

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

RAQUEL BINDA PEREIRA

**Efeito da doença periodontal sobre a reatividade
vascular de camundongos ateroscleróticos (APOE^{-/-})**

**VITÓRIA
2008**

RAQUEL BINDA PEREIRA

**EFEITO DA DOENÇA PERIODONTAL SOBRE A
REATIVIDADE VASCULAR DE CAMUNDONGOS
ATEROSCLERÓTICOS (APOE^{-/-})**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências Fisiológicas, na área de concentração Fisiologia Cardiovascular.
Orientadora: Prof^a Dr^a Silvana dos Santos Meyrelles
Coorientadora: Prof^a Dr^a Ivanita Stefanon

**VITÓRIA
2008**

Pereira, Raquel Binda.

Efeito da Doença Periodontal sobre a Reatividade Vascular de Camundongos Ateroscleróticos (ApoE^{-/-}) / Raquel Binda Pereira – 2008.

72 f.: il. color.; 30 cm

Orientadora: Silvana dos Santos Meyrelles

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1.Reatividade Vascular. 2. Doença Periodontal. 3. Aterosclerose. I. Pereira, Raquel Binda. II. Universidade federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. III. Efeito da Doença Periodontal sobre a Reatividade Vascular de Camundongos Ateroscleróticos (ApoE^{-/-}).

A Izaura e Diva, minhas queridas avós.

AGRADECIMENTOS

A Deus, meu refúgio e minha força.

Aos meu pais e à minha irmã, por cada momento em que compartilhamos carinho, alegria, tristezas, respeito, compreensão, ... enfim, a vida!

Aos familiares, muito obrigada pelo carinho e pelo apoio! Em especial à tia Maria, que tem cuidado de mim com tanta persistência! Um dia eu chego lá!

À Prof^a Dr^a Silvana Meyrelles, por ter acreditado no projeto, ter aberto as portas do laboratório e por ter sido tão compreensiva nos momentos de turbulência pessoal. Você foi mais do que orientadora, foi bênção de Deus na minha vida.

À Prof^a Dr^a, “chefa” e amiga, Ivanita Stefanon, por ter permitido que eu “desbravasse minha floresta”! Que experiência....

A Adília Binda, por ter colocado o laboratório Bioclínico à disposição e por ter me incentivado nos momentos de “literal desespero”, principalmente quando as bactérias teimavam em não crescer! Muito obrigada!

Ao Prof. Dr. Elisardo Corral Vasquez, pesquisador e pessoa exemplar, capaz de conciliar tamanho conhecimento com humildade e serenidade. Ao senhor, minha admiração.

Ao Prof. Dr. Mário Júlio de Ávila-Campos, do Departamento de Microbiologia da USP, por ter aberto as portas de seu Laboratório.

À Prof^a Dr^a Robéria Arruda, pioneira na reatividade vascular em leito mesentérico de camundongos, por ter aceito participar da avaliação deste trabalho. É uma honra tê-la na Banca!

À Prof^a Dr^a Sônia Alves Gouvêa, pela gentileza de participar da Banca Examinadora.

À Thaís, por ter continuado a pesquisa em ratinhos infartados com e sem insuficiência cardíaca! Sucesso, Tatá!

Aos amigos e colegas do LTCC, Ágata, Adriana, Bianca, Breno, Camile, Clarissa, Fernanda, Flávia, Isabele, Leandro, Lis, Lídia, Maíne, Marcela, Thiago, e em especial ao João Paulo, pela ajuda na histologia.

Aos demais colegas da pós – graduação.

Aos funcionários do Laboratório Bioclínico, em especial à Rose.

À Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e ao Laboratório Bioclínico, pelo apoio financeiro.

“Tudo tem o seu tempo determinado... há tempo de nascer e tempo de morrer; tempo de plantar e tempo de colher... tempo de chorar e tempo de rir; tempo de espalhar pedras e tempo de ajuntar pedras; tempo de abraçar e tempo de afastar-se de abraçar; tempo de buscar e tempo de perder; tempo de guardar e tempo de deitar fora; tempo de rasgar e tempo de coser; tempo de estar calado e tempo de falar; tempo de amar e tempo de aborrecer; tempo de guerra e tempo de paz”.
(Eclesiastes 3:1-8)

RESUMO

A doença periodontal foi induzida em camundongos mediante a inoculação oral do patógeno *Porphyromonas gingivalis* (Pg) com o objetivo de comparar alterações na reatividade vascular de animais sem aterosclerose (C57BL/6), com aterosclerose moderada (ApoE) e com aterosclerose avançada (ApoE D). A reabsorção óssea alveolar foi semelhante entre os grupos ($P > 0,05$). Preparações *in vitro* do leito arteriolar mesentérico foram utilizadas para determinar a resposta vascular à acetilcolina, ao nitroprussiato de sódio e à fenilefrina. O relaxamento induzido pela acetilcolina e pelo nitroprussiato de sódio mostrou-se inalterado em todos os grupos ($P > 0,05$). A resposta máxima à fenilefrina esteve aumentada nos três grupos avaliados, quando comparados aos seus controles (C57 CT: $78,6 \pm 2,7$ vs C57 Pg: $92 \pm 5,5$; ApoE CT: 98 ± 5 vs ApoE Pg: $119 \pm 6,5$; ApoE D CT: 97 ± 7 vs ApoE D Pg: 120 ± 6 mmHg). Este estudo demonstra que a doença periodontal aumenta a reatividade à fenilefrina tanto em animais saudáveis, quanto em animais com aterosclerose moderada e avançada. Adicionalmente ao aumento da reatividade, a doença periodontal exacerbou a inflamação sistêmica na aterosclerose avançada (razão neutrófilos/linfócitos. ApoE D CT: $0,30 \pm 0,04$ vs ApoE D Pg: $2,37 \pm 0,23$, $P < 0,05$).

Palavras-chave: Reatividade vascular. Doença periodontal. Aterosclerose.

ABSTRACT

Periodontal disease was induced in mice by oral *Porphyromonas gingivalis* (Pg) inoculation to compare changes in vascular reactivity from animals without atherosclerosis (C57BL/6), animals with moderate atherosclerosis (ApoE) and animals with advanced atherosclerosis (ApoE D). The alveolar bone resorption was similar between the groups ($P>0,05$). *In vitro* preparations of mesenteric arteriolar bed were used to determine the vascular responses to acetylcholine, sodium nitroprusside and phenylephrine. Acetylcholine and sodium nitroprusside – induced relaxation were similar in the all groups ($P>0,05$). The maximal response to phenylephrine increased in the all groups, when compared to controls (C57 CT: $78,6 \pm 2,7$ vs C57 Pg: $92 \pm 5,5$; ApoE CT: 98 ± 5 vs ApoE Pg: $119 \pm 6,5$; ApoE D CT: 97 ± 7 vs ApoE D Pg: 120 ± 6 mmHg; $P<0,05$). This study demonstrates that periodontal disease increases the reactivity to phenylephrine in mice systemically healthy, with moderate atherosclerosis and with advanced atherosclerosis. Additionally to increased reactivity to phenylephrine, the periodontal disease exacerbated the systemic inflammation in mice with advanced atherosclerosis (neutrophils/lymphocytes ratio. ApoE D CT: $0,30 \pm 0,04$ vs ApoE D Pg: $2,37 \pm 0,23$, $P<0,05$).

Keywords: Vascular reactivity. Periodontal disease. Atherosclerosis.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Peso corporal (PC) na trigésima semana de vida de camundongos sem aterosclerose (C57), com aterosclerose moderada (ApoE) e com aterosclerose avançada (ApoE D), portadores (Pg) ou não (CT) de doença periodontal.	38
Tabela 2:	Representação da doença periodontal dada pela quantidade óssea relativa (QOR) nos grupos sem aterosclerose (C57), com aterosclerose moderada (ApoE) e com aterosclerose avançada (ApoE D). Os animais com doença periodontal estão representados pela sigla Pg, enquanto os animais controles estão representados pela sigla CT.	40
Tabela 3:	Perfis lipídico e glicêmico nos grupos sem aterosclerose (C57), com aterosclerose moderada (ApoE) e com aterosclerose avançada (ApoE D), sejam os camundongos portadores (Pg) ou não (CT) de doença periodontal.	42
Tabela 4:	Razão entre a contagem absoluta de neutrófilos e linfócitos (N/L) em camundongos sem aterosclerose (C57), com aterosclerose moderada (ApoE) e com aterosclerose avançada (ApoE D), sejam eles portadores (Pg) ou não (CT) de doença periodontal.	44
Tabela 5:	Área de deposição lipídica na parede vascular de camundongos sem aterosclerose (C57), com aterosclerose moderada (ApoE) e com aterosclerose avançada (ApoE D), sejam eles portadores (Pg) ou não (CT) de doença periodontal.	46
Tabela 6:	Valores de resposta máxima (Rmax) e pD2 para as curvas dose-resposta à fenilefrina (FE), à acetilcolina (ACh) e ao nitroprussiato de sódio (NPS) nos grupos de camundongos sem aterosclerose (C57 CT) e com aterosclerose moderada (ApoE CT).	47
Tabela 7:	Valores de resposta máxima (Rmax) e pD2 para as curvas dose-resposta à fenilefrina (FE), à acetilcolina (ACh) e ao nitroprussiato de sódio (NPS) nos grupos com aterosclerose moderada (ApoE CT) e com aterosclerose avançada (ApoE D CT).	49

Tabela 8:	Valores de resposta máxima (Rmax) e pD2 para as curvas dose-resposta à fenilefrina (FE), à acetilcolina (ACh) e ao nitroprussiato de sódio (NPS) nos animais sem aterosclerose e sem doença periodontal (C57 CT) e sem aterosclerose mas com doença periodontal (C57 Pg).	51
Tabela 9:	Valores de Resposta Máxima (Rmax) e pD2 para as curvas dose-resposta à Fenilefrina (FE), à Acetilcolina (ACh) e ao Nitroprussiato de Sódio (NPS) nos grupos com aterosclerose moderada, portadores (ApoE Pg) ou não (ApoE CT) de doença periodontal.	53
Tabela 10:	Valores de Resposta Máxima (Rmax) e pD2 para as curvas dose-resposta à Fenilefrina (FE), à Acetilcolina (ACh) e ao Nitroprussiato de Sódio (NPS) nos grupos com aterosclerose avançada, portadores (ApoE D Pg) ou não (ApoE D CT) de doença periodontal.	55

LISTA DE GRÁFICOS

- | | | |
|-------------------|--|----|
| Gráfico 1: | Representação gráfica da quantidade óssea relativa (QOR) nos grupos sem aterosclerose (C57), com aterosclerose moderada (ApoE) e com aterosclerose avançada (ApoE D). Os animais com doença periodontal estão representados pela sigla Pg e os animais controle pela sigla CT. C57 CT (n = 08); C57 Pg (n = 08); ApoE CT (n = 07); ApoE Pg (n = 06); ApoE D CT (n = 08); ApoE D (n = 10). | 40 |
| Gráfico 2: | Representação dos níveis plasmáticos de colesterol total e frações nos grupos sem aterosclerose (C57 CT; n = 08), com aterosclerose moderada (ApoE CT; n = 07) e com aterosclerose avançada (ApoE D CT; n = 08). | 42 |
| Gráfico 3: | Ilustração gráfica da razão entre a contagem absoluta de neutrófilos e linfócitos (N/L) em camundongos sem aterosclerose (C57), com aterosclerose moderada (ApoE) e com aterosclerose avançada (ApoE D), sejam eles portadores (Pg) ou não (CT) de doença periodontal. C57 CT (n = 08); C57 Pg (n = 08); ApoE CT (n = 07); ApoE Pg (n = 06); ApoE D CT (n = 08); ApoE D (n = 10). | 44 |
| Gráfico 4: | Correlação entre os valores de colesterol total e a razão N/L nos animais dos grupos C57 CT, ApoE CT e ApoE D CT. O valor de n representa o número de animais dos 3 grupos. | 45 |
| Gráfico 5: | Área de deposição de lipídeos na parede vascular em camundongos sem aterosclerose (C57 CT, n = 04), com aterosclerose moderada (ApoE CT, n = 04), com aterosclerose avançada (ApoE D CT, n = 04), sem aterosclerose com doença periodontal (C57 Pg, n = 04), com aterosclerose moderada e doença periodontal (ApoE Pg, n = 04), e com aterosclerose avançada e doença periodontal (ApoE D Pg, n = 04). | 46 |
| Gráfico 6: | Curvas dose – resposta à fenilefrina (A), à acetilcolina (B) e ao nitroprussiato de sódio (C) em leito arteriolar mesentérico de camundongos C57 controle (C57 CT; n = 07, ■) e ApoE controle (ApoE CT; n = 07, ●). | 48 |

- Gráfico 7:** Curvas dose – resposta à fenilefrina (**A**), à acetilcolina (**B**) e ao nitroprussiato de sódio (**C**) em leito arteriolar mesentérico de camundongos com aterosclerose moderada (ApoE CT; n = 07, ●) e avançada (ApoE D CT; n = 06, ▲).
- Gráfico 8:** Curvas dose – resposta à fenilefrina (**A**), à acetilcolina (**B**) e ao nitroprussiato de sódio (**C**) em leito arteriolar mesentérico de camundongos C57 controle (C57 CT; n = 07, ■) e C57 com doença periodontal (C57 Pg; n = 06, □).
- Gráfico 9:** Curvas dose – resposta à fenilefrina (**A**), à acetilcolina (**B**) e ao nitroprussiato de sódio (**C**) em leito arteriolar mesentérico de camundongos ApoE controle (ApoE CT; n = 07, ●) e ApoE com doença periodontal (ApoE Pg; n = 06, ○).
- Gráfico 10:** Curvas dose – resposta à fenilefrina (**A**), à acetilcolina (**B**) e ao nitroprussiato de sódio (**C**) em leito arteriolar mesentérico de camundongos ApoE com aterosclerose avançada (ApoE D CT; n = 06, ▲) e ApoE com aterosclerose avançada e doença periodontal (ApoE D Pg; n = 08, △).

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVOS	
2.1 Objetivo Geral.....	22
2.2 Objetivos Específicos.....	22
3 MATERIAL E MÉTODOS	
3.1 Animais Experimentais.....	23
3.1.1 Modelos Experimentais.....	23
3.1.1.1 Aterosclerose.....	23
3.1.1.2 Doença Periodontal.....	25
3.1.2 Grupos Experimentais.....	26
3.1.3 Preparação dos Animais para as Avaliações Experimentais.....	27
3.2 Lipidograma e Análise de Glicemia.....	28
3.3 Análise da Inflamação Sistêmica.....	28
3.4 Análise da Reatividade Vascul ar <i>in vitro</i>	29
3.4.1 Metodologia da Perfusão do LAM.....	29
3.4.2 Reatividade à Fenilefrina.....	30
3.4.3 Vasodilatação Dependente do Endotélio.....	30
3.4.4 Vasodilatação Independente do Endotélio.....	31
3.5 Avaliação da Extensão da Lesão Aterosclerótica.....	31
3.5.1 Histoquímica.....	31
3.5.2 Análise Morfométrica.....	33
3.6 Determinação da Doença Periodontal.....	34
3.6.1 Análise Morfométrica.....	34
3.7 Expressão dos Dados.....	35
3.8 Análise Estatística.....	36
3.9 Fármacos e Reagentes.....	36

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação Ponderal.....	38
4.2 Análise da Doença Periodontal.....	39
4.3 Análise do Perfil Lipídico e da Glicemia.....	41
4.4 Análise da Inflamação Sistêmica.....	43
4.5 Extensão da Lesão Aterosclerótica.....	45
4.6 Reatividade Vascular.....	47
5 DISCUSSÃO.....	57
6 CONCLUSÕES.....	65
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66

1 INTRODUÇÃO

No início do século XX as doenças cardiovasculares eram responsáveis por menos de 10 % de todas as mortes no mundo. No final, elas já representavam a principal *causa mortis* nos países desenvolvidos, enquanto nos países em desenvolvimento eram responsáveis por cerca de um quarto dos óbitos (GAZIANO, 2003). A estimativa da Organização Panamericana de Saúde para essas nações em desenvolvimento é de que até 2010 as doenças cardiovasculares também representem a maior causa de mortalidade (OPAS, 2003).

No Brasil, dados do Sistema Único de Saúde revelam que essa estimativa já é realidade, podendo ser notada mesmo na década passada, quando as doenças cardiovasculares foram responsáveis por 33,36 %¹ do total de óbitos registrados. Os dados mais recentes são referentes à 2005, e são semelhantes aos dos anos 90: a mortalidade proporcional por doenças cardiovasculares foi de 31,46 % (DATASUS, 2008).

O termo “doenças cardiovasculares” representa um grupo de doenças. De todas elas, quais seriam as que lideram a mortalidade? Nos Estados Unidos a doença arterial coronariana (DAC) é sozinha a principal causa de morte e o acidente vascular cerebral (AVC), a terceira (AMERICAN HEART ASSOCIATION, 2008). No Brasil, os registros de 2005 mostram que juntos, a DAC e o AVC perfazem cerca de 60 % dos óbitos atribuídos às doenças cardiovasculares (DATASUS, 2008).

Respondida a pergunta, cabe enfatizar que a doença arterial coronariana e o acidente vascular cerebral compartilham entre si a mesma causa primária: a aterosclerose. Logo, pode-se inferir que a aterosclerose é a principal responsável pelos eventos cardiovasculares que mais matam no mundo.

O termo aterosclerose foi introduzido no início do século XX, por Marchand, para descrever a associação entre degeneração gordurosa e enrijecimento vascular (CROWTHER, 2005). Entretanto, a aterosclerose é muito mais do que o acúmulo de lipídeos na parede arterial. É um processo crônico, progressivo e sistêmico,

¹ Média registrada na década de 90.

caracterizado por resposta inflamatória e fibroproliferativa da parede arterial, causada por agressões à superfície das artérias (ROSS, 1999). Como processo sistêmico, pode acometer todos os leitos arteriais, mas a artéria aorta é preferencial e precocemente acometida, seguida pelas coronárias e cerebrais (STRONG, 1992). O tratamento e o impacto clínico da aterosclerose variam de acordo com o leito arterial afetado (FAXON et al., 2004).

Quanto aos fatores de risco para aterosclerose, os fatores clássicos são a hipercolesterolemia, o tabagismo, a hipertensão, o sobrepeso/obesidade, o diabetes mellitus, o sexo masculino, a idade e o histórico familiar de doença cardiovascular prematura (FRUCHART et al., 2004). Entretanto, nem toda doença aterosclerótica pode ser explicada pelos fatores clássicos, uma vez que pelo menos 30 % de suas manifestações não estão associadas a esses fatores (HAYNES; STANFORD, 2003).

Na última década, a admissão de novos fatores de risco para a aterosclerose fez-se pertinente, uma vez que possibilitaria melhor predição de risco futuro. Dentre os fatores de risco emergentes adotados pelo *U.S. National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults – adult treatment panel III (ATP III) (2002)* estão as infecções por vírus e bactérias. Evidências soropidemiológicas sustentam a participação de bactérias, notavelmente a *Chlamydia pneumoniae*, e de vírus, em especial o citomegalovírus, na etiologia da aterosclerose (KÄLVEGREN et al., 2003; GRAHAME-CLARKE et al., 2003).

No início da década de 60 foi publicado um estudo descrevendo associação entre doença periodontal e doença cardiovascular (MACKENZIE; MILLARD, 1963). Trinta anos mais tarde foi publicado outro estudo sugerindo a doença periodontal como fator de risco para doença cardiovascular. Este estudo durou 14 anos, envolveu 20.000 indivíduos, onde todos os portadores de doença periodontal grave exibiram risco aumentado para aterosclerose e conseqüentemente suas manifestações clínicas: infarto do miocárdio e acidente vascular cerebral (DE STEFANO et al., 1993). Recentemente, Beck e Offenbacher (2005) encontraram cerca de 40 publicações associando doença periodontal e doença cardiovascular. Da totalidade destas publicações, 80 % relataram associação positiva entre as duas doenças.

A doença periodontal é de etiologia infecciosa e natureza inflamatória. É a infecção oral mais comum em adultos (DOGAN et al., 2005). Ela acomete o periodonto, que é composto por gengiva, cemento radicular, ligamento periodontal e osso alveolar (Figura 1.1).

A principal função do periodonto é inserir o dente no tecido ósseo dos maxilares, além de manter a integridade da superfície da mucosa mastigatória na cavidade oral (LINDHE et al., 2005). A doença periodontal pode se restringir apenas ao tecido gengival (gengivites) (Figura 1.2), mas também pode acometer os tecidos de suporte (periodontites) (Figura 1.3 e 1.4). Quando os tecidos de suporte são acometidos, a doença periodontal exhibe caráter destrutivo, com perda de inserção dental, e sua consequência final pode ser a perda do dente.

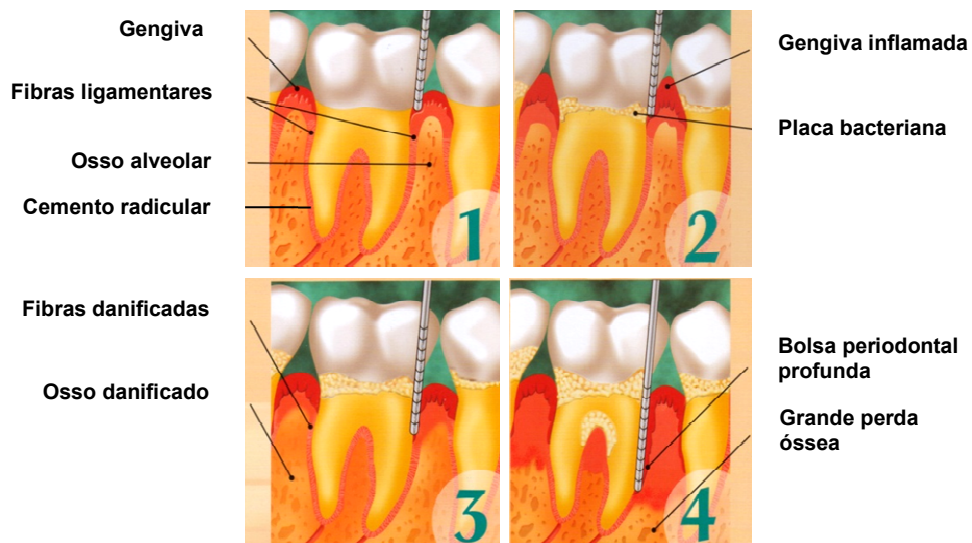


Figura 1 – Periodonto saudável e diferentes estágios da doença periodontal. 1. Periodonto saudável; 2. Gengivite; 3. Periodontite; 4. Periodontite avançada.

Fonte: COLGATE (2008).

Nota: Figura adaptada pelo autor.

Os microorganismos causadores da doença periodontal colonizam a superfície dental supra e subgengival, mediante a formação de biofilmes (SOCRANSKY; HAFFAJEE, 2002). A placa bacteriana constitui um biofilme e, apesar de ser composta por cerca de 500 a 600 espécies diferentes de microorganismos, apenas três espécies são reconhecidas como patógenos periodontais (MEYER; FIVES-TAYLOR, 1998).

Em 1996, o Workshop Mundial de Periodontia designou como periodontopatógenos as espécies: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* e *Tannerella forsythia* (antigo *Bacteroides forsythus*) (SOCRANSKY; HAFFAJEE, 2002).

Em se tratando da relação entre doença periodontal e aterosclerose, alguns autores relatam características que são comuns às duas doenças: ambas ocorrem com maior frequência em pessoas mais idosas, do sexo masculino, hipertensas, fumantes, com diabetes mellitus e com sobrepeso/obesidade (BECK et al., 2000; KINANE; LOWE, 2000; HAYNES; STANFORD, 2003). Beck e Offenbacher chegaram a sugerir que o compartilhamento dessas características poderia indicar que a doença periodontal e a aterosclerose possuem uma via etiológica semelhante (BECK et al., 2000).

Além do compartilhamento das características supracitadas, a doença periodontal e a aterosclerose compartilham outra característica. São doenças marcadas por inflamação. A aterosclerose é uma doença inflamatória sistêmica em que a ocorrência de dislipidemia favorece o fluxo turbulento. As células endoteliais respondem à essa agressão mediante alteração de sua função e superexpressão de moléculas de adesão. A partir de então, ocorre o recrutamento de células inflamatórias, a liberação de citocinas e o recrutamento de lipídios para o interior da placa aterosclerótica (CROWTHER, 2005). A doença periodontal é caracterizada por inflamação local (no periodonto), como resposta do sistema imunológico para debelar a infecção. O resultado da inflamação local é a destruição dos tecidos periodontais. Entretanto, a resposta inflamatória na doença periodontal não se restringe apenas localmente. A periodontite também está associada a elevados níveis de marcadores inflamatórios sistêmicos, como proteína C reativa, interleucina 6 e neutrófilos (LOOS et al., 2000; SLADE et al., 2000; NOACK et al., 2001; MATTILA et al., 2002). Mas para que ocorra inflamação sistêmica na doença periodontal, é necessário que os patógenos periodontais estejam presentes na corrente sanguínea. E isso é possível pelas sucessivas bacteremias que ocorrem fisiologicamente em resposta à higienização oral e à mastigação.

Uma vez na circulação os microrganismos passam a ser mais ou menos agressores de acordo com sua virulência. No caso dos patógenos periodontais, por serem

bactérias gram negativas, um importante fator de virulência são os lipopolissacarídeos. Eles podem iniciar ou acelerar a aterosclerose através de alguns mecanismos, como a adesão de leucócitos ao endotélio, a produção de superóxidos, de citocinas pró-inflamatórias e de quimiocinas (STOLL et al., 2004).

Outros autores relacionam a doença periodontal com a aterosclerose pelo fato de terem observado mudanças desfavoráveis no metabolismo de lipoproteínas em indivíduos com doença periodontal (LÖSCHE et al., 2000; PUSSINEN et al., 2004).

Ainda, mesmo que não tenham sido detectadas bactérias viáveis em placas ateroscleróticas de humanos, a existência de fragmentos genéticos de patógenos periodontais em placas já foi comprovada (CHIU, 1999; HARASZTHY et al., 2000; STELZEL et al., 2002; FIEHN et al., 2005). Este achado ressalta o fato de que para ter ação sistêmica a viabilidade bacteriana não é uma condição necessária.

Independentemente do mecanismo envolvido, a inflamação sistêmica parece ser fundamental para explicar a natureza da ligação entre infecções crônicas e aterosclerose (RIDKER et al., 1997; DANESH et al., 1999; ROSS, 1999; LIBBY et al., 2002). E em se tratando do sistema cardiovascular, alterações no estado inflamatório sistêmico podem contribuir para a gênese e para o desenvolvimento da aterosclerose (EPSTEIN, 2002).

É sabido que antes mesmo de apresentar evidências de placa aterosclerótica, indivíduos com aterosclerose apresentam disfunção endotelial (ROSS, 1999). O endotélio é o maior regulador da homeostase vascular. Ele mantém o equilíbrio entre substâncias vasodilatadoras e vasoconstritoras, controla a proliferação e a migração das células musculares lisas, controla a trombogênese e a fibrinólise (LÜSCHER; BARTON, 1997; KINLAY et al., 2001). Qualquer desequilíbrio na função do endotélio é danoso à parede arterial, podendo contribuir para a aterosclerose.

Alguns autores observaram prejuízo da vasodilatação dependente do endotélio em indivíduos com periodontite crônica (MERCANOGLU et al., 2004 ; SEINOST et al., 2005; ELTER et al., 2006; HIGASHI et al., 2008). Em animais, até o momento não existe nenhum estudo de reatividade vascular na doença periodontal. E em se tratando da coexistência de doença periodontal e aterosclerose, os estudos

vasculares são inexistentes tanto em animais quanto em humanos. Em outras palavras, estaria a doença periodontal alterando a função vascular na aterosclerose?

2 OBJETIVOS

2.1 Ojetivo Geral

Determinar o efeito da doença periodontal sobre a reatividade do leito arteriolar mesentérico de camundongos ateroscleróticos.

2.2 Objetivos Específicos

Estabelecer dois diferentes estágios de aterosclerose para o estudo;

Observar se a aterosclerose e a doença periodontal experimentais produzem resposta inflamatória sistêmica;

Determinar se a doença periodontal exerce efeito sobre a extensão da lesão aterosclerótica;

Determinar o efeito da aterosclerose, da doença periodontal e da coexistência das duas doenças sobre a resposta contrátil do leito arteriolar mesentérico à fenilefrina;

Determinar o efeito da aterosclerose, da doença periodontal e da coexistência das duas doenças sobre os relaxamentos dependente e independente do endotélio, no mesmo leito vascular.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais Experimentais

Neste estudo foram utilizados camundongos C57BL/6 isogênicos (C57) e C57BL/6 transgênicos *knockout* para apolipoproteína E (ApoE^{-/-}), fornecidos pelo Biotério do Laboratório de Transgenes e Controle Cardiovascular do Programa de Pós – Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo.

Os animais foram confinados em gaiolas transparentes contendo filtro micro – isolador (MI109, BEIRAMAR Indústria e Comércio Ltda), mantidos em ambiente com controle de temperatura (22 ± 2°C), umidade (70 %) e luminosidade (12 h claro/escuro), servindo-se *ad – libitum* de água e ração (AIN – 93G, RHOSTER Indústria e Comércio Ltda).

O projeto está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Escola Superior de Ciências da Santa Casa de Misericórdia de Vitória (Protocolo nº: 020/2007).

3.1.1 Modelos Experimentais

3.1.1.1 Aterosclerose

Como modelo de aterosclerose foram utilizados camundongos ApoE^{-/-} (PIEDRAHITA et al., 1992; PLUMP et al., 1992). Estes animais desenvolvem aterosclerose espontaneamente, são hipercolesterolêmicos e suas lesões arteriais são similares às encontradas em humanos (ZHANG et al., 1992; ZHANG et al., 1994; JAWIEN et al., 2004).

As primeiras lesões surgem na região proximal da aorta, próximo às válvulas (seio aórtico). Com o tempo aparecem lesões no arco e em segmentos distais da artéria aorta (REDDICK et al., 1994).

Estrias gordurosas estão presentes na aorta proximal de camundongos ApoE^{-/-} com doze semanas de idade (ZHANG et al., 1992). Lesões intermediárias contendo células espumosas e células musculares lisas são observadas com quinze semanas e, na vigésima semana pode-se observar o aparecimento de placas fibrosas. Lesões mais complexas, com fragmentação da lâmina elástica, calcificação e espessamento da parede vascular são encontradas em animais com pelo menos trinta e duas semanas de idade (REDDICK et al., 1994).

Assim sendo, quanto maior for a idade dos animais, maiores são a distribuição, a complexidade, e o tamanho da lesão aterosclerótica (MEIR; LEITERSDORF, 2004). Além do fator idade/tempo, a progressão da aterosclerose é influenciada pela dieta do animal. Haja vista que a administração de dieta aterogênica acelera a progressão da aterosclerose (ZHANG et al., 1994). Logo, sem que se altere a idade dos camundongos, diferentes estágios evolutivos de aterosclerose podem ser obtidos mediante alteração na dieta dos animais.

Para atender o objetivo de se trabalhar com dois estágios de aterosclerose, denominados neste trabalho como moderado e avançado, foi estabelecido o seguinte protocolo:

Na sexta semana de vida os camundongos ApoE^{-/-} foram divididos aleatoriamente em grupos que receberam dieta padrão ou que receberam dieta aterogênica (ração AIN - 93G, acrescida de 1,25 % de colesterol, fornecida pela RHOSTER).

Decorridas vinte e quatro semanas, ou seja, na trigésima semana de vida, os camundongos que nesse período receberam dieta regular foram classificados como portadores de aterosclerose moderada, enquanto os que receberam dieta aterogênica foram classificados como portadores de aterosclerose avançada.

3.1.1.2 Doença Periodontal

Para a obtenção do modelo experimental de doença periodontal foi utilizada a inoculação oral tópica do periodontopatógeno *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277. Esta cepa foi fornecida pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS, Fiocruz).

A ampola contendo a cepa liofilizada foi serrada e o microrganismo foi posto em caldo BHI (infusão cérebro-coração) suplementado com sangue desfibrinado de carneiro (5 %), extrato de levedura (0,5 %), hemina (5 µg/mL) e menadiona (1 µg/mL) para crescimento por 48 horas, a 37°C, em anaerobiose estrita (Anaerogen[®], Oxoid).

Após as 48 horas no caldo, foram realizados repiques em meio agar-sangue suplementado. A composição deste meio é a mesma do caldo BHI supracitado, acrescido de 2 % de agar. A cada sete dias novos repiques eram realizados para preservação da cepa bacteriana.

Na décima oitava semana de vida dos animais, foi dado início à inoculação do patógeno. Foram realizadas três inoculações por animal, com intervalo de 2 dias entre elas (BAKER et al., 1994). E a via de inoculação foi tópica bucal.

Colônias bacterianas eram coletadas das placas e suspensas em solução salina estéril, cuja densidade foi ajustada até se obter 10⁹ unidades formadoras de colônia por mililitro (CFU/mL) (JAIN et al., 2003). Adicionava-se então, 2 % de carboximetilcelulose à solução, para torná-la mais viscosa e aumentar o tempo de contato com a superfície oral. O volume depositado em cada inoculação era de 100 µL (BAKER et al., 1994). Para não machucar o animal na inoculação, o gel foi posto em seringa descartável de 1 mL com agulha sem bisel (25 x 8 mm, PrecisionGlide[®], BD).

Os animais eram imobilizados manualmente e a ponta da agulha era cuidadosamente introduzida na cavidade oral, o gel contendo *P. gingivalis* era

depositado, de modo a banhar não só os dentes, mas toda a cavidade oral. Nos animais dos grupos controles foi realizada a deposição do gel, porém sem o microrganismo.

Ainda, para confirmar a viabilidade do patógeno durante o tempo gasto entre a abertura da jarra de anaerobiose (JA401, Permution) e a inoculação, foi realizada cultura do resíduo de gel deixado na seringa, meia hora após a inoculação, em duas amostras aleatórias. O tempo gasto, de aproximadamente setenta minutos, não afetou a viabilidade do *P. gingivalis*.

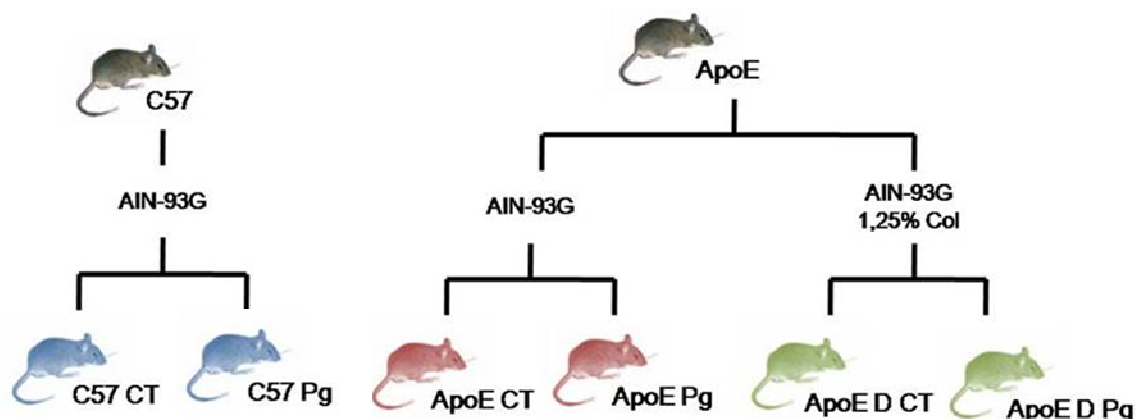
Na trigésima semana os animais foram retirados do biotério e levados ao laboratório para a etapa experimental propriamente dita.

3.1.2 Grupos Experimentais

Foram estudados seis grupos de animais:

- Grupo sem aterosclerose, representado pelos animais C57, sem doença periodontal (C57 CT);
- Grupo sem aterosclerose, representado pelos animais C57, com doença periodontal (C57 Pg);
- Grupo com aterosclerose moderada, representado pelos animais ApoE^{-/-}, sem doença periodontal (ApoE CT);
- Grupo com aterosclerose moderada, representado pelos animais ApoE^{-/-}, com doença periodontal (ApoE Pg);
- Grupo com aterosclerose avançada, representado pelos animais ApoE^{-/-} que ingeriram dieta hipercolesterolêmica, sem doença periodontal (ApoE D CT);
- Grupo com aterosclerose avançada, representado pelos animais ApoE^{-/-} que ingeriram dieta hipercolesterolêmica, com doença periodontal (ApoE D Pg).

O organograma a seguir ilustra essa divisão.



Organograma: Estão representados os seis grupos utilizados neste estudo. C57 CT (n = 08), C57 Pg (n = 08), ApoE CT (n = 07), ApoE Pg (n = 06), ApoE D CT (n = 08) e ApoE D Pg (n = 10).

3.1.3 Preparação dos Animais para as Avaliações Experimentais

Com trinta semanas de vida os animais foram imobilizados manualmente para a injeção intraperitoneal de tiopental sódico (40 mg / kg).

Uma vez sedados, prosseguiu-se com a coleta de sangue periférico mediante punção do plexo axilar. Para cada animal foram obtidas três amostras de sangue. Uma amostra foi utilizada para o leucograma, outra para dosagem da glicemia e outra para o lipidograma.

Após a coleta de sangue o leito arteriolar mesentérico foi cateterizado e removido para avaliação vascular, a aorta foi coletada para avaliação da extensão da lesão aterosclerótica e a mandíbula foi extraída para constatação da doença periodontal.

Seguiu-se à eutanásia dos animais, que foram acondicionados em freezer para posterior coleta pela Prefeitura Municipal de Vitória.

3.2 Lipidograma e Análise da Glicemia

A amostra sanguínea para a análise da glicemia (200 µL) foi armazenada em tubo eppendorf[®] contendo solução anticoagulante inibidora da glicólise (fluoreto/EDTA: 17 µL para cada mL de sangue). Já a amostra para a análise do perfil lipídico (300 µL) foi armazenada em tubo eppendorf[®] sem anticoagulante.

As amostras sanguíneas foram centrifugadas a 3000 rpm durante cinco minutos para separação do plasma.

O lipidograma consistiu de colesterol total, frações LDL, HDL e VLDL, e de triglicerídeos.

Tanto a análise glicêmica quanto a lipídica foram realizadas pelo analisador bioquímico Labmax 240 (Labtest), através do método enzimático colorimétrico.

3.3 Análise da Inflamação Sistêmica

A contagem de leucócitos é um marcador de inflamação sistêmica de baixo custo, fácil execução e fácil interpretação. Tanto a leucocitose quanto a neutrofilia indicam inflamação sistêmica e são preditoras da incidência de eventos cardiovasculares futuros (MADJID et al., 2004). Entretanto, dados recentes sugerem que o valor preditivo na avaliação do risco cardiovascular é ainda maior quando se emprega a razão entre o número total de neutrófilos e linfócitos (HORNE et al., 2005).

Isto posto, a inflamação sistêmica foi avaliada pela razão entre o número total de neutrófilos e linfócitos.

Para a realização do leucograma um volume de 500 µL de sangue foi armazenado em tubo eppendorf[®] contendo anticoagulante etilenodiaminotetra acético (EDTA: 5 µL para cada mL de sangue). A amostra foi homogeneizada suavemente para evitar hemólise. Em seguida o sangue foi aspirado pelo contador automatizado (Beckman Coulter MAXM HMX, USA) que realizou a análise diferencial de leucócitos.

3.4 Análise da Reatividade Vascular *in vitro*

Os protocolos que se seguem foram realizados em todos os grupos (C57 CT, C57 Pg, ApoE CT, ApoE Pg, ApoE D CT e ApoE D Pg). Para cada animal foram realizados os protocolos de contração (fenilefrina) e relaxamento (acetilcolina e nitroprussiato de sódio).

3.4.1 Metodologia da perfusão do leito arteriolar mesentérico (LAM)

Sob efeito anestésico os animais foram posicionados em mesa cirúrgica e tricotomizados para a realização de laparotomia. Após cuidadosa exteriorização das alças intestinais, a artéria mesentérica superior foi cateterizada, utilizando-se cateter de polietileno (PE 50) preenchido com solução nutritora (Krebs-Henseleit¹). O intestino foi rapidamente seccionado e o leito vascular mesentérico conectado ao sistema de perfusão. A solução nutritora perfundida foi mantida em temperatura constante de 37° C, gaseificada com mistura carbogênica (95 % de O₂ e 5 % de CO₂) com pH de 7,4. O fluxo foi mantido constante (2 mL / min) por meio de uma bomba peristáltica (Harvard Apparatus[®], EUA).

Para excluir a participação do sistema venoso na resposta vascular e isolar o leito arteriolar mesentérico, as alças intestinais foram removidas. A pressão de perfusão média (PPM) do leito arteriolar mesentérico foi aferida através de um transdutor de pressão (BSL-SS13L, Biopac Systems[®], EUA), situado entre a bomba peristáltica e o cateter arterial. O transdutor foi conectado a um pré-amplificador (IPS-100C, Biopac Systems[®], EUA) acoplado a um sistema de aquisição de dados (AcqKnowledge, Biopac Systems[®], EUA), que possibilitou o registro contínuo dos dados pressóricos. Uma vez montadas, as preparações foram mantidas em período de estabilização de 30 a 45 minutos. Em seguida, a responsividade do músculo liso foi testada mediante injeção de duas a três doses intervaladas de fenilefrina (1µg em 0,1 mL) no cateter.

Mantendo-se o fluxo constante, as variações de pressão registradas indicam variações da resistência vascular.

¹ A solução de Krebs-Henseleit era composta por (em M): NaCl - 130, KCl - 4.7, CaCl₂ · 2 H₂O - 1.6, MgSO₄ · 7 H₂O - 4.7, KH₂PO₄ - 1.8, NaHCO₃ - 14.9, glicose - 11.1 e EDTA - 0.026.

$$\Delta P = Q \times R$$

Onde:

ΔP → variação de pressão, dada por: $P_{\text{final}} - P_{\text{inicial}}$

Q → fluxo

R → resistência

3.4.2 Reatividade Vascular à Fenilefrina

Para comparar o efeito da doença periodontal sobre a reatividade vascular em animais sem doença cardiovascular, com aterosclerose moderada e com aterosclerose avançada, foi utilizada a fenilefrina, agonista α_1 -adrenérgico, dado que a resposta vasoconstritora vascular é primariamente mediada por receptores α_1 .

As curvas dose-resposta à fenilefrina (FE: 0,001 a 300 μg , em 100 μL , *in bolus*) foram realizadas na presença de endotélio, cuja integridade foi avaliada por meio da administração *in bolus* de acetilcolina (ACh, 5 μg em 100 μL). Após o período de estabilização e o teste da responsividade da musculatura lisa vascular, as preparações foram pré-contraídas com fenilefrina (10^{-5} M). Ao atingir-se um platô de contração, administrava-se acetilcolina.

3.4.3 Vasodilatação Dependente do Endotélio

Para se avaliar a vasodilatação dependente do endotélio, foi realizada curva dose-resposta à acetilcolina (ACh: 10^{-10} a 10^{-3} M). Após pré-contração em solução de Krebs com 10^{-5} M de fenilefrina, cada dose era administrada *in bolus*, com intervalo de aproximadamente 3 minutos.

A acetilcolina, ao atuar sobre receptores muscarínicos das células endoteliais, promove a liberação de vasodilatadores que atuarão sobre as células da musculatura lisa vascular. São eles: O óxido nítrico (NO), a prostaciclina (PGI_2) e o

fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) (MONCADA et al, 2006; CAMPBELL; HARDER, 2001).

3.4.4 Vasodilatação Independente do Endotélio

Para se avaliar a vasodilatação independente do endotélio, foi realizada curva dose-resposta ao nitroprussiato de sódio (NPS: 10^{-10} a 10^{-3} M). Após pré-contração em solução de Krebs com 10^{-5} M de fenilefrina, cada dose era administrada *in bolus*, com intervalo aproximado de 2 minutos.

O nitroprussiato de sódio é um doador de óxido nítrico, que ao ser liberado diretamente no músculo liso vascular, causa relaxamento, pelo aumento de GMPc.

3.5 Avaliação da Extensão da Lesão Aterosclerótica

A avaliação da extensão da lesão aterosclerótica foi dada pela quantificação da área de lipídeos corados no segmento vascular analisado.

3.5.1 Histoquímica

Após a remoção do leito arteriolar mesentérico os animais foram expostos à toracotomia para a exposição do coração. Mediante incisão no átrio direito foram realizadas duas infusões. Primeiro de salina em tampão fosfato (PBS: 0,1 M; pH 7,4) e em seguida de formaldeído (4 %), com volume estabelecido de 50 mL para cada solução.

Para que o formato da artéria aorta fosse mantido, evitando possíveis rupturas e degradação das placas ateromatosas, as infusões foram realizadas com pressão controlada em níveis próximos à pressão arterial média do animal. Uma vez que a pressão arterial média do camundongo é de aproximadamente 100 mmHg, e que 1 mmHg corresponde a 1,36 cm H₂O, duas colunas líquidas (equipos) de 136 cm, uma para cada solução infundida, foram suspensas, de modo que a pressão hidrostática

em cada coluna correspondesse a 100 mmHg. O fluxo foi mantido constante, a 20 mL/mim, pela conexão de um frasco de Mariotti a cada equipo. Após as infusões a árvore aórtica foi coletada e estocada em recipiente plástico contendo solução fixadora 1:9 (PBS com 10 % de formaldeído a 4 % / salina).

Na preparação histológica o excesso de tecido conjuntivo perivascular foi removido, o arco aórtico foi seccionado transversalmente imediatamente antes do início do tronco braquiocefálicodireito e imediatamente após a carótida comum esquerda, de modo que a análise se detivesse à região compreendida entre essas ramificações. O arco foi emblocado em gelatina incolor a 24 % e congelado. Cada bloco foi posicionado em um criostato (Jung CM 1800, Leica), a -16°C , para a obtenção de cortes transversos (8 μm de espessura), de maneira que os cortes tivessem início pelo lado do tronco braquiocefálico direito. Os cortes teciduais foram feitos de maneira seqüencial totalizando uma media de 40 amostras por arco aórtico sendo que foram descartados da quantificação os cortes imperfeitos e sem placa, sobrando uma media de 20 cortes por animal.

A preparação das lâminas deu-se da seguinte maneira: As lâminas foram lavadas em solução de água quente (45°C) e detergente. O detergente foi removido por repetidas lavagens em água quente, e as lâminas foram recobertas por uma solução de gelatinização (500 mL de água destilada, 5 g de gelatina incolor e 0,5 g de sulfato de cromo potássio). As lâminas permaneceram nessa solução por 2 minutos, à temperatura de 50°C . Em seguida foram mantidas em estufa a 45°C por 24 horas, para secagem.

Para a identificação dos lipídeos os cortes teciduais foram corados com *Oil Red – O*, que confere cor vermelho-alaranjada aos lipídeos. A solução de coloração era composta por 24 mL de solução estoque (*Oil Red – O*, 0,3 %) e 16 mL de água destilada. Após misturá-la por 10 minutos, a solução foi centrifugada a 4000 rpm por 2 minutos e meio, e então filtrada.

As lâminas contendo os cortes foram posicionadas em um recipiente de vidro fechado contendo a solução de coloração, a uma distância de 2 mm do fundo do recipiente, de maneira a formar uma interface líquida entre a lâmina e o recipiente.

Essa interface fez-se necessária para que resíduos cristalinos da solução pudessem precipitar no fundo do recipiente e não na lâmina, protegendo assim os cortes. O tempo de permanência das lâminas na solução foi de 10 minutos. Quando retiradas da solução de coloração, as lâminas foram lavadas em água corrente também por 10 minutos.

Após a impregnação dos cortes pelo corante, o próximo passo foi a preservação dos mesmos utilizando uma solução de montagem (glicerol em PBS e azida sódica 0,1 %, *mounting medium*) sobre as amostras. As lâminas foram recobertas diretamente com verniz de secagem rápida que impede a entrada de ar e preserva os cortes por mais tempo.

3.5.2

Análise

Morfométrica

A captura de imagens das lâminas foi realizada pela objetivas de 40x do microscópio trinocular Olympus AX70. A imagem registrada pela câmera digital (VK – C150, Hitachi, Japão) acoplada ao microscópio era arquivada no computador pelo programa Honestech TVR2.5. Na tela do monitor a ampliação final real das imagens foi de 1260x. As imagens possuíam resolução de 640 x 480 *pixels*. Para a correta quantificação da área de placa foi fotografada pelo microscópio, nas mesmas condições citadas acima, uma régua micrométrica padrão, a qual foi utilizada como referência para o cálculo da área da lesão vascular.

Foram analisados em média 20 cortes por animal. A área de deposição lipídica, incluindo as camadas média e íntima, foi quantificada diretamente pelo programa Image J. Para cada corte foram fotografados todos os campos contendo área de deposição lipídica, variando de 3 a 8 campos por corte transversal. A área de deposição lipídica para cada corte foi somada e então foi obtida uma média para todas as amostras retiradas de um mesmo animal. O total de área de deposição lipídica encontrada em cada animal foi expresso em μm^2 .

3.6 Determinação da Doença Periodontal

A hemimandíbula esquerda foi extraída do animal logo após a coleta da aorta. Em seguida, foi imersa em água fervente por 15 minutos, foi dissecada mecanicamente e imersa em solução de peróxido de hidrogênio a 3 %, permanecendo nesta solução durante a noite (BAKER et al., 1994; LI; AMAR, 2007).

3.6.1 Análise Morfométrica

O nível ósseo, dado pela a distância compreendida entre a junção cimento-esmalte (JCE) e a crista óssea alveolar (COA) (Figura 2) (BAKER et al., 1994), foi medido através de microscópio (Olympus AX70), utilizando objetiva de 40 x.

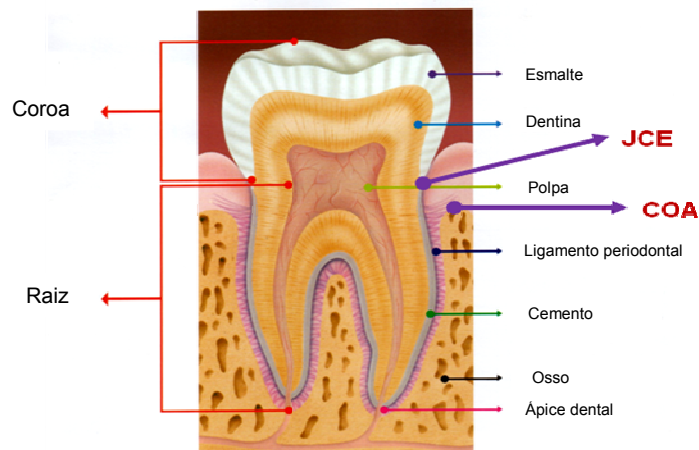


Figura 2. Ilustração de elemento dental e estruturas periodontais. Em destaque, a junção cimento-esmalte (JCE) e a crista óssea alveolar (COA).

Fonte: COLGATE (2008).

Nota: Figura adaptada pelo autor.

A área examinada foi a região interdental entre o primeiro e o segundo molares (Figura 3). As amostras foram codificadas e analisadas de maneira randômica. As aferições foram realizadas duas vezes por amostra e os resultados foram expressos como distância em mm (LI; AMAR, 2007). Dois campos da área interdental foram analisados e então efetuada a média das distâncias por animal. Uma vez que um aumento da distância JCE-COA indica menos osso alveolar, o nível ósseo foi convertido em quantidade óssea relativa pelo cálculo: $1/\text{distância JCE-COA}$. Os

valores foram normalizados pela conversão da quantidade óssea relativa de cada animal infectado em porcentagem da média do grupo controle de cada grupo (BAKER et al., 1994). Quanto menor a porcentagem de osso, maior a reabsorção sofrida.

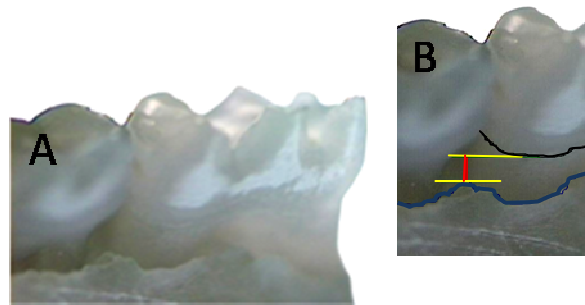


Figura 3. Primeiro e segundo molares mandibulares de camundongos, da esquerda para a direita. Destaque para a junção cimento esmalte (JCE) em preto e para a crista óssea alveolar (COA) em azul escuro. A linha vermelha representa a distância JCE-COA.

3.7 Expressão dos dados

Os resultados estão apresentados como média \pm EPM (erro padrão da média).

A resposta vasopressora induzida pela fenilefrina foi expressa como mudança da pressão de perfusão, subtraindo-se o pico da resposta pressora pela pressão de perfusão basal.

As respostas de relaxamento induzido pela acetilcolina e pelo nitroprussiato de sódio foram expressas como a porcentagem de contração residual à fenilefrina (10^{-5} M). O platô de pré-contração foi considerado como 100 % de contração.

Para a determinação da pD_2 ($-\log$ de ED_{50}), foi realizada análise de regressão não-linear, obtida por meio das análises das curvas dose-resposta (GraphPad Prism Software 4.02, San Diego, CA, USA).

3.8 Análise Estatística

A análise estatística dos dados foi realizada por correlação linear simples, teste “t” de Student para amostras independentes e análise de variância (ANOVA) duas vias, seguida pelo teste *post hoc* de Bonferroni, quando detectada diferença.

Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos.

3.9 Fármacos e Reagentes

- Acetilcolina, cloridrato (Sigma)
- Ácido etilenodiamino tetracético (EDTA) (Sigma)
- Ácido etilenodiamino tetracético, solução (EDTA) (Bioclin)
- Agar (Difco)
- Bicarbonato de sódio (Merck)
- Caldo infuso cérebro-coração (BHI) (Difco)
- Carboximetilcelulose (Imafar)
- Cloreto de cálcio, diidrato (Merck)
- Cloreto de potássio (Merck)
- Cloreto de sódio (Merck)
- Cromo potássio, sulfato (Lachema)
- Extrato de levedura (Difco)
- Fluoreto e EDTA, solução (Bioclin)
- Formaldeído (Dinâmica)
- Fosfato de sódio (Merck)
- Gelatina incolor (Dr. Oetker[®])
- Glicose (Reagen)
- Hemina – menadiona, solução (Laborclin)
- L – Fenilefrina, hidrocloreto (Sigma)
- *Mouting medium* (glicerol em PBS e azida sódica 0,1 %) (Sigma)
- Nitroprussiato de sódio, diidrato (Sigma)

- *Oil Red-O* (Sigma)
- Peróxido de hidrogênio, solução (Lahas)
- Salina em tampão fosfato (PBS) (Gibco)
- Sangue desfibrinado de carneiro (Laborclin)
- Sulfato de magnésio heptaidratado (Merck)
- Tiopental sódico (Thiopentax[®], Cristália)
- Verniz de secagem rápida (Acrilex)

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação Ponderal

Como representado na tabela 1, nem a aterosclerose, nem a doença periodontal alteraram o peso corporal aferido na trigésima semana de vida dos camundongos.

Tabela1. Peso corporal (PC) na trigésima semana de vida de camundongos sem aterosclerose (C57), com aterosclerose moderada (ApoE) e com aterosclerose avançada (ApoE D), portadores (Pg) ou não (CT) de doença periodontal.

	C57		ApoE		ApoE D	
	CT	Pg	CT	Pg	CT	Pg
PC (g)	35 ± 0,6	33 ± 0,6	34 ± 0,8	33 ± 1,5	34 ± 0,8	32 ± 1
n	08	08	07	06	08	10

ANOVA duas vias, P>0,05.

4.2 Análise da Doença Periodontal

Como método comprobatório da eficácia das inoculações de *P. gingivalis* em produzir doença periodontal, foi utilizada a mensuração da distância entre a junção cimento-esmalte e a crista óssea alveolar (DJCE-COA) para o cálculo da quantidade óssea relativa. A diminuição da quantidade óssea equivale à perda ou absorção óssea alveolar.

As médias dos grupos estão representadas na tabela 2 e ilustradas no gráfico 1. A doença periodontal foi confirmada pela redução da quantidade óssea relativa em todos os grupos inoculados (C57 Pg, ApoE Pg, ApoE D Pg).

A absorção óssea observada foi similar em todos os grupos (ANOVA 2 vias; $P > 0,05$).

Tabela 2. Representação da doença periodontal dada pela quantidade óssea relativa (QOR) nos grupos sem aterosclerose (C57), com aterosclerose moderada (ApoE) e com aterosclerose avançada (ApoE D). Os animais com doença periodontal estão representados pela sigla Pg, enquanto os animais controles estão representados pela sigla CT.

	C57		ApoE		ApoE D	
	CT	Pg	CT	Pg	CT	Pg
QOR (%)	100 ± 2,4	48,2 ± 6,2*	103 ± 6	62,9 ± 1,8*	100 ± 6,6	56,8 ± 1,9*
n	08	08	07	06	08	10

*Pg vs seu respectivo controle; ANOVA duas vias, seguida do *post hoc* de Bonferroni. P<0,05.

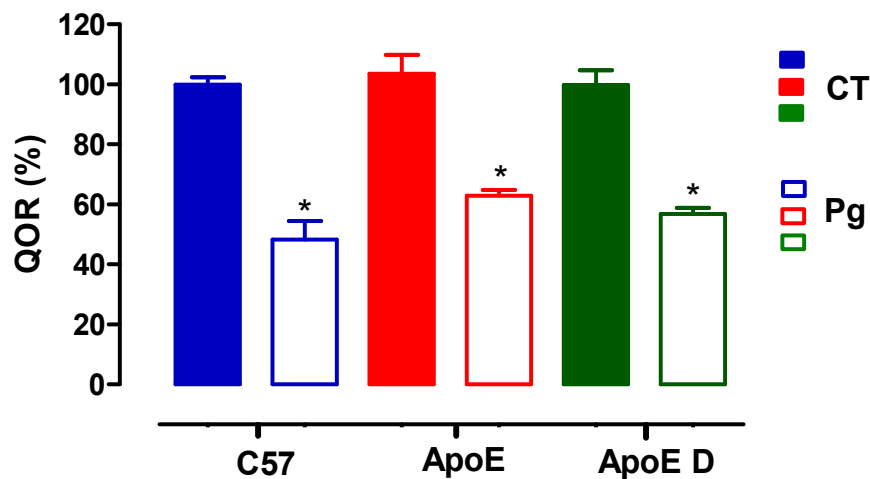


Gráfico 1. Representação gráfica da quantidade óssea relativa (QOR) nos grupos sem aterosclerose (C57), com aterosclerose moderada (ApoE) e com aterosclerose avançada (ApoE D). Os animais com doença periodontal estão representados pela sigla Pg e os animais controle pela sigla CT. C57 CT (n = 08); C57 Pg (n = 08); ApoE CT (n = 07); ApoE Pg (n = 06); ApoE D CT (n = 08); ApoE D (n = 10).

ANOVA duas vias, seguida do *post hoc* de Bonferroni. *Pg vs seu respectivo controle; P<0,05.

4.3 Análise do Perfil Lipídico e da Glicemia

Os dados referentes ao lipidograma e à glicemia estão representados na tabela 3. É pertinente lembrar que, como um dos objetivos do estudo foi estabelecer dois estágios de aterosclerose, diferentes níveis de hipercolesterolemia é que determinarão as distintas fases da aterosclerose.

A eficácia do modelo ApoE^{-/-} é demonstrada pelo aumento de aproximadamente sete vezes nos níveis de colesterol total no grupo que recebeu dieta padrão (ApoE CT), quando comparado ao seu isogênico C57BL/6 (C57 CT). Este aumento é resultado do incremento na fração LDL e é ainda mais acentuado no grupo que recebeu dieta hipercolesterolêmica (ApoE D CT). A fração HDL encontra-se diminuída e a fração VLDL inalterada tanto na aterosclerose moderada (ApoE CT) quanto na avançada (ApoE D CT). Quanto aos triglicerídeos e à glicemia, os animais ateroscleróticos não apresentaram diferença em relação aos animais sem aterosclerose (Gráfico 2).

A doença periodontal não exerceu efeito sobre os níveis séricos aferidos nos animais sem aterosclerose (C57 Pg vs C57 CT) e com aterosclerose avançada (ApoE D Pg vs ApoE D CT). Entretanto, foi observado aumento da fração VLDL e de triglicerídeos em camundongos com aterosclerose moderada e doença periodontal (ApoE Pg), quando comparado ao seu controle (ApoE CT) e aos demais grupos. As demais frações, o colesterol total, os triglicerídeos e a glicemia permaneceram inalterados (Tabela 3).

Tabela 3. Perfis lipídico e glicêmico nos grupos sem aterosclerose (C57), com aterosclerose moderada (ApoE) e com aterosclerose avançada (ApoE D), sejam os camundongos portadores (Pg) ou não (CT) de doença periodontal.

	C57		ApoE		ApoE D	
	CT	Pg	CT	Pg	CT	Pg
Colesterol (mg/dL)	77,7 ± 6,3	85 ± 3	523 ± 64 ⁺	629 ± 41 [#]	913 ± 69 ^{+\$}	1011 ± 61 ^{#o}
LDL (mg/dL)	22,5 ± 3	27 ± 2	489 ± 57 ⁺	569 ± 38 [#]	890 ± 68 ^{+\$}	981 ± 59 ^{#o}
HDL (mg/dL)	40,4 ± 3	47 ± 2 [*]	12 ± 2,5 ⁺	16 ± 1 [#]	8 ± 0,8 ⁺	11 ± 0,8 ^{#o}
VLDL (mg/dL)	11 ± 2	10 ± 1	22 ± 6	44 ± 6 ^{*#}	17 ± 3,5	19 ± 4 ^o
Triglicerídeos (mg/dL)	59 ± 2	51 ± 5	111 ± 32	212 ± 30 ^{*#}	87 ± 17	97 ± 21 ^o
Glicemia (mg/dL)	93 ± 5	114 ± 13	104 ± 16	110 ± 20	134 ± 10	111 ± 6,5
n	08	08	07	06	08	10

⁺ vs C57 CT; ^{\$} vs ApoE CT; [#] vs C57 Pg; ^o vs ApoE Pg; * Pg vs CT; ANOVA duas vias, *post hoc* de Bonferroni. P<0,05.

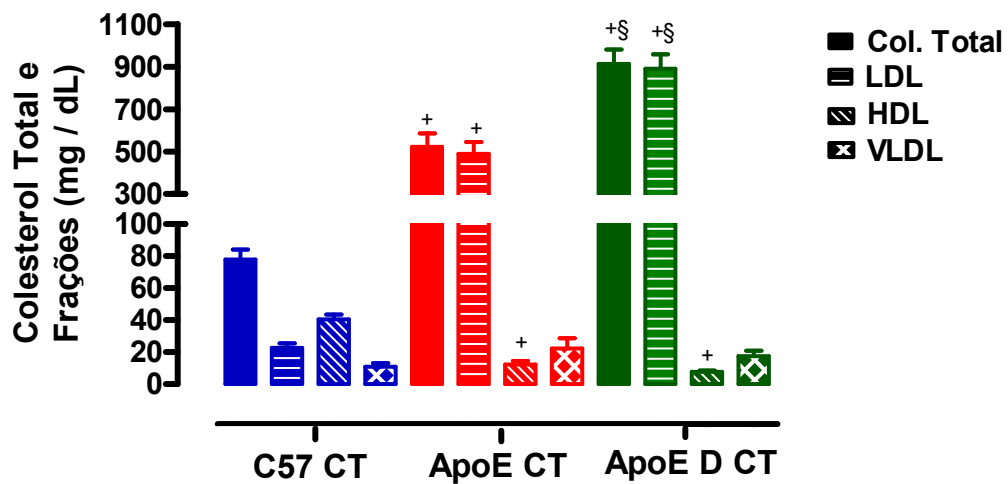


Gráfico 2. Representação dos níveis plasmáticos de colesterol total e frações nos grupos sem aterosclerose (C57 CT; n = 08), com aterosclerose moderada (ApoE CT; n = 07) e com aterosclerose avançada (ApoE D CT; n = 08).

ANOVA duas vias, *post hoc* de Bonferroni. ⁺ vs C57 CT; ^{\$} vs ApoE CT; P<0,05.

4.4 Análise da Inflamação Sistêmica

O estado inflamatório sistêmico foi avaliado pela razão entre a contagem absoluta de neutrófilos e linfócitos (N/L) do sangue periférico. Quando é detectado aumento da razão N/L constata-se então a presença de inflamação sistêmica, que resulta em risco cardiovascular elevado.

Como representado na tabela 4 e ilustrado no gráfico 3, o grupo ApoE CT apresentou aumento aproximado de 180 % na razão N/L em relação ao isogênico C57 CT, enquanto o grupo com aterosclerose avançada apresentou aumento de 400 %, também em relação ao C57 CT. Ainda, o grupo com aterosclerose avançada (ApoE D CT) apresentou aumento de 76 % quando comparado ao grupo com aterosclerose moderada (ApoE CT). Entretanto, a ANOVA duas vias seguida do *post hoc* de Bonferroni não detectou diferença entre os grupos com e sem aterosclerose. Cabe ressaltar que o teste *t* de Student foi capaz de detectar que os animais ateroscleróticos possuem razão N/L aumentada em relação ao seu controle, e que a inflamação na aterosclerose avançada é maior que na aterosclerose moderada.

Sendo assim, para avaliar se a hipercolesterolemia exerce efeito sobre o estado inflamatório sistêmico foi realizada uma correlação entre os valores de colesterol total e a razão N/L nos grupos C57 CT, ApoE CT e ApoE D CT.

O gráfico 4 ilustra a correlação positiva existente entre os parâmetros avaliados, ou seja, quanto maior o valor de colesterol total, maior a razão N/L.

Quando avaliado o efeito da doença periodontal sobre o indicador de inflamação sistêmica (razão N/L), não foram observadas alterações nos animais sem aterosclerose (C57 Pg) e com aterosclerose moderada (ApoE Pg), quando comparados aos seus respectivos controles. Todavia, a doença periodontal foi capaz de aumentar cerca de 700 % o valor da razão N/L na aterosclerose avançada (Tabela 4, Gráfico 3).

Tabela 4. Razão entre a contagem absoluta de neutrófilos e linfócitos (N/L) em camundongos sem aterosclerose (C57), com aterosclerose moderada (ApoE) e com aterosclerose avançada (ApoE D), sejam eles portadores (Pg) ou não (CT) de doença periodontal.

	C57		ApoE		ApoE D	
	CT	Pg	CT	Pg	CT	Pg
N/L	0,06 ± 0,01	0,05 ± 0,009	0,17 ± 0,01	0,17 ± 0,02	0,30 ± 0,04	2,37 ± 0,23 ^{*#°}
n	08	08	07	06	08	10

* Pg vs CT; # vs C57 Pg; ° vs ApoE Pg; ANOVA duas vias, *post hoc* de Bonferroni. P<0,05.

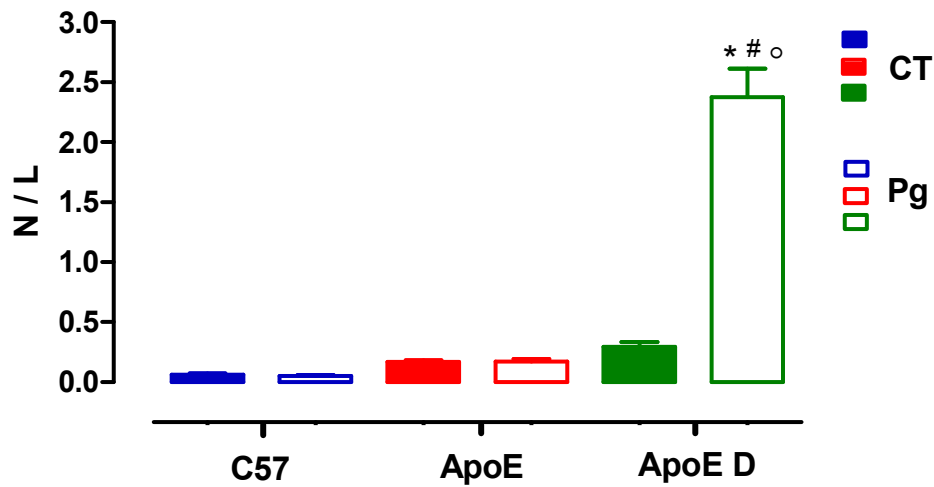


Gráfico 3. Ilustração gráfica da razão entre a contagem absoluta de neutrófilos e linfócitos (N/L) em camundongos sem aterosclerose (C57), com aterosclerose moderada (ApoE) e com aterosclerose avançada (ApoE D), sejam eles portadores (Pg) ou não (CT) de doença periodontal. C57 CT (n = 08); C57 Pg (n = 08); ApoE CT (n = 07); ApoE Pg (n = 06); ApoE D CT (n = 08); ApoE D (n = 10). ANOVA duas vias, *post hoc* de Bonferroni. * Pg vs CT; # vs C57 Pg; ° vs ApoE Pg; P<0,05.

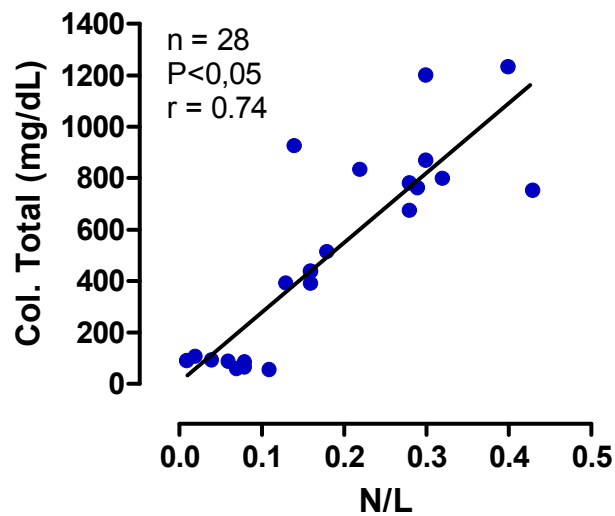


Gráfico 4. Correlação entre os valores de colesterol total e a razão N/L nos animais dos grupos C57 CT, ApoE CT e ApoE D CT. O valor de n representa o número de animais dos 3 grupos. Correlação linear simples. $r = 0,74$; $P < 0,05$.

4.5 Extensão da Lesão Aterosclerótica

Na análise da área transversal de deposição lipídica na parede vascular pôde-se observar que a linhagem C57 apresenta discreta extensão de lipídeos corados, enquanto a linhagem ApoE^{-/-} apresenta evidente área de coloração de lipídeos.

Também foi possível constatar a eficácia da dieta hipercolesterolêmica em aumentar a extensão da lesão aterosclerótica no modelo de aterosclerose avançada (ApoE D CT vs ApoE CT), ao passo que o modelo de periodontite experimental utilizado não demonstrou ter efeito sobre esse parâmetro.

Os valores numéricos estão representados na tabela 5 e em forma de gráfico de barras no gráfico 5.

Tabela 5. Área de deposição lipídica na parede vascular de camundongos sem aterosclerose (C57), com aterosclerose moderada (ApoE) e com aterosclerose avançada (ApoE D), sejam eles portadores (Pg) ou não (CT) de doença periodontal.

	C57		ApoE		ApoE D	
	CT	Pg	CT	Pg	CT	Pg
Área de deposição lipídica ($\mu\text{m}^2 \times 10^3$)	0,66 \pm 0,2	0,75 \pm 0,2	41,25 \pm 0,9 ⁺	57,5 \pm 4,32 [#]	115,5 \pm 12,18 ^{+§}	120,54 \pm 6,83 ^{#°}
n	04	04	04	04	04	04

⁺ vs C57 CT; [§] vs ApoE CT; [#] vs C57 Pg; [°] vs ApoE Pg; ANOVA duas vias, *post hoc* de Bonferroni. P<0,05.

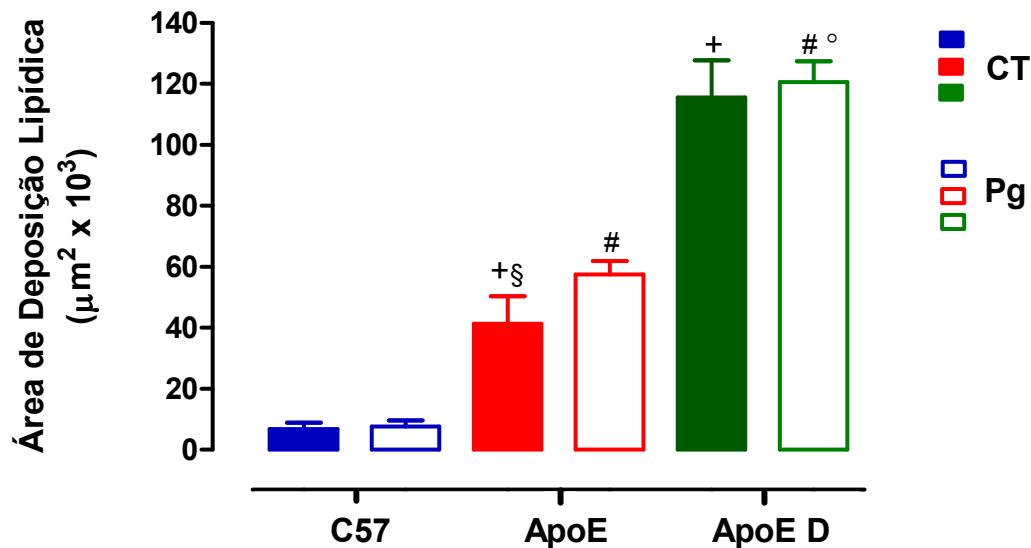


Gráfico 5. Área de deposição de lipídeos na parede vascular em camundongos sem aterosclerose (C57 CT, n = 04), com aterosclerose moderada (ApoE CT, n = 04), com aterosclerose avançada (ApoE D CT, n = 04), sem aterosclerose com doença periodontal (C57 Pg, n = 04), com aterosclerose moderada e doença periodontal (ApoE Pg, n = 04), e com aterosclerose avançada e doença periodontal (ApoE D Pg, n = 04).

ANOVA duas vias seguida de *post hoc* de Bonferroni. ⁺ vs C57 CT; [§] vs ApoE CT; [#] vs C57 Pg; [°] vs ApoE Pg; P< 0,05.

4.6 Reatividade Vascular

Todos os experimentos de reatividade vascular foram realizados no leito arteriolar mesentérico de camundongos com trinta semanas de vida.

Antes de avaliar se a doença periodontal exerce algum efeito sobre a reatividade vascular, demonstrar-se-á como está a resposta do leito arteriolar mesentérico na ausência e na presença de aterosclerose moderada e avançada.

A primeira comparação foi realizada entre animais sem aterosclerose (C57 CT) e com aterosclerose moderada (ApoE CT). A tabela 6 contém os valores de resposta máxima e pD2 à fenilefrina, à acetilcolina e ao nitroprussiato de sódio dos grupos C57 CT e ApoE CT. O gráfico 6 ilustra as respectivas curvas dose-resposta.

Como resultado, a aterosclerose aumentou a resposta máxima à fenilefrina, sem alterar as curvas de relaxamento.

Tabela 6. Valores de resposta máxima (Rmax) e pD2 para as curvas dose-resposta à fenilefrina (FE), à acetilcolina (ACh) e ao nitroprussiato de sódio (NPS) nos grupos de camundongos sem aterosclerose (C57 CT) e com aterosclerose moderada (ApoE CT).

	Grupos	
	C57 CT	ApoE CT
Rmax FE (mmHg)	78,6 ± 2,7	98 ± 5 *
pD2 FE	2,52 ± 0,09	2,39 ± 0,07
Rmax ACh (mmHg)	76 ± 2,3	75,5 ± 2,9
pD2 ACh	6,15 ± 0,17	6,12 ± 0,27
Rmax NPS (mmHg)	92 ± 1,3	90,5 ± 2,5
pD2 NPS	6,59 ± 0,07	6,90 ± 0,10
n	07	07

* vs C57 CT; Teste *t* de Student. P<0,05.

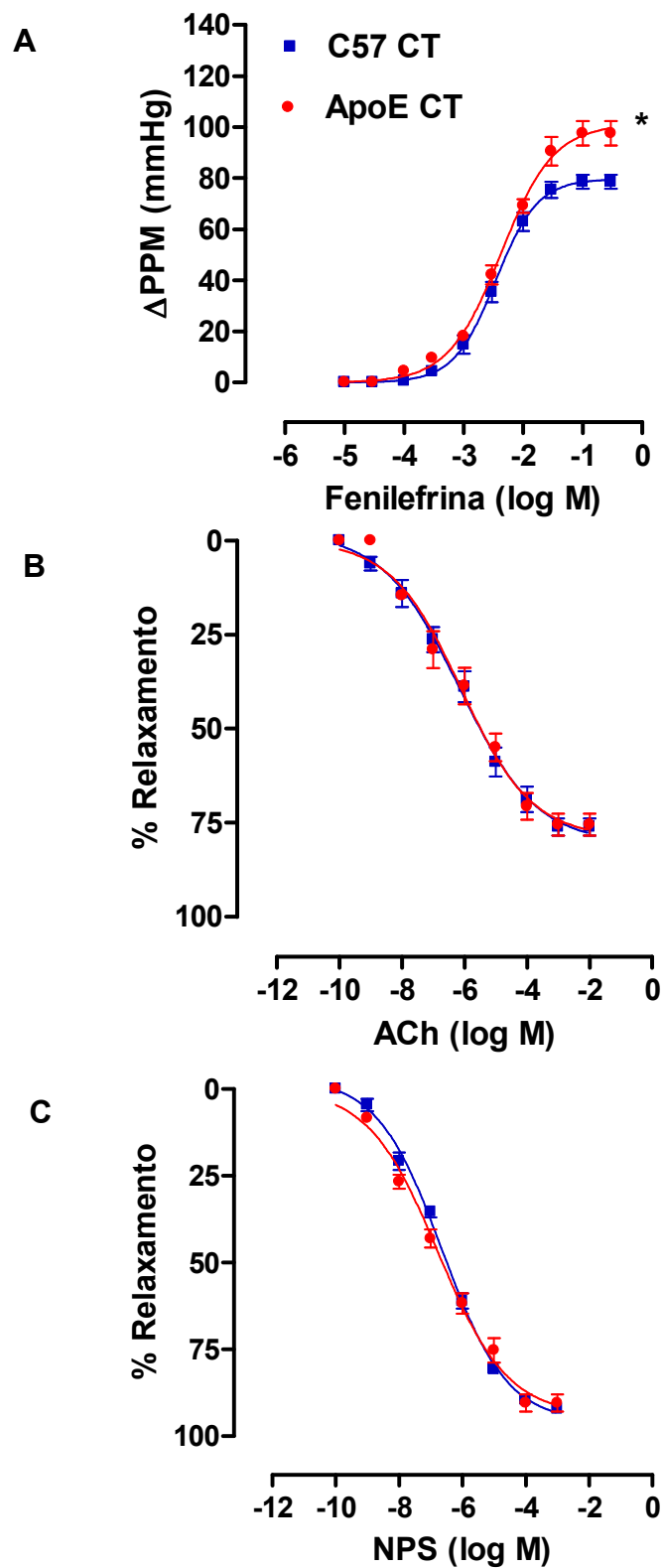


Gráfico 6. Curvas dose – resposta à fenilefrina (A), à acetilcolina (B) e ao nitroprussiato de sódio (C) em leito arteriolar mesentérico de camundongos C57 controle (C57 CT; n = 07, ■) e ApoE controle (ApoE CT; n = 07, ●).
 Teste *t* de Student, * P < 0,05, relativo à resposta máxima.

Ao comparar os animais com aterosclerose avançada aos com aterosclerose moderada observou-se que o incremento da resposta máxima à fenilefrina encontrada nos animais com aterosclerose moderada foi mantido no grupo com aterosclerose avançada. Adicionalmente, os animais com aterosclerose avançada apresentaram aumento da sensibilidade ao agonista alfa adrenérgico. Quanto às curvas de relaxamento, as respostas entre os grupos foram semelhantes.

Esse resultado pode ser visualizado na tabela 7 e no gráfico 7.

Tabela 7. Valores de resposta máxima (Rmax) e pD2 para as curvas dose-resposta à fenilefrina (FE), à acetilcolina (ACh) e ao nitroprussiato de sódio (NPS) nos grupos com aterosclerose moderada (ApoE CT) e com aterosclerose avançada (ApoE D CT).

	Grupos	
	ApoE CT	ApoE D CT
Rmax FE (mmHg)	98 ± 5	97 ± 7
pD2 FE	2,40 ± 0,07	2,66 ± 0,06 *
Rmax ACh (mmHg)	75,5 ± 2,9	79 ± 2
pD2 ACh	6,12 ± 0,27	5,9 ± 0,18
Rmax NPS (mmHg)	90,5 ± 2,5	93 ± 0,8
pD2 NPS	6,90 ± 0,10	6,54 ± 0,21
n	07	06

* vs C57 CT; Teste *t* de Student. P<0,05.

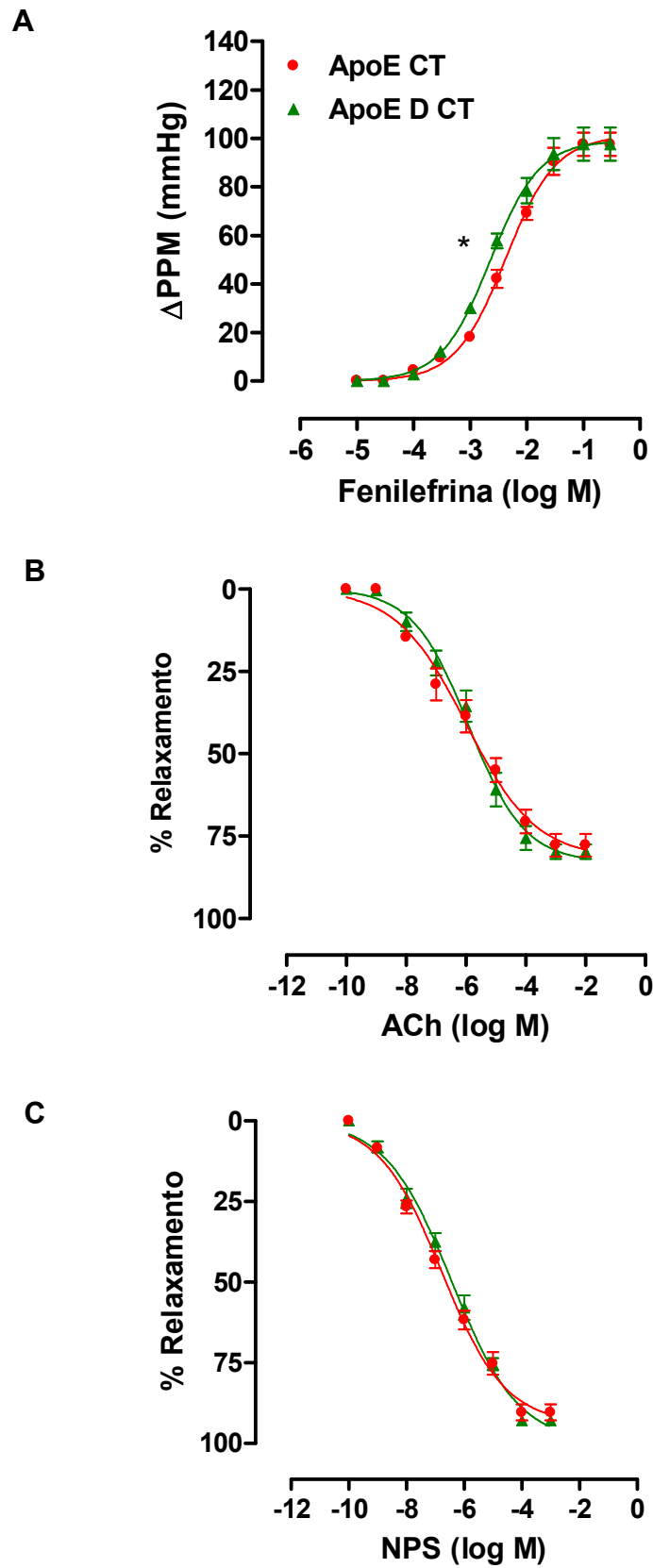


Gráfico 7. Curvas dose – resposta à fenilefrina (**A**), à acetilcolina (**B**) e ao nitroprussiato de sódio (**C**) em leito arteriolar mesentérico de camundongos com aterosclerose moderada (ApoE CT; n = 07, ●) e avançada (ApoE D CT; n = 06, ▲).
Teste *t* de Student, * P < 0,05, relativo à resposta máxima e à pD2.

Para avaliar se a doença periodontal exerce algum efeito sobre a reatividade vascular de animais sem aterosclerose ou sistemicamente saudáveis, realizou-se a comparação entre curvas dose-resposta de camundongos C57 com e sem doença periodontal (C57 Pg vs C57 CT, respectivamente).

Como resultado, a doença periodontal aumentou a resposta máxima à fenilefrina. Em contrapartida, não foram detectadas alterações nas curvas de relaxamento à acetilcolina e ao nitroprussiato de sódio.

Os valores de resposta máxima e de pD2 dos grupos C57 CT e C57 Pg estão representados na tabela 8, e o gráfico 8 ilustra as curvas dose-resposta.

Tabela 8. Valores de resposta máxima (Rmax) e pD2 para as curvas dose-resposta à fenilefrina (FE), à acetilcolina (ACh) e ao nitroprussiato de sódio (NPS) nos animais sem aterosclerose e sem doença periodontal (C57 CT) e sem aterosclerose mas com doença periodontal (C57 Pg).

Grupos		
	C57 CT	C57 Pg
Rmax FE (mmHg)	78,6 ± 2,7	92 ± 5,5 *
pD2 FE	2,52 ± 0,09	2,37 ± 0,06
Rmax ACh (mmHg)	76 ± 2,3	74,5 ± 1,4
pD2 ACh	6,15 ± 0,17	6,25 ± 0,1
Rmax NPS (mmHg)	92 ± 1,3	89 ± 0,8
pD2 NPS	6,59 ± 0,07	6,71 ± 0,04
n	07	06

* vs C57 CT; Teste *t* de Student. P<0,05.

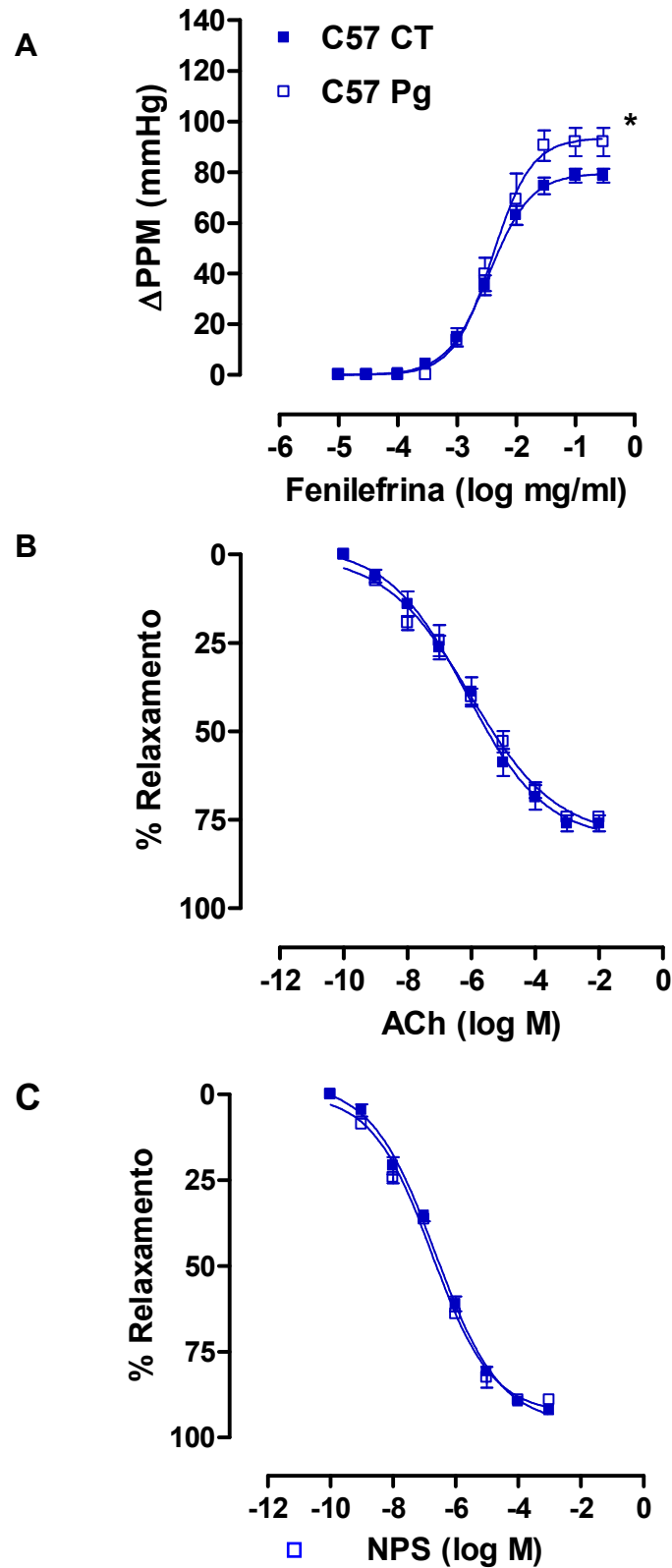


Gráfico 8. Curvas dose – resposta à fenilefrina (A), à acetilcolina (B) e ao nitroprussiato de sódio (C) em leito arteriolar mesentérico de camundongos C57 controle (C57 CT; n = 07, ■) e C57 com doença periodontal (C57 Pg; n = 06, □).
 Teste *t* de Student, * $P < 0,05$, relativo à resposta máxima.

Definido que a doença periodontal leva à hiperreatividade alfa adrenérgica, seria o aumento de resposta máxima à fenilefrina encontrado na aterosclerose moderada incrementado pela doença periodontal? E como estariam as curvas de relaxamento na coexistência das duas doenças?

Para responder a esta pergunta, foram comparados os grupos de camundongos com aterosclerose moderada com e sem doença periodontal (ApoE Pg vs ApoE CT, respectivamente).

Como resposta, a doença periodontal exacerbou a hiperreatividade à fenilefrina encontrada na aterosclerose, sem alterar a resposta vasodilatadora.

Os valores de resposta máxima e pD2 estão representados na tabela 9 e as curvas dose-resposta estão ilustradas no gráfico 9.

Tabela 9. Valores de Resposta Máxima (Rmax) e pD2 para as curvas dose-resposta à Fenilefrina (FE), à Acetilcolina (ACh) e ao Nitroprussiato de Sódio (NPS) nos grupos com aterosclerose moderada, portadores (ApoE Pg) ou não (ApoE CT) de doença periodontal.

	Grupos	
	ApoE CT	ApoE Pg
Rmax FE (mmHg)	98 ± 5	119 ± 6,5 *
pD2 FE	2,36 ± 0,05	2,30 ± 0,05
Rmax ACh (mmHg)	75,5 ± 2,9	75 ± 3
pD2 ACh	6,12 ± 0,27	6 ± 0,18
Rmax NPS (mmHg)	90,5 ± 2,5	92 ± 2
pD2 NPS	6,90 ± 0,10	6,7 ± 0,08
n	07	06

* vs ApoE CT; Teste *t* de Student. P<0,05.

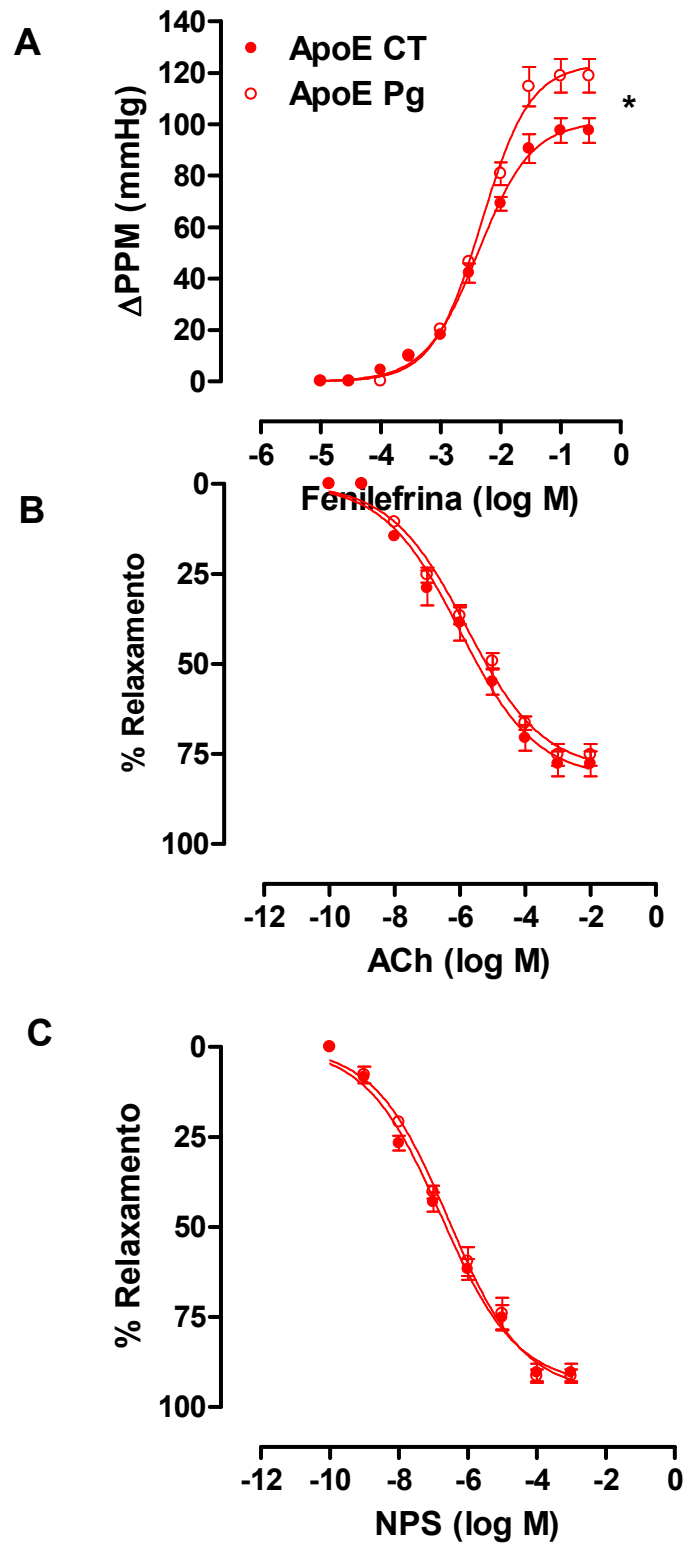


Gráfico 9. Curvas dose – resposta à fenilefrina (A), à acetilcolina (B) e ao nitroprussiato de sódio (C) em leito arteriolar mesentérico de camundongos ApoE controle (ApoE CT; n = 07, ●) e ApoE com doença periodontal (ApoE Pg; n = 06, ○). Teste t de Student, * P < 0,05, relativo à resposta máxima.

O passo seguinte foi determinar se a doença periodontal modifica a resposta vascular na aterosclerose avançada.

Da mesma forma que nos demais grupos, a doença periodontal aumentou a resposta máxima à fenilefrina nos camundongos com aterosclerose avançada, sem alterar o relaxamento vascular.

A tabela 10 contém os valores de resposta máxima e pD2 e o gráfico 10 ilustra as curvas dose-resposta.

Tabela 10. Valores de Resposta Máxima (Rmax) e pD2 para as curvas dose-resposta à Fenilefrina (FE), à Acetilcolina (ACh) e ao Nitroprussiato de Sódio (NPS) nos grupos com aterosclerose avançada, portadores (ApoE D Pg) ou não (ApoE D CT) de doença periodontal.

	Grupos	
	ApoE D CT	ApoE D Pg
Rmax FE (mmHg)	97 ± 7	120 ± 6 *
pD2 FE	2,66 ± 0,06	2,65 ± 0,07
Rmax ACh (mmHg)	79 ± 2	79 ± 3
pD2 ACh	5,9 ± 0,18	6,01 ± 0,18
Rmax NPS (mmHg)	93 ± 0,8	92,3 ± 2,2
pD2 NPS	6,54 ± 0,21	6,42 ± 0,13
n	06	08

* vs ApoE D CT; Teste *t* de Student. P<0,05.

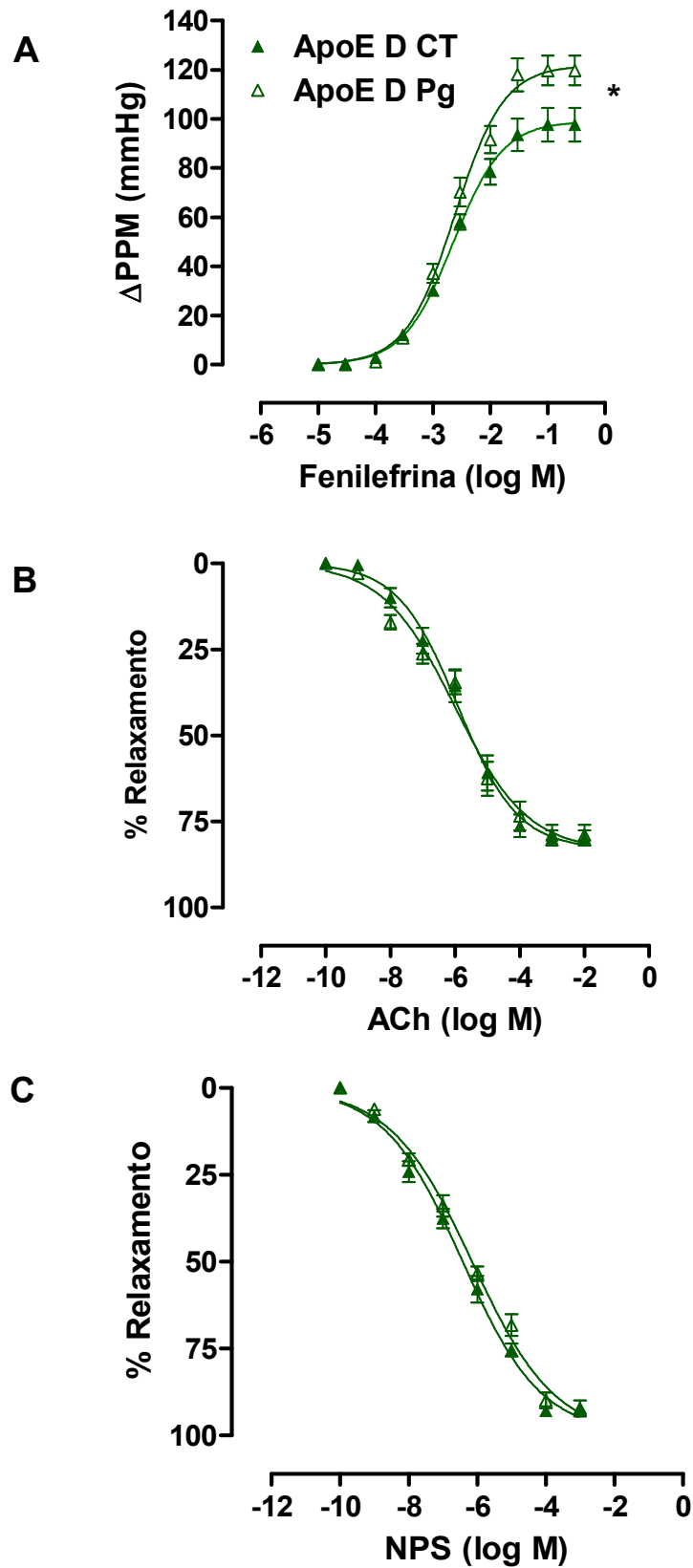


Gráfico 10. Curvas dose – resposta à fenilefrina (**A**), à acetilcolina (**B**) e ao nitroprussiato de sódio (**C**) em leito arteriolar mesentérico de camundongos com aterosclerose avançada (ApoE D CT; n = 06, ▲) e com aterosclerose avançada e doença periodontal (ApoE D Pg; n = 08, △). Teste *t* de Student, * P < 0,05, relativo à resposta máxima.

5 DISCUSSÃO

O presente estudo mostrou que, independentemente da aterosclerose, a doença periodontal exerce efeito sobre a reatividade vascular do leito arteriolar mesentérico de camundongos. Adicionalmente, a doença periodontal exacerbou a inflamação sistêmica nos animais com aterosclerose avançada, aumentando o risco de eventos cardiovasculares nesse grupo.

De acordo com estudos anteriores e condizente com o detectado neste estudo, os níveis de colesterol plasmático encontram-se elevados em camundongos ApoE^{-/-} tratados com dieta padrão (PLUMP et al, 1992; ZHANG et al., 1992; ZHANG et al., 1994; JAWIEN et al., 2004). Ao utilizar dieta aterogênica para estabelecer um estágio mais avançado de aterosclerose, a eficácia da mesma pôde ser comprovada pelo aumento da hipercolesterolemia e da extensão de deposição lipídica na lesão aterosclerótica. Paralelamente, a inflamação sistêmica se mostrou exacerbada na aterosclerose avançada. Aliás, a correlação positiva entre colesterol total e razão N/L demonstra que o grau de inflamação sistêmica é proporcional à gravidade da aterosclerose. Esse resultado pode ser explicado pelo fato de a aterosclerose ser uma doença inflamatória sistêmica (ROSS, 1999).

Quanto à influência da doença periodontal nos níveis de colesterol e glicemia, nenhuma alteração foi observada, estando esse resultado de acordo com o encontrado na doença periodontal em camundongos (LALLA et al., 2003) e em humanos (AMAR et al., 2003). Todavia, o grupo com doença periodontal e aterosclerose moderada apresentou aumento de triglicérides em relação aos demais grupos. Essa alteração pode ser atribuída ao fato de os animais não terem sido submetidos a jejum antes da coleta de sangue.

Um achado importante foi o de que na aterosclerose avançada a doença periodontal amplificou o grau de inflamação sistêmica nos animais. A razão N/L foi aumentada em oito vezes pela doença periodontal nesse grupo. E como a razão N/L é utilizada como preditora de eventos cardiovasculares futuros (HORNE et al., 2005), a doença

periodontal aumenta o risco de eventos cardiovasculares na aterosclerose avançada. Entretanto, na aterosclerose moderada não houve alteração de resposta inflamatória provocada pela doença periodontal, resultado compatível com o de Miyamoto e colaboradores (2006), que também não observaram alteração da resposta inflamatória sistêmica em camundongos ApoE^{-/-} infectados com *P. gingivalis*, alimentados com dieta padrão e examinados na vigésima primeira semana de vida. Nos animais sem aterosclerose também não foi detectada resposta inflamatória sistêmica induzida pela doença periodontal, apesar de alguns autores relacionarem a periodontite em humanos ao aumento de marcadores inflamatórios sistêmicos, como proteína C reativa, interleucina 6 e neutrófilos (LOOS et al., 2000; MATTILA et al., 2002; NOACK et al., 2001; SLADE et al., 2000).

Embora a literatura relate aumento da área de lesão aterosclerótica provocado pela doença periodontal em animais, neste estudo a doença periodontal não alterou a área de lesão aterosclerótica nem na aterosclerose moderada nem na avançada. Li e colaboradores (2002) relataram aumento da área de lesão apenas a partir de 14 inoculações semanais de 50 µL de 10⁷ UFC de *P. gingivalis* por via intravenosa em camundongos ateroscleróticos. Em contrapartida, os animais inoculados por 10 semanas não apresentaram nenhuma alteração da área de placa. No presente trabalho foram realizadas apenas três inoculações, de 100 µL de 10⁹ UFC e, como o objetivo foi mimetizar as condições normais pelas quais o periodontopatógeno poderia alcançar o sistema circulatório, a inoculação do *P. gingivalis* foi tópica, e não intravenosa como descrita pelos autores. Lalla e colaboradores (2003) também observaram aumento na média das áreas das lesões do seio aórtico em camundongos ApoE^{-/-} inoculados com *P. gingivalis* por 3 semanas, num total de 15 inoculações de 0,2 mL de 1,5x10¹² UFC. Foram realizadas inoculações por gavagem e por via tópica anal, sendo esta última utilizada pelo fato de os camundongos serem coprofágicos, estabelecendo assim um ciclo oral de reinfecção. Entretanto, na própria discussão os autores criticam o fato de a carga patogênica ter sido alta. Miyamoto e colaboradores (2006) utilizaram a mesma metodologia de Lalla e colaboradores (2003) também encontrando aumento na área de placa no seio aórtico de camundongos ApoE^{-/-} infectados. Neste trabalho porém, a extensão da lesão pode não ter sofrido alteração pelo fato de a carga de patógenos ter sido menor, pelas inoculações terem sido mais esparsas e em menor número que as

referidas por Lalla e colaboradores (2003), e pelo fato de ter sido utilizada apenas a via oral tópica.

Fato é que existe grande dificuldade em se estabelecer um modelo de doença periodontal que represente fielmente a doença periodontal em humanos. Além da dificuldade de se estabelecer uma carga patogênica ideal, existe grande diversidade de microrganismos orais e, apesar de apenas três serem considerados periodontopatógenos, os microrganismos podem coagregar-se, e interagir entre si (SOCRANSKY; HAFFAJEE, 2002). A associação entre espécies bacterianas pode variar de benéfica à maléfica, tanto reduzindo a patogenicidade de uma espécie, quanto acentuando a patogenicidade de outra de maneira aditiva ou sinérgica (SOCRANSKY; HAFFAJEE, 2005). E como a microbiota oral do camundongo é diferente da microbiota oral humana, não se sabe como o *P. gingivalis* interage nestes animais.

Entretanto, sendo o *Porphyromonas gingivalis* o principal patógeno encontrado na periodontite crônica, e sua inoculação em camundongos capaz de reproduzir a destruição tecidual periodontal encontrada em humanos, este modelo é bem aceito para se estudar os efeitos sistêmicos da doença periodontal.

Em se tratando de aterosclerose e função vascular, uma característica marcante é a disfunção endotelial. Inclusive, ela antecede as alterações vasculares estruturais (ROSS, 1999). Além de ser observada em humanos (DAVIGNON; GANZ, 2004), a disfunção endotelial na aterosclerose também tem sido relatada em camundongos ApoE^{-/-} submetidos à dieta rica em gordura (DECKERT et al., 1999; LAMPING et al., 1999; d'USCIO et al., 2001^a; d'USCIO et al., 2001^b; JIANG et al., 2001; JIANG et al., 2003; MATSUMOTO et al., 2003; BENKÖ et al., 2004; WASSMANN et al., 2004; KAUL et al., 2004; KYSELOVIC et al., 2005; MUJYNYA - LUDUNGE et al., 2005).

Em camundongos ApoE^{-/-} tratados com dieta regular os relatos são controversos. Bonthu e colaboradores (1997) não detectaram disfunção endotelial em aortas de camundongos ApoE^{-/-} com aproximadamente 20 semanas de idade, da mesma forma que Villeneuve e colaboradores (2003), em camundongos ApoE^{-/-} com 35 semanas. Já Crauwels e colaboradores (2003) observaram que, em aortas de camundongos ApoE^{-/-} com 18 meses, a disfunção ocorria apenas em segmentos

com placa aterosclerótica. Por fim, Ohashi e colaboradores (2006) publicaram que a disfunção endotelial em camundongos ApoE^{-/-} sob dieta regular depende do vaso estudado.

A maioria dos estudos que relatam disfunção endotelial em camundongos ApoE^{-/-} utilizou anéis de aorta, um vaso de condutância, e a disfunção endotelial foi determinada por prejuízo do relaxamento mediado pelo endotélio. Em vasos de resistência os estudos são em menor quantidade. Gödecke e colaboradores (2002), ao estudarem a reatividade das coronárias de camundongos ApoE^{-/-} sob dieta regular com aproximadamente 7 meses de idade, observaram que o relaxamento mediado pela acetilcolina se manteve preservado. Entretanto, quando Xu e colaboradores (2007) avaliaram a função endotelial de coronárias de camundongos ApoE^{-/-} com aproximadamente 6 meses de idade, sob dieta rica em gordura, observaram prejuízo do relaxamento mediado pelo endotélio. d'Uscio e colaboradores (2002) observaram disfunção endotelial em anéis de artéria mesentérica de camundongos que ingeriram ração rica em gordura por 30 semanas. Em contrapartida, Morikaua e colaboradores (2005) não observaram prejuízo na vasodilatação mediada pelo endotélio em anéis de artéria mesentérica de camundongos submetidos à dieta regular. Nesses exemplos, embora os dois primeiros estudos tenham utilizado arteríolas coronárias e os dois últimos anéis de mesentérica, o fato de haver disfunção endotelial quando da administração de dieta rica em gordura foi mantido. Ainda, admitindo que as condições de avaliação vascular nos referidos estudos tenham sido diferentes, Lamping e colaboradores (1999) e Kitayama e colaboradores (2007) vêm comprovar a influência da dieta rica em gordura ao detectar prejuízo da vasodilatação à acetilcolina apenas em vasos de camundongos ApoE^{-/-} submetidos à referida dieta, enquanto os camundongos que ingeriram dieta padrão não manifestaram alteração de resposta.

Estudos em leito vascular de camundongos ateroscleróticos *knockout* para apolipoproteína E são ainda mais escassos (GÖDECKE et al., 2002; WÖLFLE; DE WIT, 2005; ARRUDA et al., 2005). No leito arteriolar mesentérico existe apenas um, realizado em nosso laboratório, em que os autores avaliaram a reatividade vascular

de camundongos jovens, com 10 a 12 semanas de idade, alimentados com dieta regular (ARRUDA et al., 2005).

Ao acessar a liberação dos vasodilatadores endoteliais mediante administração de acetilcolina, Arruda e colaboradores (2005) demonstraram que o relaxamento mediado pelo endotélio encontrou-se preservado. Paralelamente, o presente estudo demonstra que, independentemente do grau de hipercolesterolemia, da extensão da lesão aterosclerótica e do grau de inflamação sistêmica, não houve prejuízo da resposta vasodilatadora endotelial. Em resumo, a hipercolesterolemia, seja ela moderada ou avançada, em animais jovens ou adultos, não afeta a resposta vasodilatadora endotelial do leito arteriolar mesentérico. Como não foi avaliada a participação isolada de cada vasodilatador derivado do endotélio, não foi possível detectar se a aterosclerose promove alguma alteração compensatória entre eles.

Entretanto, Villeneuve e colaboradores (2003) ao estudarem anéis de aorta de camundongos ApoE^{-/-} tratados ou não com dieta rica em gordura, observaram que a biodisponibilidade do principal vasodilatador endotelial deste vaso, o óxido nítrico, manteve-se inalterada, mesmo à despeito de hipercolesterolemia grave, o que indica que não há alteração compensatória na liberação dos vasodilatadores endoteliais. O mais interessante nesse estudo foi que a biodisponibilidade do óxido nítrico manteve-se inalterada não somente à despeito de hipercolesterolemia grave, mas também apesar da presença de lesões ateroscleróticas, do aumento da atividade da NADPH oxidase e da redução da expressão da superóxido dismutase e da catalase. Um verdadeiro paradoxo. Diante desse resultado os autores chegaram a relatar que o camundongo ApoE^{-/-} representa um modelo atípico de aterosclerose.

Em arteríolas musculares, onde o principal vasodilatador endotelial é o fator hiperpolarizante derivado do endotélio, a liberação e a eficácia do mesmo também manteve-se inalterada pela hipercolesterolemia, independentemente de ter sido administrada dieta rica em gordura ou não (WÖLFLE et al., 2005). E sendo o leito arteriolar mesentérico considerado de resistência, os resultados de Wölfle e colaboradores (2005) reforçam os achados deste estudo.

Fator comum a praticamente todos os estudos vasculares no modelo ApoE^{-/-} é o fato de a responsividade a doador de óxido nítrico estar preservada, uma vez que o relaxamento independente do endotélio não difere do grupo controle. Semelhantemente, o presente trabalho não detectou diferença de resposta entre os animais ateroscleróticos e C57BL/6, quando da administração de nitroprussiato de sódio.

Além da avaliação da resposta vasodilatadora, este estudo também investigou a resposta vascular contrátil. E poucos são os trabalhos que o fazem no modelo ApoE^{-/-} (ARRUDA et al., 2005; FRANSEN et al., 2008). O aumento de resposta máxima à fenilefrina encontrado nos animais com aterosclerose moderada é semelhante ao encontrado por Arruda e colaboradores (2005) em resposta à noradrenalina em camundongos ApoE^{-/-} jovens. Somado ao aumento de resposta máxima à fenilefrina, os animais com aterosclerose avançada também apresentaram aumento de sensibilidade. Resultado semelhante foi recentemente observado por Fransen e colaboradores (2008) em anéis de aorta. Os autores destacaram a diferença entre a biodisponibilidade basal e a estimulada de óxido nítrico. Como a resposta a acetilcolina manteve-se preservada, a biodisponibilidade de óxido nítrico estimulada por ativação de receptores colinérgicos estava inalterada. Como a resposta à fenilefrina estava aumentada e esse aumento foi revertido pela administração de inibidor da óxido nítrico sintase, constatou-se que a liberação basal de óxido nítrico estava diminuída. E esta diminuição foi atribuída à redução da concentração basal de cálcio.

Apesar de não ter sido objeto deste estudo determinar os mecanismos envolvidos na alteração da resposta vascular, pode ser que a hiperreatividade à fenilefrina tenha sido provocada pela redução da biodisponibilidade basal de óxido nítrico. A inflamação sistêmica encontrada no modelo de aterosclerose estudado, poderia, através da produção de espécies reativas de oxigênio, inativar o óxido nítrico, diminuindo sua biodisponibilidade basal. E a piora do estado inflamatório sistêmico no grupo com aterosclerose avançada também poderia ajudar a explicar o efeito adicional na sensibilidade à fenilefrina.

Outra possibilidade seria o sobrerregulação de uma via constritora. A endotelina-1 está sobrerregulada na aterosclerose e suas principais ações são nas células musculares lisas. Dentre seus efeitos, ela promove proliferação e contração dessas células, que pode levar ao aumento da resposta à fenilefrina (IVEY et al., 2008).

Quando além de aterosclerose os camundongos apresentaram doença periodontal, a hiperreatividade à fenilefrina foi ainda mais acentuada. Todavia, como a doença periodontal piorou consideravelmente a inflamação sistêmica apenas na aterosclerose avançada, e o aumento de resposta máxima à fenilefrina foi semelhante ao encontrado na aterosclerose moderada, o argumento de que a piora do estado inflamatório estaria diminuindo a biodisponibilidade basal de óxido nítrico não é válido na coexistência das duas doenças.

O mecanismo pelo qual a doença periodontal interfere na reatividade à fenilefrina de camundongos ateroscleróticos é desconhecido. O que se sugere é que, como a produção de endotelina está aumentada no fluido crevicular de indivíduos com periodontite (FUJIOKA et al., 2003) pode ser que sistemicamente a produção de endotelina também seja estimulada pela doença periodontal, levando à hiperreatividade vasoconstritora.

É interessante notar que mesmo nos camundongos sem aterosclerose esse efeito também foi observado, mostrando que a doença periodontal é capaz de alterar a função vascular, mesmo em animais saudáveis sistemicamente. Recentemente, Higashi e colaboradores (2008) detectaram alteração de função vascular provocada pela doença periodontal em indivíduos saudáveis.

Entretanto, em indivíduos com aterosclerose nenhum estudo foi publicado. Só é sabido que, além de alterar a função vascular de indivíduos saudáveis, a doença periodontal também altera a reatividade de indivíduos hipertensos (HIGASHI et al., 2008).

E para que a função vascular se mostrasse alterada 12 semanas após a inoculação oral do *P. gingivalis*, a agressão endotelial teria de ser constante. E o foi. A via pela

qual a doença periodontal repercute sistemicamente é a bacteremia (SYRJANEN et al., 1989). Em cada ato mastigatório há bacteremia transiente. Como a doença periodontal nos camundongos exibiu caráter crônico uma vez que não houve tratamento, e sendo o ato mastigatório freqüente, a bacteremia deixa de ser transitória para ser constante. E a entrada repetida de bactérias periodontais na corrente sanguínea reforça a influência da doença periodontal nas doenças cardiovasculares (DE STEFANO et al., 1993, BECK et al., 1996).

É importante ressaltar que o modelo de doença periodontal utilizado neste estudo não equivale à forma mais avançada de periodontite crônica, o que ressalta ainda mais a influência que a doença periodontal exerce sobre função vascular.

Em síntese, o fato de a doença periodontal alterar a resposta vascular em animais saudáveis, de incrementar a hiperreatividade em animais ateroscleróticos e de exacerbar a inflamação sistêmica na aterosclerose avançada, reforça a inclusão da doença periodontal como fator de risco cardiovascular.

6 CONCLUSÕES

Este estudo reforça a doença periodontal como fator de risco cardiovascular. Fator de risco este que pode ser controlado por hábitos eficientes de higienização bucal, uma vez que para que a doença periodontal se instale, é necessária a presença de placa bacteriana. Como a prevalência de doença periodontal é elevada em adultos, falta informação do que o descuido com a higiene bucal pode causar. Somente com a divulgação da informação é que a população poderá se conscientizar da importância da prevenção da doença periodontal. E mais do que se conscientizar, executar a parte que a cabe.

7 REFERÊNCIAS

AMAR, S. et al. Periodontal disease is associated with brachial artery endothelial dysfunction and systemic inflammation. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v. 23, n. 7, p. 1245-1249, 2003.

AMERICAN HEART ASSOCIATION. Heart Disease and Stroke Statistics — 2008 Update. c2008. Disponível em: <<http://www.americanheart.org>>. Acesso em: 10 nov. 2008.

ARRUDA, R. M. et al. Evaluation of vascular function in apolipoprotein E knockout mice with angiotensin-dependent renovascular hypertension. **Hypertension**, v. 46, n. 4, p. 932-936, 2005.

BAKER, P. J. et al. Oral infection with *Porphyromonas gingivalis* and induced alveolar bone loss in immunocompetent and severe combined immunodeficient mice. **Archives of Oral Biology**, v. 39, n. 12, p. 1035-1040, 1994.

BECK, J. D; OFFENBACHER, S. Systemic effects of periodontitis: epidemiology of periodontal disease and cardiovascular disease. **Journal of Periodontology**, v. 76, p. 2089-2100, 2005.

BECK, J. D; SLADE, G; OFFENBACHER, S. Oral disease, cardiovascular disease and systemic inflammation. **Periodontology 2000**, v. 23, p. 110-120, 2000.

BECK, J. et al. Periodontal disease and cardiovascular disease. **Journal of Periodontology**, v. 67 (supl. 10), p. 1123-1137, 1996.

BENKÖ, R. et al. Restoration of the endothelial function in the aortic rings of apolipoprotein E deficient mice by pharmacological inhibition of the nuclear enzyme poly(ADP-ribose) polymerase. **Life Science**, v. 75, n. 10, p.1255-1261, 2004.

BONTHU, S. et al. Atherosclerosis, vascular remodeling, and impairment of endothelium-dependent relaxation in genetically altered hyperlipidemic mice. **Arteriosclerosis, Trombosis and Vascular Biology**, v. 17, n. 11, p.2333-2340, 1997.

CAMPBELL W. B; HARDER, D. R. Prologue: EDHF--what is it? **American Journal of Physiology Heart and Circulation Physiology**, v. 280, n. 6, p. H2413-H2416, 2001.

CHIU, B. Multiple infections in carotid atherosclerotic plaques. **American Heart Journal**, v. 138 (parte 2), p. 534-536, 1999.

COLGATE. c2008. Disponível em: <www.colgateprofissional.com.br>. Acesso em: 08 nov. 2008.

CRAUWELS, H. M. et al. Plaque-associated endothelial dysfunction in apolipoprotein E-deficient mice on a regular diet. Effect of human apolipoprotein AI. **Cardiovascular Research**, v. 59, n. 1, p. 189-199, 2003.

CROWTHER, M. A. Pathogenesis of atherosclerosis. American Society of Hematology, **Hematology** 2005, p. 436-441, 2005.

D'USCIO, L. V. et al. Chronic ET(A) receptor blockade prevents endothelial dysfunction of small arteries in apolipoprotein E-deficient mice. **Cardiovascular Research**, v. 53, n. 2, p. 487-495, 2002.

D'USCIO, L. V. et al. Hypercholesterolemia impairs endothelium-dependent relaxations in common carotid arteries of apolipoprotein E-deficient mice. **Stroke**, v. 32, p. 2658-2664, 2001^a.

D'USCIO, L. V. et al. Mechanism of Endothelial Dysfunction in Apolipoprotein E-Deficient Mice. **Arteriosclerosis, Trombosis and Vascular Biology**, v. 21, p.1017-1022, 2001^b.

DANESH, J. et al. C-reactive protein and other circulating markers of inflammation in the prediction of coronary heart disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 350, p. 1387-1397, 2004.

DATASUS. c2008. Disponível em: <<http://w3.datasus.gov.br/datasus/datasus.php>>. Acesso em 07 out. 2008.

DAVIGNON, J; GANZ, P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. **Circulation**, v. 109, n. 23 (supl. 1), p.III27-III32, 2004.

DE STEFANO, F. et al. Dental disease and risk of coronary heart disease and mortality. **British Medical Journal**, v. 306, p. 688-691, 1993.

DECKERT, V. et al. Impairment of endothelium-dependent arterial relaxation by high-fat feeding in ApoE-deficient mice : toward normalization by human ApoA-I expression. **Circulation**, v. 100, p. 1230-1235, 1999.

DOGAN, B. et al. Characteristics of periodontal microflora in acute myocardial infarction. **Journal of Periodontology**, v. 76, p. 740-748, 2005.

ELTER, J. R. et al. The effects of periodontal therapy on vascular endothelial function: a pilot trial. **American Heart Journal**, v. 151, n. 1, p. 47, 2006.

EPSTEIN, S. E. The multiple mechanisms by which infection may contribute to atherosclerosis development and course. **Circulation Research**, v. 90, p. 2-4, 2002.

FAXON, D. P. et al. Atherosclerotic vascular disease conference: Writing group III: pathophysiology. **Circulation**, v. 109, n. 21, p. 2617-2625, 2004.

FIEHN, N. E. et al. Identification of periodontal pathogens in atherosclerotic vessels. **Journal of Periodontology**, v. 76, n. 5, p. 731-736, 2005.

FRANSEN, P. et al. Endothelial function in aorta segments of apolipoprotein E-deficient mice before development of atherosclerotic lesions. **European Journal of Physiology**, v. 455, p. 811-818, 2008.

FRUCHART, J-C. et al. New risk factors for atherosclerosis and patient risk assessment. **Circulation**, v. 109 (suppl III), p. 15-19, 2004.

FUJIOKA, D. et al. Expression of endothelins and their receptors in cells from human periodontal tissues. **Journal of Periodontal Research**, v. 38, n. 3, p. 269-275, 2003.

GAZIANO, J. M. Ônus global da doença cardiovascular. In: BRAUNWALD, E; ZIPES, D. P; LIBBY, P. (Org.). **Tratado de medicina cardiovascular**. 6 ed. São Paulo: Roca, 2003. v. 1, p. 1-20.

GÖDECKE, A. et al. Endothelial dysfunction of coronary resistance vessels in apoE-/- mice involves NO but not prostacyclin-dependent mechanisms. **Cardiovascular Research**, v. 53, p. 253-262, 2002.

GRAHAME-CLARKE, C. et al. Human cytomegalovirus seropositivity is associated with impaired vascular function. **Circulation**, v.108, p. 678-683, 2003.

HARASZTHY, V. I. et al. Identification of periodontal pathogens in atheromatous plaques. **Journal of Periodontology**, v. 71, n. 10, p. 1554-1560, 2000.

HAYNES, W. G; STANFORD, C. Periodontal disease and atherosclerosis: from dental to arterial plaque. **Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology**, v. 23, p. 1309-1311, 2003.

HIGASHI, Y. et al. Periodontal infection is associated with endothelial dysfunction in healthy subjects and hypertensive patients. **Hypertension**, v. 51, n. 2, p. 446-453, 2008.

HORNE, B. D. et al. Which white blood cell subtypes predict increased cardiovascular risk? **Journal of the American College of Cardiology**, v. 45, n. 10, p. 1638-1643, 2005.

IVEY, M. E. et al. Endothelin-1 signalling in vascular smooth muscle: pathways controlling cellular functions associated with atherosclerosis. **Atherosclerosis**, v. 199, n. 2, p. 237-247, 2008.

JAIN, A. et al. Role for periodontitis in the progression of lipid deposition in an animal model. **Infection and Immunity**, v. 71, n.10, p. 6012-6018, 2003.

JAWIENÍ, J. et al. Mouse models of experimental atherosclerosis. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 55, n. 3, p. 503-517, 2004.

JIANG, F. et al. Endothelial dysfunction induced by oxidized low-density lipoproteins in isolated mouse aorta: a comparison with apolipoprotein-E deficient mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 424, n. 2, p. 141-149, 2001.

JIANG, F. et al. Superoxide dismutase mimetic M40403 improves endothelial function in apolipoprotein(E)-deficient mice. **British Journal of Pharmacology**, v. 139, n. 6, p. 1127-1134, 2003.

KÄLVEGREN, H; MAJEED, M; BENGTSSON, T. Chlamydia pneumoniae binds to platelets and triggers p-selectin expression and aggregation. **Arteriosclerosis, Trombosis and Vascular Biology**, v. 23, p. 1677-1683, 2003.

KAUL, S. et al. Rapid reversal of endothelial dysfunction in hypercholesterolemic apolipoprotein E-null mice by recombinant apolipoprotein A-I(Milano)-phospholipid complex. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 44, n. 6, p. 1311-1319, 2004.

KINANE, D. F; LOWE, G. D. How periodontal disease may contribute to cardiovascular disease. **Periodontology 2000**, v. 23, p. 121-126, 2000.

KINLAY, S. et al. Role of endothelin-1 in the active constriction of human atherosclerotic coronary arteries. **Circulation**, v. 104, n. 10, p. 1114-1118, 2001.

KITAYAMA, J. et al. Cerebral Vascular Dysfunction During Hypercholesterolemia. **Stroke**, v. 38, p. 2136-2141, 2007.

KYSELOVIC, J. et al. Calcium channel blocker inhibits Western-type diet-evoked atherosclerosis development in ApoE-deficient mice. **Journal of the Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 315, n. 1, p. 320-328, 2005.

LALLA, E. et al. Oral infection with a periodontal pathogen accelerates early atherosclerosis in apolipoprotein E-null mice. **Arteriosclerosis, Trombosis and Vascular Biology**, v. 23, p. 1405-1411, 2003.

LAMPING, K. G. et al. Agonist-specific impairment of coronary vascular function in genetically altered, hyperlipidemic mice. **American Journal Physiology (Regulatory Integrative and Comparative Physiology)**, v. 256, n. 45, p. R1023–R1029, 1999.

LI, C. H; AMAR, S. Morphometric, histomorphometric, and microcomputed tomographic analysis of periodontal inflammatory lesions in a murine model. **Journal of Periodontology**, v. 78, n. 6, p. 1120-1128, 2007.

LI, L. et al. *Porphyromonas gingivalis* infection accelerates the progression of atherosclerosis in a heterozygous apolipoprotein E-deficient murine model. **Circulation**, v. 105, p. 861-867, 2002.

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

LINDHE, J; KARRING, T; LANG, N. P. **Tratado de Periodontia Clínica e Implantologia Oral**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

LOOS, B. G et al. Elevation of systemic markers related to cardiovascular diseases in peripheral blood of periodontitis patients. **Journal of Periodontology**, v. 71, p. 1528-1534, 2000.

LÖSCHE, W. et al. Plasma lipid and blood glucose levels in patients with destructive periodontal disease. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 27, p. 537-541, 2000.

LÜSCHER, T. F; BARTON, M. Biology of the endothelium. **Clinical Cardiology**, v. 20, n. 11 (supl. 2), p. II-3-10, 1997.

MACKENZIE, R.S; MILLARD, H.D. Interrelated effects of diabetes, arteriosclerosis and calculus on alveolar bone loss. **Journal of the American Dental Association**, v. 66, p. 192-198, 1963.

MADJID, M. et al. Leukocyte count and coronary heart disease: implications for risk assessment. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 44, n. 10, p. 1945-1956, 2004.

MATSUMOTO, T. et al. Apocynin normalizes hyperreactivity to phenylephrine in mesenteric arteries from cholesterol-fed mice by improving endothelium-derived hyperpolarizing factor response. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 41, n. 8, p. 1289-1303, 2006.

MATTILA, K. J. et al. Effect of treating periodontitis on C-reactive proteins: A pilot study. **BMC Infectious Diseases**, v. 2, p. 30-32, 2002.

MEIR, K. S; LEITERSDORF. E. Atherosclerosis in the apolipoprotein-E-deficient mouse: a decade of progress. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v. 24, n. 6, p. 1006-1014, 2004.

MERCANOGLU, F. et al. Endothelial dysfunction in patients with chronic periodontitis and its improvement after initial periodontal therapy. **Journal of Periodontology**, v. 75, n. 12, p. 1694-1700, 2004.

MEYER, D. H; FIVES-TAYLOR, P. M. Oral pathogens: from dental plaque to cardiac disease. **Current Opinion in Microbiology**, v.1, p. 88-95, 1998.

MIYAMOTO, T. et al. Pathogen-accelerated atherosclerosis occurs early after exposure and can be prevented via immunization. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 2, p. 1376-1380, 2006.

MONCADA, S; HIGGS, E. A. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. **British Journal of Pharmacology**, v. 147 (Supl 1), p. S193-S201, 2006.

MORIKAWA, K. et al. Influence of diabetes mellitus, hypercholesterolemia, and their combination on EDHF-mediated responses in mice. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 45, n. 5, p. 485-490, 2005.

MUJYNYA – LUDUNGE, K. et al. Endothelial nitric oxide synthase gene transfer restores endothelium-dependent relaxations and attenuates lesion formation in carotid arteries in apolipoprotein E-deficient mice. **Basic Research in Cardiology**, v. 100, n. 2, p. 102-111, 2005.

National Cholesterol Education Program. Third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on detection, evaluation, and treatment of

high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III) final report. **Circulation**, v. 106, p. 3143-3421, 2002.

NOACK, B. et al. Periodontal infections contribute to elevated systemic C-reactive protein level. **Journal of Periodontology**, v. 72, n. 9, p. 1221-1227, 2001.

OHASHI, M. et al. MnSOD deficiency increases endothelial dysfunction in ApoE-deficient mice. **Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology**, v. 26, n. 10, p. 2331-2336, 2006.

OPAS. Doenças crônicas degenerativas e obesidade: Estratégia mundial sobre alimentação saudável, atividade física e saúde. **Organização Pan-Americana de Saúde**, Brasília, 2003.

PIEDRAHITA, J. A. et al. Generation of mice carrying a mutant apolipoprotein E gene inactivated by gene targeting in embryonic stem cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. 10, p. 4471-4475, 1992.

PLUMP, A. S. et al. Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. **Cell**, v. 71, n. 2, p. 343-353, 1992.

PUSSINEN, P. J. et al. Periodontitis decreases the antiatherogenic potency of high density lipoprotein. **Journal of Lipid Research**, v. 45, p. 139-147, 2004.

REDDICK, R. L. et al. Atherosclerosis in mice lacking apo E. Evaluation of lesion development and progression. **Arteriosclerosis and Thrombosis**, v. 14, n. 1, p. 141-147, 1994.

RIDKER, P. M; et al. Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men. **The New England Journal of Medicine**, v. 336, n. 14, p. 973-979, 1997.

ROSS, R. Atherosclerosis – an inflammatory disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 340, n. 2, p. 115-126, 1999.

SEINOST, G. et al. Periodontal treatment improves endothelial dysfunction in patients with severe periodontitis. **American Heart Journal**, v. 149, p.1050-1054, 2005.

SLADE, G. D. et al. Acute-phase inflammatory response to periodontal disease in the US population. **Journal of Dental Research**, v. 79, p. 49-57, 2000.

SOCRANSKY, S. S; HAFFAJEE, A. D. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. **Periodontology 2000**, v. 28, p. 12-55, 2002.

SOCRANSKY, S. S; HAFFAJEE, A. D. Periodontal microbial ecology. **Periodontology 2000**, v. 38, p. 135-187, 2005.

STELZEL, M. et al. Detection of Porphyromonas gingivalis DNA in aortic tissue by PCR. **Journal of Periodontology**, v. 73, p. 868-870, 2002.

STOLL, L. L. et al. Potential role of endotoxin as a proinflammatory mediator of atherosclerosis. **Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology**, v. 24, p. 2227-2236, 2004.

STRONG, J. P. Atherosclerotic lesions. Natural history, risk factors, and topography. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 116, n. 12, p. 1268-1275, 1992.

SYRJANEN, J. et al. Dental infections in association with cerebral infarction in young and middle-aged men. **Journal of Internal Medicine**, v. 225, p. 179-184, 1989.

VILLENEUVE, N. et al. Persistence of the nitric oxide pathway in the aorta of hypercholesterolemic apolipoprotein-E-deficient mice. **Journal of Vascular Research**, v. 40, n. 2, p. 87-96, 2003.

WASSMANN et al. Inhibition of diet-induced atherosclerosis and endothelial dysfunction in apolipoprotein E/angiotensin II type 1A receptor double-knockout mice. **Circulation**, v. 110, n. 19, p. 3062-3067, 2004.

WÖLFLE, S. E. et al. Intact Endothelium-Dependent Dilation and Conducted Responses in Resistance Vessels of Hypercholesterolemic Mice in vivo. **Journal of Vascular Research**, v. 42, n. 2, p. 475-482, 2005.

XU, X. et al. Anti-LOX-1 Rescues Endothelial Function in Coronary Arterioles in Atherosclerotic ApoE Knockout Mice. **Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology**, v. 27, p. 871-877, 2007.

ZHANG, S. H. et al. Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. **Science**, v. 258, n. 5081, p. 468-471, 1992.

ZHANG, S. H. et al. Diet-induced atherosclerosis in mice heterozygous and homozygous for apolipoprotein E gene disruption. **Journal of Clinical Investigation**, v. 94, n. 3, p. 937-945, 1994.