2,29 – 6,88) $p < 0,001$	4,04 (2,23 – 7,29) $p < 0,001$
AA	2 (1,0%)	1 (0,5%)	2,69 (0,24 – 29,9) $p = 0,421$	2,54 (0,19 – 34,3) $p = 0,483$
AA/AG	61 (29,6%)	21 (9,7%)	3,91 (2,27 – 6,71) $p < 0,001$	4,01 (2,25 – 7,18) $P < 0,001$

* Associação ajustada por idade, tabagismo, e escore da Doença Arterial Coronariana - DAC

Tabela 4. Associação de Doença Arterial Coronariana com o polimorfismo na região promotora – 308 do gene TNF- α

Polimorfismo	Risco intermediário /elevado	Baixo risco	OR (IC(95%))	OR (IC(95%))*
Região promotora – 308				
GG	27 (79,4%)	313 (80,6%)	1,0	1,0
AG	7 (20,6%)	72 (18,6%)	1,13 (0,47 – 2,70) $p = 0,788$	1,48 (0,59 – 3,71) $p = 0,399$
AA	0 (-)	3 (0,8%)	Não calculado	Não calculado
AA/AG	7 (20,6%)	75 (19,4%)	1,08 (0,45 – 2,57) $p = 0,865$	1,36 (0,55 – 3,39) $p = 0,505$

* Associação ajustada por idade, sexo, condição de diabetes e dislipidemia

Tabela 5. Caracterização dos pacientes segundo Scores SINTAX.

Características	Todos os pacientes	Score Syntax intermediário/elevado (23 a 33) / (>33)	Score Syntax Baixo risco (0 a 22)	p-valor
Número de pacientes	422	35	387	-
Biológicas				
Idade (média ± dp)	56,3 ± 8,3	60,1 ± 7,0	55,9 ± 8,4	0,005 [†]
Sexo				
Feminino	168 (39,8%)	7 (20,6%)	161 (41,6%)	0,016 [†]
Masculino	254 (60,2%)	27 (79,4%)	226 (58,4%)	
Etnia				
Branco	211 (50,0%)	20 (58,8%)	190 (49,1%)	0,449
Pardo	132 (31,3%)	10 (29,4%)	122 (31,5%)	
Negro	79 (18,7%)	4 (11,8%)	75 (19,4%)	
Antecedentes clínicos				
Tabagismo				
Sim	98 (23,3%)	9 (26,5%)	88 (22,8%)	0,626
Não	324 (76,7%)	25 (73,5%)	298 (77,2%)	
Diabetes				
Sim	137 (32,5%)	19 (55,9%)	117 (30,2%)	0,002 [†]
Não	285 (77,5%)	15 (44,1%)	270 (69,8%)	
Hipertensão				
Sim	296 (70,1%)	23 (67,5%)	272 (70,3%)	0,747
Não	126 (29,9%)	11 (32,5%)	115 (29,7%)	
Insuficiência renal				
Sim	23 (5,5%)	1 (2,9%)	22 (5,7%)	0,500
Não	399 (94,5%)	33 (97,1%)	365 (94,3%)	
Dislipidemia				
Sim	142 (33,6%)	17 (50,0%)	124 (32,0%)	0,033 [†]
Não	280 (66,4%)	17 (50,0%)	263 (68,0%)	
Infecções sistêmicas				
Sim	10 (2,4%)	1 (2,9%)	9 (2,3%)	0,821
Não	412 (97,6%)	33 (97,1%)	378 (97,7%)	
Obesidade				
Não	347 (82,2%)	31 (91,2%)	315 (81,4%)	0,109
Sim				
Grau I	54 (12,8%)	1 (2,9%)	53 (13,7%)	
Grau II	10 (2,4%)	2 (5,9%)	8 (2,1%)	
Grau III	11 (2,6%)	0 (-)	11 (2,8%)	
Relacionada a DAC				
Síndrome coronariana				
Aguda	152 (36,0%)	11 (32,3%)	141 (36,4%)	0,635
Crônica	270 (64,0%)	23 (67,7%)	246 (73,6%)	

[†] Associação estatisticamente significante (p < 0,05)

REFERÊNCIAS

1. Hausmann E, Raisz LG, Miller WA. Endotoxin: simulation of bone resorption in tissue culture. *Science* 1970; 168:862-864.
2. Rang, HP. et al. *Farmacologia*. 6.ed. São Paulo: Elsevier, 2007.920p.
3. Rocha VZ, Libby P. Obesity, inflammation, and atherosclerosis. *Nat RevCardiol*. 2009; 6 (6): 399-409.
4. Serrano CV Jr, Souza JA, Paiva MSMO. Fatores desencadeantes da instabilização da placa aterosclerótica. *RevSocCardiol Estado de São Paulo*. 2001; 4: 724-32
5. Fernandes JL, Soeiro A, Ferreira CB, Serrano CV Jr. Síndromes coronárias agudas e inflamação. *RevSocCardiol Estado de São Paulo*. 2006; 3: 178-87.
6. Serrano CV Jr, Souza JA, Heinisch RH. A agressão vascular no desencadeamento das síndromes isquêmicas miocárdicas instáveis. In: Nicolau JC, Marin JA. (eds.). *Síndromes isquêmicas miocárdicas instáveis*. São Paulo: Atheneu; 2001. p. 25-36.
7. Hotamisligil G, Arner P, Caro JF, Atkinson RL, Spiegelman BM. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance. *J Clin Invest*. 1995; 95: 2409-15.
8. Inoue K, Kobayashi Y, Hanamura H, Toyokawa S. Association of periodontitis with increased white blood cell count and blood pressure. *Blood Press*. 2005;14(1):53-8.
9. Mujapara AK, Gupta G, Gupta N, Trivedi S, Patil P, Gupta M., Jhadav A., Vamsi K.K. Khairnar Y., Boraste A, Joshi B. Factors affecting coronary arterial disease, comparative study in male vs female *International Journal of Pharmaceuticals Analysis*. 2009; (1)2:37-39.
10. Kuo LC, Polson AM, Kang T. Associations between periodontal diseases and systemic diseases: a review of the inter-relationships and interactions with diabetes, respiratory diseases, cardiovascular diseases and osteoporosis. *Public Health*. 2008 Apr;122(4):417-33.
11. Paquette DW, Brodala N, Nichols TC. Cardiovascular disease, inflammation, and periodontal infection. *Periodontol 2000*. 2007;44:113-26.
12. Beck JD, Offenbacher S. Relationships among clinical measures of periodontal disease and their associations with systemic markers. *Ann Periodontol*. 2002 Dec;7(1):79-89.
13. Fardi A, Papadimitriou D. Periodontal and atherosclerosis-induced diseases. *Int Angiol*. 2007 Sep;26(3):197-205.
14. Herring ME, Shah SK. Periodontal disease and control of diabetes mellitus. *J Am Osteopath Assoc*. 2006 Jul;106(7):416-21.
15. Preshaw PM, Foster N, Taylor JJ. Cross-susceptibility between periodontal disease and type 2 diabetes mellitus: an immunobiological perspective. *Periodontol 2000*. 2007;45:138-57.
16. Pischon N, Pischon T, Kröger J, et al. Association among rheumatoid arthritis, oral hygiene, and periodontitis. *J Periodontol*. 2008 Jun;79(6):979-86.
17. Soory M. Chronic periodontitis as a risk Marker for Systemic Diseases with reference to cardiometabolic disorders: common pathways in their progression. *Immunol Immunogenet Insights*. 2010;2:7-21.
18. Ritchie CS. Obesity and periodontal disease. *Periodontol 2000*. 2007;44:154-63.
19. Dias RB, Almeida MOS, Ribeiro EP, et al. Estudo da Obesidade como indicador de risco para doença periodontal. *Braz.J Periodontol* 2011 Jun 21;02: 70-8.
20. Carin SJ, Nils R, Christos P, Arina . Periodontitis in Patients With Coronary Artery Disease: An 8-year Follow-up. *Journal of Periodontology* May 2013.(31).
21. Rech RL, Nurkin N, Cruz I, Sostizzo F, Baião C, Perrone JA, Wainstein R, Pretto D, Manenti ERF, Bodanese LC. Association between Periodontal Disease and Acute Coronary Syndrome. *Arq Bras Cardiol* 2007; 88(2) : 185-190.
22. Emingil G, Buduweli E, Aliyeu A. Association between periodontal disease and acute myocardial infarction. *J Periodontol*. 2000; 71: 1882-6.

23. Szmítko PE, Wang CH, Weisel RD, de Almeida JR, Anderson TJ, Verma S. New markers of inflammation and endothelium cell activation. Part 1. *Circulation*. 2003; 108: 1917-23.
24. Szmítko PE, Wang CH, Weisel RD, Jeffries GA, Anderson TJ, Verma S. Biomarkers of vascular disease linking inflammation to endothelium activation. Part 2. *Circulation*. 2003; 108: 2041-8.
25. Hujoel PP, Draughholt M, Spiekerman C. Periodontal disease and coronary heart disease risk. *JAMA*. 2000; 284: 1406-10.
26. Hung HC, Willett W, Joshipura KJ, Merchant A, Rosner BA, Ascherio A. Oral health and peripheral arterial disease. *Circulation*. 2003; 107: 1152-7. Jonas MA, Oates JA, Ockene JK, Hennekens CH. Statement on smoking and cardiovascular disease for health care professionals. AHA Medical / Scientific Statement. *Circulation*. 1992; 86: 1664-9.
27. Jonas MA, Oates JA, Ockene JK, Hennekens CH. Statement on smoking and cardiovascular disease for health care professionals. AHA Medical / Scientific T.
28. Barbosa RR, Costa Jr. JR, Feres F, Abizaid A, Costa RA, Impacto do Escore SYNTAX na Estratificação de Risco após Intervenção Coronária Percutânea em Pacientes Não-Selecionados Escore SYNTAX na Estratificação de Risco Pós-ICP. *Rev Bras Cardiol Invasiva*. 2012, Impacto do Escore SYNTAX na Estratificação de Risco após Intervenção Coronária Percutânea em Pacientes Não-Selecionados.
29. Abalı G, Akpınar O, Söylemez N. Correlation of the Coronary Severity Scores and Mean Platelet Volume in Diabetes Mellitus. *Advances in Therapy* December 2013.
30. Al-Musalhi KH, Nair DR. Re: Lipoprotein(a) and SYNTAX Score Association with Severity of Coronary Artery Atherosclerosis in North India. *Sultan Qaboos Univ Med J*. 2013 Aug;13(3):465.
31. Altun B, Turkon H, Tasolar H, Beggı H, Altun M, Temız A, Gazı E, Barutcu A, Bekler A, Colkesen Y, Scand J. The relationship between high-sensitive troponin T, neutrophil lymphocyte ratio and SYNTAX Score. *Clin Lab Invest*. Dec 2013.
32. Griva M., Naplava R, Spendlikova M, Jarkovsky J, Hlinomaz O., Cihalik C., POTENTIAL Role of Selected Biomarkers For Predicting The Presence And Extent of Coronary Artery Disease *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2010 Sep; 154(3):219–226. 219.
33. Morice M.C, Serruys P, WKappetein A.P. *et al*. Outcomes in patients with de novo left main disease treated with either percutaneous coronary intervention using paclitaxel-eluting stents or coronary artery bypass graft treatment in the Synergy Between Percutaneous Coronary Intervention with TAXUS and Cardiac Surgery (SYNTAX) trial *Circulation*, 121 (2010), pp. 2645–2653.
34. Farkouh M.E, Domanski M, Sleeper L.A, for the FREEDOM Trial Investigators *et al*. Strategies for multivessel revascularization in patients with diabetes *N Engl J Med*, 367 (2012), pp. 2375–2384.
35. Park D.W., Kim Y.H., Yun S.C *et al*. Complexity of atherosclerotic coronary artery disease and long-term outcomes in patients with unprotected left main disease treated with drug-eluting stents or coronary artery bypass grafting *J Am Coll Cardiol*, 57 (2011), pp. 2152–2159.
36. Shiomi H., Morimoto T., Hayano M, for the CREDO-Kyoto PCI/CABG Registry Cohort-2 Investigators *et al*. Comparison of long-term outcome after percutaneous coronary intervention versus coronary artery bypass grafting in patients with unprotected left main coronary artery disease (from the CREDO-Kyoto PCI/CABG Registry Cohort-2) *Am J Cardiol*, 110 (2012), pp. 924–932.
37. Serruys P.W, Morice M.C, Kappetein A.P., for the SYNTAX Investigators *et al*. Percutaneous coronary intervention versus coronary-artery bypass grafting for severe coronary artery disease *N Engl J Med*, 360 (2009), pp. 961–972.
38. Head SJ, Holmes Jr. DR, Mack M.J, for the SYNTAX Investigators *et al*. Risk profile and 3-year outcomes from the SYNTAX percutaneous coronary intervention and coronary artery bypass grafting nested registries *J Am Coll Cardiol Intv*, 5 (2012), pp. 618–625.

39. Percutaneous Coronary Intervention versus Coronary-Artery Bypass Grafting for Severe Coronary Artery Disease Patrick W. Serruys, M.D., Ph.D. Morice, M.D, Pieter A. Kappetein, Colombo A, for the SYNTAX Investigators .N Engl J Med 2009.
40. Zhang HF, Xie SL, Wang JF, Chen YX, Wang Y, Huang TC. Tumor necrosis factor-alpha G-308A gene polymorphism and coronary heart disease susceptibility: an updated meta-analysis. *Thromb Res.* 2011 May;127(5):400-5.
41. Trombone F. Cardoso CRC. Repeke E. Ferreira Jr S, Martins Jr BW, Campanelli A P, Avila-Campos MJ. Trevilatto5 P. C, Silva J. S, Garlet GP. Tumor necrosis factor-alpha)308G/A single nucleotide polymorphism and red-complex periodonto pathogens are independently associated with increased levels of tumor necrosis factor-a in diseased periodontal tissues.A. P. *J Periodont Res* 2009; 44: 598–608.
42. Song GG, Choi SJ, Ji JD, Lee YH. Association between tumor necrosis factor-a promoter 2308 A/G, 2238 A/G, interleukin-6 2174 G/C and 2572 G/C polymorphisms and periodontal disease: a meta-analysis. *Mol Biol Rep* (2013) 40:5191–5203.
43. Moreira P R., Costa JE.. Gomez R. S, Gollob K.J.3, e Dutra W O. TNFA and IL10 Gene Polymorphisms are not Associated with Periodontitis in Brazilians. *The Open Dentistry Journal*, 2009, 3, 184-190.

8.0 LIMITAÇÕES DO ESTUDO

O presente estudo avaliou de modo isolado apenas uma das várias características genéticas que podem influenciar no comportamento da DAC e DP, sendo assim, outras características genéticas não avaliadas, além dos próprios fatores externos podem estar envolvidos no curso da inflamação e nos resultados encontrados. Estudos que avaliem a relação entre a DAC e DP com outros marcadores moleculares, bem como, a dosagem das citocinas avaliadas permitirão um melhor manejo clínico das doenças, por isso devem ser incentivados.

9.0 CONCLUSÃO

Não houve associação significativa entre a gravidade da DAC, estratificada pelo Escore SINTAX, e a doença periodontal ($p>0,05$). O polimorfismo na região promotora do gene *TNF α* (-308) está fortemente associado à doença periodontal (PD) (OR = 4,01, 95% IC:2,25 – 7,18) e não está associado a gravidade da DAC.

10. REFERÊNCIAS

Em modificação

11. APÊNDICE 1

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Resolução nº 196/96 – Conselho Nacional de Saúde

O(a) Sr(a) foi selecionado(a) e está sendo convidado(a) para participar da pesquisa intitulada **Associação entre Doença Arterial Coronariana e a Doença periodontal: Papel do Polimorfismo – 308 G/A do gene TNF α** . Tendo como pesquisadora a aluna do mestrado de Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina de Pernambuco da Universidade de Pernambuco – FCM/UPE e cirurgiã-dentista CRO – PE 9574, **Pérola Michelle Vasconcelos Caribé**.

O **objetivo** desta pesquisa é analisar, se existe associação da modificação de um gene específico com o pior desenvolvimento da Doença no coração e agravo da Doença Periodontal (doença nas estruturas de suporte dos dentes). Com a finalidade de que este conhecimento contribua para melhor condução no tratamento/e ou prevenção da Doença Arterial Coronariana e Periodontal.

Para realização desta pesquisa o Sr(a) participará de uma consulta odontológica inicial, onde será realizado uma entrevista seguida por um exame clínico intra-bucal, no qual serão avaliadas as estruturas que sustentam seus dentes e averiguado a presença/ou ausência de doença periodontal. Será realizada coleta de sangue por punção periférica da veia do antebraço para realização de exames laboratoriais no estudo do gene de uma proteína que o corpo humano produz, chamada TNF.

Esta pesquisa oferece baixos riscos previsíveis, como: desconfortos ao passar algum tempo com a boca aberta para a realização do exame intra-bucal e na punção da amostra de sangue pode-se sentir dor, sensação de desmaio e hematomas no local da retirada de sangue.

Os dados obtidos nesta pesquisa serão confidenciais e serão utilizados apenas **NESTA** pesquisa e os resultados divulgados em eventos e/ou revistas científicas. Em nenhum momento será divulgado o seu nome em qualquer fase do estudo.

Sua participação é **voluntária**. O senhor (a) está livre para interromper a sua participação na pesquisa a qualquer momento, sem nenhuma forma de prejuízo. Não há nenhum custo ou quaisquer compensações financeiras. Este termo será assinado em duas vias e o(a) Sr(a) receberá uma das vias originais. Caso necessite, haverá ressarcimento de despesas de transporte, e alimentação. O(a) Sr(a) tem direito à indenização se julgar que incorreu em danos durante sua participação nesta pesquisa

Pérola Michelle Vasconcelos Caribé
(pesquisadora)
Telefone celular (81)9283-8338
Email: perolamichelle@hotmail.com

Dr. Dário Celestino Sobral Filho
(Orientador)

Declaro estar ciente do inteiro teor deste TERMO DE CONSENTIMENTO e estou de acordo em participar do estudo proposto, sabendo que dele poderei desistir a qualquer momento, sem sofrer qualquer punição ou constrangimento.

Sujeito da Pesquisa: _____
(assinatura)

11.1. APÊNDICE 2

Nome: _____ Gênero M() F()

Data de nascimento:

Grupo Étnico: (1)Branco (2)Amarelo (3)Negra (4)Parda (5)Indígena (6)Sem registro

Nacionalidade:

Naturalidade: Pai: _____ Avós: _____

Histórico Médico:

S() N() Diabete (com diagnóstico há mais de 5 anos)

S() N() Hipertensão Arterial (Com diagnóstico há 5 anos)

S() N() Insuficiência Renal Crônica

S() N() Dislipidemia

S() N() Infecções sistêmicas

S() N() Obesidade (IMC>30)

S() N() Fumo (Serão excluídos fumantes de um maço de cigarro por semana, nos últimos 3 anos, pelo menos)

Doença Arterial Coronariana: Diagnóstico Atual

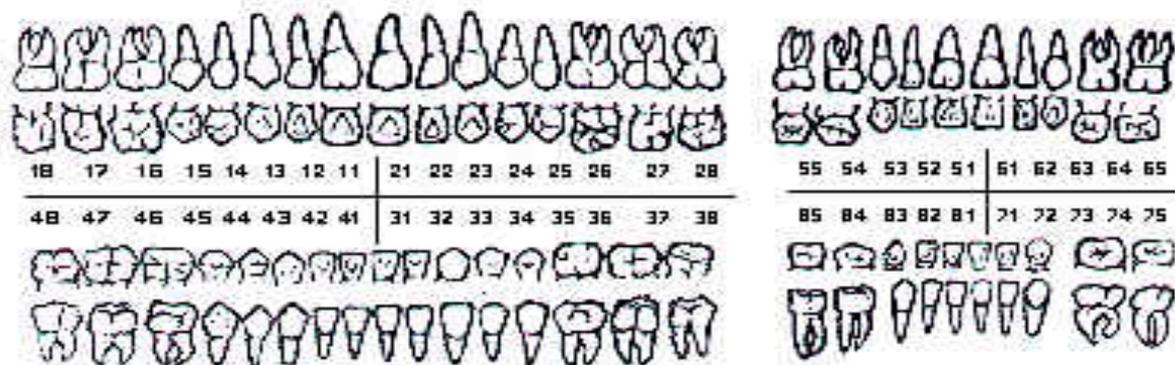
Síndrome Coronariana () Aguda	() Crônico
(A)() Angina Instável	(A.) () Clínico (dor)
(B)() Síndrome Intermediária	(B.) () Alterações de ECG
(C)() IAM	(C.) () Alterações de Enzimas
Se aguda, tempo de início da dor:	

Exames/Resultados

Hemoglobina Glicada:	Glicemia em Jejum:
Glicose:	Peso e Altura:
Uréia:	Pressão Arterial:
Creatinina:	Esta tomando alguma medicação:
Colesterol Total:	
HDL:	
LDL:	
VLDL:	
Triglicerídeos:	

Score Syntax:	
Nível Doença Pericardial:	

ODONTOGRAMA



GRAU DE MOBILIDADE DENTÁRIA = 1 (); 2 (); 3 ()

ÍNCIDE PERIODONTAL COMUNITÁRIO – IPC

Código 0	Sextante hígido;
Código 1	Sextante com sangramento (observado diretamente ou com espelho, após sondagem);
Código 2	Cálculo (qualquer quantidade, mas com toda área preta da sonda visível);
Código 3	Bolsa de 4 a 5mm (margem gengival na área preta da sonda visível)
Código 4	Bolsa de 6 mm ou mais (área preta da sonda não está visível);
Código X	Sextante excluído
Código 9	Sextante não examinado

SEXTANTE	1	2	3	4	5	6
CÓDIGO						

12. ANEXO 1

GUIA PARA AUTORES

12.1 ANEXO 2

APROVAÇÃO DO CONEP