



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS**

**JULIANA MAGALHÃES DA CUNHA RÊGO**

**POLIMORFISMO DA APOLIPOPROTEÍNA E E SUA ASSOCIAÇÃO COM  
FATORES DE RISCO CARDIOVASCULAR E ATROSCLEROSE SUBCLÍNICA  
EM PACIENTES COM DOENÇA PERIODONTAL NO CEARÁ**

**FORTALEZA**

**2019**

**JULIANA MAGALHÃES DA CUNHA RÊGO**

**POLIMORFISMO DA APOLIPOPROTEINA E E SUA ASSOCIAÇÃO COM  
FATORES DE RISCO CARDIOVASCULAR E ATROSCLEROSE SUBCLÍNICA  
EM PACIENTES COM DOENÇA PERIODONTAL NO CEARÁ**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Doutora em Ciências Médicas.

Área de Concentração: Biomedicina.

Linha de Pesquisa: Patogêneses das doenças imunoinflamatórias.

Orientador: Prof. Dr. Reinaldo Barreto Oriá

**FORTALEZA**

**2019**

**JULIANA MAGALHÃES DA CUNHA RÊGO**

**POLIMORFISMO DA APOLIPOPROTEINA E E SUA ASSOCIAÇÃO COM  
FATORES DE RISCO CARDIOVASCULAR E ATEROSCLEROSE SUBCLÍNICA  
EM PACIENTES COM DOENÇA PERIODONTAL NO CEARÁ**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Doutora em Ciências Médicas.

Aprovada em 15/05/2019.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Reinaldo Barreto Oriá (orientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Profa. Dra. Maria Elena Crespo López  
Universidade Federal do Pará (UFPA)

---

Prof. Dr. Ricardo Pereira Silva  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Profa. Dra. Lidiany Karla Azevedo Rodrigues Gerage  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Profa. Dra. Juliana Forte Mazzeu de Araújo  
Universidade de Brasília (UnB)

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

R267p

Rêgo, Juliana Magalhães da Cunha.

Polimorfismo da apolipoproteína E e sua associação com fatores de risco cardiovascular e aterosclerose subclínica em pacientes com doença periodontal no Ceará / Juliana Magalhães da Cunha Rêgo. – 2019.  
190 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Fortaleza, 2019.

Orientação: Profa. Dra. Reinaldo Barreto Oriá.

1. Apolipoproteína E. 2. Aterosclerose subclínica. 3. Periodontite. 4. Espessura da camada mediointimal da carótida. 5. Genotipagem da APOE. I. Título.

CDD 610

---

## DEDICATÓRIA

Aos meus amados pais

*Luís e Ana Maria.*

## AGRADECIMENTOS

*Gratidão...*

Ao meu orientador, Professor Doutor Reinaldo Barreto Oriá, que acreditou na minha capacidade, abriu o seu laboratório para uma então desconhecida e permitiu que contribuísse na condução de uma grande pesquisa, grandiosa não apenas na magnitude e complexidade da proposta, mas deveras importante na minha formação como doutoranda, pesquisadora e docente. O meu eterno agradecimento pela confiança depositada e por tudo o que aprendi nesses quatro anos de convivência.

À Universidade Federal do Ceará (UFC), em especial à Faculdade de Medicina, por proporcionar a formação de novos doutores e pesquisadores, em seus programas de pós-graduações, com excelência no ensino e na evolução da ciência. Sempre foi um sonho fazer parte desta instituição tão renomada.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, em especial, ao Professor Doutor Pedro de Bruin Carvalhedeo, coordenador do programa, e seus excepcionais professores, proporcionando meios de conhecimento para todos, e seus funcionários, tão dedicados a prontamente nos ajudar, orientar e esclarecer qualquer dúvida relacionada à pós-graduação.

A toda equipe de alunos e pesquisadores da UFC que fizeram parte ao longo desses quatro anos de pesquisa, iniciando o projeto muito antes da minha entrada na equipe, fundamentais em todas as fases, desde a concepção do projeto, envio para o comitê de ética, reuniões de planejamento, recrutamento de pacientes, realização e remarcação de exames, e muitas atribuições em que, por incontáveis vezes, nos encontramos na fase de coleta e análise dos dados. Em especial a Lianna Cavalcante, Cristhyane Aquino, Kildere Canuto, Amanda Fontenele, Antônio Alex, Ana Luiza Conceição, Manuel Paiva, Priscila Briseno, Dulce Maria, Márcio Wilker e Jovita Feitosa, os dois últimos essenciais na realização do ecodoppler das carótidas. A pesquisa só foi possível com o empenho, dispor e dedicação de todos.

À Professora Doutora Maria Elena Crespo-López e à pós-doutoranda Gabriela Arrifano, por me receberam na Universidade Federal do Pará (UFPA), em colaboração técnica nas análises de genotipagem da apolipoproteína E (ApoE), realizadas no Laboratório de Farmacologia

Molecular (LFM). Foi uma experiência muito enriquecedora ter convivido uma semana de trabalhos intensos na UFPA, no início das análises. Agradeço imensamente a paciência e a dedicação em compartilhar conhecimentos teórico-práticos da técnica realizada e por todo o apoio desde então.

Aos periodontistas dos Centros de Especialidades Odontológicas (CEO), que disponibilizaram um pouco do seu tempo para realização dos exames odontológicos, até fora da rotina prevista, além de serem essenciais no recrutamento dos pacientes, em especial ao Dr. Luís Marinho, Dra. Célia Normando e Dra. Mariana Saraiva.

Aos profissionais responsáveis pelas coletas de sangue e análises bioquímicas, à diretora Prof. Renata de Sousa Alves e ao técnico e mestrando Glautemberg, do Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas (LACT); e ao técnico de enfermagem, Manuel Paiva, voluntário na coleta de sangue dos pacientes, na presteza em todo o período de colaboração e parceria, viabilizando as coletas e as análises, além de prontamente atenderem às nossas solicitações, até mesmo fora do horário de atendimento e/ou após plantões noturnos de trabalho.

Ao Professor Doutor Paulo Goberlânio, do Centro Universitário Christus (Unichristus), pela amizade, por todo o ensinamento e troca de conhecimentos como dentista e como exímio estatístico, foi essencial no tratamento estatístico na fase da análise dos dados. Entretanto, não posso esquecer de mencionar meu agradecimento ao Professor Doutor Paulo César de Almeida, da Universidade Estadual do Ceará (UECE), que nos orientou quanto à tabulação, organização e análises estatísticas iniciais; ao pós-doutorando e amigo Gdayllon Menezes, uma amizade construída entre análises e discussões estatísticas; e aos meus amigos nutricionistas e estatísticos Antônio Augusto Carioca e Emanuel Diego, com seus vastos conhecimentos em estatística, me socorreram em determinadas situações de análises complexas e rápidas. Realmente, todos foram fundamentais para essa importante etapa de tratamento estatístico.

A todos os pacientes que aceitaram voluntariamente participar desta pesquisa, com a qual foi possível avaliar e identificar precocemente alterações sistêmicas e encaminhá-los para os serviços especializados, promovendo assistência e prevenindo o desenvolvimento de doenças crônicas inflamatórias em estágios mais complexos de tratamento. O benefício maior foi para eles do que para nós, pesquisadores.

Aos colegas da pós-graduação, alunos de iniciação científica e todos que fizeram ou ainda fazem parte da família LABICONTE: Kildere Canuto, Lianna Cavalcante, Ítalo Figueiredo, Daniel Vieira, Cristhyane Aquino, Leonardo Lobo, Raul Freitas, Gabriella Araújo, Felipe Moura, Naftanael Alves, Jardlon Costa, Amanda Ribeiro, Carolina Benício, Dulce Maria, Robson Matos, José Carlos Nascimento, Fátima Virgínia, Cássia Rodrigues, Ronaldo Dias, Kalina Kelma, Priscila Briseno, Carlos Câmara e Juliana Zani. Todos são especiais e serão lembrados com muito carinho!

Aos professores membros da banca examinadora, da qualificação e da defesa da tese, que tanto contribuíram para melhorias e ajustes deste trabalho, para que seja alcançada uma qualidade ainda maior do trabalho acadêmico. Sou grata por todas as suas considerações e contribuições para melhorar esta tese.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo fomento da bolsa de doutorado, que providencialmente foi disponibilizada a partir do meu terceiro ano no curso, proporcionando melhores condições e apoio financeiro para condução de todas as atividades desenvolvidas até aqui.

À Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP), Chamada 07/2013 PPSUS CE – FUNCAP/SESA/MS/CNPq – Programa Pesquisa para o SUS, pelo financiamento da pesquisa.



## AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

*Gratidão mais do que especial...*

A Deus, por modificar os meus sonhos e, assim, aumentar a minha fé ao me entregar aos Seus planos, e permitir viver essa experiência da pós-graduação perto dos meus familiares e amigos. Com Seu coração misericordioso, planejou o retorno à minha terra natal, junto aos meus, aliviando diariamente o cansaço de conciliar trabalho e estudo, me dando forças de sempre continuar estudando, amadurecendo-me como professora, doutoranda e pesquisadora, e me transformando nessa constante mudança que é a VIDA! *“Quando Deus tira algo de você, Ele não está punindo, mas apenas abrindo suas mãos para que receba algo muito melhor”*. À Nossa Senhora, por interceder junto ao Pai as minhas preces, nos muitos momentos de fraqueza, angústia e exaustão, e me cobrir de bênçãos e graças para que consiga perseverar, apesar das adversidades, com serenidade, calma e discernimento, nesse caminho penoso e repleto de tentações que é o do ESTUDO.

Aos meus amados pais, Luís e Ana Maria Rêgo, pelo imensurável amor que a cada dia só aumenta em demonstrações de afeto, preocupação constante com meus estudos, carinho e incentivo, me proporcionando as melhores condições de aprendizado, além de suporte financeiro e psicológico, independente de qual etapa na vida acadêmica esteja, para que me torne uma pessoa melhor, tanto profissionalmente como ser humana, me ensinando que os melhores e mais importantes títulos não são aqueles conquistados na vida acadêmica, mas como o seu nome será perpetuado no futuro, como você será reconhecido por ser uma pessoa boa. Amo sem medidas! *“Estude, continue estudando! Você nunca perde em estudar!”*

Ao meu esposo, Leonardo Mascarenhas, pelos mais diversos sentimentos que habitaram nossa relação nesse meu tempo dedicado ao doutorado: amor, compreensão, renúncia, apoio, respeito, solidariedade, preocupação, companheirismo, compaixão, descanso, consolo, força, paciência e, principalmente, pela confiança e esperança em mim, por acreditar mais em mim do que eu mesma. Perdão pelos muitos momentos de ausência por causa do Doutorado. Amo você!

E a todos os familiares, amigos, colegas, alunos, orientandos, conhecidos e até desconhecidos que direta ou indiretamente contribuíram, torceram e intercederam para eu chegar até aqui...

*O meu ‘muito obrigada’!*



*“Então lembre-se de olhar para as estrelas, e não para seus pés. Tente achar um sentido para o que vê, e pergunte-se o porquê da existência do universo. Seja curioso. E não importa o quão difícil a vida seja, há sempre algo que você pode fazer e ter sucesso. Não desista. É um tempo maravilhoso para estar vivo.”*

— Stephen Hawking (★1942 – †2018)

## RESUMO

**Introdução:** O risco aterosclerótico em pacientes com doença periodontal pode estar relacionado a fatores nutricionais, bioquímicos e genéticos, dentre eles, a presença de genes de risco, como o alelo E4 da apolipoproteína E. A apolipoproteína E (ApoE) é envolvida no metabolismo do colesterol e influencia os parâmetros lipídicos e risco para a doença cardiovascular. O gene que codifica a ApoE é polimórfico, apresentando três alelos mais comuns: E2, E3 e E4, sendo esse último reconhecidamente associado à doença cardiovascular. Este estudo investigou a associação dos polimorfismos da apolipoproteína E com fatores de risco cardiovascular e aterosclerose subclínica em pacientes com doença periodontal no Ceará. **Metodologia:** Trata-se de um estudo transversal caso-controle, com 239 pacientes recrutados com doença periodontal (casos) e controles atendidos nos Centros de Especialidades Odontológicas no período de setembro de 2014 a janeiro de 2018. 141 pacientes concluíram a genotipagem da ApoE e foram avaliados para o perfil sociodemográfico, anamnese nutricional, exames bioquímicos, espessura mediointimal carotídea por ultrassonografia modo B e exame clínico-odontológico. Amostras de células bucais foram coletadas para extração de DNA genômico e para análise dos polimorfismos da ApoE. Os dados foram expressos como média e desvio-padrão, analisados por teste de qui-quadrado e teste *t de Student* não pareado para as variáveis contínuas, com um intervalo de confiança de 95% e  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo. O coeficiente de Pearson, teste exato de Fischer e análises multivariadas foram realizados para identificar as correlações dos fatores de risco aterosclerótico e a espessura mediointimal das carótidas (EMI) com os polimorfismos da ApoE. As frequências dos alelos e genótipos da ApoE foram analisadas e testadas para o equilíbrio de *Hardy-Weinberg*. Todas as análises estatísticas foram realizadas usando os pacotes estatísticos SPSS e o R. **Resultados:** Foram incluídos no estudo 141 pacientes, sendo 67 casos (53,5%) e 74 controles (47,5%), com média de idade de  $44,5 \pm 6,5$  anos. Na população total, não foram encontradas diferenças nos dados sociodemográficos, exceto renda familiar, maior entre controles ( $p=0,028$ ). Foi relatado entre os casos, um percentual maior de mobilidade dentária quando comparado aos controles ( $p=0,001$ ). O alelo E3 foi identificado em 80,8%, o alelo E4 em 15% e o alelo E2 em 4,3% da população total estudada. Não houve diferença na frequência alélica e genotípica entre casos e controles. Portadores do alelo E4 relataram mais histórico familiar de doença periodontal quando comparado aos não portadores ( $p=0,007$ ). A maioria dos pacientes apresentava excesso de peso (65,9%), circunferência da cintura de risco (66,4%) e índice de adiposidade corporal indicativo de excesso de gordura (77,8%) na população estudada de forma independente ao polimorfismo da ApoE. Não houve diferença também entre casos e controles. Na população total, verificou-se níveis séricos de LDL (73,5%) e HDL (56,2%) fora dos valores desejáveis, sendo que casos E2 positivos apresentaram valores médios mais elevados de HDL e reduzidos de LDL, quando comparados aos E2 negativos. Nos controles, os níveis de colesterol total sérico se correlacionaram positivamente com LDL ( $r=0,93$ ,  $p=0,000$ ) e com índice aterogênico plasmático (IAP) ( $r=0,62$ ,  $p=0,000$ ), enquanto nos casos, se correlacionaram positivamente com LDL ( $r=0,92$ ,  $p=0,000$ ), triglicerídeos ( $r=0,56$ ,  $p=0,000$ ), Castelli 1 ( $r=0,53$ ,  $p=0,000$ ) e 2 ( $r=0,46$ ,  $p=0,010$ ), e IAP ( $r=0,57$ ,  $p=0,000$ ). Em casos E4 positivos, níveis séricos de colesterol total se correlacionaram forte e positivamente com LDL ( $r=0,95$ ,  $p=0,000$ ), Castelli 2 ( $r=0,72$ ,  $p=0,000$ ) e IAP ( $r=0,80$ ,  $p=0,000$ ). Além disso, observou-se em casos E4 positivos um risco 4,2 vezes maior de apresentar  $EMI \geq 1,0\text{mm}$  ( $OR=4,17$ ,  $p=0,028$ ), na carótida comum esquerda ( $OR=7,75$ ;  $p=0,003$ ), independente da severidade da doença periodontal ( $\geq 5$  mm de profundidade da bolsa periodontal). Foi encontrada maior frequência do alelo E4 em indivíduos com baixo risco de desenvolver doença cardiovascular, em relação aos níveis séricos de proteína C-reativa (PCR). **Conclusão:** A correlação positiva de EMI elevada das carótidas comuns ( $\geq 1,0\text{mm}$ ) em portadores de E4 sugere que esse alelo é um fator preditor de aterosclerose subclínica de forma independente aos níveis séricos de PCR e outros fatores de risco cardiovascular. Os resultados desse estudo também sugerem que o alelo 2 da ApoE foi protetor em alguns fatores de risco bioquímicos.

**Palavras-chaves:** Apolipoproteína E; Aterosclerose subclínica; Periodontite; Espessura da camada mediointimal da carótida; Genotipagem da APOE.

## ABSTRACT

**Introduction:** Atherosclerotic risk in patients with periodontal disease may be related to nutritional, biochemical and genetic factors, among them, the presence of risk genes, such as the E4 allele of apolipoprotein E. Apolipoprotein E (ApoE) is involved in the metabolism of cholesterol and influences lipid parameters and risk for cardiovascular disease. The gene encoding ApoE is polymorphic, presenting three common alleles: E2, E3 and E4, the latter being known to be associated with cardiovascular disease. This study investigated the association of apolipoprotein E polymorphisms with cardiovascular risk factors and subclinical atherosclerosis in patients with periodontal disease in Ceara.

**Methodology:** This is a cross-sectional case-control study, with 239 patients recruited with periodontal disease (cases) and controls attended at the Dental Specialties Centers from September 2014 to January 2018. 141 patients completed ApoE genotyping and were evaluated for sociodemographic profile, nutritional anamnesis, biochemical laboratory tests, carotid medial-intimal thickness by B-mode ultrasonography and clinical-odontological examination. Buccal cell samples were harvested for genomic DNA extraction and ApoE polymorphisms analysis. Data were expressed as mean and standard deviation, analyzed by chi-square test and Student's t-test not paired for continuous variables, with a confidence interval of 95% and  $p < 0.05$  was considered statistically significant. Pearson's coefficient, Fischer's exact test and multivariate analyses were performed to identify correlations of atherosclerotic risk factors and carotid intima-media thickness (cMIT) with ApoE polymorphisms. The allele frequencies and ApoE genotypes were analyzed and tested for the Hardy-Weinberg equilibrium. All statistical analyses were conducted using the SPSS and R softwares.

**Results:** A total of 141 patients were included in the study, of whom 67 (53.5%) and 74 controls (47.5%) with an average age of  $44.5 \pm 6.5$  years. In the total population, no differences were found in the sociodemographic data, except for family income, higher among controls ( $p=0.028$ ). A greater percentage of dental mobility was reported among cases when compared to controls ( $p=0.001$ ). The E3 allele was identified in 80.8%, the E4 allele in 15% and the E2 allele in 4.3% of the studied population. There was no difference in allelic and genotype frequency between cases and controls. E4 allele carriers reported more family history of periodontal disease when compared to non-carriers ( $p=0.007$ ). The majority of the patients presented excess weight (65.9%), waist circumference at risk (66.4%) and body fat index (77.8%) in the population studied independently of the polymorphism of ApoE. There was also no difference between cases and controls. In the total population, serum levels of LDL (73.5%) and HDL (56.2%) were out of the desirable values, with E2 positive cases having higher mean values of HDL and reduced LDL, when compared to E2 negative. In controls, serum total cholesterol (TC) levels were positively correlated with LDL ( $r=0.93$ ,  $p=0.000$ ) and with plasma atherogenic index (PAI) ( $r=0.62$ ,  $p=0.000$ ), whereas in the cases, TC positively correlated with serum LDL ( $r=0.92$ ,  $p=0.000$ ), triglycerides ( $r=0.56$ ,  $p=0.000$ ), Castelli 1 ( $r=0.53$ ,  $p=0.000$ ) and Castelli 2 ( $r=0.46$ ,  $p=0.000$ ) and PAI ( $r=0.57$ ,  $p=0.000$ ). In E4 positive cases, serum levels of TC were strongly and positively correlated with LDL ( $r=0.95$ ,  $p=0.000$ ), Castelli 2 ( $r=0.72$ ,  $p=0.000$ ) and PAI ( $r=0.80$ ,  $p=0.000$ ). In addition, a 4.2-fold higher risk of presenting a  $cMIT > 1.0$  mm (OR = 4.17,  $p=0.028$ ) was observed in E4 positive cases in the left common carotid (OR = 7.75,  $p=0.003$ ) regardless of the periodontal disease severity ( $\geq 5$  mm deep in the periodontal pocket). Increased frequency of the E4 allele was found in individuals at low risk for developing cardiovascular disease, relative to C-reactive protein (CRP) serum levels.

**Conclusion:** The positive correlation of elevated cMIT of common carotid arteries ( $\geq 1.0$ mm) in E4 carriers suggests that this allele is a predictor of subclinical atherosclerosis independently of CRP serum levels and other cardiovascular risk factors. The results of this study also suggest that ApoE 2 allele was protective in some biochemical risk factors.

**Key-words:** Apolipoprotein E; Subclinical atherosclerosis; Periodontitis; Carotid intima-media thickness; APOE genotyping.

## LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS

<b>Figura 1</b> –	Mapa mundial da prevalência de doenças cardiovasculares ajustadas por idade, por 100.000 habitantes, em 2015.	23
<b>Figura 2</b> –	Principais causas de anos de vida perdidos para ambos os sexos, no Brasil, para 1990 e 2016.	25
<b>Figura 3</b> –	Causas de anos de vida perdidos (AVP) ajustado por idade nos estados brasileiros, nos anos de 1990 e 2016, de acordo com o sexo.	26
<b>Figura 4</b> –	Mecanismo envolvido na formação das células espumosas em macrófagos.	29
<b>Figura 5</b> –	Formação de placa de ateroma dentro do lúmen arterial.	31
<b>Figura 6</b> –	Esquema de formação do processo de aterosclerose na camada mediointimal das artérias até a ruptura da placa.	32
<b>Figura 7</b> –	Localização das medidas da espessura da camada mediointimal (EMI) (delineada em destaque azul) na carótida comum.	33
<b>Figura 8</b> –	Periodonto saudável e doente.	37
<b>Figura 9</b> –	Sangramento na sondagem no diagnóstico de doenças periodontais (ausente – 9a; presente – 9b).	38
<b>Figura 10</b> –	Evolução da fisiopatologia da doença periodontal.	41
<b>Figura 11</b> –	Mecanismos relacionando periodontite a inflamações sistêmicas crônicas.	43
<b>Figura 12</b> –	Mecanismo de invasão da <i>Porphyromonas gingivalis</i> no sistema circulatório e no desenvolvimento da placa de ateroma.	44
<b>Figura 13</b> –	Mecanismos imunológicos desencadeados pela microbiota oral na aterogênese na aorta.	46
<b>Figura 14</b> –	Interações bidirecionais entre a doença aterosclerótica e a doença periodontal.	47
<b>Figura 15</b> –	Desenho esquemático das moléculas de E3 e E4.	49
<b>Figura 16</b> –	Modelo para potenciais interações entre ApoE4, doença periodontal e aterosclerose.	51
<b>Figura 17</b> –	Fluxograma de recrutamento e da coleta de dados deste estudo.	57
<b>Figura 18</b> –	Exame Periodontal Simplificado – PSR (Registro do PSR nos Sextantes)	63
<b>Figura 19</b> –	Ilustração do StepOne™ Real-Time PCR (Applied Biosystems®).	70
<b>Figura 20</b> –	Curvas de amplificação marcadas com fluorescência para cada polimorfismo.	71

- Figura 21** - Mapas de calor de correlação de variáveis antropométricas de risco com valores de EMI das artérias carótidas direita e esquerda. 96
- Figura 22** - Mapas de calor de correlação das variáveis bioquímicas e laboratoriais com valores de EMI das artérias carótidas direita e esquerda. 97
- Figura 23** - Mapas de calor de correlação de variáveis antropométricas de risco com valores de artéria carótida direita e esquerda da EMI nos casos. 98
- Figura 24** - Mapas de calor de correlação das variáveis bioquímicas e laboratoriais com valores de artéria carótida direita e esquerda da EMI nos casos. 99
- Gráfico 1** - Percentual do total de indivíduos com periodontite de acordo com a severidade da doença estratificado por idade. 37

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1</b>	– Aminoácidos presentes nas posições 112 e 158 da molécula de ApoE, diferenciando os alelos da molécula.	48
<b>Quadro 2</b>	– Formulários e documentos utilizados neste estudo.	58
<b>Quadro 3</b>	– Classificação do estado nutricional de adultos, segundo valores de IMC, propostos pela OMS, e risco para desenvolver doenças crônicas.	60
<b>Quadro 4</b>	– Classificação da circunferência da cintura (CC) de acordo com o risco metabólico por sexo.	60
<b>Quadro 5</b>	– Classificação da relação cintura-quadril (RCQ) de acordo com o risco para doenças cardiovasculares.	61
<b>Quadro 6</b>	– Classificação dos valores de IAC (%) de acordo com a adiposidade corporal.	62
<b>Quadro 7</b>	– Definições dos códigos do <i>Periodontal Screening and Recording</i> (PSR).	63
<b>Quadro 8</b>	– Valores de referências para os parâmetros bioquímicos analisados.	65
<b>Quadro 9</b>	– Fórmulas e valores de referências dos índices de estimativa de risco aterosclerótico.	66
<b>Quadro 10</b>	– Critérios para interpretação das imagens do ecodoppler de carótidas.	66
<b>Quadro 11</b>	– Classificação dos genótipos da ApoE de acordo com as fluorescências dos SNPs (rs429358 e rs7412).	72
<b>Quadro 12</b>	– Sequência de bases para cada alelo da ApoE de acordo com a determinação do aminoácido pelos códons correspondentes.	72

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	– Perfil sociodemográfico da população estudada, dos casos e dos controles.	75
<b>Tabela 2</b>	– Distribuição genotípica e alélica da apolipoproteína E (ApoE) da população total, casos e controles.	76
<b>Tabela 3</b>	– Distribuição genotípica e alélica da apolipoproteína E (ApoE) dos casos com doença periodontal severa (profundidade $\geq 5$ mm) e controles.	76
<b>Tabela 4</b>	– Perfil odontológico da população estudada, dos casos e dos controles.	77
<b>Tabela 5</b>	– Características do exame bucal dos pacientes com o alelo E4 da população total.	78
<b>Tabela 6</b>	– Perfil antropométrico da população estudada, dos casos e dos controles.	80
<b>Tabela 7</b>	– Perfil antropométrico dos casos com doença periodontal severa (profundidade $\geq 5$ mm) e dos controles.	81
<b>Tabela 8</b>	– Média e desvio padrão da idade, em anos, e medidas antropométricas pela presença de alelos (E2 e E4) na população estudada, casos e controles.	82
<b>Tabela 9</b>	– Perfil da população estudada de acordo com as categorias de classificação das variáveis antropométricas, presença do alelo E2 na população estudada, casos e controles	83
<b>Tabela 10</b>	– Perfil da população estudada de acordo com as categorias de classificação das variáveis antropométricas, presença do alelo E4 na população estudada, casos e controles.	84
<b>Tabela 11</b>	– Perfil bioquímico e laboratorial da população estudada, dos casos e dos controles.	86
<b>Tabela 12</b>	– Perfil bioquímico e laboratorial dos casos com doença periodontal severa (profundidade $\geq 5$ mm) e dos controles.	87
<b>Tabela 13</b>	– Perfil bioquímico e laboratorial da população estudada, dos casos e dos controles de acordo com a presença ou ausência do alelo E2.	89
<b>Tabela 14</b>	– Valores médios e desvios-padrões de variáveis bioquímicas e laboratoriais na população total, casos e controles, em relação à presença ou ausência do alelo E2.	90
<b>Tabela 15</b>	– Perfil bioquímico e laboratorial da população estudada, dos casos e dos controles de acordo com a presença ou ausência do alelo E4.	92



<b>Tabela 16</b> -	Valores médios e desvios-padrões de variáveis bioquímicas e laboratoriais na população total, casos e controles, em relação à presença ou ausência do alelo E4.	93
<b>Tabela 17</b> -	Valores de correlação (r) entre as variáveis antropométricas e bioquímicas/laboratoriais nos casos.	131
<b>Tabela 18</b> -	Valores de p entre as variáveis antropométricas e bioquímicas/laboratoriais nos casos.	132
<b>Tabela 19</b> -	Valores de correlação (r) entre as variáveis antropométricas e bioquímicas/laboratoriais nos controles.	133
<b>Tabela 20</b> -	Valores de p entre as variáveis antropométricas e bioquímicas/laboratoriais nos controles.	134
<b>Tabela 21</b> -	Valores de correlação (r) entre as variáveis antropométricas e bioquímicas/laboratoriais nos E2+.	135
<b>Tabela 22</b> -	Valores de p entre as variáveis antropométricas e bioquímicas/laboratoriais nos E2+.	136
<b>Tabela 23</b> -	Valores de correlação (r) entre as variáveis antropométricas e bioquímicas/laboratoriais nos E2-.	137
<b>Tabela 24</b> -	Valores de p entre as variáveis antropométricas e bioquímicas/laboratoriais nos E2-.	138
<b>Tabela 25</b> -	Valores de correlação (r) entre as variáveis antropométricas e bioquímicas/laboratoriais nos E4+.	139
<b>Tabela 26</b> -	Valores de p entre as variáveis antropométricas e bioquímicas/laboratoriais nos E4+.	140
<b>Tabela 27</b> -	Valores de correlação (r) entre as variáveis antropométricas e bioquímicas/laboratoriais nos E4-.	141
<b>Tabela 28</b> -	Valores de p entre as variáveis antropométricas e bioquímicas/laboratoriais nos E4-.	142
<b>Tabela 29</b> -	Valores de correlação (r) entre as variáveis antropométricas e bioquímicas/laboratoriais nos casos com o alelo E4+.	143
<b>Tabela 30</b> -	Regressão entre controles e casos dos fatores de risco para doenças cardiovasculares, de acordo com a distribuição alélica da ApoE.	99

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABCA1 – ATP transportador A1  
ABCG1 – ATP transportador G1  
ACAT1 – acetil-coA acetil-transferase  
ACC – artéria carótida comum  
ACCI – artérias carótidas comuns internas  
ACI – artéria carótida interna  
AINEs – anti-inflamatórios não esteroidais  
ApoB – apolipoproteína B  
ApoE – estrutura da apolipoproteína E  
APOE – genes da apolipoproteína E  
arg – arginina  
AVC – acidente vascular cerebral  
AVD – anos de vida com deficiência  
AVI – anos de vida ajustados por incapacidade  
AVP – anos de vida perdidos  
CC – Circunferência da cintura  
CEOs – Centros de Especialidades Odontológicas  
CD36 – cluster de diferenciação 36 ou glicoproteína plaquetária  
CHCM – concentração de hemoglobina corpuscular média  
cys – cisteína  
DA – Doença de Alzheimer  
DAC – doença cardíaca coronariana  
DCNT – doenças crônicas não transmissíveis  
DCV – doenças cardiovasculares  
DM2 – diabetes melitus tipo 2  
DNA – ácido desoxirribonucleico  
DP – doença periodontal  
E2 – alelo E2 da apolipoproteína E  
E3 – alelo E3 da apolipoproteína E  
E4 – alelo E4 da apolipoproteína E  
EMI – espessura mediointimal da carótida

EROS – espécies reativas de oxigênio

ESB – Equipe de Saúde Bucal

EUA – Estados Unidos da América

FFOE – Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem

FUNCAP – Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico

GBD – *Global Burden Disease*

HAS – hipertensão arterial sistêmica

IAC – índice de adiposidade corporal

IAP – índice aterogênico plasmático

IC – índice de conicidade

IL2 – interleucina 2

IL6 – interleucina 6

IMC – índice de massa corporal

HCM – hemoglobina corpuscular média

HDL – lipoproteína de alta densidade (*high density lipoproteins*)

HSV – *Herpes simplex vírus*

LABICONTE – Laboratório de Biologia da Cicatrização, Ontogenia e Nutrição de Tecidos

LACT – Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas

LDL – lipoproteína de baixa densidade (*low density lipoproteins*)

LDLox – lipoproteína de baixa densidade (*low density lipoproteins*) oxidada

nCEH – hidrolases de éster de colesterol neutros

MMP – metaloproteinases de matriz induzidas por bactérias

NHANES – *National Health and Nutrition Examination Survey*

OMS – Organização Mundial de Saúde

OR – *odds ratio*

PAF – fator ativador de plaquetas

PAI-1 – Inibidor do ativador de plasminogênio tipo 1

PCR – proteína C-reativa

PCR-us – proteína C-reativa ultrasensível

PIB – produto interno bruto

PSR – *Periodontal Screening and Recording*

PVSi – velocidade de pico sistólico da carótida interna

RCQ – razão cintura-quadril

RD – redução da luz.

RDW – *Red Cell Distribution Width*

RNase – ribonuclease

RT-PCR – *reverse transcription polymerase chain reaction quantitative real time*

SB BRASIL 2010 – Pesquisa Nacional de Saúde Bucal 2010

SNP – *single nucleotide polymorphisms*

SPSS – *Statistical Package for the Social Sciences*,

SR-A – receptor de varredura classe A

SR-BI – receptor de varredura classe B tipo 1

SUS – Sistema único de saúde

TGO – transaminase oxalacética

TGP – transaminase pirúvica

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TG – Triglicerídeos

TNF- $\alpha$  – fator de necrose tumoral  $\alpha$

UFC – Universidade Federal do Ceará

UPC – Unidade de Pesquisa Clínica

VCM – volume corpuscular médio

VDFi – velocidade diastólica final da artéria carótida interna

VLDL – lipoproteínas de muito baixa densidade (*very low density lipoproteins*)

%GC – percentual de gordura corporal

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	22
1.1	DOENÇA ATEROSCLERÓTICA	23
1.1.1	Epidemiologia e impacto da doença aterosclerótica na população	23
1.1.2	Fisiopatologia da doença aterosclerótica	28
1.1.3	Métodos diagnósticos da doença aterosclerótica	32
1.1.4	Fatores antropométricos e bioquímicos para risco cardiovascular	34
1.2	DOENÇA PERIODONTAL	35
1.2.1	Epidemiologia e diagnóstico da doença periodontal	35
1.2.2	Fisiopatologia e fatores de risco para doença periodontal	39
1.2.3	Relação fisiopatológica da doença periodontal com doenças sistêmicas	41
1.3	APOLIPOPROTEÍNA E	46
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	52
2.1	Objetivo Geral	53
2.2	Objetivo Específicos	53
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	54
3.1	DELINEAMENTO DO ESTUDO	55
3.2	POPULAÇÃO E AMOSTRA DO ESTUDO	55
3.3	COLETA E ANÁLISE DE DADOS	57
3.3.1	Anamnese	57
3.3.1.1	Avaliação sociodemográfica	57
3.3.1.2	Avaliação nutricional	58
3.3.1.3	Exame clínico odontológico	61
3.3.1.4	Exames laboratoriais e bioquímicos	63
3.3.1.5	Avaliação ultrassonográfica	65
3.3.1.6	Polimorfismo genético	67
3.3.2	Análises estatísticas	71
3.4	ASPECTOS ÉTICOS	72
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b>	73
4.1	PERFIL SOCIODEMOGRÁFICO	74
4.2	POLIMORFISMO DA APOLIPOPROTEINA E (APOE)	75
4.3	PERFIL ODONTOLÓGICO	76

4.4	PERFIL ANTROPOMÉTRICO	79
4.5	PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E LABORATORIAIS	85
4.6	FATORES DE RISCO RELACIONADOS AO EXAME ULTRASSONOGRÁFICO DAS CARÓTIDAS	94
4.7	ANÁLISE DE RISCO PARA ESPESSEAMENTO DA EMI DE ACORDO COM O POLIMORFISMO DA APOE	99
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	101
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	109
	<b>REFERÊNCIAS</b>	112
	<b>MATERIAL SUPLEMENTAR</b>	130
	<b>ANEXOS</b>	147
	<b>ANEXO 1. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)</b>	148
	<b>ANEXO 2 – QUESTIONÁRIO ODONTOLÓGICO</b>	151
	<b>ANEXO 3 – FICHA DE AVALIAÇÃO NUTRICIONAL</b>	156
	<b>ANEXO 4 - QUESTIONÁRIO SOCIODEMOGRÁFICO</b>	158
	<b>ANEXO 5 – APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ (PROPESQ-UFC)</b>	160
	<b>MANUSCRITOS</b>	165
	<b>Manuscrito 1.</b> Artigo publicado na <i>Archives of Oral Biology</i>	166
	<b>Manuscrito 2.</b> Artigo publicado na <i>Nutrients</i>	173



# 1 INTRODUÇÃO

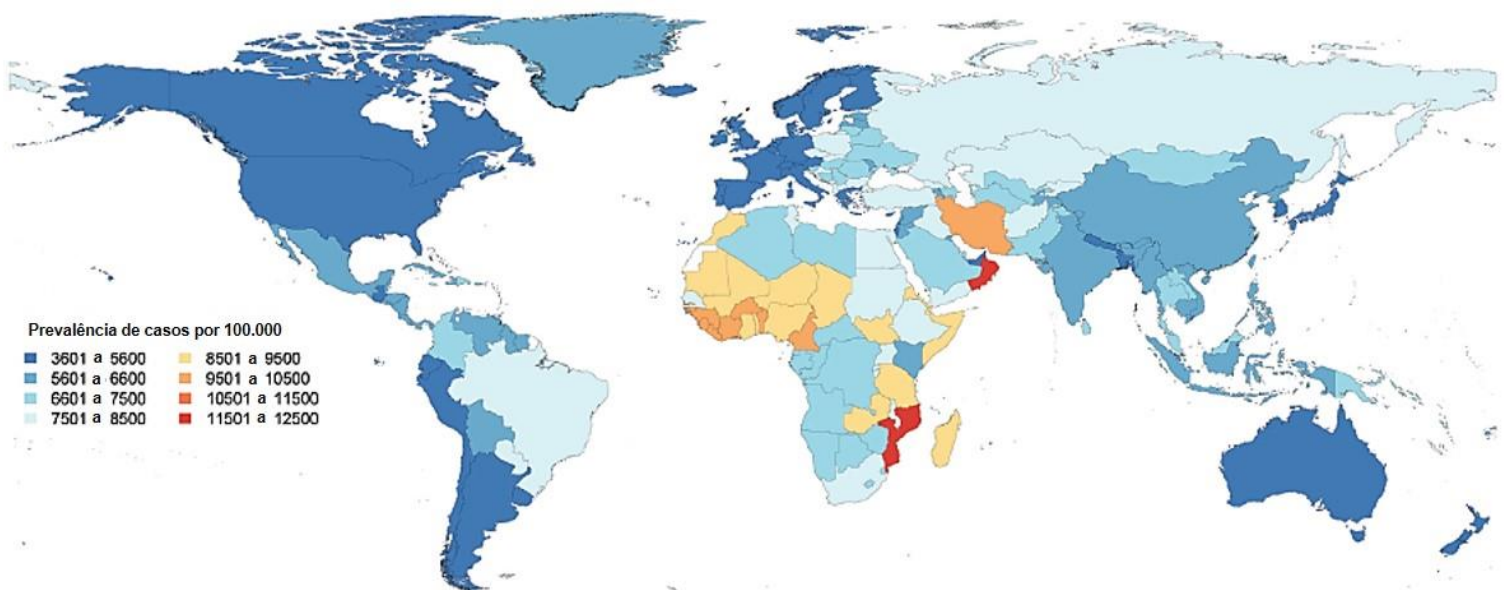
## 1.1 DOENÇA ATEROSCLERÓTICA

### 1.1.1. Epidemiologia e impacto da doença aterosclerótica na população

A doença cardiovascular (DCV) é um complexo processo inflamatório das artérias e vasos periféricos, que pode levar ao infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral e doença arterial periférica, sendo a aterosclerose seu o principal processo patológico (MARINHO et al., 2018).

Em 2017, o estudo *Global Burden Disease* (GBD) apresentou dados integrados sobre a incidência, prevalência e mortalidade de doenças cardiovasculares no mundo. Globalmente, estima-se que existam 422,7 milhões de casos prevalentes de DCV, em 2015, e estas continuam sendo a principal causa de perda de saúde em todas as regiões do mundo. A alteração sociodemográfica dos últimos 25 anos contribuiu para que houvesse uma manutenção ou aumento da prevalência na maioria das regiões do mundo, a exceção dos países com índice de desenvolvimento social muito alto, onde foi possível identificar um declínio das DCV nos últimos anos (ROTH et al., 2017) (**Figura 1**).

**Figura 1** – Mapa mundial da prevalência de doenças cardiovasculares ajustadas por idade, por 100.000 habitantes, em 2015.



Fonte: Adaptado de Roth et al. (2017).



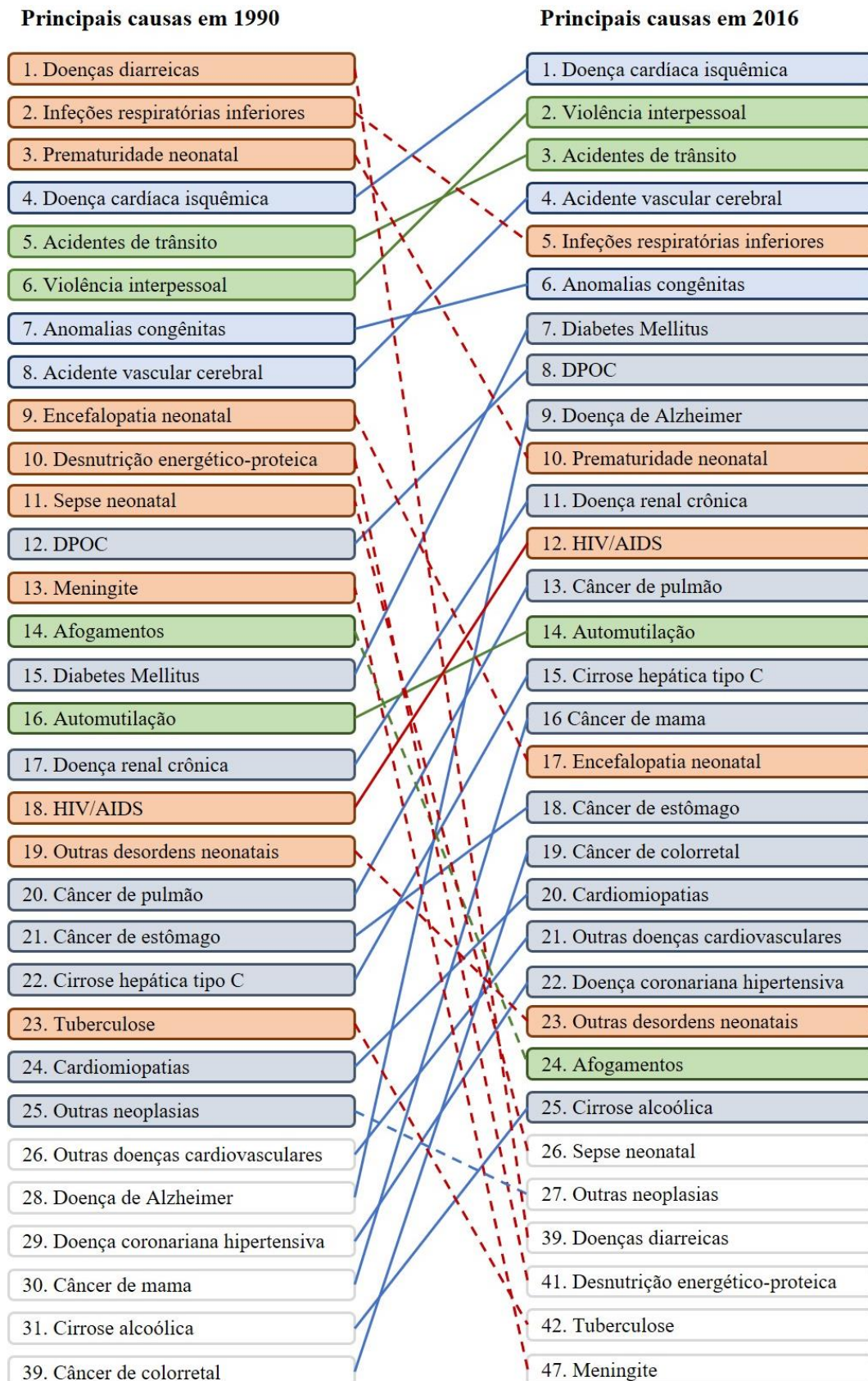
Há um elevado percentual de indivíduos no mundo que desenvolve complicações decorrentes das DCV, com 7,3 milhões infartos agudos do miocárdio e 110,6 milhões de casos de doença coronariana isquêmica, em 2015, principalmente na população após 40 anos. Estima-se que existam 10,8 milhões de casos de doença coronariana isquêmica entre pessoas de 50 a 54 anos, o que equivale a três vezes o número de casos na faixa etária de 40 a 44 anos (ROTH et al., 2017).

Estima-se que, em 2016, 41 milhões de mortes ocorreram devido às doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), 71% de todas as mortes, sendo que as doenças cardiovasculares são as que mais contribuem para esses elevados índices, com 17,9 milhões de óbitos, cerca de 44% do total causado pelas DCNT, alta taxa de mortalidade na população mundial (TORRES et al., 2015). Entende-se como DCNTs a doença cardíaca coronariana (DAC), acidente vascular cerebral (AVC), diabetes melitus tipo 2 (DM2), cânceres de pulmão, cólon, colo do útero e mama, doença pulmonar obstrutiva crônica e doença renal crônica, por exemplo.

O GBD avaliou a estimativa de mortalidade, anos de vida perdidos (AVP) (do inglês, *years of life lost* – YLL), anos de vida com deficiência (do inglês, *years lived with disability* - YLD) e anos de vida ajustados por incapacidade (do inglês, *disability adjusted life-years* - DALYS), expectativa de vida saudável e fatores de risco construídos com base nas evidências publicadas no GBD, especificamente no Brasil, e identificou alterações nas principais doenças que estão aumentando os AVP pela população brasileira, evidenciando o impacto direto das doenças crônicas e suas complicações em países emergentes, como o Brasil.

Em 1990, enquanto as doenças diarreicas eram a principal causa, segundo GBD em 2016, estas passaram a ocupar o 39º lugar, com incremento nas medidas de saneamento básico e tratamento mais eficazes, dando lugar a doença coronária isquêmica, que já ocupa o primeiro lugar dentre as causas de AVP, seguido de acidente vascular cerebral, dentre as doenças mais causadoras de mortalidade em 2016.

**Figura 2** – Principais causas de anos de vida perdidos (AVP) para ambos os sexos, no Brasil, para 1990 e 2016.

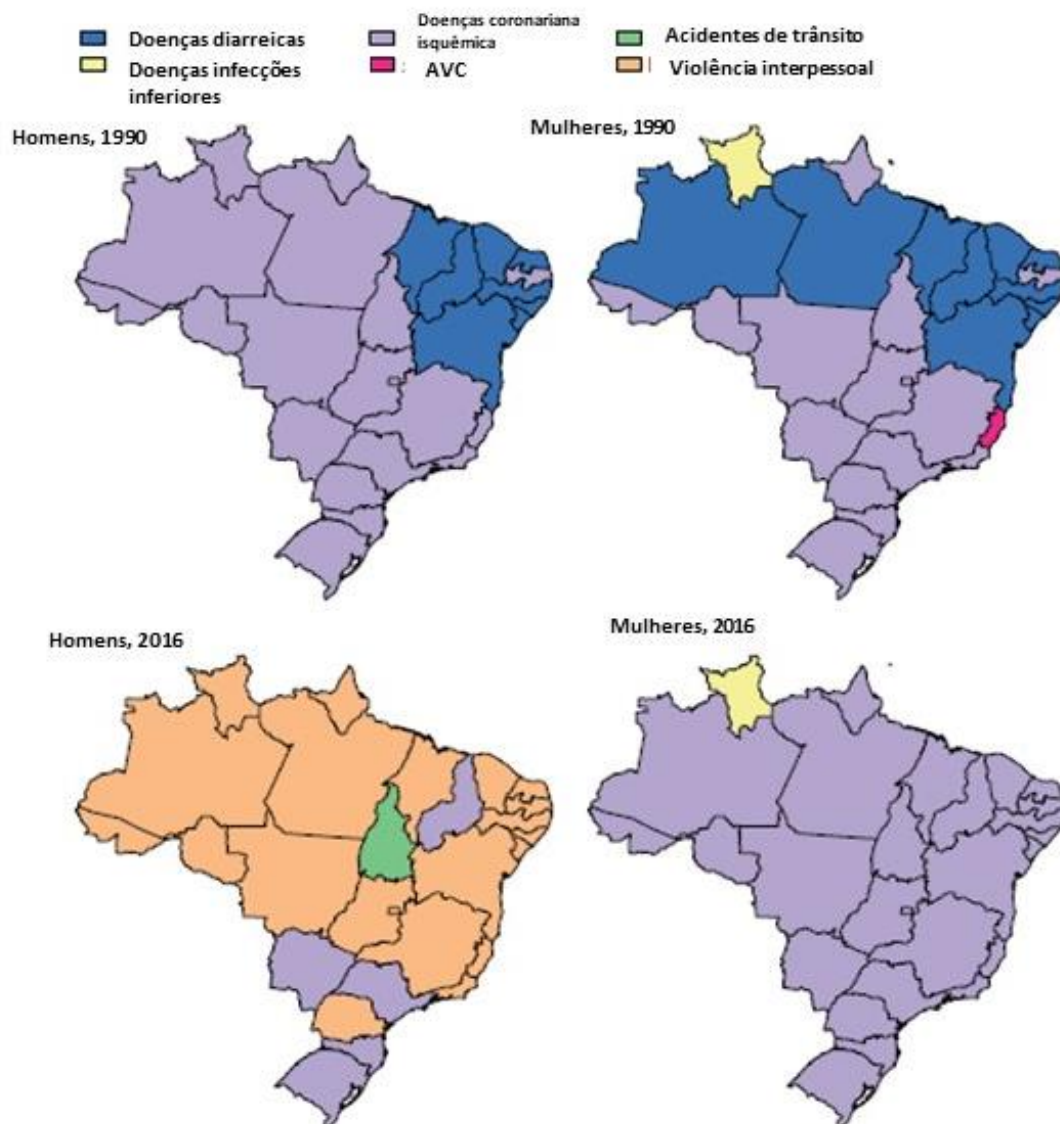


Fonte: Adaptado de Marinho et al. (2018).

Houve uma modificação das causas dos AVP, entre os sexos, identificados entre 1990 e 2016, sendo que a aterosclerose foi a principal responsável pela alta taxa de mortalidade da população (TORRES et al., 2015), contribuindo para o aumento dos AVP. Quase todos os estados brasileiros têm como principal causa de AVP a doença coronariana isquêmica, em mulheres, a exceção do estado de Roraima (**Figura 3**).

Considerando o sexo masculino, a violência se tornou a principal causa de AVP, entretanto, pode-se observar que, em 1990, a doença coronariana isquêmica contribuía em boa parte do país para redução dos anos de vida neste sexo, há exceção da maioria dos estados do Nordeste, que ainda sofria com as doenças diarreicas (MARINHO et al., 2018) (**Figura 3**).

**Figura 3** – Causas de anos de vida perdidos (AVP) ajustado por idade nos estados brasileiros, nos anos de 1990 e 2016, de acordo com o sexo.



Fonte: Adaptado de Marinho et al. (2018).

Segundo Allen et al. (2017), as DCNTs são as principais causas globais de morte e afetam desproporcionalmente aqueles que vivem em países de média e baixa renda. Estes países apresentam uma prevalência significativamente maior de tabagismo e uso de álcool, além do consumo inferior de frutas, legumes, peixes e fibras, quando comparados aos grupos socioeconômicos mais abastados, fatores de risco já conhecidos para o desenvolvimento e complicações das DCNTs. Evidencia-se, assim, a importância para os profissionais de saúde nessas populações, para formular políticas públicas voltadas para prevenção e controle destas doenças.

O impacto das DCNTs nos gastos com saúde e na renda nacional é descrito por Jaspers et al. (2014) e Muka et al. (2015), ao relatarem que os gastos associados às doenças cardiovasculares (12 a 16,5% do orçamento anual para cuidados de saúde nos Estados Unidos e na Europa foram os mais altos em comparação aos demais, além de haver um aumento nos custos em casos com maior gravidade da doença, representando um encargo financeiro significativo para os orçamentos de saúde e o bem-estar das nações, o que provavelmente aumentará com a tendência do aumento da expectativa de vida das pessoas, principalmente nos países emergentes.

Brouwer et al. (2015), em uma revisão sistemática, relataram sobre os custos com tratamento das DCV em países de baixa e média renda, e identificaram que as condições mais comuns que elevam os custos foram cardiopatia isquêmica aguda, DM2, AVC e hipertensão arterial sistêmica (HAS).

Na revisão sistemática de Einarson et al. (2018), é possível identificar entre os anos de 2007 a 2017, os custos médios por paciente/ano, e com a associação de DCV e DM2. Foram encontrados custos anuais médios por paciente para DCV, doença arterial coronariana, insuficiência cardíaca e acidente vascular cerebral, respectivamente, de 112%, 107%, 59% e 322% maiores em comparação aos pacientes com DM2 sem DCV, além dos custos do tratamento que variaram de US\$ 3.418,00 a 9.705,00 em comparação com o tratamento de pacientes com DM2 apenas, demonstrando que não só as DCV, mas suas complicações e associações com outras doenças crônicas podem interferir na economia da saúde em nível global.

Já é demonstrado na literatura o impacto na economia da saúde pelos custos associados ao tratamento dessas doenças e suas complicações, principalmente em países desenvolvidos e com o envelhecimento populacional. Kunz et al. (2018) chamaram atenção para o impacto do custo-efetividade na terapia endovascular de pacientes pós-AVC, entre 50 a 100 anos, dos Estados Unidos, e demonstraram que o cuidado e tratamento precoce reduz o

custo de vida para os pacientes com até 79 anos, sendo ainda mais efetivo na faixa etária de 80 a 100 anos.

A evidência da DCV sobre o impacto na economia em países emergentes foi relatada na revisão de Gheorghe et al. (2018), que incluíram países como China, Brasil, Índia e México, e identificaram que os custos por episódio de hipertensão e DCV variaram entre US\$ 500,00 e 1.500,00, enquanto que para as DAC e o AVC foram geralmente maiores, com estimativa de US\$ 5.000,00 por episódio. Na maioria dos países de baixa e média renda, tanto o custo anual da assistência quanto o custo de um episódio agudo excedem, muitas vezes, o gasto total em saúde per capita.

Siqueira et al. (2017) apresentaram em seu estudo a preocupação crescente do impacto econômico das DCV no Brasil nos últimos cinco anos, através de bancos de dados nacionais. A mortalidade por DCV representou 38% dos óbitos na faixa etária produtiva, com custos crescentes e estimados de 37,1 bilhões de reais/ano. Por morte prematura, os custos podem representar até 61%, com 22% provenientes de internações e consultas, e 15% pela perda da produtividade. Considerando que 9,5% no produto interno bruto (PIB) é gasto com saúde, o custo médio impacta em 0,7% do PIB, e aumenta significativamente nos últimos cinco anos, à medida que a população brasileira envelhece e a prevalência de DCV aumenta.

### ***1.1.2 Fisiopatologia da doença aterosclerótica***

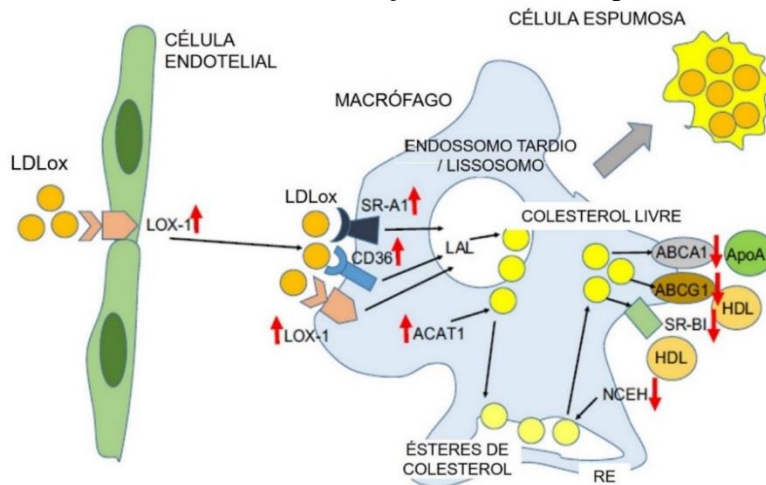
A aterosclerose é uma doença inflamatória ocasionada pelas altas concentrações plasmáticas de colesterol, em particular, o colesterol de baixa densidade (LDL), acumulando-se dentro da parede da artéria, levando a respostas celulares e moleculares específicas que podem desencadear um processo inflamatório sistêmico, com ativação de macrófagos, em artérias de grande e médio calibre, predispondo ao infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral e doença arterial periférica (ROSS, 1999; GETZ; REARDON, 2017; MARINHO et al., 2018; ADAY et al., 2018).

A formação de células espumosas na camada íntima da artéria carótida, por meio da agregação de macrófagos, é a principal característica do desenvolvimento de lesões decorrentes do processo aterosclerótico no início. A captação descontrolada de LDL oxidada (LDLox), a excessiva esterificação do colesterol e/ou a diminuição da liberação de colesterol resultam no acúmulo de ésteres de colesterol armazenado como gotículas lipídicas citoplasmáticas e, subsequentemente, desencadeando a formação de células espumosas (YU et al., 2013).

O desenvolvimento da placa de ateroma é desencadeado pela diminuição do efluxo de colesterol devido à redução da expressão do cassete de ligação do ATP-1 (ABCA1), cassete de ligação do ATP-G1 (ABCG1) e receptor *scavenger* da classe B tipo 1 (SR-BI) (MAÏGA; KALOPISSIS; CHABERT, 2014), além de sua captação ser aumentada devido ao aumento da expressão da glicoproteína plaquetária III b / IV (CD36), que é um receptor de alta afinidade a LDLox, e de uma glicoproteína de superfície celular altamente expressa em macrófagos e que medeia a captação de LDLox ao receptor *scavenger*-A1 (SR-A1). Níveis mais elevados de acetil-coA acetil-transferase-1 (ACAT1) e menores de hidrolases de éster de colesterol (nCEH) elevam excessivamente a esterificação do colesterol (YU et al., 2013; KURITA-OCHIAI; YAMAMOTO, 2014; HAJISHENGALLIS, 2015; CHISTIakov et al., 2017).

A molécula de ACAT1 tem sua regulação induzindo elevação na sua expressão, enquanto o nCEH é inversamente regulado (na diminuição). Esses mecanismos juntos levam a depósitos de lipídios excessivos e a transformação de macrófagos em células espumosas (Figura 4) (CHISTIakov et al., 2017).

**Figura 4** – Mecanismo envolvido na formação das células espumosas em macrófagos.

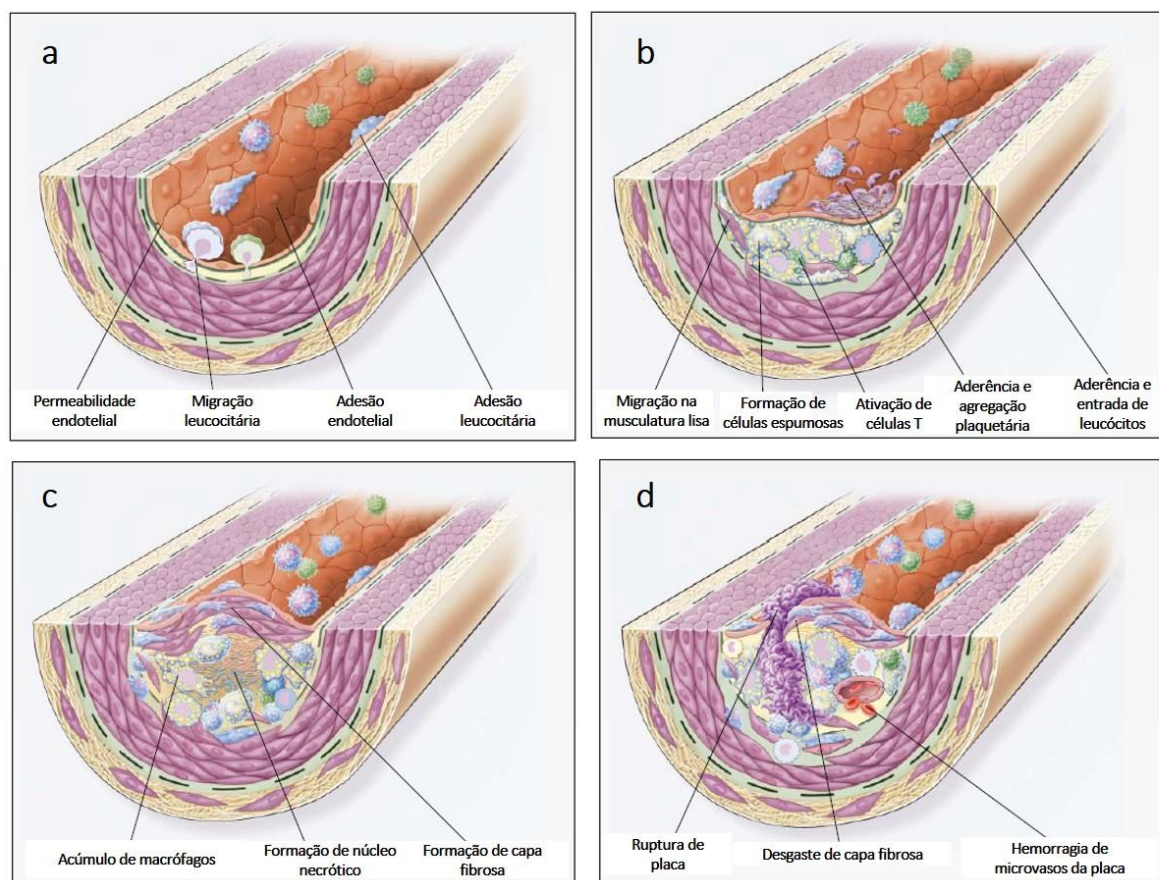


Nota: As células endoteliais permitem a transferência de LDLox facilitada pela alta expressão de receptores. Com a infiltração, os macrófagos detectam e se ligam a LDLox pelos receptores, como SR-A1, CD-36 e LOX-1. Nos lisossomos tardios, a LAL degrada os ésteres de colesterol, presentes nas moléculas de LDL, liberando colesterol e ácidos graxos livres. No retículo endoplasmático, a ACAT1 contribui para a formação de ésteres de colesterol com o colesterol livre, se acumulando no retículo endoplasmático. A nCEH processa ésteres de colesterol, liberando colesterol livre, que é transportado para fora das células através dos transportadores ABCA1 e ABCG1, assim como via SR-BI. A ApoA-1 serve como receptor do colesterol transportado pela ABCA1. A HDL recebe o colesterol que é transferido pela ABCG1 e pela SR-BI. Na aterosclerose, o controle é desregulado, aumentando a expressão de receptores *scavenger* (SR), levando uma absorção ainda maior de LDLox, enquanto que a expressão de ABCA1 e ABCG1 é reduzida, diminuindo o efluxo de colesterol e promovendo uma deposição dentro dos macrófagos, o que pode gerar acúmulo de ésteres de colesterol na célula e levar à transformação de macrófagos em células espumosas.

Legenda: LDLox – lipoproteína de baixa densidade oxidada; HDL – lipoproteína de alta densidade; SR-A1 - receptor scavenger-A1; ABCA1 - cassete de ligação do ATP-1; ABCG1 - cassete de ligação do ATP-G1; ACAT1- acetil-coA acetil-transferase-1; CD36 - glicoproteína plaquetária IIIb/IV; nCEH - hidrolases de éster de colesterol; RE – retículo endoplasmático; LAL - lipase ácida lisossômica.  
 Fonte: Adaptado de Chistiakov et al. (2017).

Na camada mediointimal, essas alterações na permeabilidade endotelial favorecem o influxo de LDLox para o vaso com posterior proliferação de células espumosas, acarreta a formação de estrias gordurosas, onde ocorre também proliferação e migração de células musculares lisas pela íntima. Esse mecanismo tem a participação do fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleucina 2 (IL-2), inibidor do ativador de plasminogênio tipo 1 (PAI-1), integrinas, fibrina e tromboxano A2 na aderência e migração de leucócitos. Essas estrias progridem e levam a lesões intermediárias e avançadas, além da formação de uma rede de fibrina (ROSS, 1999; YU et al., 2013; HAJISHENGALLIS, 2015; DI PIETRO; FORMOSO; PANDOLFI, 2016; MITEVA et al., 2018) (**Figuras 5a e 5b**).

**Figura 5** – Formação de placa de ateroma dentro do lúmen arterial.



Fonte: Adaptado de Ross (1999).

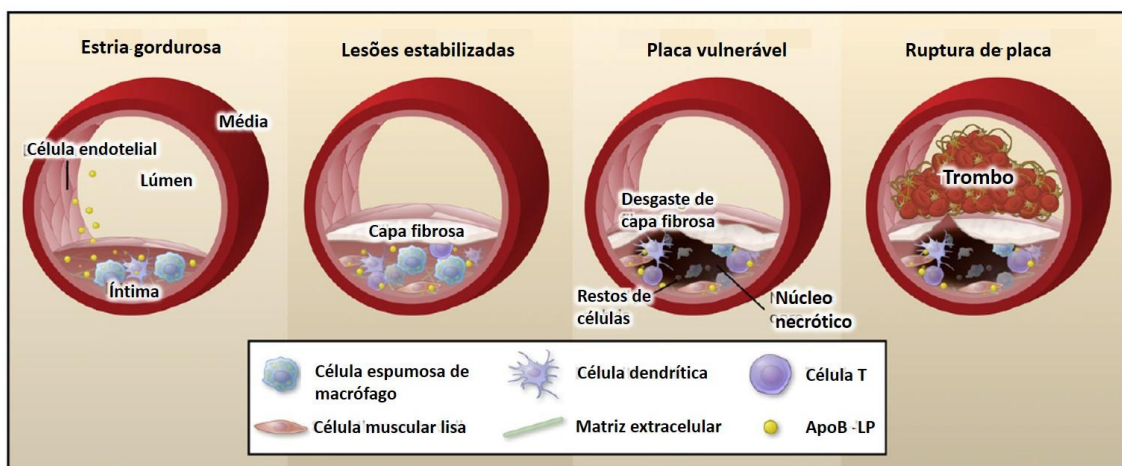
As lesões iniciais de gordura são caracterizadas pelo acúmulo de lipoproteínas, contendo apolipoproteína B (ApoB) no espaço subendotelial, que incita o recrutamento de células dendríticas e macrófagos. À medida que a lesão aterosclerótica progride, o músculo liso e as células T também se infiltram na íntima e a retenção de lipoproteínas é amplificada (MOORE; TABAS, 2011; BALE; DONEEN; VIGERUST, 2017).

As placas vulneráveis caracterizam-se pelo acúmulo de células apoptóticas e pela depuração fagocítica defeituosa, resultando no núcleo necrótico, envolvido por uma mistura de leucócitos, lipídios e detritos, resultando em mais apoptose e necrose, aumento da atividade proteolítica e acúmulo progressivo de lipídios (MOORE; TABAS, 2011; GROOTAERT et al., 2018).

O desgaste da fina capa fibrosa reduz a estabilidade da lesão, tornando essas placas ateroscleróticas suscetíveis à ruptura e à formação de um trombo, e essa ruptura pode levar rapidamente à trombose e que geralmente ocorre nos locais de estreitamento da capa que recobre a lesão avançada. Essa ruptura pode levar à hemorragia do vaso ou do lúmen da artéria, além de também resultar na formação de trombo e/ou na oclusão da artéria (ROSS, 1999; PACKARD; LICHTMAN; LIBBY, 2009; MOORE; TABAS, 2011; YU et al., 2013; HOVLAND et al., 2015) (Figuras 5c, 5d e 6).

Em estudo com camundongos expostos a uma dieta hiperlipídica, esses cristais de colesterol aparecem no seio aórtico dentro de uma semana, ou seja, tempo relativamente curto para uma doença crônica, pois precede inclusive a infiltração de macrófagos (BAUMER et al., 2017).

**Figura 6** – Esquema de formação do processo de aterosclerose na camada mediointimal das artérias até a ruptura da placa.



Fonte: Adaptado de Moore e Tabas (2011).



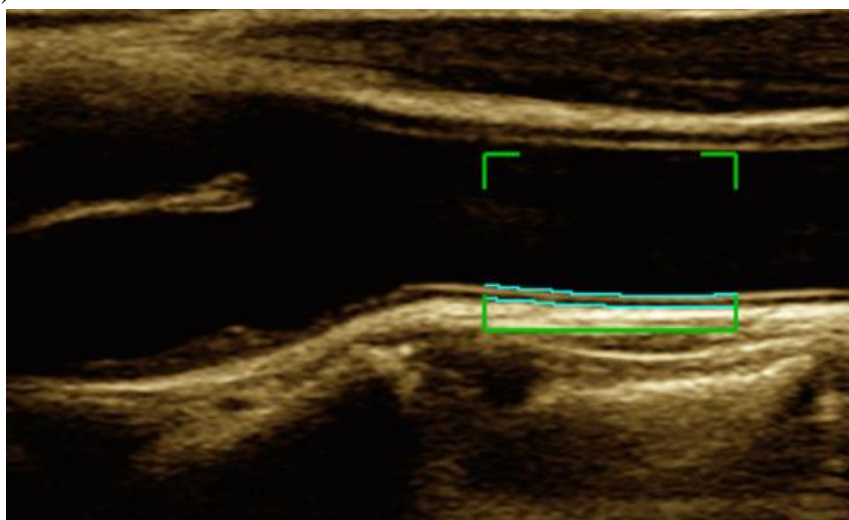
### 1.1.3 Métodos diagnósticos da doença aterosclerótica

A detecção precoce de processos de obstrução dos vasos sanguíneos ou mesmo, início da doença vascular, antes de sua apresentação clínica é um importante objetivo para se evitar complicações decorrentes do estágio mais avançado da doença aterosclerótica. A aterosclerose pode ser identificada em artérias carótidas ou em vasos periféricos e a ultrassonografia da espessura mediointimal (EMI) das carótidas pode ser considerada um marcador importante para avaliar a doença arterial coronariana, sendo validado em grandes estudos populacionais (LUNDBERG et al., 2014; ZHANG et al., 2014; FLIOTSOS et al., 2018).

Dentre as técnicas que permitem a caracterização precisa das placas ateroscleróticas (*in vivo*), temos o mapeamento por ressonância magnética por imagem e a ultrassonografia colorida com Doppler. O método ultrassonográfico baseia-se no fenômeno da interação de som e tecidos, a partir da transmissão de ondas sonoras pelo meio, de tal sorte que é possível determinar as propriedades mecânicas dos tecidos, a detecção da arquitetura vascular, com a determinação da direção e velocidade do fluxo de sangue (UNDERHILL et al., 2010).

A **Figura 7** ilustra o sítio onde são realizadas as medidas para detecção de placas ateroscleróticas em artérias carótidas comuns em humano afim de um diagnóstico precoce para DCV. Além disso, a detecção desta placa, quando comparada a EMI, apresenta maior acurácia diagnóstica para o risco de patologias cardiovasculares, tais como o acidente vascular cerebral (INABA; CHEN; BERGMANN, 2012).

**Figura 7.** Localização das medidas da espessura da camada mediointimal (EMI) (delineada em destaque azul) na carótida comum.



Fonte: Freire et al. (2015).

A obtenção das medidas da espessura mediointimal (EMI) das carótidas por ultrassonografia modo-B tem sido utilizada por ser um método não invasivo e altamente confiável para os estágios precoces de aterosclerose, comumente associada à fase subclínica, processo inicial definido com a presença de qualquer placa em locais carotídeos, aórtico ou iliofemoral ou com espessura da carótida mediointimal maior ou igual a 1 mm (FERNÁNDEZ-ALVIRA et al., 2017). Quando as medidas de EMI das artérias carótidas comuns (ACC) e das carótidas comuns internas (ACCI) são combinadas, existe uma forte associação com fatores de risco e prevalência de doenças cardiovasculares do que se analisadas sozinhas (TOUBOUL et al., 2007; AMARENCO et al., 2018).

Embora vários estudos clínicos tenham demonstrado que a EMI espessada prediz, independentemente, o risco ou eventos de DCV, de forma confiável, ainda não há consenso nos achados. O valor preditivo inconsistente da EMI pode ser atribuído à variabilidade da metodologia de medição, tais como aquisição de imagens, leitura e processamento, além de poder ocorrer erro na avaliação das condições hemodinâmicas, com achados de velocidade e de forma de onda do doppler com distorções, causando um diagnóstico errôneo, e das diferenças étnicas da população estudada e de erros do operador (HO, 2016), o que requer cautela e treinamento dos profissionais especialistas (ZWIEBEL; PELLERITO, 2005).

Estudos vêm mostrando que o fluxo sanguíneo, quando associado à presença de uma patologia, tais como aterosclerose, apresenta-se mais lento na periferia do que no centro, com a luz do vaso alterada. Desta forma, Zwiebel e Pellerito (2005) mostraram que na presença de um fluxo sanguíneo atípico foram produzidas alterações, na qual a análise espectral tornou-se necessária porque organizava a mistura de frequências geradas por fluxos atípicos, que poderiam servir de suporte para diagnóstico de alterações vasculares.

O uso de métodos que avaliam precocemente fatores de risco cardiovascular é útil para prever a presença de aterosclerose subclínica em indivíduos aparentemente saudáveis, com baixo risco cardiovascular e/ou na fase inicial da doença (FERNÁNDEZ-ALVIRA et al., 2017).

#### ***1.1.4. Fatores antropométricos e bioquímicos para risco cardiovascular***

A obesidade é um dos maiores problemas de saúde pública no mundo, com projeções, até 2025, estimando em cerca de 2,3 bilhões de adultos estarão com sobrepeso e mais

de 700 milhões com obesidade. Entre os anos de 2006 e 2016, a prevalência da obesidade passou de 11,8% para 18,9% (BRASIL, 2017).

A obesidade pode ser classificada, em estudos populacionais, utilizando o índice de massa corporal (IMC), por ser um cálculo simples da razão do peso, em kg, pelo quadrado da altura, em m, considerando IMC igual ou acima de 30,0 kg/m<sup>2</sup> como indicativo de obesidade (WHO, 2015).

O excesso de tecido adiposo, muitas vezes associado ao sobrepeso, pode acelerar e ser risco para desenvolvimento de DCNT, sendo as DCV as mais prevalentes, a partir do enrijecimento arterial e formação de placa ateromatosa. Há parâmetros antropométricos que estão associados ao aumento do risco de desenvolver DCV, como a circunferência da cintura (CC), a razão cintura-quadril (RCQ) e o percentual de gordura corporal (%GC), podendo estar associados ao acúmulo de gordura na região visceral. Esses parâmetros tem uma relação direta com o aumento do risco de desenvolver doenças metabólicas e cardiovasculares, associando-se, assim, a níveis alterados de LDL, HDL, triglicérides e aumento dos valores séricos de insulina (HIRSCHLER et al., 2005; LUNARDI; PETROSKI, 2008; ROMERO-VELARDE et al., 2013).

Estudos demonstram que a prevalência de fatores de risco para DCV eleva-se quando há aumento das medidas de adiposidade, ou seja, homens e mulheres com valores elevados de obesidade global e central, valores de índice de massa corporal elevados e circunferência da cintura elevada, respectivamente. Esses achados são considerados fatores de risco cardiometabólicos, com aumento na propensão de formação de placas de ateroma (CHUANG et al., 2012; KNOWLES et al., 2011; LIMA, 2010; SUKA et al., 2011; YING et al., 2010).

Em suma, a obesidade central é um dos principais fatores associados a síndrome metabólica e risco cardiovascular, e medidas de IMC, CC e RCQ fornecem informações úteis para avaliar a adiposidade corporal na prática clínica (AMATO; GUARNOTTA; GIORDANO, 2013)

## **1.2 DOENÇA PERIODONTAL**

### ***1.2.1 Epidemiologia e diagnóstico da doença periodontal***

A doença periodontal (DP) é definida como uma doença inflamatória do tecido que cerca e apoia os dentes (periodonto), afetando de 20 a 50% (NAZIR, 2017), podendo chegar

até 90% da população mundial, em alguns estudos (PIHLSTROM; MICHALOWICZ; JOHNSON, 2005). É causada por microrganismos patogênicos presentes na cavidade oral, associado à destruição óssea alveolar e perda do suporte do tecido conjuntivo adjacente (HIGHFIELD, 2009), chegando até a perda dentária (SANZ; VAN WINKELHOFF, 2011).

É considerada uma doença complexa com múltiplas causas, algumas de base genética, com influências epigenéticas, e outras modificáveis, relacionadas aos fatores ambientais e comportamentais, que podem impactar no estabelecimento e propagação da lesão (MEYLE; CHAPPLE, 2015).

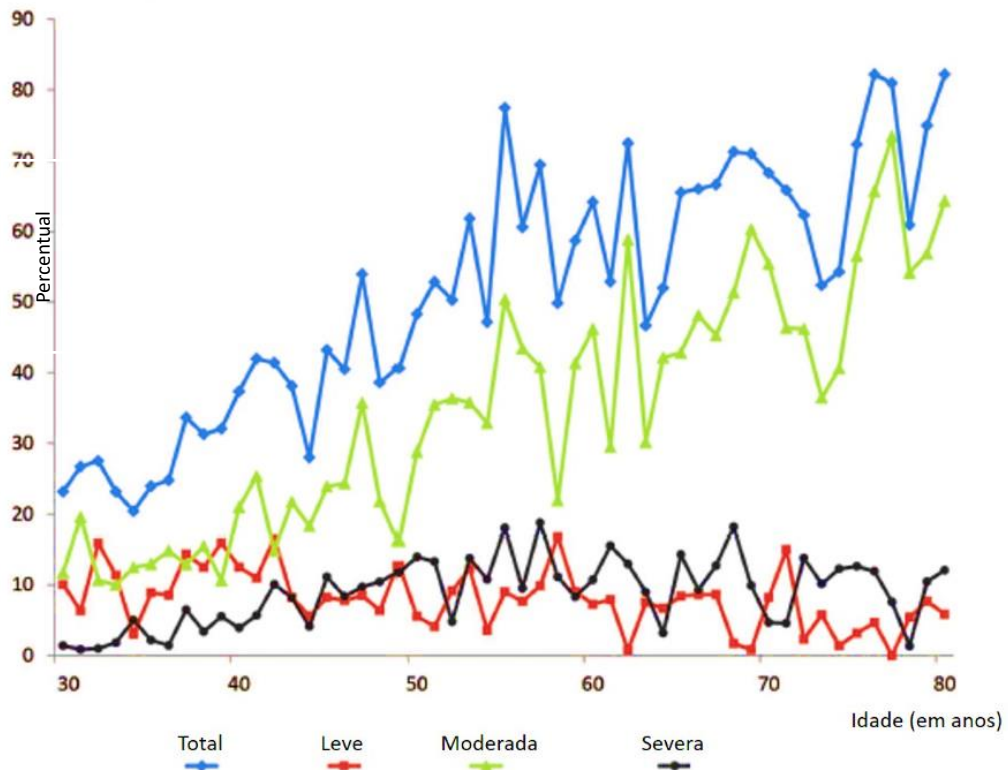
Dados globais de saúde bucal, provenientes de grandes estudos epidemiológicos em diferentes países, mostram que a distribuição da DP é bem abrangente, presente em qualquer fase da vida (KINANE; STATHOPOULOU; PAPAPANOU, 2017). Grande parte da população mundial sofre com algum grau de DP, independente da faixa etária, sendo a periodontite crônica mais prevalente com o avançar da idade, nos idosos ( $\geq 65$  anos) (NAZIR, 2017).

A classificação, segundo Highfield (2009), caracteriza-se por três estágios de severidade da periodontite, sendo: crônica; agressiva e associada a manifestações sistêmicas, com distinção baseada no início da doença, na taxa de progressão, na intensidade da destruição do periodonto, no grau de inflamação e na quantidade de biofilme e cálculo acumulados (ARMITAGE; CULLINAN, 2010). Ainda é possível classificar em periodontite leve, moderada ou grave, considerando a profundidade de sondagem e inserção de 1 a 2 mm, 3 a 4 mm e  $\geq 5$ mm, respectivamente (ARMITAGE, 2004).

O estudo “Prevalência de periodontite em adultos nos Estados Unidos da América (EUA): 2009 e 2010” foi realizado com amostra probabilística de múltiplos estágios estratificada da população não institucionalizada nos 50 estados dos EUA e no Distrito de Columbia, estimando 64,7 milhões de adultos convivendo com periodontite nos diversos graus de severidade da doença, sendo o estágio moderado como o mais prevalente (SANTOSH et al., 2017; EKE et al., 2012) (**Gráfico 1**).

Apesar da manifestação na idade adulta, crianças e adolescentes podem desenvolver precocemente DP (CHATZISTAVRIANOU; BLAIR, 2017), e em adolescentes (15 a 19 anos) de países em desenvolvimento, há uma maior prevalência de cálculos e sangramento na sondagem, variando entre 35 e 70%, quando comparado aos dos países desenvolvidos (entre 4 e 34%), semelhante às prevalências maiores na população adulta nos países em desenvolvimento (36 a 63%) frente aos 14 a 47% dos países desenvolvidos (NAZIR, 2017).

**Gráfico 1** – Percentual do total de indivíduos com periodontite de acordo com a severidade da doença estratificado por idade.



Fonte: Adaptado de Eke et al. (2012)

Entretanto, nos países desenvolvidos, há um percentual maior de indivíduos adultos com bolsas periodontais mais profundas (4 a 5 mm) e os idosos são a parcela da população que mais sofre com bolsas acima de 6 mm (NAZIR, 2017), impactando na quantidade de edêntulos totais nessa faixa etária (um a cada cinco idosos  $\geq 65$  anos nos EUA) (EKE et al., 2016).

A doença periodontal mais severa ( $\geq 5$  mm de profundidade de bolsa periodontal) é a sexta patologia mais prevalente na população global, afetando 10,8% de indivíduos, o equivalente a 743 milhões de adultos (MARCENES et al., 2013).

No Brasil, a última pesquisa epidemiológica com publicação dos dados em 2012, a “Pesquisa Nacional de Saúde Bucal 2010”, conhecida por SB BRASIL 2010, indicou que cerca de metade dos adultos no país apresenta sangramento gengival e cálculos dentários e 30% já apresentam bolsas periodontais em uma ou mais regiões da boca (BRASIL, 2012).

A destruição tecidual é proporcional aos níveis de placas dentárias, sistema de defesa do hospedeiro e fatores de risco relacionados, apresentando uma característica importante da periodontite crônica e agressiva, mais severa: a especificidade do local, com bolsas periodontais características, além da perda de inserção e óssea associadas (**Figura 8**)

(HIGHFIELD, 2009; BINDERMAN; GADBAN; YAFFE, 2014; ALBANDAR, 2014; KINANE; STATHOPOULOU; PAPAPANOU, 2017).

**Figura 8** – Periodonto saudável e doente.



Nota: a) Tecidos periodontais saudáveis. b) Inflamação gengival precoce (gengivite; seta) pode ser vista na gengiva entre os incisivos centrais. c) Aparência clínica de periodontite crônica, com perda de tecido e bolsas periodontais profundas, que são uma característica da doença (seta).

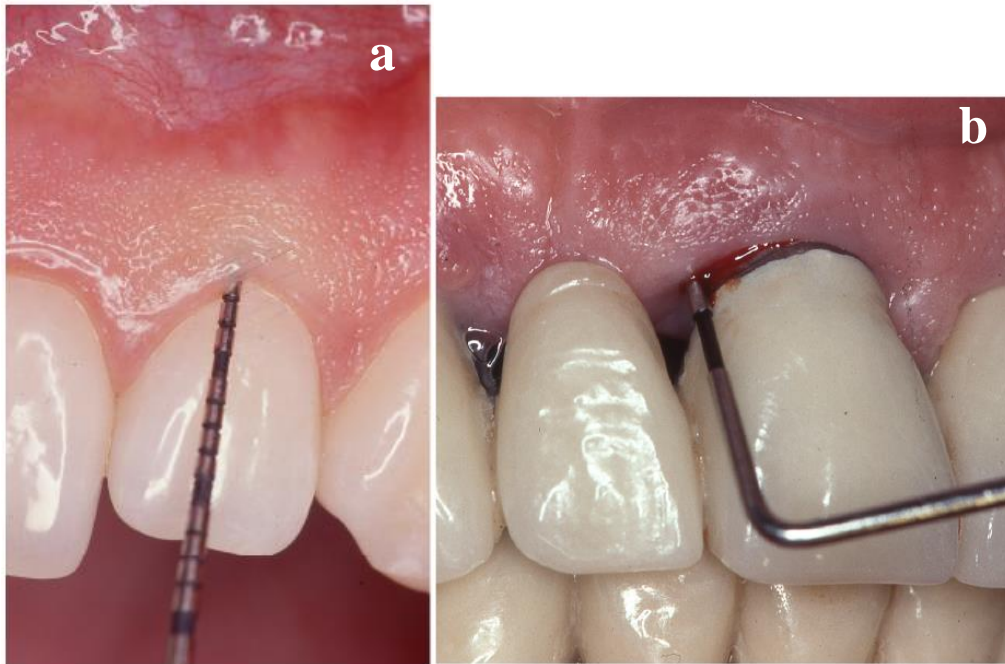
Fonte: Kinane; Stathopoulou; Papapanou (2017).

A DP crônica é a forma mais prevalente de periodontite, com progressão lenta, diagnosticada pelas alterações inflamatórias crônicas na gengiva marginal, caracterizada pelo sangramento, assim como a presença de bolsas periodontais e perda de inserção no periodonto, diferentemente da agressiva, quando pode ser identificada presença abundante de placa e cálculo (BINDERMAN; GADBAN; YAFFE, 2014; ALBANDAR, 2014; HIGHFIELD, 2009).

A classificação e definição de um caso de periodontite depende de três fatores: magnitude da profundidade da sondagem da bolsa, perda de inserção clínica e perda óssea alveolar nos dentes afetados (KINANE; STATHOPOULOU; PAPAPANOU, 2017), que podem ser observadas do ponto de vista clínico, ocasionando mobilidade dental, migração patológica e perda dentária (KIM; KIM; CAMARGO, 2013).

A avaliação clínica periodontal envolve desde a avaliação visual da gengiva até o exame clínico de sondagem da bolsa e/ou sulco. Ao realizar o exame, utilizando uma sonda específica, a ausência de sangramento na sondagem é um excelente preditor negativo do desenvolvimento da doença (**Figura 9a**), enquanto a presença de sangramento é amplamente utilizada na prática clínica, apesar de poder superestimar o diagnóstico decorrente da lesão proposital no tecido de suporte (**Figura 9b**) (KIM; KIM; CAMARGO, 2013).

**Figura 9** - Sangramento na sondagem no diagnóstico de doenças periodontais (ausente – 9a; presente – 9b).



Fonte: Kim; Kim; Camargo (2013)

A periodontite agressiva pode apresentar-se nas formas localizada ou generalizada, iniciando precocemente o processo de doença inflamatória periodontal crônica entre a puberdade e o início da terceira década de vida, ou seja, no adulto jovem (KULKARNI; KINANE, 2014), sendo que não há biomarcador específico para diferenciar a periodontite crônica da agressiva, pela similaridade etiológica e histopatológica, que pode cursar para a periodontite crônica sindrômica, que se caracteriza pela destruição do periodonto em maior severidade, manifestando-se por uma doença sistêmica, relacionada à estrutura periodontal ou ao sistema imune do hospedeiro (ALBANDAR, 2014; KINANE; STATHOPOULOU; PAPAPANOU, 2017).

Tais investigações devem refletir a eficácia longitudinal de diferentes abordagens para o manejo da saúde bucal, dada a possibilidade de recidiva da doença periodontal (DP) após a terapia e o longo período de evolução da patologia e suas manifestações. Critérios uniformes para definição, extensão e gravidade do caso de DP; protocolos padronizados de tratamento; e a consideração do curso do tempo, confundidores importantes e modificadores de efeito sobre a associação de DP e processo aterosclerótico também melhorariam estudos futuros. (LOCKHART et al., 2012)

### ***1.2.2 Fisiopatologia e fatores de risco para doença periodontal***

Dentre as várias espécies de bactérias que podem estar associada à doença periodontal (DP), destacam-se: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (TUOMAINEN et al., 2008), *Tannerella forsythia* (MORALES et al., 2018), *Prevotella intermedia*, *Treponema denticola*, *Chlamydia pneumoniae* (JOAQUIM et al., 2017), *Campylobacter rectus* (SANTOSH et al., 2017), *Helicobacter pylori* (HU et al., 2016) e *Porphyromonas gingivalis*, sendo este um dos mais associados à periodontite (ZHOU et al., 2014; HUSSAIN; STOVER; DUPONT, 2015), por induzir comunidades microbianas disbióticas no hospedeiro, mesmo presente em baixa frequência (HAJISHENGALLIS, 2015; HAJISHENGALLIS; DARVEAU; CURTIS, 2012).

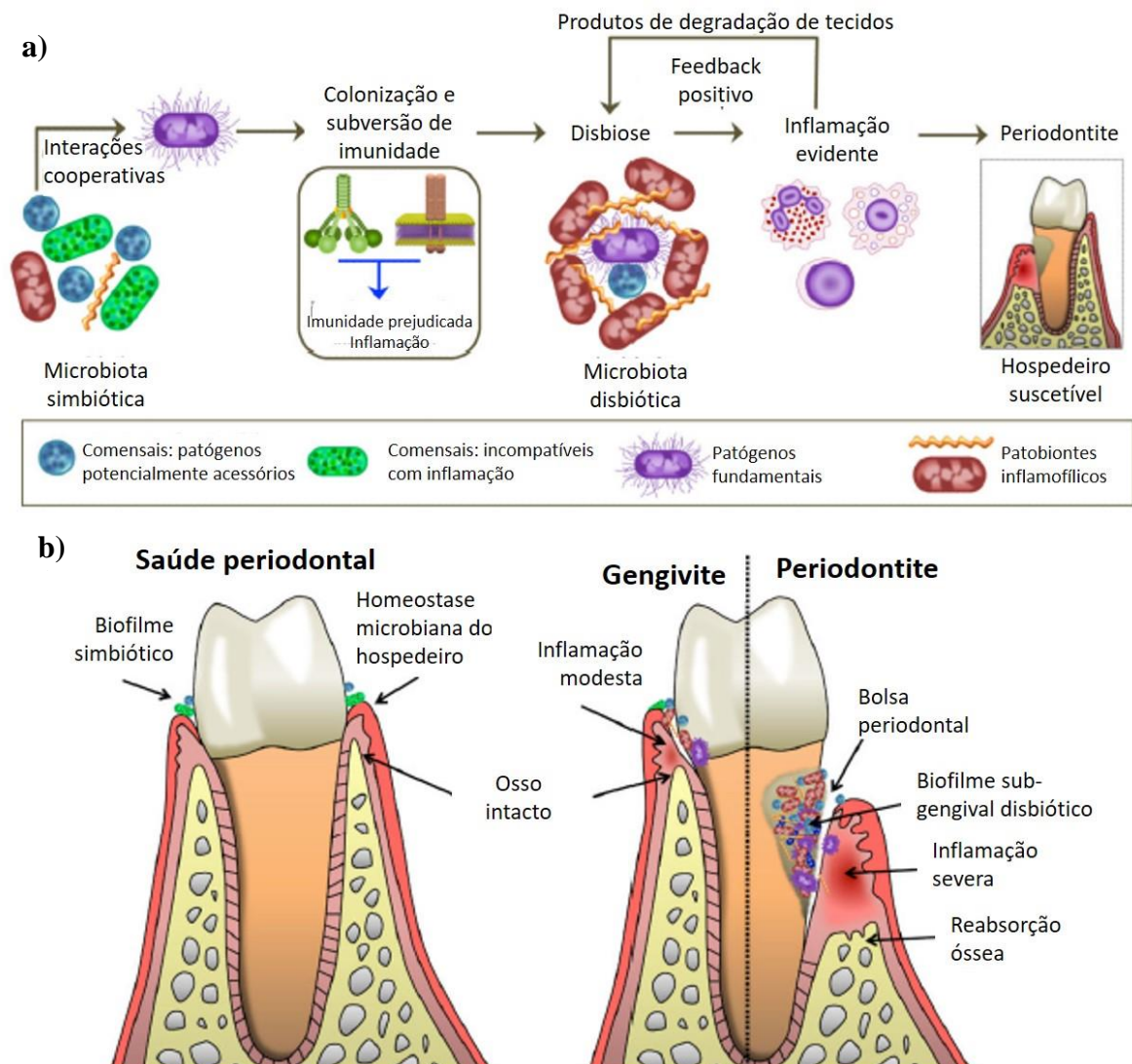
Certos comensais, como o *Streptococcus gordonii*, promovem a colonização por *P. gingivalis*, sendo considerados patógenos acessórios, evidenciando que a manipulação da resposta imune do hospedeiro é fundamental para alterar quantitativa e qualitativamente a microbiota bucal, antes de favorecer o desenvolvimento de DP em um processo periodontal inflamatório (WHITMORE; LAMONT, 2011), por meio da formação de bolsas periodontais, abrigando bactérias que podem se beneficiar de substratos da cascata inflamatória, como peptídeos de colágeno e outros compostos transportados com o fluido gengival (HAJISHENGALLIS, 2015) (**Figura 10a**).

A inflamação periodontal começa como uma resposta protetora contra o biofilme bacteriano (DAMGAARD et al., 2015). Em indivíduos suscetíveis, o sistema imune não consegue controlar e a inflamação crônica e torna-se uma lesão periodontal mais aparente, e os objetivos da intervenção nesta doença se concentram no retorno do tecido lesionado à homeostase, definindo como ausência da inflamação (CEKICI et al., 2014) (**Figura 10b**).

A evolução da patogênese da DP pode levar a um quadro mais crônico que inclui edema gengival, infiltração leucocitária e liberação de mediadores inflamatórios (GONÇALVES et al., 2018) (**Figura 10b**).



**Figura 10** – Evolução da fisiopatologia da doença periodontal.



Nota: a) A DP é induzida em indivíduos suscetíveis, com uma microbiota disbiótica, que ocorre sinergicamente para causar inflamação e a destruição do periodonto, promovendo a reabsorção óssea. b) A progressão da lesão, inicialmente com fissura gengival sem perda óssea, com sondagem  $\leq 2$  mm de profundidade, enquanto a periodontite já se apresenta bem desenvolvida com formação de bolsas e profundidade de  $\geq 4$  mm de profundidade, além da resposta inflamatória associada à perda óssea alveolar.

Fonte: Adaptado de Hajishengallis (2015).

Alguns indivíduos podem tolerar a disbiose em virtude da resposta imune individual e intrínseca, em casos de polimorfismos hiporresponsivos, o que pode atenuar a inflamação e prevenir, conseqüentemente, o desenvolvimento de DP. Já em outros, com mais suscetibilidade, há uma formação com menos acúmulo de biofilme e, ainda assim, são extremamente propensos à DP (LAINE; CRIELAARD; LOOS, 2012; BORGNACKE, 2015), podendo permear mais rapidamente pelas quatro fases do desenvolvimento da DP: colonização, invasão, estímulo da resposta do hospedeiro com ativação da resposta imunológica, e destruição dos tecidos

conjuntivos e ósseos (GRAVES et al., 2011; LOCKHART et al., 2012; MOUTSOPOULOS; LIONAKIS; HAJISHENGALLIS, 2015).

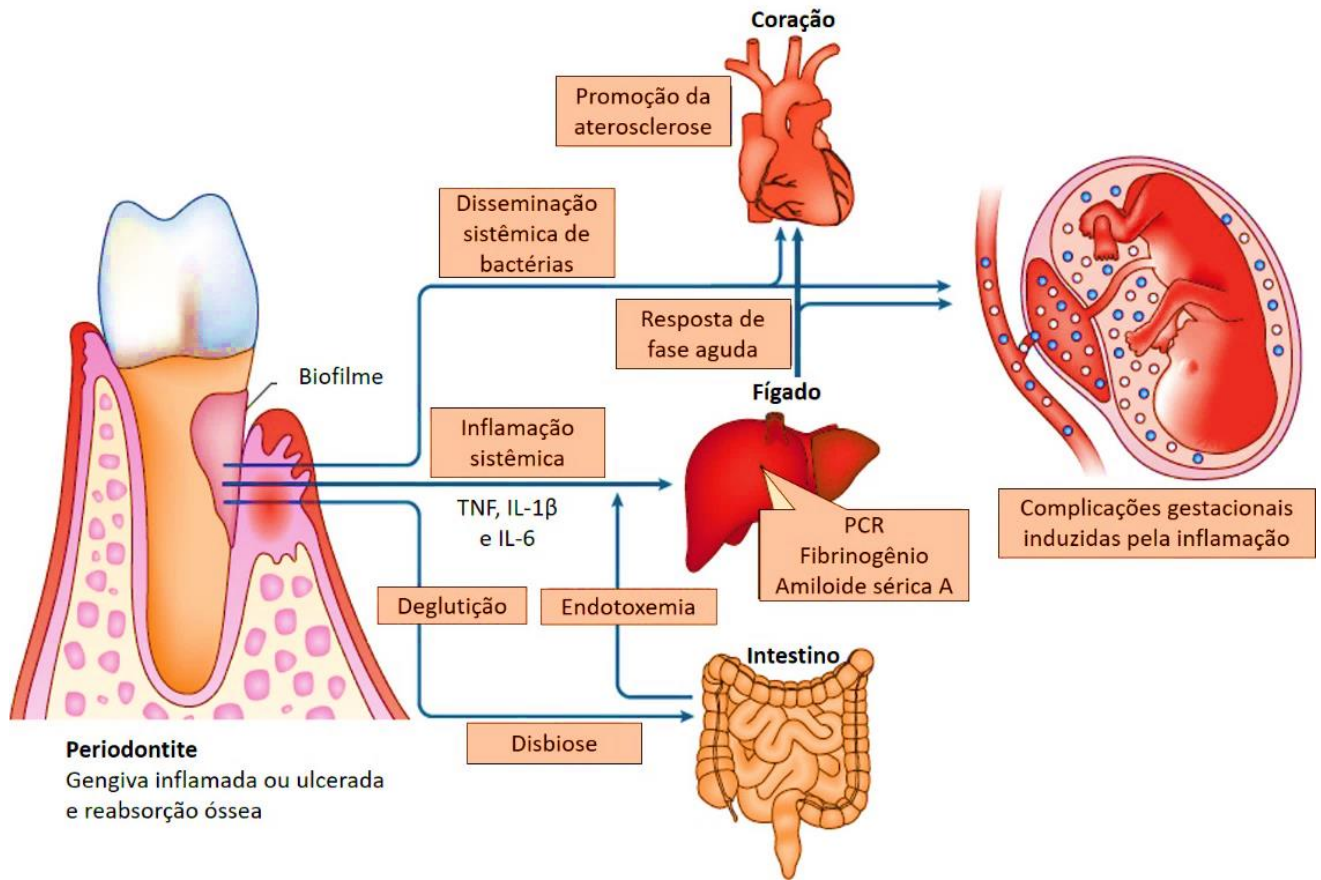
Os principais fatores de risco para DP podem ser divididos em dois tipos: modificáveis e não modificáveis, sendo que o primeiro está relacionado ao estilo de vida (tabagismo ativo e passivo, higiene bucal precária e estresse), doenças (diabetes mellitus, mudanças hormonais (principalmente em mulheres) e/ou uso de medicamentos) e condição socioeconômica (CASANOVA; HUGHES; PRESHAW, 2014; LEITE et al., 2018; SHIM; HAN, 2018). Em países industrializados, o tabagismo é o maior fator de risco para desenvolvimento de DP em adultos (SANTOSH et al., 2017). A idade, o sexo e a etnia são os fatores não modificáveis (RHEU et al., 2011), relacionados ao desenvolvimento, progressão, e gravidade da periodontite (OGAWA et al., 2002; NAZIR, 2017).

### ***1.2.3 Relação fisiopatológica da doença periodontal com doenças sistêmicas***

A bactéria *Porphyromonas gingivalis*, além de ser um dos patógenos mais relacionados à periodontite crônica, pode estar associada a outras patologias inflamatórias sistêmicas crônicas, incluindo doenças cardiovasculares, dentre elas a aterosclerose (MATTILA et al., 1989, BUHLIN et al., 2009, BELSTRØM et al., 2011, AHN et al., 2016; ZENG et al., 2016), pneumonia aspirativa em idosos e imunossuprimidos (PAJU; SCANNAPIECO, 2007), doença de Alzheimer (CERAJEWSKA; DAVIES; WEST, 2015) (REBECK, 2017), artrite reumatoide (BARTOLD et al., 2010) e diabetes *mellitus* tipo 2 (CHAPPLE; GENCO, 2013; CASANOVA; HUGHES; PRESHAW, 2014; JOSHIPURA et al., 2018) (**Figura 4**).

Na DP, as citocinas pró-inflamatórias produzidas localmente entram na circulação sistêmica e induzem resposta hepática aguda, principalmente pelo aumento da proteína C-reativa (PCR), fibrinogênio e da proteína amiloide A sérica (SAA), contribuindo, por sua vez, na aterosclerose e na inflamação sistêmica, que pode afetar vários órgãos. Por meio das bolsas periodontais, há translocação das bactérias presentes, incluindo a *Porphyromonas gingivalis*, detectadas em leucócitos circulantes e lesões ateroscleróticas, atuando pró-aterogênese, além de contribuir na disbiose intestinal, afetando diretamente no mecanismo de permeabilidade epitelial intestinal e da endotexemia, podendo ser precursor da inflamação sistêmica (**Figura 11**) (HAJISHENGALLIS, 2015).

**Figura 11** – Mecanismos relacionando periodontite a inflamações sistêmicas crônicas.

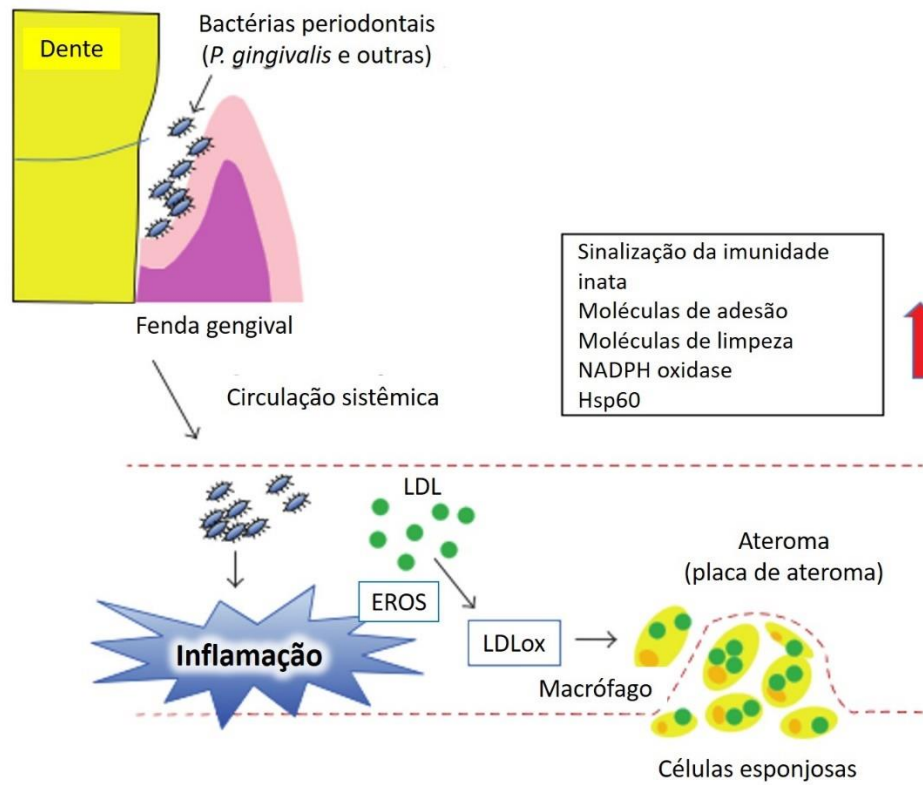


Legenda: TNF- $\alpha$  - fator de necrose tumoral  $\alpha$ ; IL – interleucina; PCR – proteína C-reativa.

Fonte: Adaptado de Hajishengallis (2015).

Especificamente para a doença aterosclerótica, a detecção de patógenos periodontais vivos em placas de ateroma, em experimentos *in vivo* em uma variedade de modelos animais corroboram que a *Porphyromonas gingivalis* pode contribuir com a aterogênese. A translocação bacteriana nos tecidos do periodonto para o sangue pode ser iniciada até por meio de procedimentos odontológicos e/ou no cuidado domiciliar com a higiene oral e, uma vez na corrente sanguínea, os antígenos podem induzir uma resposta imune sistêmica e as bactérias serem transportadas pelo sangue livremente na circulação ou agregadas em monócitos, neutrófilos ou plaquetas, podendo iniciar processos patogênicos, pela facilidade que os patógenos aderem e invadem várias células vasculares humanas (KURITA-OCHIAI; YAMAMOTO, 2014) (**Figura 12**).

**Figura 12** – Mecanismo de invasão da *Porphyromonas gingivalis* no sistema circulatório e no desenvolvimento da placa de ateroma.



Legenda: EROS – radicais livres; Hsp60 - *Heat shock protein family D*; LDLox – lipoproteína de baixa densidade oxidada.

Fonte: Adaptado de Kurita-Ochiai; Yamamoto (2014).

Tanto DP como aterosclerose são doenças complexas e tem fatores de risco comuns, como obesidade e tabagismo (FRIEDEWALD et al., 2009).

Os primeiros estudos (MATTILA et al., 1989) a correlacionarem a etiologia dessas desordens inflamatórias, associaram a disbiose oral com a presença de *P. gingivalis*, com papel fundamental na aceleração da progressão destas doenças, o que pode desencadear eventos agudos, com o infarto agudo no miocárdio (RENVERT et al., 2004; WILLERSHAUSEN et al., 2009), evidenciando a importância do tratamento da DP na prevenção de desordens cardiovasculares (BUHLIN et al., 2009; LOCKHART et al., 2012).

Os efeitos do tratamento da DP reduz a inflamação sistêmica e biomarcadores subclínicos da aterosclerose, desde a melhora da função endotelial (FRIEDEWALD et al., 2009; OFFENBACHER et al., 2009), diminuindo, assim, a progressão da aterosclerose carotídea em adultos (BUHLIN et al., 2009; DESVARIEUX et al., 2013).

Existem evidências de que a DP causada pelos patógenos de alto risco pode influenciar de forma adversa a tríade da patogênese da aterosclerose: concentração sérica de

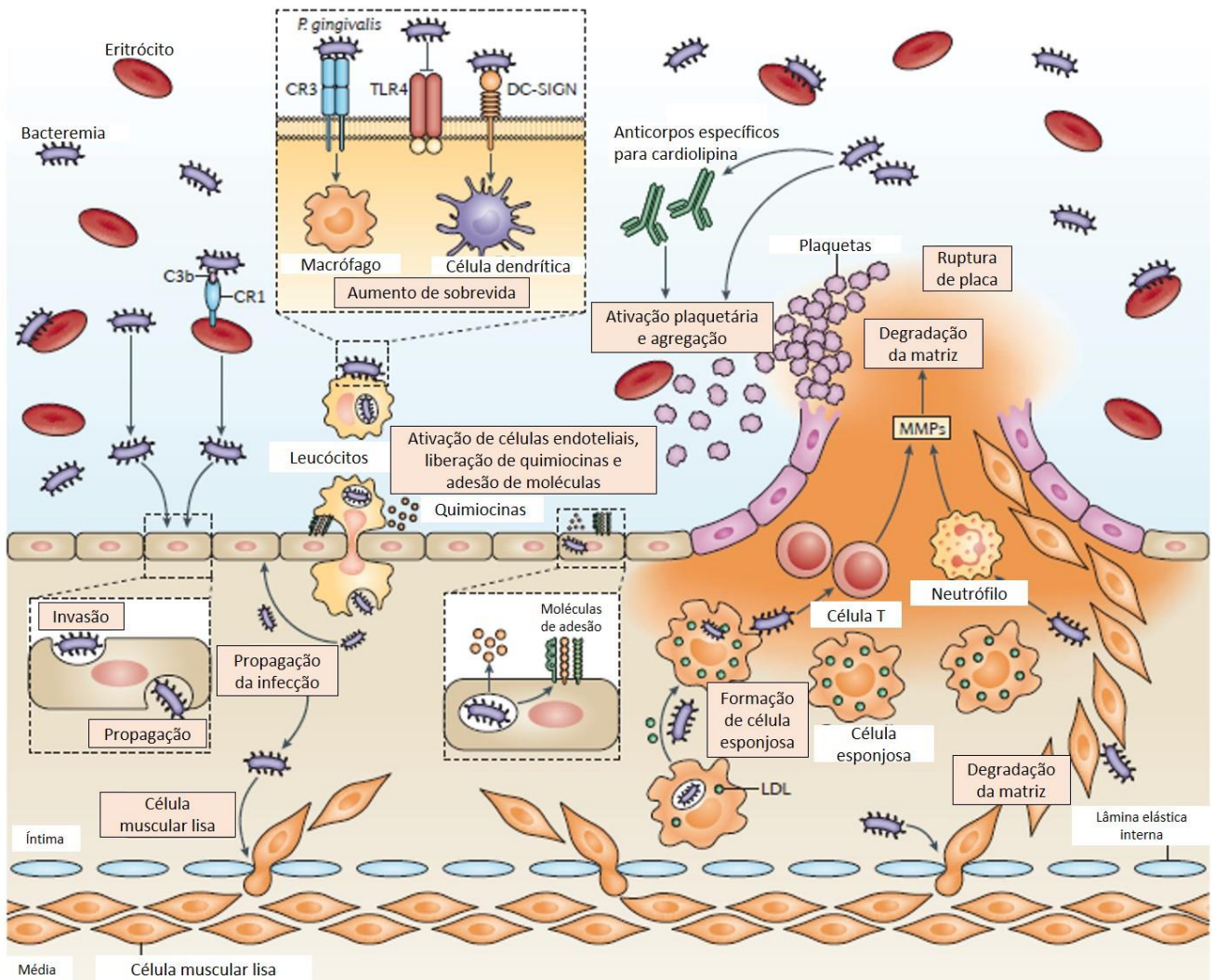
lipoproteínas, permeabilidade endotelial e ligação de lipoproteínas na íntima arterial, podendo contribuir, desta forma, para a evolução significativa da doença arterial (BALE; DONEEN; VIGERUST, 2017).

Encontrou-se correlação positiva dos marcadores moleculares de inflamação periodontal (TNF- $\alpha$  e PAI-1) com perda óssea alveolar e índice glicêmico, principalmente em casos de animais com resistência à insulina e suscetíveis a diabetes, que também apresentam aumento nas populações de *Porphyromonadaceae*, *Prevotella* e *Tannerella* na microbiota oral de camundongos, considerados patógenos periodontais. A periodontite combinada com essa alteração na microbiota oral, concomitante à dieta hiperlipídica, foi associada a gravidade de alterações cardiometabólicas (BRANCHEREAU et al., 2016).

As bactérias da microbiota oral não só invadem os tecidos da aorta pela circulação, como também ativam as células endoteliais, aumentando a expressão de moléculas de adesão celular e as quimiocinas, promovendo, assim, a transmigração de leucócitos que podem abrigar as bactérias intracelulares viáveis. Os patógenos podem favorecer a captação de lipoproteína de baixa densidade (LDL) por macrófagos transmigrados, levando a formação acelerada de células espumosas e à aterogênese, como consequência (KURITA-OCHIAI; YAMAMOTO, 2014).

A agregação plaquetária pode contribuir para a oclusão trombótica do vaso e a ruptura da placa aterosclerótica, que pode ser facilitada pela produção de metaloproteinases de matriz por linfócitos ou células mieloides induzidas por bactérias (HAJISHENGALLIS, 2015) **(Figura 13)**.

**Figura 13** – Mecanismos imunológicos desencadeados pela microbiota oral na aterogênese na aorta.



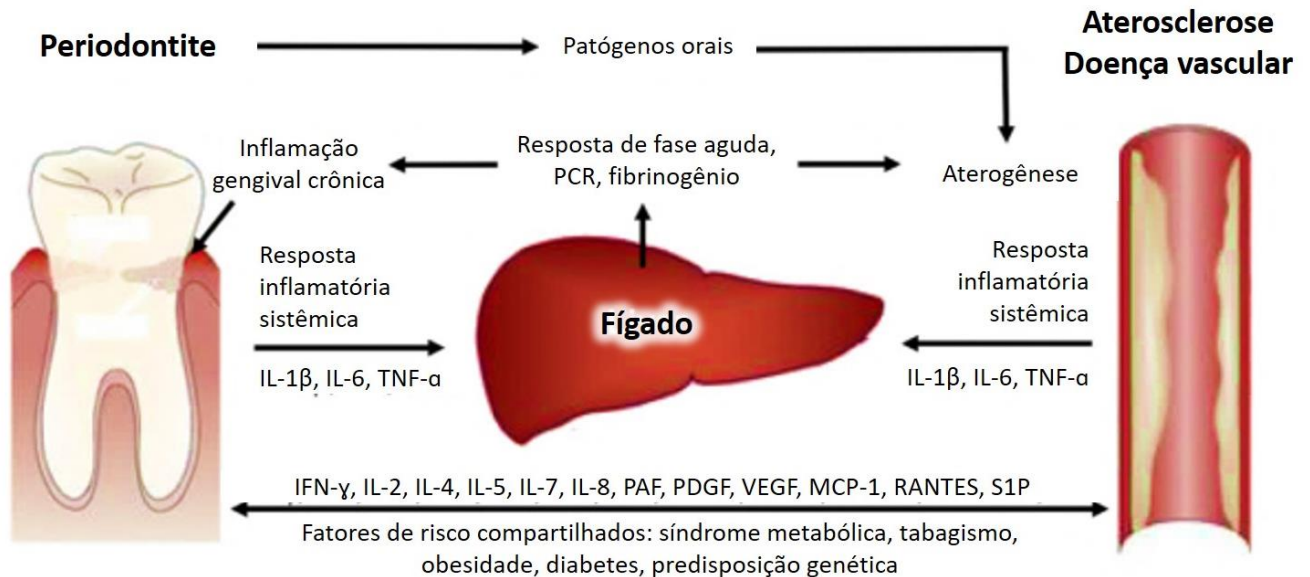
Nota: As bactérias periodontais, principalmente a *P. gingivalis*, podem se ligar ao receptor 1 do complemento C3b (CR1), facilitando sua disseminação da mucosa oral para os tecidos da aorta. As bactérias também ativam as células endoteliais, aumentando a expressão de moléculas de adesão celular e quimiocinas, o que pode promover a transmigração de leucócitos com bactérias intracelulares. A captação de LDL por macrófagos transmigraçados é aumentada, levando ao processo de formação de células espumosas e placas ateromatosas. Essas placas podem causar a oclusão do vaso (trombos) ou se romper, por meio das metaloproteinases de matriz secretadas por linfócitos.

Fonte: Adaptado de Hajishengallis (2015).

A relação da aterosclerose com a DP pode ser evidenciada pela resposta inflamatória desencadeada bidirecionalmente (**Figura 14**), pela mediação das citocinas pró-inflamatórias, bem como outras moléculas (fator ativador de plaquetas (PAF), e outros mediadores inflamatórios eicosanoides). As citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$ ) induzem a produção de proteína C-reativa (PCR) e fibrinogênio no fígado, proteínas de uma

resposta de fase aguda, inicialmente induzidas pela translocação para o sangue de patógenos orais presentes na DP, e também pode ser influenciada pelo processo inflamatório da lesão aterosclerótica, induzindo assim a formação de ateroma (AARABI et al., 2015).

**Figura 14** – Interações bidirecionais entre a doença aterosclerótica e a doença periodontal.



Fonte: Adaptado de (AARABI et al., 2015).

Por fim, a hipótese inflamatória oral da aterosclerose necessitará de estudos de coorte longitudinais em larga escala, para descobrir as relações causa-efeito e para permitir a quantificação do risco. Além disso, estudos randomizados controlados demonstrando que tratamentos antiinflamatórios para inflamações orais e a higiene bucal podem reduzir as taxas de eventos vasculares. Além disso, a importância da inflamação oral em relação a outros distúrbios associados à inflamação sistêmica deve ser investigada.

### 1.3 APOLIPOPROTEÍNA E (ApoE)

A apolipoproteína E (ApoE) é uma glicoproteína de 34 KDa sintetizada no fígado, que desempenha papel chave no catabolismo dos triglicerídeos e colesterol sérico, além de estar relacionada a diferentes condições inflamatórias (AZEVEDO et al., 2012; AZEVEDO et al., 2014). O polimorfismo da ApoE está entre os mais estudados em relação ao seu impacto nos níveis de lipoproteínas plasmáticas na população (BERGDAHL et al., 2008).

A ApoE foi descoberta em 1970, com 299 aminoácidos na sua composição, é sintetizada principalmente pelo fígado e levada para o plasma sanguíneo, sendo componente

importante de todas as lipoproteínas, exceto a LDL, e está envolvida na redistribuição de triglicerídeos e colesterol em diversos tecidos corporais (MAHLEY, 2016).

A ApoE é uma proteína plasmática abundante e desempenha um papel importante no metabolismo lipídico e medeia a captação de lipoproteínas através da interação ligante-receptor com os receptores de LDL (BENNET et al., 2007), interagindo diretamente com os receptores de LDL e a molécula LDL, lipase lipoproteica e outras apolipoproteínas (MEDH et al., 2000). A ApoE está associada principalmente às partículas de VLDL ricas em triglicerídeos para mediar o suprimento lipídico extra-hepático e com partículas de HDL, no transporte reverso de colesterol. Estes processos envolvem a ligação de ApoE a receptores de membrana específicos incluindo membros da família de receptores de LDL (HUEBBE; RIMBACH, 2017).

Os três alelos mais comuns da ApoE são os *epsilons*  $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$  e  $\epsilon 4$ , que diferem por meio de mutações nos códons, resultando em um resíduo de cisteína ou arginina nas posições 112 e 158 da molécula, sendo que o alelo E2 codifica o aminoácido cisteína nas duas posições, o E3 codifica na posição 112 a cisteína e na posição 158 a arginina, enquanto que o E4 codifica em ambas posições o aminoácido arginina (E2 = cys-112, cys-158; E3 = cys-112, arg-158; E4 = arg-112, arg-158 (HUEBBE; RIMBACH, 2017) (Quadro 1). Para descrever o gene, utiliza-se letras maiúsculas na escrita (*APOE*), enquanto ao se referir a estrutura da apolipoproteína, recomenda-se escrever *ApoE*.

**Quadro 1** - Aminoácidos presentes nas posições 112 e 158 da molécula de ApoE, codificados pelos alelos do gene polimórfico.

	$\epsilon 2$	$\epsilon 3$	$\epsilon 4$
<b>Posição 112</b>	Cisteína	Cisteína	Arginina
<b>Posição 158</b>	Cisteína	Arginina	Arginina

Fonte: própria.

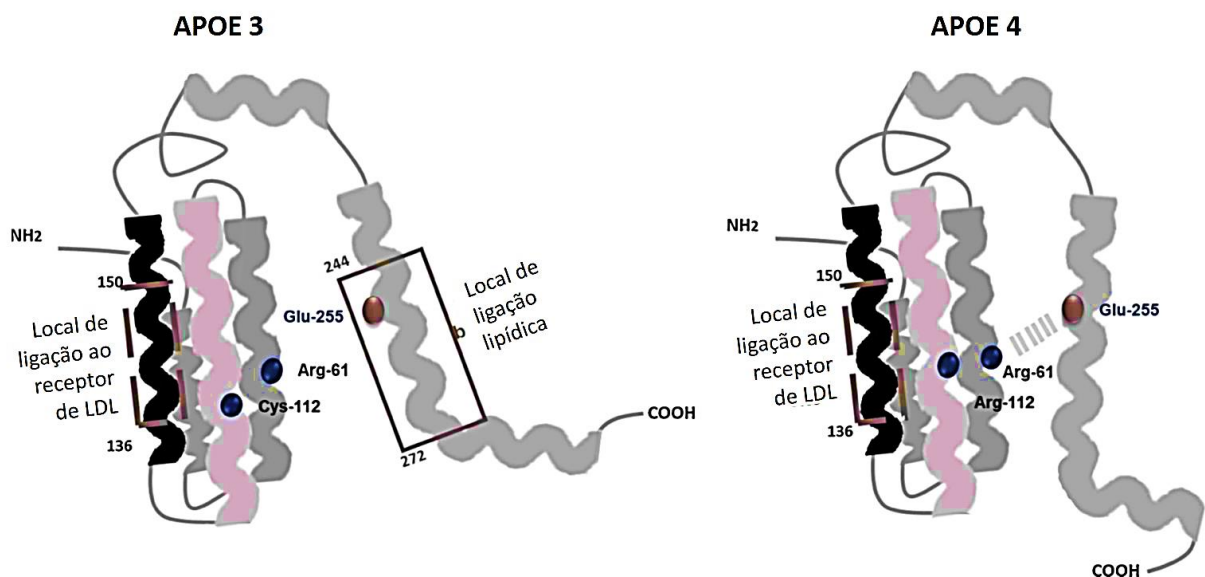
O alelo mais frequente é o E3, presente na maioria das populações. Enquanto o alelo E2 é o mais raro, com prevalências ainda menores quando se apresentando com o genótipo E2/E2, em boa parte das populações estudadas (ANGULO et al., 2015)

Com as mutações, há alterações nas isoformas da ApoE, dependente dos aminoácidos codificados nas posições e, conseqüente, alelos encontrados, que podem influenciar diretamente o metabolismo lipídico, principalmente no receptor de LDL ou com o proteoglicano de sulfato de heparano, que são importantes para o metabolismo do colesterol.



Essas interações afetam os níveis lipídicos, sendo o alelo E4 mais associado ao aumento do colesterol total (em vez da E3 e E2) e aumentando o risco de doenças cardiovasculares, enquanto o E2 tem menor afinidade de ligação ao receptor do LDL, sendo considerado em muitos estudos como o alelo protetor. Um esquema de isoformas da ApoE está ilustrado na **figura 15**, que mostra afinidades das ligações em relação à expressão de cisteína ou arginina nas posições 112 e 158.

**Figura 15.** Desenho esquemático das moléculas de E3 e E4.



Nota: A diferença entre estas moléculas é a presença de um resíduo de arginina (Arg) na posição 112 na ApoE4 (Arg-112, Arg-158), enquanto a ApoE3 tem uma cisteína (Cys) nesta posição (Cys-112, Arg-158). Observe o domínio de interação onde ocorre uma ponte salina entre Arg-61 e glutamato-255 na ApoE4, mas não na ApoE3 (nem na ApoE2, não mostrada nesta figura). Essa interação é responsável por uma maior afinidade pelas lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) para E4 em vez da afinidade aumentada para lipoproteínas de alta densidade (HDL) que é observada para E3 e E2.

Fonte: Adaptado de Pereira et al. (2019).

Existem relações aproximadamente lineares de genótipos da ApoE com níveis de LDL e risco coronariano. Comparado com indivíduos  $\epsilon 3/\epsilon 3$ , os portadores de  $\epsilon 2$  tem 20% de risco reduzido de doença coronariana, enquanto que os portadores de  $\epsilon 4$  apenas um risco ligeiramente aumentado (BENNET et al., 2007).

Muitas dessas variantes genéticas, incluindo a Apolipoproteína E (ApoE) (PEREIRA et al., 2019), resultam em um risco duplo ou maior de doença arterial coronariana (DAC), infarto do miocárdio (VÉGH et al., 2012) e doença de Alzheimer (REBECK, 2017; LÖWE; GASER; FRANKE, 2016). Os polimorfismos da ApoE estão entre os mais estudados em relação ao seu impacto nos níveis de lipoproteínas plasmáticas na população

(BERGDAHL et al., 2008), interagindo diretamente com LDL e receptores LDL, lipase lipoproteína e outras apolipoproteínas (MEDH et al., 2000).

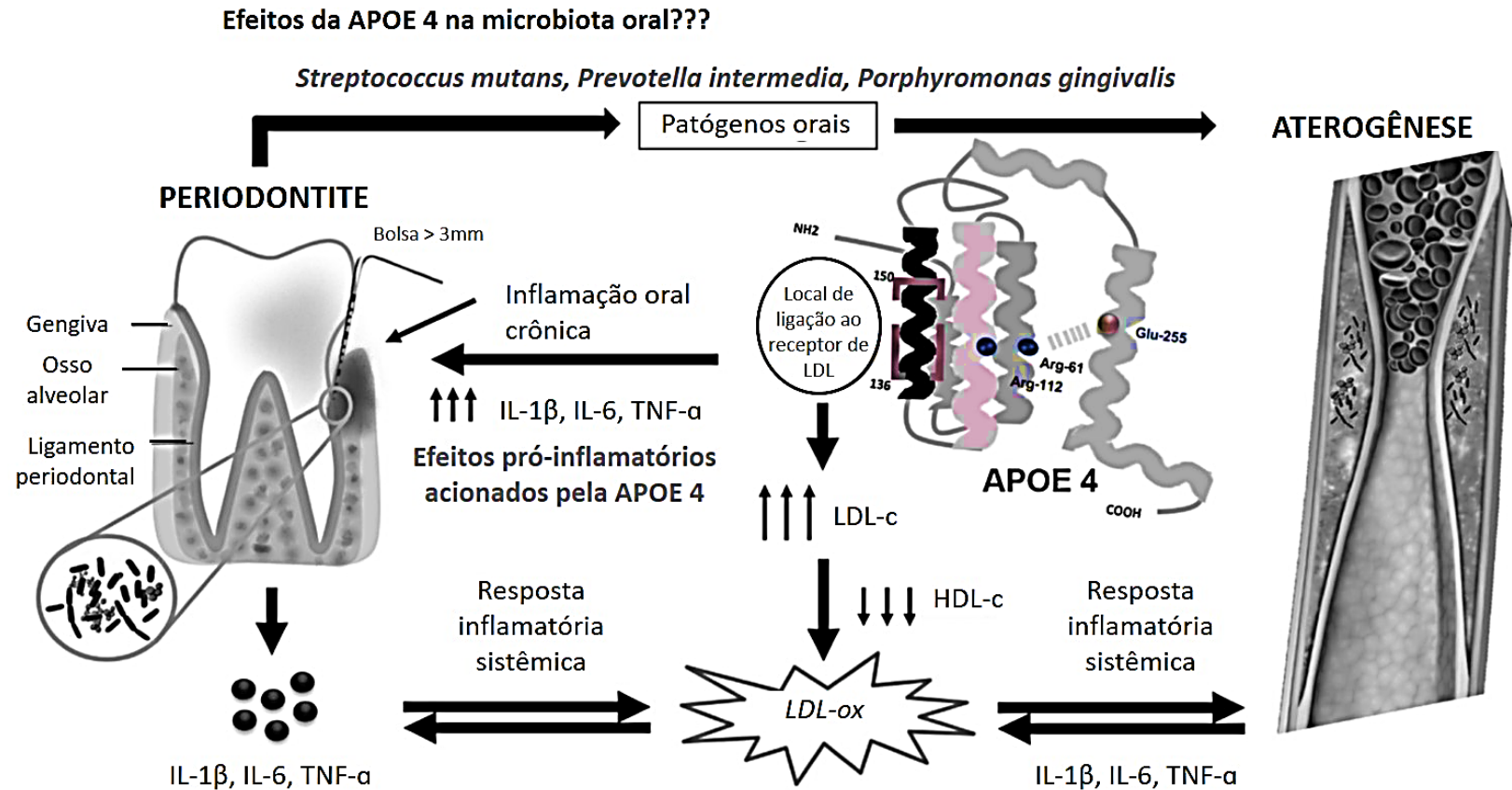
Em uma meta-análise, encontrou-se associação entre o alelo E4 com aumento do risco de doença arterial coronariana (DAC), na população chinesa, na qual incluíram 4.564 casos de DAC e 3.985 controles (YIN et al., 2013).

O alelo E4, encontrado em aproximadamente 14% da população, está associado com risco aumentado para uma variedade de doenças cardiovasculares, que inclui a doença cerebrovascular isquêmica e aterosclerose, devido à inflamação sistêmica, pelos valores de proteína C reativa (PCR) aumentados em portadores de E4 (THIFFAULT et al., 2013). A maioria dos estudos que associa a genotipagem da ApoE e o risco de aterosclerose em pacientes com doenças periodontais é feita em populações idosas ( $\geq 65$  anos) quando a placa de ateroma é provavelmente mais grave, o que é incomum. Este estudo aborda casos adultos de meia-idade (35-55 anos de idade) com periodontite crônica e controles, quando as mudanças pré-ateroscleróticas estão iniciando, podendo se caracterizar como aterosclerose subclínica.

Mesmo que na literatura seja consenso a relação da E4 com a doença cardiovascular, principalmente a aterosclerose, e alterações metabólicas (ARRIFANO et al., 2018b) desencadeada por diversos fatores induzindo a adesão de LDL na camada mediointimal de artérias, a existência de um fator de risco para o acidente vascular cerebral em decorrência deste processo ainda é controverso (TANG et al., 2018).

As alterações subclínicas para o desenvolvimento de aterosclerose e/ou alterações ateroscleróticas, com o aumento da espessura da camada mediointimal (DOLINER et al., 2018, ZHANG et al., 2013), pode ter associação com doença periodontal por causa de potenciais interações com a APOE4 (PEREIRA et al., 2019), permeado pela associação dos fatores genéticos, nutricionais, bioquímicos e ambientais associados às doenças inflamatórias cardiovasculares e periodontais (**Figura 16**).

**Figura 16** – Modelo para potenciais interações entre ApoE4, doença periodontal e aterosclerose.



Nota: A APOE4 está associada a níveis aumentados de circulação do colesterol, lipoproteína de baixa densidade (LDL) e citocinas pró-inflamatórias. O aumento dos níveis de LDL na circulação sistêmica pode favorecer a oxidação de LDL, gerando LDL-ox, que é conhecido por ativar células endoteliais e respostas inflamatórias vasculares, que podem culminar em recrutamento e diferenciação de monócitos em macrófagos e, potencialmente, aterogênese. Esse processo pode ser acelerado por uma doença inflamatória crônica coexistente, como a DP, e pode ser associado a outras comorbidades e fatores de risco, como o estilo de vida ocidental. A ApoE4 pode ter uma influência chave na microbiota oral (embora este efeito permaneça inexplorado na literatura). A periodontite também pode favorecer a aterogênese, através da translocação de patógenos orais para a placa aterogênica e um aumento adicional na resposta inflamatória sistêmica.

Fonte: Adaptado de Pereira et al. (2019).

O potencial achado de lesão precoce pré-aterosclerótica em pacientes com doença periodontal pode ajudar profissionais de saúde em países em desenvolvimento com alta endemia a procurar intervenção de baixo custo antes da hospitalização e cirurgia, além de reduzir o risco de morte relacionada ao acidente vascular cerebral e incapacidades decorrentes desta enfermidade.

Essa lacuna no conhecimento é consequência da ausência ou escassez de estudos de coortes de longo prazo, além de estudos clínicos de determinação dos polimorfismos da ApoE, especialmente em países em desenvolvimento, como o Brasil, e ainda mais, em regiões menos desenvolvidas, como o Nordeste brasileiro (PEREIRA et al., 2019). São nessas regiões, em que os habitantes carecem de condições melhores de saúde, geral e odontológica, não são encontrados estudos e benefícios para se evitar os processos inflamatórios iniciados na cavidade oral (BLASCO-BAQUE et al., 2016). Sendo assim, os benefícios de se identificar essa interação podem ser determinantes para ações de promoção e prevenção de doenças, reduzindo ou controlando o aumento da incidência do desenvolvimento das doenças e suas comorbidades, com a mortalidade por evento cardiovascular agudo (acidente vascular encefálico ou infarto agudo do miocárdio).



## **2.1. OBJETIVO GERAL**

- Correlacionar os polimorfismos da apolipoproteína E (APOE) com fatores de risco cardiovascular e aterosclerose subclínica, em pacientes com doença periodontal e controles no Ceará.

## **2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Identificar o perfil sociodemográfico da população total, nos casos com doença periodontal e nos controles (sem doença periodontal);
- Identificar a distribuição genotípica e alélica da APOE na população total, em pacientes com doença periodontal e nos controles;
- Avaliar alterações ultrassonográficas do espessamento da camada mediointimal das carótidas comum direita e esquerda (como marcador para aterosclerose subclínica), assim como presença ou não de placa aterosclerótica na população total, nos casos com doença periodontal e nos controles;
- Associar os parâmetros da doença periodontal, histórico clínico e práticas de saúde bucal na população estudada com os fatores cardiovasculares, aterosclerose subclínica e polimorfismos da APOE;
- Identificar fatores de risco para desenvolvimento de doenças cardiovasculares e metabólicas, segundo avaliação antropométrica, laboratorial e bioquímica, e sua correlação com achados ultrassonográficos das carótidas comum na população total, nos casos com doença periodontal e nos controles;
- Correlacionar as alterações ultrassonográficas com os fatores de risco sociodemográficos, odontológicos, antropométricos e laboratoriais na população total, em paciente com doença periodontal e controles, e após estratificação de acordo com a presença ou não do alelo E4 ou do E2 da APOE.



### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. DELINEAMENTO DO ESTUDO

Trata-se de estudo transversal, caso controle, realizado com pacientes adultos atendidos nos Centros de Especialidades Odontológicas (CEOs) por periodontistas, responsáveis pelo processo de avaliação odontológica dos pacientes com doença periodontal, no período de setembro de 2014 a janeiro de 2018.

#### 3.2. POPULAÇÃO E AMOSTRA DO ESTUDO

Foram recrutados para o estudo 239 pacientes adultos atendidos em três CEOs da cidade de Fortaleza – Ceará, localizados nos bairros Rodolfo Teófilo, Joaquim Távora e Floresta.

Os Centros de Especialidades Odontológicas, conhecidos CEOs, são unidades de referência para as Equipes de Saúde Bucal (ESB), implantados com a estruturação das Redes de Atenção à Saúde Bucal do Ceará, prevendo a prestação de serviços de saúde bucal com foco na integralidade, qualidade da atenção e na referência às demandas especializadas.

São ofertados serviços complementares odontológicos nas diversas especialidades, como prótese dentária, periodontia, odontopediatria, cirurgia bucomaxilofacial, estomatologia, atendimento à paciente com necessidades especiais, emergência 24 horas, entre outros, por meio de encaminhamento realizado pelos cirurgiões-dentistas das ESB dos postos de saúde.

Os grupos de pacientes recrutados voluntária e aleatoriamente foram divididos da seguinte forma:

✓ **Grupo caso (com doença periodontal):** pacientes com doença periodontal (DP) detectável, por meio do *Periodontal Screening and Recording* (PSR), com diagnóstico de doença periodontal crônica (periodontite crônica) quando apresentarem, pelo menos, três dentes em dois ou mais sextantes, com profundidade de sondagem maior ou igual a 3 mm, segundo Highfield (2009).

✓ **Grupo controle (sem doença periodontal):** sujeitos que não apresentavam sinais de DP determinada pela ausência de perda de adesão, suscetibilidade à mobilidade dentária, e sem pontos de profundidade de sondagem maior que três milímetros, que foram atendidos nos CEOs para outras especialidades, como revisão e/ou limpeza dentária.

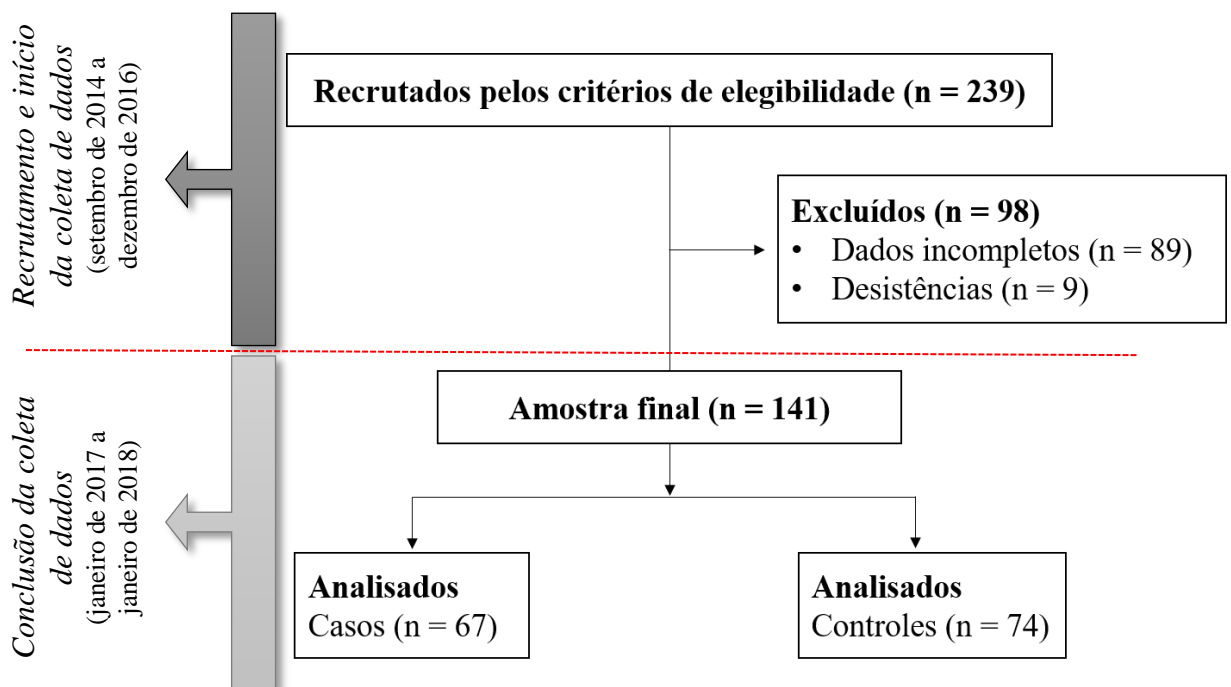


Os critérios de inclusão foram respeitados no momento do recrutamento e da anamnese clínica inicial do paciente, englobando pacientes entre 35 e 55 anos de idade; não fumantes; sem diagnóstico de doença periodontal crônica, para grupo controle; e com diagnóstico de doença periodontal crônica, que apresentarem pelo menos três dentes em dois ou mais sextantes, com profundidade de sondagem maior ou igual a 3 mm, para o grupo caso.

Na amostra, foram incluídos todos os pacientes que satisfizeram as condições anteriormente citadas e que completaram todos os exames, apresentando, desta forma, todos os dados necessários das variáveis estudadas.

Foram considerados inelegíveis para compor a amostra estudada os pacientes que não conseguiram concluir todos os exames realizados, se recusaram a permanecer na pesquisa, que tinham conhecimento prévio de alguma doença sistêmica, fumantes, mulheres grávidas ou amamentando, pacientes imunossuprimidos ou com desordens pépticas ou esofágicas, em tratamento concomitante com drogas antimicrobianas, anti-inflamatórias não esteroidais (AINEs), glicocorticoides ou antibióticos três meses antes ou durante o período de coleta de dados do sujeito. Desta forma, a amostra final foi de 141 pacientes, sendo 74 controles e 67 casos (com doença periodontal) (**Figura 17**).

**Figura 17** – Fluxograma de recrutamento e da coleta de dados deste estudo.



Nota: Dados incompletos: ausência de algum dado antropométrico, laboratorial, ultrassonográfico e/ou ausência de amostra de células bucais; que impediram as análises dos dados.

Fonte: própria.

### 3.3. COLETA E ANÁLISE DE DADOS

Os dados foram obtidos por meio de entrevistas realizadas por equipes previamente treinadas para realizá-las, e registrados em questionários específicos, elaborados pela coordenação do projeto, que, juntamente com o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), estão descritos a seguir no **Quadro 2**:

**Quadro 2** - Formulários e documentos utilizados neste estudo.

<b>Formulários e documentos</b>	<b>Conteúdos</b>
TCLE (Anexo 1)	Termo de consentimento livre e esclarecido
Questionário Odontológico (Anexo 2)	Histórico odontológico, recursos de higiene bucal, exame periodontal simplificado (PSR), plano de tratamento e procedimentos executados
Ficha de Avaliação Nutricional (Anexo 3)	Dados pessoais, histórico clínico (funcionamento do intestino, sono, diurese, alergias, cirurgias, medicamentos, tabagismo, etilismo, bebida alcoólica) e avaliação antropométrica (peso atual, altura e circunferências corporais)
Questionário Sociodemográfico (Anexo 4)	Identificação e dados socioeconômicos

Fonte: própria.

Os pacientes voluntários foram submetidos às seguintes etapas de coleta de dados, recrutados no menor tempo possível para realização dos exames, evitando, assim, qualquer tipo de alteração ocasionada pelo período entre as avaliações:

#### 3.3.1. Anamnese

##### 3.3.1.1. Avaliação sociodemográfica

Cada paciente, após assinado o termo de consentimento livre e esclarecido de participação, respondeu ao entrevistador previamente treinado o questionário sociodemográfico (Anexo 4), incluindo dados pessoais (nome completo, telefone, data de nascimento, idade, procedência, endereço atual, estado civil, ocupação, escolaridade, renda familiar, quantidade de

peessoas que residiam na mesma casa e quantas contribuíaam para o sustento da família, tempo no domicílio, hábitos como tabagismo e etilismo; e se o próprio entrevistado tinha diagnóstico de hipertensão arterial sistêmica (HAS) ou diabetes mellitus tipo 2 (DM2) ou antecedentes familiares para essas doenças). Este questionário foi preenchido na ocasião do primeiro contato, ou seja, no recrutamento dos pacientes pela equipe de pesquisadores nos CEOs, em sala reservada e exclusiva para a pesquisa.

### ***3.3.1.2. Avaliação nutricional***

Ainda no momento inicial, os sujeitos da pesquisa foram submetidos à avaliação nutricional, com preenchimento de dados na ficha de avaliação (Anexo 3), novamente com dados pessoais, histórico clínico (funcionamento do intestino, diurese, horas de sono por dia, presença de alergias, cirurgias prévias, uso de medicamentos e se tinha conhecimento de alguma patologia pré-existente, além da avaliação antropométrica, com aferição do peso, altura e circunferências corporais).

Para aferição de medidas antropométricas, foram utilizados os seguintes equipamentos calibrados:

- Peso - utilizou-se balança portátil digital, tipo plataforma, com capacidade de até 150kg (Balmak, BK50F, São Paulo, SP, Brasil);
- Altura - estadiômetro clínico portátil Caprice, de alumínio, com capacidade de medição de 115 a 210 cm (Caprice Sanny, American Medical do Brasil, São Paulo, SP); e
- Circunferências do braço, cintura e quadril – trena antropométrica inelástica sem trava, com extensão de até 200 cm, sem trava (Sanny, American Medical do Brasil, São Paulo, SP).

O estado nutricional foi classificado para a população adulta de acordo com o Índice de Massa Corporal (IMC), calculado através da divisão do peso, em kg, pela altura, em metros, elevada ao quadrado ( $\text{kg}/\text{m}^2$ ), sendo o cálculo mais usado para estimativa da adiposidade corporal.

Proposta pela *World Health Organization (WHO)* (WHO, 2000), a classificação também considera que o IMC prediz a adiposidade e, conseqüentemente, as doenças a ela associadas, ou seja, a OMS destaca o excesso de peso corporal como preditor de risco para doenças crônicas (**Quadro 3**).

**Quadro 3** - Classificação do estado nutricional de adultos, segundo valores de IMC, propostos pela OMS, e risco para desenvolver doenças crônicas.

Valores de IMC (em kg/m <sup>2</sup> )	Classificação do estado nutricional	Risco para doenças crônicas
< 18,5	Baixo peso	Baixo risco
18,5 a 24,9	Eutrofia	Sem risco
25,0 a 29,9	Pré-obesidade / Sobrepeso	Risco aumentado
30,0 a 34,9	Obesidade grau I	Moderado
35,0 a 39,9	Obesidade grau II	Grave
≥ 40,0	Obesidade grau III	Muito grave

Fonte: Adaptada de WHO (2000).

Foram consideradas quatro categorias de estado nutricional: baixo peso (< 18,5 kg/m<sup>2</sup>); eutrofia (18,5 a 24,9 kg/m<sup>2</sup>); sobrepeso (25,0 a 29,9 kg/m<sup>2</sup>) e obesidade (≥ 30,0 kg/m<sup>2</sup>), na qual foram agrupados todos os graus de obesidade em um único grupo, considerando que a partir desta classificação, o risco já é moderado/grave para doenças crônicas (**Quadro 2**).

Para avaliação da distribuição de gordura corporal ou visceral, foram analisados os valores de circunferência da cintura (CC), que foi medida com fita inelástica na horizontal. O indivíduo permanece em pé, com roupas leves, e a aferição foi tomada no final da expiração, no ponto médio entre o ponto mais baixo do rebordo costal e o ponto mais alto da crista ilíaca superior, ponto anatômico no protocolo de Lohman et al. (1988), adotado também pela WHO (WHO, 2000), classificando os pontos de corte de CC como preditor de risco para doenças cardiovasculares e metabólicas no adulto (**Quadro 4**).

**Quadro 4** - Classificação da circunferência da cintura (CC) de acordo com o risco metabólico por sexo.

Sexo	Risco elevado	Risco muito elevado
Masculino	≥ 94 cm	≥ 102 cm
Feminino	≥ 80 cm	≥ 88 cm

Fonte: Adaptada de WHO (2000).

A relação cintura quadril (RCQ) expressa o risco de doenças cardiovasculares em indivíduos obesos, sendo uma avaliação para estimar obesidade visceral, sendo calculada pela

divisão da circunferência da cintura pela do quadril, aferida na WHO (WHO, 2000) (**Quadro 5**).

**Quadro 5** - Classificação da relação cintura-quadril (RCQ) de acordo com o risco para doenças cardiovasculares.

Sexo	Alto risco
Masculino	$\geq 1,0$
Feminino	$\geq 0,85$

Fonte: Adaptada de WHO (2000).

Calculou-se o índice de conicidade (IC) e o índice de adiposidade corporal (IAC), dois parâmetros recentemente relacionados à avaliação da distribuição de gordura corporal na obesidade.

O IC tem sido estudado em diversos estudos com o intuito de avaliar sua possível relação com variáveis consideradas de risco para desenvolvimento de doenças cardiovasculares, tendo em vista que representa um bom indicador para obesidade central (MOTAMED; PERUMAL; FHEA, 2015). Utiliza os valores de circunferência da cintura (em m), peso (em kg) e altura (em m), conforme a equação matemática abaixo:

$$\text{Índice de Conicidade (IC)} = \frac{\text{Circunferência da cintura (m)}}{0,109 \sqrt{\frac{\text{Peso corporal (kg)}}{\text{Altura (m)}}}}$$

São valores de risco para homens  $IC \geq 1,25$ , independentemente da idade, e para mulheres menores de 50 anos,  $IC \geq 1,18$ , e para aquelas com 50 anos ou mais,  $IC \geq 1,22$ .

O IAC foi proposto e validado para a população, e reflete o percentual de gordura corporal em homens e mulheres adultos em diferentes etnias, sem necessitar de correções nos valores para os sexos, sendo bastante fácil de se obter por utilizar os valores de circunferência do quadril (em cm) e da altura (em m), de acordo com a fórmula descrita abaixo, com classificação do nível de adiposidade corporal (BERGMAN et al., 2011) (**Quadro 6**):

$$\text{IAC (\% Gordura corporal)} = \frac{\text{Circunferência do quadril (cm)}}{\text{Altura (m)} \times \sqrt{\text{Altura (m)}}} - 18$$

**Quadro 6** - Classificação dos valores de IAC (%) de acordo com a adiposidade corporal.

Sexo	Adiposidade normal (%)	Sobrepeso (%)	Obesidade (%)
Masculino	8 a 20	21 a 25	Acima de 25
Feminino	21 a 32	33 a 38	Acima de 38

Fonte: Adaptada de Bergman et al. (2011).

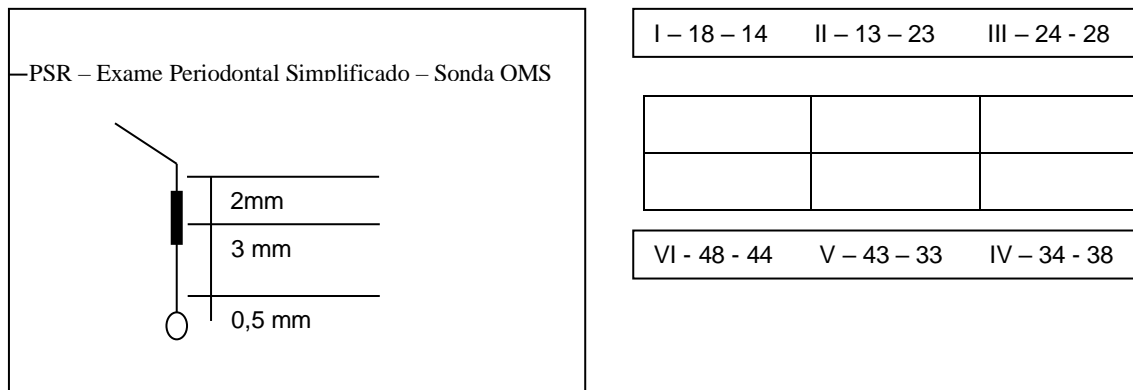
### 3.3.1.3. Exame clínico odontológico

Os sujeitos da pesquisa foram avaliados por dois cirurgiões-dentistas periodontistas experientes e colaboradores dos CEOs, previamente orientados quanto à padronização do instrumento de avaliação, por meio de uma sonda periodontal (sonda 621 OMS) e um espelho clínico plano, sendo realizada nas dependências dos CEOs.

O exame clínico estabeleceu o diagnóstico de presença ou ausência de doença periodontal por meio dos seguintes parâmetros, segundo Highfield (2009):

- *Profundidade clínica de sondagem* → distância da margem gengival ao fundo da bolsa periodontal, medida em milímetros através de uma sonda periodontal milimetrada em seis pontos para cada dente (regiões méso-vestibular, vestibular, disto-vestibular, méso-lingual, lingual e disto-lingual).
- *Sangramento gengival* → durante a sondagem foi registrada a ausência ou presença de sangramento.
- *Nível de inserção clínica* → distância em milímetros da junção cimento-esmalte ao fundo da bolsa ou sulco gengival.
- *Mobilidade dentária* → a perda contínua dos tecidos de suporte do dente pode resultar em um aumento da mobilidade dentária, que foi ser classificada em três graus diferentes, a saber: grau 1 (mobilidade da coroa do dente de 0,2 - 1 mm no sentido horizontal); grau 2 (mobilidade da coroa dentária excedendo 1 mm no sentido horizontal); e grau 3 (mobilidade da coroa do dente nos sentidos vertical e horizontal).

O exame *Periodontal Screening and Recording* (PSR), nos sextantes, foi realizado para verificar a profundidade de sondagem e características de alterações da estrutura do periodonto nos sextantes da cavidade oral dos pacientes (**Figura 18**).

**Figura 18 - Exame Periodontal Simplificado – PSR (Registro do PSR nos Sextantes)**

Fonte: própria.

Este método foi desenvolvido pela Academia Americana de Periodontologia (AAP) junto à Associação Dental Americana (ADA), em 1992, e é considerado um método simples e de fácil aplicação para a detecção precoce da doença periodontal, confiável e reprodutível na triagem de pacientes, com classificação específica de acordo com a profundidade de sondagem (**Quadro 7**) (LANDRY; JEAN, 2002).

**Quadro 7 – Definições dos códigos do *Periodontal Screening and Recording* (PSR).**

Código	Características encontradas
0	ausência de sangramento e fatores retentivos e faixa escura da sonda totalmente visível
1	presença de sangramento à sondagem/ ausência de fatores retentivos/ faixa escura da sonda totalmente visível
2	presença de fatores retentivos de placa (cálculo, restaurações com falhas marginais, cáries)/ faixa escura totalmente visível
3	faixa escura da sonda parcialmente visível – 4 a 5 mm de profundidade de sondagem
4	faixa escura da sonda não mais visível – 6 mm ou mais de profundidade de sondagem
*	indica presença de recessão gengival maior que 3 mm/ mobilidade dental/ envolvimento de furca/ problemas mucogengivais
Obs: Anotar o * juntamente com o código atribuído a cada sextante.	

Fonte: Adaptado de Landry; Jean (2002).

#### ***3.3.1.4. Exames laboratoriais e bioquímicos***

Os pacientes recrutados foram submetidos à coleta de sangue para avaliação laboratorial e bioquímica de sangue e soro coletados.

Em dia previamente marcado, os pacientes foram orientados a permanecer em jejum por 12 horas, para evitar qualquer tipo de alteração dos resultados.

A coleta de sangue foi realizada por profissional treinado e experiente para a realização da mesma (técnico de enfermagem), participando de todas as coletas, realizadas na Unidade de Pesquisa Clínica (UPC) vinculado ao complexo hospitalar da Universidade Federal do Ceará (UFC).

O protocolo de coleta foi o seguinte: colocou-se um garrote no braço para identificação da veia, seguindo de assepsia do local com algodão e álcool a 70%. Após inserção da seringa, o garrote foi retirado e foram coletados cinco mililitros em duplicada, para análises. O paciente foi orientado a pressionar com algodão a área puncionada, mantendo o braço estendido, enquanto o descarte da seringa era realizado pelo técnico, em local apropriado para descarte de agulhas e material biológico.

As amostras foram coletadas, identificadas e imediatamente acondicionadas em depósito com temperatura resfriada, sem contato com gelo, e transportadas para o Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas (LACT), vinculado à Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem (FFOE) da UFC, para análise de hemograma completo, glicemia de jejum, colesterol total e frações, ureia, creatinina, transaminase oxalacética (TGO) e pirúvica (TGP), proteínas totais e frações e proteína C reativa (PCR) ultrasensível.

No quadro abaixo, seguem os valores de referências considerados na avaliação bioquímica dos sujeitos da pesquisa (**Quadro 8**):



**Quadro 8** - Valores de referências para os parâmetros bioquímicos analisados.

Parâmetros	Valores de referências	Unidades
<i>Eritrograma</i>		
Hemácias	4,3 a 5,9	milhões/mm <sup>3</sup>
Hemoglobina	13,7 a 17,7	g/dL
Hematócrito	41,0 a 54,0	%
VCM	80,0 a 99,0	fL
HCM	27,0 a 32,0	pg
CHCM	32,0 a 36,0	g/dL
RDW	11,8 a 15,6	%
<i>Leucograma</i>		
Neutrófilos	1.600 a 8.000	/mm <sup>3</sup>
Eosinófilos	40 a 600	/mm <sup>3</sup>
Linfócitos	800 a 4.000	/mm <sup>3</sup>
Monócitos	80 a 1.000	/mm <sup>3</sup>
<i>Plaquetograma</i>		
Plaquetas	140.000 a 450.000	/mm <sup>3</sup>
Glicemia em jejum	60 a 99	mg/dL
<i>Colesterol total e frações</i>		
Colesterol total	Desejável: < 200 Limítrofe: 200 a 240 Aumentado: > 240	mg/dL
HDL	Desejável: ≥ 35 Ótimo: ≥ 60	mg/dL
LDL*	Desejável: inferior a 130 Limítrofe: 130 a 159 Elevado: acima de 160	mg/dL
VLDL*	Abaixo de 30	mg/dL
Triglicerídeos	Ótimo: < 150 Limítrofe: 150 a 200 Alto: 201 a 499 Muito alto: ≥ 500	mg/dL
<i>Marcadores nitrogenados</i>		
Ureia	15 a 40	mg/dL
Creatinina	0,40 a 1,30	mg/dL
PCR ultrasensível**	Risco baixo: inferior a 1,0 Risco médio; 1,0 a 3,0 Risco alto: superior a 3,0	mg/L

Legenda: VCM – volume corpuscular médio; HCM – hemoglobina corpuscular média; CHCM – concentração de hemoglobina corpuscular média; RDW – *Red Cell Distribution Width*; HDL – *High-density lipoprotein*; LDL – *Low-density lipoprotein*; VLDL – *Very low-density lipoprotein*; PCR – proteína C reativa. Nota: \*calculado pela equação de Friedwald. \*\*Classificação para avaliação do risco de doença cardiovascular, considerado risco > 1,0 mg/L, para as análises. Valores referidos pelo LACT.

Os índices de Castelli 1 e 2, que estimam o comportamento de risco para doença aterosclerótica, foram calculados de acordo com Millán et al. (2009), enquanto o índice aterogênico plasmático (IAP) segundo Dobiášová e Frohlich (2001), com as fórmulas e classificados de acordo com os valores de referências abaixo (**Quadro 9**):

**Quadro 9** - Fórmulas e valores de referências dos índices de estimativa de risco aterosclerótico.

Índices	Fórmulas	Valores de referências normais
Castelli 1	colesterol total/HDL	Homens: até 4,9   Mulheres: até 4,3
Castelli 2	LDL/HDL	Homens: até 3,3   Mulheres: até 2,9
Índice aterogênico plasmático (IAP)	log (TG/HDL)	Baixo risco: < 0,11 Risco: 0,11 a 0,21 Risco aumentado: > 0,21

Legenda: HDL – *High-density lipoprotein*; LDL – *Low-density lipoprotein*; IAP – Índice Aterogênico Plasmático.

Fonte: Millán et al. (2009); Dobiášová e Frohlich (2001).

### 3.3.1.5. Avaliação ultrassonográfica

Foi utilizado para o exame de ultrassom com doppler colorido por sonda apropriada para vasos cervicais em modo B, colorido e com capacidade para identificar velocidades de fluxo, por profissional médico cirurgião cardiovascular com qualificação para realização deste exame e previamente orientado do protocolo.

A espessura do complexo mediointimal (EMI) foi medida bilateralmente nas artérias carótidas comum, externa e interna, em cada grupo (caso e controle), de forma cega, ou seja, sem informar ao avaliador a presença ou ausência de doença periodontal. As carótidas foram visualizadas longitudinal e transversalmente com o objetivo de identificar foco de lesão aterosclerótica definida segundo grau de estenose (**Quadro 10**):

**Quadro 10** - Critérios para interpretação das imagens do ecodoppler de carótidas.

<b>Grau de estenose</b>	<b>PVSi (cm/s)</b>	<b>Índice ACI/ACC</b>	<b>VDFi (cm/s)</b>	<b>Imagem da placa</b>
Normal	< 125	< 2	<40	sem placa
< 50%	< 125	< 2	<40	EMI > 1,0 mm <50% RD
50 a 60%	125-230	2 a 4	40 - 100	Presente >50 % RD
> 70%	> 230	> 4	>100	> 50 % RD
> 90%	Baixo ou ausente	Variável	Variável	Pequeno fluxo
Oclusão	Sem fluxo	Não aplicável	Não aplicável	Ocluído a luz

Legenda: PVSi – velocidade de pico sistólico da carótida interna; ACI – artéria carótida interna; ACC – artéria carótida comum; VDFi – velocidade diastólica final da artéria carótida interna; EMI – espessura do complexo miointimal; RD – redução da luz.

Fonte: Grant et al. (2003).

A medida da EMI foi por meio da média de 10 medições de cada lado e o protocolo da avaliação bilateral das carótidas consistiu do scanner de varredura das artérias carótidas, transversalmente pelas artérias carótidas comuns, externa e interna, para detectar presença de placa ateroscleróticas e grau de estenose. Ao detectar a presença de placa aterosclerótica, o médico avaliou, longitudinalmente, passou para a descrição das características da placa, como tamanho (extensão), tipo (fibrosa, calcificada, lipídica ou mista), localização, superfície (lisa ou irregular).

A EMI foi calculada para pacientes com ausência de placas ateroscleróticas, e foi definida uma imagem da artéria carótida comum a dois centímetros da bifurcação carotídea em escaneamento longitudinal. A imagem definida foi congelada e amplificada e cinco pontos mais espessos foram analisados.

Transdutores com angulações delicadas foram utilizados para mostrar claramente as fronteiras íntima-sangue e média-adventícia, ambos perto e longe das paredes das artérias, sempre na parede posterior. Tomou-se por base a referência dos valores que se encontram abaixo de 1,0 mm, como normais; de 1,0 a 1,5mm, espessado ou aterosclerose subclínica; acima de 1,5mm, estenose ou presença de placa aterosclerótica (LORENZ et al., 2006).

Em cada imagem, as fronteiras visualizadas íntima-sangue e média-adventícia foram marcadas com um mouse-controlado no segmento definido. A EMI de carótidas foi calculada com uma média de 5 pontos, que combinam perto e longe da parede do máximo EMI da artéria carótida comum.

### **3.3.1.6. Polimorfismo genético**

#### **- Coleta de células bucais**

As amostras de células bucais foram identificadas somente por código, permanecendo o sigilo de informações e classificação, quanto à presença ou não de doença periodontal nos pacientes analisados, restrito aos pesquisadores responsáveis pela coleta, para evitar qualquer viés na análise posterior.

O método de coleta de células bucais propicia uma fonte não invasiva, um método simples e efetivo para se conduzir a extração de ácido desoxirribonucleico (DNA), para que possa ser realizado o exame de genotipagem em estudos epidemiológicos, com importante vantagem, sem oferecer riscos e ser indolor ao avaliado.

As coletas de células bucais para extração de DNA genômico foram obtidas dos pacientes durante o atendimento na clínica odontológica (antes do início do tratamento), por um pesquisador responsável e previamente orientado para realização dessa coleta, orientando os pacientes quanto às instruções durante a coleta, que seguiu o protocolo sugerido no kit para purificação de DNA utilizando uma escova bucal estéril (*cytobrush*), sugerido pela Gentra Puregene® (Qiagen® - Gentra System, Minneapolis MN).

O procedimento inicial para coleta de células bucais é raspar o interior da boca 10 vezes com a escova bucal estéril, pelo menos, uma hora após comer ou beber algo. O DNA pode ser purificado imediatamente após a coleta ou as amostras podem ser armazenadas na própria escova à temperatura entre 15 e 25°C, entretanto, pode-se manter por pelo menos dois anos à temperatura ambiente as amostras quando imersas em solução de lise.

Como não era possível a realização da extração de DNA imediatamente após a coleta, o armazenamento era realizado em temperatura controlada, visto que a temperatura ambiente do local da coleta poderia ser superior a 25°C.

As amostras eram colocadas dentro de microtubos de centrífuga de 1,5 mL, com 300 µL de solução de lise celular em cada ou até um pouco mais, dependendo se a escova estava totalmente imersa dentro da solução. Assim, podem permanecer armazenadas por um período

maior, entretanto, priorizava-se o menor tempo possível para realização da etapa de extração e purificação do DNA. Ao cortar a alça da escova para que coubesse dentro do microtubo, foi utilizado uma tesoura estéril pelo pesquisador com luvas.

#### **- Extração do DNA**

O DNA de amostras de células bucais foi extraído utilizando o protocolo modificado Gendra Puregene<sup>®</sup> (Gendra System, Minneapolis MN), a partir de etapas de lise celular, tratamento com ribonuclease (RNase), precipitação de proteínas, precipitação do DNA e hidratação do DNA (LONDON et al., 2001).

Como cada tubo já continha a escova bucal pós-coleta imersa em 300 µL de solução de lise, foi adicionado 1,5 µL de proteinase K (20 mg/mL), sendo retiradas após incubação por 55°C por 1 hora. As escovas eram, então, retiradas e adicionou-se 100 µL de solução de precipitação de proteína. As escovas retiradas foram armazenadas em outro microtubo, para que se resguarda amostras originais, apesar de estarem apenas agregadas à escova, para alguma eventual necessidade futura.

Foram acrescidos 1,5 µL de solução de RNase, misturando suavemente e incubando por 15 min em 37°C, sendo, depois, colocado 1 min no gelo, para resfriar rapidamente. Após essa etapa, foram adicionados 100 µL de solução de precipitação de proteínas e agitado fortemente por 20 s em alta velocidade, sendo, posteriormente, incubado 5 min no gelo. Após centrifugar por 3 min a 15.000 x, as proteínas formaram um *pellet* sedimentado no fundo do microtubo. O sobrenadante foi desprezado e o tubo invertido sobre papel absorvente. Foram adicionados 300 µL de etanol 70% para lavar o DNA.

Os tubos permaneceram abertos por 15 min para evaporação do etanol residual e, a seguir, o DNA foi dissolvido em 20 µL de solução de hidratação do DNA, e armazenados até a análise de genotipagem em congelador a -20°C, devidamente identificados com os códigos dos pacientes.

As extrações de DNA foram realizadas no Laboratório de Biologia da Cicatrização, Ontogenia e Nutrição de Tecidos (LABICONTE) do Centro de Biomedicina da Universidade Federal do Ceará (UFC).

### - Genotipagem da Apolipoproteína E

O genótipo APOE de cada participante foi detectado por *real time polymerase chain reaction quantitative* (RT-PCR) com ensaios experimentais, utilizando a sonda TaqMan R no equipamento StepOnePlus R (ThermoFisher, Brasil) (**Figura 19**). A amplificação foi realizada em um sistema *StepOne RT-PCR*, no formato de 96 poços pela Applied Biosystems®, usando o método experimental de quantificação ( $\Delta$ CT) (CALERO et al., 2009).

**Figura 19** - Ilustração do StepOne™ Real-Time PCR (Applied Biosystems®).



Fonte: Extraído de <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/4376357>.

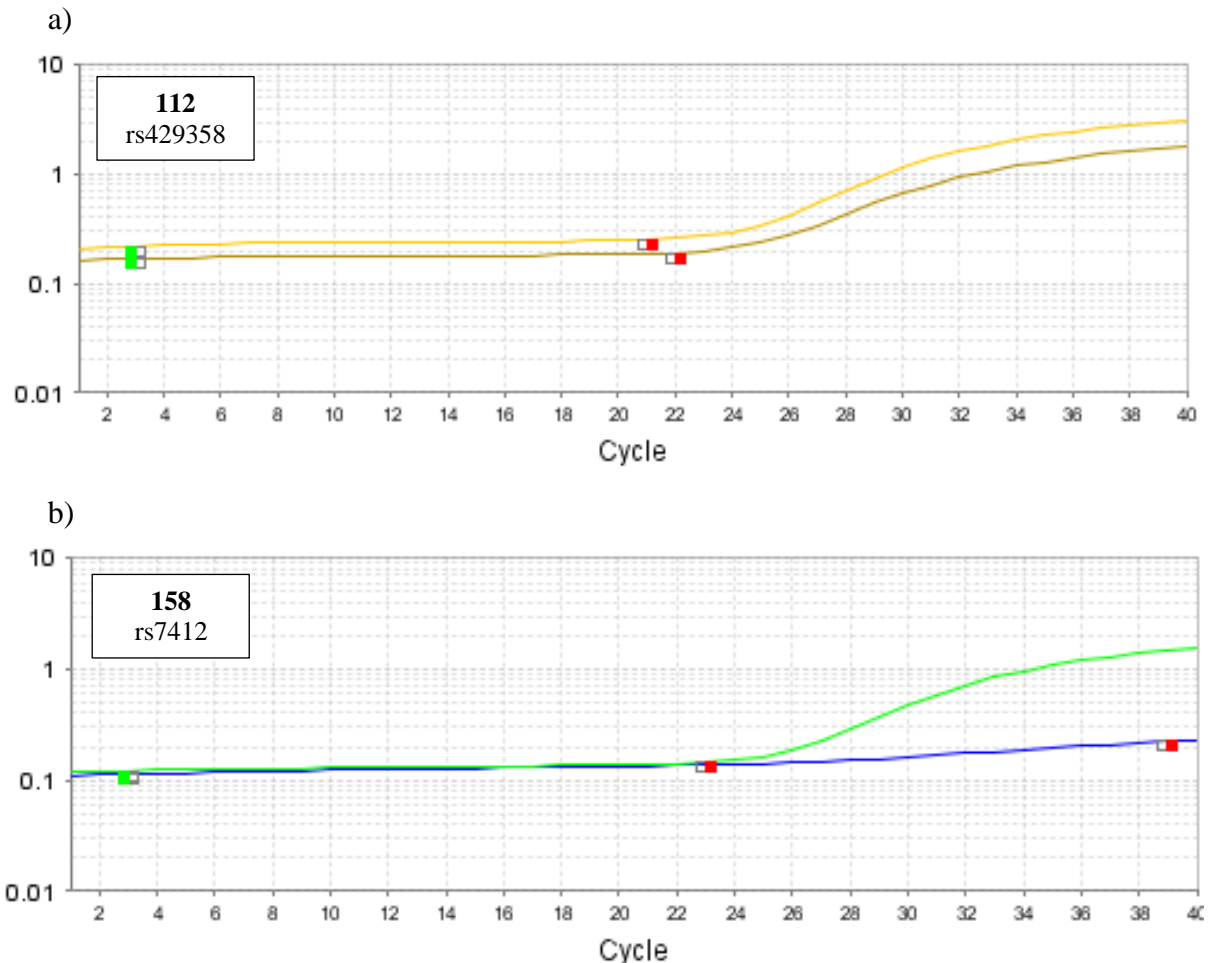
Dois polimorfismos de nucleotídeos único para ApoE (*single nucleotide polymorphisms* - SNP), rs429358 e rs7412, correspondentes às posições 112 e 158 da proteína, respectivamente, foram analisados.

Para cada SNP, as reações foram realizadas em duplicata em placas de microtitulação de 96 poços com volume final de 10 ml, contendo 5 ml de TaqMan (ThermoFisher, No Brasil), 25  $\mu$ ol/L de cada sonda (marcada com FAM ou VIC), e 0,5 mL de DNA (30 a 100 ng). As condições de execução foram 40 ciclos de desnaturação a 92°C por 15s e hibridização e extensão em 60°C por um minuto.

Sondas de cada SNP tinham duas sequências marcadas com um corante diferente VIC/FAM para os polimorfismos C/T, respectivamente. Esta técnica permite a identificação dos seis possíveis genótipos: E2/E2; E2/E3; E2/E4; E3/E3; E3/E4; e E4/E4, de acordo a combinação de fluorescência detectada para cada posição. Assim, E2 teve apenas a detecção de fluorescência FAM; E3 tinha detecção de fluorescência FAM para rs429358 e VIC para rs7412

e; E4 tinha somente detecção de VIC para ambos os SNPs (ARRIFANO et al., 2018a) (**Figura 20**).

**Figura 20** – Curvas de amplificação marcadas com fluorescência para cada polimorfismo.



Nota: a) Foi detectada amplificação para valores de Ct abaixo de 25 para VIC e FAM, caracterizando cisteína no nucleotídeo T e arginina no C na posição 112 (E3). b) Detecção de amplificação apenas para VIC, com a presença de arginina no nucleotídeo T na posição 158 (E4). Resultado da identificação do genótipo para este paciente em questão: E3/E4.

Fonte: própria. Laboratório de Farmacologia Molecular na Universidade Federal do Pará (UFPA).

Os primers de PCR (5'3') foram GCGGGCACGGCTGTCCAA (para frente) e GCAGGTCATCGGCATCGC (reverso) para ApoE112 e GGCCAGAGCACCGAGGAG (para frente) e CACGCGGCCCTGTTCCAC (reverso) para ApoE158. Os iniciadores de "minissequenciamento" foram CTGGGCGCGGACATGGAGGACGTG para ApoE112 e GCGATGCCGATGACCTGCAGAAG para ApoE158. Ambos os iniciadores de minissequenciação detectaram os nucleotídeos C e T na cadeia de DNA codificante. O alelo E2

tem uma substituição de pares de bases citosina-a-timina em rs7412, enquanto em E4, uma timina é substituída por uma citosina em rs429358 (KOCH et al., 2002) (**Quadro 11**).

**Quadro 11** – Classificação dos genótipos da APOE de acordo com as fluorescências dos SNPs (rs429358 e rs7412).

Genótipos	rs429358	rs7412
<b>E2/E2</b>	T	T
<b>E3/E3</b>	T	C
<b>E4/E4</b>	C	C
<b>E2/E3</b>	T	C/T
<b>E2/E4</b>	T/C	C/T
<b>E3/E4</b>	T/C	C

Legenda: T – timina; C – citosina.

Fonte: própria.

Em qualquer uma das posições, a cisteína é determinada pelo códon TGC e a arginina pelo códon CGC, sendo então nomeados os SNPs de acordo com a determinação dos códons (KOCH et al., 2002) (**Quadro 12**).

**Quadro 12** - Sequência de bases para cada alelo da APOE de acordo com a determinação do aminoácido pelos códons correspondentes.

Alelos	Sequência de bases
<b>E2</b>	TGC TGC
<b>E3</b>	TGC CGC
<b>E4</b>	CGC CGC

Legenda: T – timina; C – citosina.

Fonte: própria.

Três grupos de genótipos foram analisados no presente estudo: E2+ (portadores dos genótipos  $\epsilon 2/\epsilon 2$  e  $\epsilon 2/\epsilon 3$ ), E3+ (portadores do genótipo  $\epsilon 3/\epsilon 3$ ) e E4+ (portadores dos genótipos  $\epsilon 3/\epsilon 4$  e  $\epsilon 4/\epsilon 4$ ). Os dados genotípicos de ambos os SNPs conferiram ao equilíbrio de *Hardy-Weinberg* (WOHLIN et al., 2007; ROHLFS; WEIR, 2008).



### 3.3.2. Análises estatísticas

As variáveis contínuas foram tabuladas e expressas em média  $\pm$  desvio-padrão, enquanto as categóricas foram apresentadas em taxas e percentuais de prevalência. Os polimorfismos, os genótipos e as distribuições alélicas foram apresentadas no trabalho em prevalências e analisados de acordo com hipótese de equilíbrio de *Hardy-Weinberg* (ROHLFS; WEIR, 2008).

Testes de associação de qui-quadrado e *p* de Fischer foram utilizados para verificar associação entre variáveis categóricas independentes. Teste *t de Student* não pareado foi utilizado para comparação de variáveis contínuas, com um intervalo de confiança de 95% e valor de  $p < 0,05$  para diferenças significativas. O cálculo de *odds ratio* (OR) e intervalos de confiança de 95% foram utilizados para identificar fatores de risco para aterosclerose. O coeficiente de correlação *r* de Pearson e regressão multivariada foram utilizados para avaliar a correlação das variáveis estudadas.

Foram utilizados os seguintes softwares para análise estatística: SPSS (SPSS *Statistical Package for the Social Sciences*, Inc, Chicago, IL, versão 20.0) e R (versão 3.4.3 for Windows).

### 3.4. ASPECTOS ÉTICOS

O presente trabalho é parte integrante da pesquisa intitulada “Fatores de risco e prevenção da doença aterosclerótica em pacientes com periodontite no Ceará”, aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará (UFC), com parecer nº 562.697 (Anexo 5) e financiado por meio da Chamada FUNCAP 07/2013 - Programa Pesquisa para o SUS: gestão compartilhada em Saúde (PPSUS/CE –FUNCAP/SESA/MS/CNPq).

Os procedimentos em todas as etapas desta pesquisa foram executados de acordo com os critérios éticos descritos na Resolução MS/CNS nº 510 de 07 de abril de 2016, que dispõe sobre as normas aplicáveis a pesquisas em Ciências Humanas e Sociais cujos procedimentos metodológicos envolvam a utilização de dados diretamente obtidos com os participantes ou de informações identificáveis ou que possam acarretar riscos maiores do que os existentes na vida cotidiana. Respeitando o que rege a resolução, foram mantidos todos os registros médicos e outros documentos da pesquisa apenas com o código do paciente, em local seguro, em concordância com guias de boas práticas clínicas e exigências institucionais e regulatórias para a proteção da confidencialidade dos sujeitos. Apenas o investigador principal e o bioestatístico

do estudo tiveram acesso a esses registros.

Todos os sujeitos da pesquisa foram esclarecidos dos objetivos e de todas as etapas necessárias durante a coleta de dados, tendo o seu consentimento livre, ciente e voluntário, mediante assinatura do TCLE (Anexo 1), antes do início da participação do mesmo na pesquisa.



## 4 RESULTADOS

### 4.1 PERFIL SOCIODEMOGRÁFICO

Após a finalização da coleta de dados, foram recrutados 239 pacientes, sendo que 98 foram excluídos da pesquisa por não completarem os dados necessários e/ou por desistência nas etapas de coleta de dados ou repetição de exames, quando necessário, conforme descrito anteriormente no fluxograma do estudo (**Figura 17**).

Os 141 indivíduos que preencheram os critérios para serem incluídos no estudo final, ao completarem todos os exames, foram subdivididos entre casos e controles, com ou sem doença periodontal (DP), respectivamente. Assim sendo, foram encontrados 47,5% casos e 53,5% controles, que seguem abaixo com a descrição de acordo com as variáveis sociodemográficas (**Tabela 1**).

Em relação à distribuição da população total, quanto ao sexo e procedência, 74,5% eram mulheres e 74,2% dos indivíduos eram da capital (Fortaleza/Ceará). A maioria apresentava, no contato inicial do recrutamento, idade < 45 anos (55,3%), era casado e/ou com união estável (53,2%), referiu outro tipo de ocupação ou desempregados (53,2%) e concluído o ensino médio (46,8%), este último sendo a maior prevalência encontrada entre as categorias de escolaridade da população estudada, não representando a maioria (**Tabela 1**).

Considerando os casos de DP mais graves, com profundidade de 5 mm ou mais de sondagem nos sextantes analisados, a maioria também é do sexo feminino (78,6%), sendo que 50% tinham acima de 45 anos de idade, sem diferença entre os controles existentes (valores de p para sexo:  $p = 0,555$ ; e para faixa etária:  $p = 0,702$ ).

Não houve diferença estatística entre os casos e controles nas características sociodemográficas da população estudada, exceto na renda mensal, em que os casos tiveram renda mensal de  $1,72 \pm 0,93$  salários mínimos, em reais (equivalentes ao valor médio de 210,00 dólares/mês), enquanto os controles tiveram maior renda ( $2,3 \pm 1,94$  salários mínimos) ( $p = 0,0276$ ).

**Tabela 1** - Perfil sociodemográfico da população estudada, dos casos e dos controles.

Classificação das variáveis sociodemográficas		Total		Controles		Casos		p*
		n	%	n	%	n	%	
Sexo	Homens	36	25,53	17	22,97	19	28,36	0,464
	Mulheres	105	74,47	57	77,03	48	71,64	
Faixa etária	< 45 anos	78	55,32	43	58,11	35	52,24	0,465
	≥ 45 anos	63	44,68	31	41,89	32	47,76	
Procedência	Capital (Fortaleza/CE)	106	75,18	57	77,03	49	77,78	0,532
	Interior	30	21,28	17	22,97	13	20,63	
	Outros	1	0,71	0	0,00	1	1,59	
Estado Civil	Casado ou união estável	75	53,19	41	55,41	34	53,97	0,149
	Solteiro(a)	45	31,91	21	28,38	24	38,10	
	Divorciado(a) ou separado(a)	12	8,51	7	9,46	5	7,94	
	Viúvo(a)	5	3,55	5	6,76	0	0,00	
Ocupação	Desempregado(a)	44	31,21	22	29,73	22	34,92	0,220
	Comércio	3	2,13	2	2,70	1	1,59	
	Servidor público	13	9,22	11	14,86	2	3,17	
	Economia informal	2	1,42	1	1,35	1	1,59	
	Outros	75	53,19	38	51,35	37	58,73	
Escolaridade	Ensino fundamental incompleto/completo	53	37,58	27	36,48	26	41,27	0,521
	Ensino médio incompleto/completo	65	46,10	35	47,24	30	47,62	
	Graduação	15	10,64	11	14,86	4	6,35	
	Outros (pós-graduação)	4	2,84	1	1,35	3	4,76	
Renda Mensal	(em salários mínimos)	média ± desvio padrão		2,3 ± 1,94		1,72 ± 0,93		0,027

Obs.: não foi encontrada diferença estatística entre casos e controles, exceto para renda mensal. \*Qui-quadrado ou teste exato de Fisher. Fonte: própria

#### 4.2 POLIMORFISMO DA APOLIPOPROTEINA E (ApoE)

O genótipo mais frequente na população foi E3/E3 (67,4%), em 68,7% dos casos, e 66,2% dos controles, sem diferença estatística ( $p = 0,831$ ). A prevalência de genótipos e frequência alélica da ApoE na população estudada é apresentada na **Tabela 2**. As frequências alélicas da ApoE para casos e controles, respectivamente, foram de 4,5 e 4,5% de E2; 80,6 e 85,1% de E3; e 14,9 e 15,6% de E4, sem diferença ( $p = 0,984$ ). As frequências dos genótipos na população estudada não diferiram significativamente daquelas previstas pelo teste de equilíbrio de *Hardy-Weinberg* ( $p = 0,0239$ ) (**Tabela 2**).

**Tabela 2** - Distribuição genotípica e alélica da apolipoproteína E (APOE) da população total, casos e controles.

<b>Características genotípicas e alélicas</b>	<b>Total (n = 141)</b>	<b>Controles (n = 74)</b>	<b>Casos (n = 67)</b>	<b>p *</b>
<b>Genótipos</b>	<b>n (%)</b>	<b>n (%)</b>	<b>n (%)</b>	
E2/E3	6 (4,25)	4 (5,41)	2 (2,99)	0,831
E2/E4	6 (4,25)	2 (2,70)	4 (5,97)	
E3/E3	95 (67,37)	49 (66,22)	46 (68,66)	
E3/E4	32 (22,69)	18 (24,32)	14 (20,9)	
E4/E4	2 (1,41)	1 (1,35)	1 (1,49)	
<b>Alelos</b>				
E2	12 (4,25)	6 (4,52)	6 (4,48)	0,984
E3	228 (80,85)	120 (85,11)	108 (80,60)	
E4	42 (14,89)	22 (15,60)	20 (14,92)	

Nota: O genótipo E2 / E2 não foi identificado na população. \*Qui-quadrado ou teste exato de Fisher.  
Fonte: própria

A presença dos alelos não foi diferente significativamente entre os casos com DP mais grave em comparação aos controles analisados, quando considerada presença ou ausência dos alelos E2 e E4 (**Tabela 3**).

**Tabela 3** - Distribuição genotípica e alélica da apolipoproteína E (APOE) dos casos com doença periodontal severa (profundidade  $\geq 5$  mm) e controles.

<b>Presença dos alelos</b>	<b>Controles</b>	<b>Casos <math>\geq 5</math> mm</b>	<b>p *</b>
E2+	6 (8,3%)	2 (14,3%)	0,483
E2-	66 (91,7%)	12 (85,7%)	
E4+	11 (17,7%)	3 (12,5%)	0,555
E4-	51 (82,3%)	21 (87,5%)	

Legenda: E2+ e E4+: presença do alelo E2 ou E4; E2- e E4-: ausência do alelo E2 ou E4. \*Qui-quadrado ou teste exato de Fisher.

Fonte: própria

### 4.3 PERFIL ODONTOLÓGICO

A população estudada apresentou um perfil odontológico sem diferença estatística, quando considerado casos e controles, exceto quanto à mobilidade dentária ( $p = 0,001$ ). Os casos relataram em 40,3% ter algum nível de mobilidade dentária, característica da doença periodontal instalada cronicamente, enquanto nos controles este percentual foi menor, de 16,2%.

Em outras características presentes e descritas na doença periodontal, como sangramento da gengiva, não foi possível identificar diferença estatística entre casos e controles, como apresentado na **Tabela 4**.

**Tabela 4** - Perfil odontológico da população estudada, dos casos e dos controles.

Classificação das variáveis odontológicas		Total		Controles		Casos		p*
		n	%	n	%	n	%	
Mobilidade dentária	Sim	39	27,7	12	16,2	27	40,3	<b>0,001</b>
	Não	102	72,3	622	83,8	40	59,7	
Tratamento prévio	Sim	81	58,7	46	63,0	35	53,8	0,275
	Não	57	41,3	27	37,0	30	46,2	
Sangramento da gengiva	Sim	64	45,7	29	39,7	35	52,2	0,138
	Não	76	54,3	44	60,3	32	47,8	
Dor na gengiva	Sim	43	30,7	21	28,8	22	32,8	0,602
	Não	97	69,3	52	71,2	45	67,2	
Gosto desagradável	Sim	77	54,6	39	52,7	38	56,7	0,633
	Não	64	45,4	35	47,3	29	43,3	
Hálito desagradável	Sim	70	49,6	39	52,7	31	46,3	0,445
	Não	71	50,4	35	47,3	36	53,7	
Sensibilidade	Sim	96	68,1	51	68,9	45	67,2	0,823
	Não	45	31,9	23	31,1	22	32,8	
Refere alimentar-se entre as refeições	Sim	29	20,6	14	18,9	15	22,4	0,600
	Não	98	69,5	50	67,6	48	71,6	
Tratamento ortodôntico	Sim	43	30,5	24	32,4	19	28,4	0,935
	Não	51	36,2	27	36,5	24	35,8	
Lesão na boca	Sim	90	63,8	47	63,5	43	64,2	0,443
	Não	13	9,4	7	9,6	6	9,2	
Histórico familiar de doença periodontal	Sim	125	90,6	66	90,4	59	90,8	0,806
	Não	31	22,5	17	23,3	14	21,5	
Número de escovações por dia	0	107	77,5	56	76,7	51	78,5	0,246
	1	1	0,7	0	0,0	1	1,5	
	2	8	5,8	2	2,8	6	9,2	
	3	40	29,2	23	31,9	17	26,2	
	4	80	58,4	43	59,7	37	56,9	
	5	6	4,4	4	5,6	2	3,1	
Recebeu orientação de higiene oral	Sim	2	1,5	0	0,0	2	3,1	0,102
	Não	103	75,2	50	69,4	53	81,5	
Considera a higiene oral adequada	Sim	34	24,8	22	30,6	12	18,5	0,410
	Não	80	58,4	45	61,6	35	54,7	
	Não	57	41,6	28	38,4	29	45,3	

Obs.: não foi encontrada diferença estatística entre casos e controles, exceto na mobilidade dentária.

\*Qui-quadrado. Fonte: própria

Avaliando o perfil odontológico em relação ao polimorfismo da APOE, especificamente da E4, verificou que os portadores de E4 com tratamento odontológico prévio (ex. limpeza, exodontia, etc.), apresentaram prevalência (66,7%) significativamente maior que os não portadores de E4 ( $p = 0,0297$ ) (**Tabela 5**).

Além de maior prevalência de pacientes com histórico familiar de doença periodontal entre os portadores de E4 ( $p = 0,007$ ), sugerindo condições de saúde bucal abaixo do esperado entre os portadores de E4, podendo desenvolver uma maior suscetibilidade às alterações e/ou desordens orais, predispondo às doenças periodontais, principalmente. Apesar disso, não houve diferença significativa entre pacientes quanto à sensibilidade e mobilidade dentária, quando se considerou o polimorfismo da APOE (**Tabela 5**).

Houve diferença estatística entre os pacientes com E4 que relataram tratamento ortodôntico prévio, com uma prevalência de 52,5%, enquanto que 29,0% dos que não tinha o alelo E4 relataram ter sido submetidos a tratamento ortodôntico anteriormente ( $p = 0,009$ ).

**Tabela 5** - Características do exame bucal dos pacientes com o alelo E4 da população total.

<i>Variáveis do exame bucal</i>	<b>ApoE4</b>				<b>p</b>
	<b>Sim</b>	<b>Não</b>	<b>Sim</b>	<b>Não</b>	
<b><i>Sangramento</i></b>					
Sim	15	37,5%	49	49,5%	0,199
Não	25	62,5%	50	50,5%	
<b><i>Dor</i></b>					
Sim	11	27,5%	32	32,3%	0,578
Não	29	72,5%	67	67,7%	
<b><i>Mobilidade dentária</i></b>					
Sim	15	37,5%	24	24,0%	0,107
Não	25	62,5%	76	76,0%	
<b><i>Gosto desagradável na boca</i></b>					
Sim	20	50,0%	57	57,0%	0,452
Não	20	50,0%	43	43,0%	
<b><i>Hálito desagradável</i></b>					
Sim	21	52,5%	49	49,0%	0,708
Não	19	47,5%	51	51,0%	
<b><i>Sensibilidade</i></b>					
Sim	29	72,5%	67	67,0%	0,527
Não	11	27,5%	33	33,0%	
<b><i>Ingestão de ácidos</i></b>					
Sim	33	82,5%	77	77,0%	0,474
Não	7	17,5%	23	23,0%	

*Continua...*



Continuação da tabela 5.

<b>Tratamento ortodôntico prévio</b>					
Sim	21	52,5%	29	29,0%	<b>0,009</b>
Não	19	47,5%	71	71,0%	
<b>Lesão na boca</b>					
Sim	4	10,8%	9	10,0%	0,891
Não	33	89,2%	81	90,0%	
<b>Histórico familiar de doença periodontal</b>					
Sim	20	54,1%	20	22,2%	<b>0,007</b>
Não	17	45,9%	70	77,8%	
<b>Recebeu orientação de higiene bucal</b>					
Sim	31	86,1%	66	73,3%	0,124
Não	5	13,9%	24	26,7%	
<b>Considera que tem higiene adequada</b>					
Sim	21	55,3%	59	59,6%	0,645
Não	17	44,7%	40	40,4%	
<b>Bochecha enxaguante bucal</b>					
Sim	17	44,7%	45	45,5%	0,940
Não	21	55,3%	54	54,5%	

\* $p < 0,05$ , teste exato de Fisher ou qui-quadrado de Pearson. Fonte: própria

#### 4.4 PERFIL ANTROPOMÉTRICO

Foi identificado excesso de peso na maioria (65,9%) dos pacientes, segundo a classificação do Índice de Massa Corporal (IMC), sendo 42,4% com sobrepeso e 23,5% com obesidade, sem diferença significativa entre os casos e os controles (**Tabela 6**).

A maioria dos pacientes foi identificada com risco para desenvolvimento de doenças cardiovasculares e metabólicas, segundo circunferência da cintura (CC) e relação cintura-quadril (RCQ), pela classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS), respectivamente, com 66,4% e 59,0% da população estudada, sem diferença entre casos e controles (**Tabela 6**).

Os índices de adiposidade corporal (IAC) e o de conicidade (IC) também não apresentaram diferença significativa entre casos e controles e em 77,9% foi estimado excesso de peso (sobrepeso: 36,6%; e obesidade: 41,2%), segundo IAC, e 61,1% com risco, segundo IC (**Tabela 6**).

**Tabela 6** - Perfil antropométrico da população estudada, dos casos e dos controles.

Classificação das variáveis antropométricas*		Total		Controles		Casos		p**
		n	%	n	%	n	%	
Índice de Massa Corporal (IMC)	Eutrofia	45	34,1	26	35,1	19	32,8	0,666
	Sobrepeso	56	42,4	29	39,2	27	46,6	
Circunferência da cintura (CC)	Obesidade	31	23,5	19	25,7	12	20,7	0,287
	Sem risco	44	33,6	22	29,7	22	38,6	
Relação cintura-quadril (RCQ)	Com risco	87	66,4	52	70,3	35	61,4	0,628
	Sem risco	55	41,0	29	39,2	26	43,3	
Índice de adiposidade corporal (IAC)	Normal	29	22,1	18	24,3	11	19,3	0,507
	Sobrepeso	48	36,6	24	32,4	24	42,1	
Índice de conicidade (IC)	Obesidade	54	41,2	32	43,2	22	58,6	0,667
	Sem risco	51	38,9	30	40,5	21	36,8	
	Com risco	80	61,1	44	59,5	36	63,2	

\*Nota: Classificação do estado nutricional pelo IMC: apresentado no **Quadro 2**. Classificação de risco para doença cardiovascular segundo CC: apresentado no **Quadro 3**. Classificação de risco para doença cardiovascular segundo RCQ: apresentado no **Quadro 4**. Classificação de excesso de gordura segundo IAC: apresentado no **Quadro 5**. Valores de risco segundo IC: valores de risco para homens  $IC \geq 1,25$ , independentemente da idade, e para mulheres menores de 50 anos,  $IC \geq 1,18$ , e para aquelas com 50 anos ou mais,  $IC \geq 1,22$ . \*\*Qui-Quadrado de Pearson.

Fonte: própria.

Quando avaliados separadamente os casos que apresentaram doença periodontal agressiva e/ou severa, não foi encontrada diferença estatística nas variáveis antropométricas estudadas, contudo, a maioria (57,1%) da população apresentou excesso de peso (sobrepeso e obesidade), segundo o IMC, com maioria de risco para desenvolver doenças cardiovasculares e metabólicas pela CC (71,4%) e RCQ (57,1%), além de apresentarem excesso de adiposidade corporal (78,6%) e ser de risco em relação ao IC (57,1%), semelhante aos controles da amostra estudada (**Tabela 7**).

**Tabela 7** - Perfil antropométrico dos casos com doença periodontal severa (profundidade  $\geq 5$  mm) e dos controles.

Classificação das variáveis antropométricas*		Controles		Casos $\geq 5$ mm		p**
		n	%	n	%	
Índice de Massa Corporal (IMC)	Eutrofia	26	35,1	6	42,9	0,617
	Sobrepeso	29	39,2	6	42,9	
	Obesidade	19	25,7	2	12,3	
Circunferência da cintura (CC)	Sem risco	22	29,7	4	28,5	0,487
	Com risco	52	70,3	10	71,4	
Relação cintura-quadril (RCQ)	Sem risco	29	39,2	6	42,9	0,625
	Com risco	45	60,8	8	57,1	
Índice de adiposidade corporal (IAC)	Normal	18	24,3	3	21,4	0,731
	Sobrepeso	24	32,4	6	42,9	
	Obesidade	32	43,2	5	35,7	
Índice de conicidade (IC)	Sem risco	30	40,5	6	42,9	0,934
	Com risco	44	59,5	8	57,1	

\*Nota: Classificação do estado nutricional pelo IMC: apresentado no **Quadro 2**. Classificação de risco para doença cardiovascular segundo CC: apresentado no **Quadro 3**. Classificação de risco para doença cardiovascular segundo RCQ: apresentado no **Quadro 4**. Classificação de excesso de gordura segundo IAC: apresentado no **Quadro 5**. Valores de risco segundo IC: valores de risco para homens  $IC \geq 1,25$ , independentemente da idade, e para mulheres menores de 50 anos,  $IC \geq 1,18$ , e para aquelas com 50 anos ou mais,  $IC \geq 1,22$ . \*\*Qui-Quadrado de Pearson.

Fonte: própria.

Ao analisarmos o perfil antropométrico em relação à presença e ausência dos alelos E2 e E4, principalmente evidenciando os preditores de risco para doenças cardiovasculares, não houve diferença estatística entre os grupos (caso e controle) ou entre os alelos (portadores E2 e E4), porém, enfatizou-se que a maioria dos indivíduos avaliados apresentavam circunferência da cintura característica de risco muito elevado para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares.

Em relação ao percentual de gordura corporal na população total, foi possível observar que os portadores do alelo E2 apresentaram um percentual médio de gordura corporal de  $36,17 \pm 5,02\%$ , maior quando comparados aos não portadores de E2 ( $32,67 \pm 5,76\%$ ), apesar de não apresentar diferença estatística significativa ( $p = 0,053$ ).

Nos controles, o percentual de gordura corporal foi estatisticamente maior ( $p = 0,017$ ) nos portadores de E2 ( $38,64 \pm 3,90\%$ ) do que entre os não-portadores de E2 ( $32,67 \pm 5,96\%$ ) (**Tabelas 8, 9 e 10**).

**Tabela 8** - Média e desvio padrão da idade, em anos, e medidas antropométricas pela presença de alelos (E2 e E4) na população estudada, casos e controles.

	Total					Controles					Casos				
	Presença E2		Ausência E2		p	Presença E2		Ausência E2		p	Presença E2		Ausência E2		p
	Média	DP	Média	DP		Média	DP	Média	DP		Média	DP	Média	DP	
<b>Idade (anos)</b>	47,50	5,96	44,23	6,56	0,099	49,17	6,15	43,90	6,84	0,073	45,83	5,81	44,61	6,27	0,647
<b>CC (cm)</b>	87,91	11,07	87,36	10,72	0,871	92,33	9,82	86,67	9,88	0,182	82,60	11,01	88,26	11,77	0,307
<b>CQ (cm)</b>	104,17	3,40	108,29	7,19	0,334	103,00	0,00	106,30	7,46	0,670	104,75	4,60	110,49	6,36	0,233
<b>RCQ</b>	0,94	0,07	0,91	0,08	0,470	1,02	0,00	0,94	0,08	0,336	0,91	0,04	0,88	0,06	0,575
<b>CABd (cm)</b>	95,71	9,22	93,04	11,63	0,461	99,83	5,95	93,20	10,32	0,126	90,76	10,60	92,83	13,26	0,736
<b>GC (%)</b>	36,17	5,02	32,67	5,76	<b>0,053</b>	38,64	3,90	32,56	5,96	<b>0,017*</b>	33,22	4,90	32,83	5,54	0,878
<b>IC</b>	1,22	0,07	1,22	0,14	0,983	1,22	0,08	1,22	0,07	0,946	1,21	0,06	1,21	0,20	0,964

	Total					Controles					Casos				
	Presença E4		Ausência E4		p	Presença E4		Ausência E4		p	Presença E4		Ausência E4		p
	Média	DP	Média	DP		Média	DP	Média	DP		Média	DP	Média	DP	
<b>Idade (anos)</b>	46,05	7,67	43,90	6,00	0,117	47,24	8,07	43,17	6,09	<b>0,046*</b>	44,74	7,19	44,71	5,85	0,987
<b>CC (cm)</b>	89,19	10,77	86,70	10,66	0,233	87,93	9,52	86,81	10,16	0,666	90,85	12,35	86,56	11,40	0,218
<b>CQ (cm)</b>	107,23	6,45	108,27	7,32	0,675	105,90	6,41	106,22	7,72	0,933	108,33	6,86	110,58	6,29	0,475
<b>RCQ</b>	0,93	0,07	0,91	0,08	0,348	0,98	0,08	0,93	0,08	0,286	0,89	0,04	0,88	0,07	0,583
<b>CABd (cm)</b>	9281	13,18	93,45	10,76	0,774	93,19	7,85	93,95	11,02	0,773	92,30	18,28	92,79	10,52	0,899
<b>GC</b>	32,58	5,98	33,12	5,70	0,635	33,31	6,27	32,95	5,99	0,817	31,63	5,62	33,34	5,37	0,291
<b>IC</b>	46,05	7,67	43,90	6,00	0,117	1,22	0,07	1,22	0,07	0,751	1,20	0,32	1,22	0,10	0,753

Legenda: CC - circunferência da cintura; CQ - circunferência do quadril; RCQ - relação cintura quadril; CABd - circunferência abdominal; GC - percentual de gordura corporal; IC - índice de conicidade; DP- desvio-padrão. \* valor de  $p < 0,05$ , teste t de Student.

Fonte: própria.

**Tabela 9** - Perfil da população estudada de acordo com as categorias de classificação das variáveis antropométricas, presença do alelo E2 na população estudada, casos e controles.

	Total		Total		p		Controles		p		Casos		p				
			Presença E2	Ausência E2			Presença E2	Ausência E2			Presença E2	Ausência E2					
<b>IMC</b>																	
Eutrofia	45	34,10%	2	18,20%	43	35,50%	0,414	2	40,0%	17	32,1%	0,933	0	0,0%	26	38,2%	0,136
Sobrepeso	56	42,40%	5	45,50%	51	42,10%		2	40,0%	25	47,2%		3	50,0%	26	38,2%	
Obesidade	31	23,50%	4	36,40%	27	22,30%		1	20,0%	11	20,8%		3	50,0%	16	23,5%	
<b>CC</b>																	
Alto risco	45	100,00%	3	100,00%	42	100,00%	1,000	2	100,0%	20	100,0%	1,000	1	100,0%	22	100,0%	1,000
Sem risco	0	0,00%		0,00%		0,00%		0	0,00%	0	0,00%		0	0,00%		0,00%	
<b>RCQ</b>																	
Sem risco	67	51,10%	7	63,60%	60	50,00%	0,387	4	80,0%	27	51,9%	0,229	3	50,0%	33	48,5%	0,945
Muito alto risco	64	48,90%	4	36,40%	60	50,00%		1	20,0%	25	48,1%		3	50,0%	35	51,5%	
<b>IAC (GC)</b>																	
Normal	29	22,10%	1	9,10%	28	23,30%	0,487	1	20,0%	10	19,2%	0,995	0	0,0%	18	26,5%	0,298
Sobrepeso	48	36,60%	4	36,40%	44	36,70%		2	40,0%	22	42,3%		2	33,3%	22	32,4%	
Obesidade	54	41,20%	6	54,50%	48	40,00%		2	40,0%	20	38,5%		4	66,7%	28	41,2%	
<b>IC</b>																	
Sem risco	51	38,90%	4	36,40%	47	39,20%	0,855	2	40,0%	19	36,5%	0,878	2	33,3%	28	41,2%	0,708
Com risco	80	61,10%	7	63,60%	73	60,80%		3	60,0%	33	63,5%		4	66,7%	40	58,8%	

Legenda: CC - circunferência da cintura; CQ - circunferência do quadril; RCQ - relação cintura quadril; IAC - índice de adiposidade corporal; GC - percentual de gordura corporal; IC - índice de conicidade.

Nota: \* $p < 0,05$ , teste exato de Fisher ou qui-quadrado de Pearson.

Fonte: própria.

**Tabela 10** - Perfil da população estudada de acordo com as categorias de classificação das variáveis antropométricas, presença do alelo E4 na população estudada, casos e controles.

	Total			p	Controles			p	Casos			p			
	Presença E4	Ausência E4			Presença E4	Ausência E4			Presença E4	Ausência E4					
<b>IMC</b>															
Eutrofia	12	31,6%	33	35,1%	0,496	6	35,3%	13	31,7%	0,925	6	28,6%	20	37,7%	0,339
Sobrepeso	19	50,0%	37	39,4%		8	47,1%	19	46,3%		11	52,4%	18	34,0%	
Obesidade	7	18,4%	24	25,5%		3	17,6%	9	22,0%		4	19,0%	15	28,3%	
<b>CC</b>															
Com risco	11	0,0%	34	0,0%	1,000	6		16		1,000	5	100,0%	18	100,0%	1,000
Sem risco	0	0,0%	0	0,0%		0	0,0%	0	0,0%		0	0,0%	0	0,0%	
<b>RCQ</b>															
Sem risco	20	54,1%	47	50,0%	0,676	10	62,5%	21	51,2%	0,442	10	47,6%	26	49,1%	0,911
Com risco muito elevado	17	45,9%	47	50,0%		6	37,5%	20	48,8%		11	52,4%	27	50,9%	
<b>IAC (GC)</b>															
Normal	7	18,9%	22	23,4%	0,554	3	18,8%	8	19,5%	0,503	4	19,0%	14	26,4%	0,789
Sobrepeso	12	32,4%	36	38,3%		5	31,3%	19	46,3%		7	33,3%	17	32,1%	
Obesidade	18	48,6%	36	38,3%		8	50,0%	14	34,1%		10	47,6%	22	41,5%	
<b>IC</b>															
Sem risco	11	29,7%	40	42,6%	0,175	4	25,0%	17	41,5%	0,247	7	33,3%	23	43,4%	0,427
Com risco	26	70,3%	54	57,4%		12	75,0%	24	58,5%		14	66,7%	30	56,6%	

Legenda: CC - circunferência da cintura; CQ - circunferência do quadril; RCQ - relação cintura quadril; IAC - índice de adiposidade corporal; GC - percentual de gordura corporal; IC - índice de conicidade.

Nota: \*p<0,05, teste exato de Fisher ou qui-quadrado de Pearson.

Fonte: própria.

#### 4.5 PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E LABORATORIAIS

A glicemia em jejum apresentou-se em quase todos os pacientes (90,5%) dentro da faixa de normalidade ( $< 100$  mg/dL), sem diferença estatística entre casos e controles ( $p = 0,612$ ) (**Tabela 11**).

O perfil lipídico foi analisado com os valores séricos de colesterol total, HDL, LDL triglicérides, e verificou-se prevalência maior de controles (56,4%) do que de casos (40,0%) com colesterol total acima do valor desejável ( $\geq 200$ mg/dL), mas sem diferença estatística ( $p = 0,094$ ), além da maior parte dos pacientes (73,5%) ter apresentado LDL acima de 100mg/dL, tanto entre casos (70,8%) como entre os controles (75,9%) e o HDL abaixo dos valores desejáveis ( $> 40$  e  $50$  mg/dL; para homens e mulheres, respectivamente) em mais da metade da população (56,2%) (**Tabela 11**).

Apesar destes valores elevados em boa parte da população, os triglicérides se apresentavam abaixo do valor desejável (150 mg/dL) em, aproximadamente, dois terços da população estudada (65,7%) (**Tabela 11**).

Foram calculados os índices de Castelli 1 e 2, (MILLÁN et al., 2009), que estimam o comportamento de risco para doença aterosclerótica e o índice aterogênico plasmático (IAP), segundo Dobiášová e Frohlich (2001), classificados de acordo com o descrito anteriormente no **quadro 9**.

A maior parte da população total estudada apresentava-se sem risco para desenvolvimento de aterosclerose em relação ao índice de Castelli 1 (61,0%) e 2 (71,3%), mas não foi encontrada diferença estatística entre os casos e os controles (**Tabela 11**).

Em relação ao IAP, observou-se uma prevalência muito alta de classificação de risco (88,1%), sendo bem homogênea entre casos (87,5%) e controles (88,7%) (**Tabela 11**).

**Tabela 11** - Perfil bioquímico e laboratorial da população estudada, dos casos e dos controles.

Classificação das variáveis bioquímicas e laboratoriais*		Total		Controles		Casos		p**
		n	%	n	%	n	%	
Glicemia	< 100 mg/dL	95	90,5	49	89,1	46	92,0	0,612
	≥ 100 mg/dL	10	9,5	6	10,9	4	8,0	
Colesterol Total	< 200 mg/dL	54	51,4	24	43,6	30	60,0	0,094
	≥ 200 mg/dL	51	48,6	31	56,4	20	40,0	
HDL	< 40 ♀ e 50 ♂	59	56,2	34	61,8	25	50,0	0,233
	≥ 40 ♀ e 50 ♂	46	43,8	21	38,2	25	50,0	
LDL	< 100 mg/dL	27	26,5	13	24,1	14	29,2	0,561
	≥ 100 mg/dL	75	73,5	41	75,9	34	70,8	
Triglicerídeos	< 150 mg/dL	69	65,7	34	61,8	35	70,0	0,378
	≥ 150 mg/dL	36	34,3	21	38,2	15	30,0	
Castelli 1	Sem risco	64	61,0	36	65,5	28	56,0	0,321
	Com risco	41	39,0	19	34,5	22	44,0	
Castelli 2	Sem risco	72	71,3	41	77,4	31	64,6	0,156
	Com risco	29	28,7	12	22,6	17	35,4	
IAP	Baixo risco	12	11,9	6	11,3	6	12,5	0,855
	Alto risco	89	88,1	47	88,7	42	87,5	
PCR	Baixo risco	21	21,4	9	17,6	12	25,5	0,625
	Moderado risco	19	19,4	10	19,6	9	19,1	
	Alto risco	58	59,2	32	62,7	26	55,3	

\*Legenda: HDL – *High-density lipoprotein*; LDL – *Low-density lipoprotein*; PCR – proteína C reativa; IAP – índice aterogênico do plasma. Classificação das variáveis bioquímicas e laboratoriais apresentada no **Quadro 9**. \*\*Qui-Quadrado de Pearson.

Fonte: própria.

Comparou-se os casos com doença periodontal grave (inserção de 5 mm ou mais na profundidade de sondagem com os controles, para se verificar alterações quando considerado o estágio mais severo da DP, entretanto, não foi encontrada diferença estatística nos parâmetros bioquímicos e laboratoriais avaliados, exceto no IAP ( $p = 0,033$ ) (**Tabela 12**).

Para essa análise, o número de casos foi bastante reduzido, visto que foram considerados apenas os casos que apresentaram profundidade de sondagem de 5 mm ou mais nos sextantes avaliados (**Tabela 12**), dificultando inclusive a estratificação e análise de correlação dos casos com DP agressiva de acordo com os polimorfismos da APOE.



**Tabela 12** - Perfil bioquímico e laboratorial dos casos com doença periodontal severa (profundidade  $\geq 5$  mm) e dos controles.

Classificação das variáveis bioquímicas e laboratoriais*		Controles		Casos $\geq 5$ mm		p**
		n	%	n	%	
Glicemia	< 100 mg/dL	49	89,1	0	0,0	0,203
	$\geq 100$ mg/dL	6	10,9	13	100,0	
Colesterol Total	< 200 mg/dL	24	43,6	7	53,8	0,858
	$\geq 200$ mg/dL	31	56,4	6	46,2	
HDL	< 40 ♀ e 50 ♂	34	61,8	8	61,5	0,961
	$\geq 40$ ♀ e 50 ♂	21	38,2	5	38,5	
LDL	< 100 mg/dL	13	24,1	4	30,8	0,438
	$\geq 100$ mg/dL	41	75,9	9	69,2	
Triglicerídeos	< 150 mg/dL	34	61,8	9	69,2	0,731
	$\geq 150$ mg/dL	21	38,2	4	30,8	
Castelli 1	Sem risco	36	65,5	9	69,2	0,827
	Com risco	19	34,5	4	30,8	
Castelli 2	Sem risco	41	77,4	9	75,0	0,887
	Com risco	12	22,6	3	25,0	
IAP	Baixo risco	6	11,3	4	33,3	<b>0,033</b>
	Alto risco	47	88,7	8	66,7	
PCR	Baixo risco	9	17,6	5	41,7	0,105
	Moderado risco	10	19,6	3	25,0	
	Alto risco	32	62,7	4	33,2	

\*Legenda: HDL – *High-density lipoprotein*; LDL – *Low-density lipoprotein*; PCR – proteína C reativa; IAP – índice aterogênico do plasma. Classificação das variáveis bioquímicas e laboratoriais apresentada no **Quadro 7**. \*\*Qui-Quadrado de Pearson.

Fonte: própria.

A proteína C reativa (PCR) foi classificada na maioria da população (78,6%) com risco elevado para doenças cardiovasculares, com 19,4% dos pacientes com risco moderado e 59,2% com alto risco, sem diferença entre casos e controles ( $p = 0,625$ ), totalizando 78,6% da população com PCR de risco moderado ou alto para doenças cardiovasculares (**Tabela 13**).

Em relação ao perfil bioquímico e laboratorial de acordo com o polimorfismo da ApoE, valores aumentados de índice aterogênico no plasma foram encontrados e classificados em risco para os não carreadores de E2 ( $p = 0,009$ ), sem diferença entre os carreadores de E4.

Os valores de proteína C reativa ultrasensível (PCR-us) foram significativamente diferentes entre casos e controles considerando a população total, sem considerar o polimorfismo da ApoE, enquanto que os não portadores de E4 tiveram valores elevados, tanto

nos casos (76,5% com  $p = 0,001$ ) quanto nos controles (68,6% com  $p = 0,016$ ), em relação aos valores de referência (**Tabela 14**).

Analisando os casos com E2, houve um percentual de 75% com classificação de baixo risco para doenças cardiovasculares em relação aos valores séricos de PCR, diferente significativamente dos que não apresentaram E2 ( $p = 0,050$ ) (**Tabela 13**).

Quanto aos valores médios, o HDL apresentou-se com valores médios maiores ( $64,25 \pm 17,50$  mg/dL) em pacientes casos com E2, em comparação aos que não tinham o alelo E2 ( $47,41 \pm 11,39$  mg/dL) ( $p = 0,009$ ). Os portadores do alelo E2 também apresentaram valores de LDL reduzidos ( $84,75 \pm 22,58$  mg/dL) quando comparados aos que não tinham E2 ( $121,90 \pm 34,71$  mg/dL) ( $p = 0,042$ ). Também foi possível identificar um menor valor médio do índice de Castelli 1 entre os casos com E2 ( $2,83 \pm 0,34$ ) do que entre aqueles sem E2 ( $4,40 \pm 1,35$ ) ( $p = 0,000$ ) (**Tabela 14**).

**Tabela 13** - Perfil bioquímico e laboratorial da população estudada, dos casos e dos controles de acordo com a presença ou ausência do alelo E2.

	Total				p*	Controles				p*	Casos				p*
	Presença E2		Ausência E2			Presença E2		Ausência E2			Presença E2		Ausência E2		
<b>Triglicerídeos &gt; 150</b>															
Sim	2	28,6%	34	34,7%	0,742	1	33,3%	20	38,5%	0,859	1	25,0%	33	75,0%	0,820
Não	5	71,4%	64	65,3%		2	66,7%	32	61,5%		3	75,0%	11	25,0%	
<b>LDL &gt; 100</b>															
Sim	4	57,1%	71	74,7%	0,309	3	100,0%	38	74,5%	0,316	0	0,0%	16	36,4%	<b>0,035</b>
Não	3	42,9%	24	25,3%		0	0,0%	13	25,5%		4	100,0%	28	63,6%	
<b>Castelli 1</b>															
Sem risco	5	71,4%	59	60,2%	0,556	1	33,3%	35	67,3%	0,229	4	100,0%	44	95,7%	0,065
Com risco	2	28,6%	39	39,8%		2	66,7%	17	32,7%		0	0,0%	2	4,3%	
<b>Castelli 2</b>															
Sem risco	5	71,4%	67	71,3%	0,993	1	33,3%	40	80,0%	0,061	3	75,0%	3	6,8%	0,122
Com risco	2	28,6%	27	28,7%		2	66,7%	10	20,0%		1	25,0%	41	93,2%	
<b>IAP</b>															
Baixo risco	3	42,9%	9	9,6%	<b>0,009</b>	0	0,0%	6	12,0%	0,524	4	100,0%	24	52,2%	<b>0,000</b>
Risco elevado	4	57,1%	85	90,4%		3	100,0%	44	88,0%		0	0,0%	22	47,8%	
<b>PCR</b>															
Baixo risco	3	42,9%	18	19,8%	0,358	0	0,0%	9	18,8%	0,645	3	75,0%	9	20,9%	<b>0,050</b>
Risco elevado	4	57,1%	73	80,2%		2	100,0%	39	81,2%		1	25,0%	34	79,1%	

Legenda: IAP – índice aterogênico plasmático; PCR – proteína C reativa; \*p<0,05, teste exato de Fisher ou qui-quadrado de Pearson.

Fonte: própria.

**Tabela 14** - Valores médios e desvios-padrões de variáveis bioquímicas e laboratoriais na população total, casos e controles, em relação à presença ou ausência do alelo E2.

	Total				p	Controles				p	Casos				p
	Presença E2		Ausência E2			Presença E2		Ausência E2			Presença E2		Ausência E2		
	Média	DP	Média	DP		Média	DP	Média	DP		Média	DP	Média	DP	
HDL	57,71	14,85	49,59	10,90	0,066	49,00	1,73	51,52	10,18	0,673	64,25	17,50	47,41	11,39	<b>0,009</b>
Triglicerídeos	135,57	46,75	144,42	100,79	0,819	124,67	47,34	140,02	91,04	0,774	143,75	51,67	149,39	111,62	0,921
LDL	108,37	37,41	124,60	37,91	0,277	139,87	28,79	126,99	40,72	0,593	84,75	22,58	121,90	34,71	<b>0,042</b>
Castelli 1	3,49	0,89	4,26	1,23	0,106	4,36	0,42	4,14	1,11	0,730	2,83	0,34	4,40	1,35	<b>0,000</b>
Castelli 2	1,98	0,88	2,52	1,05	0,192	2,85	0,52	2,45	0,83	0,425	1,33	0,27	2,59	1,26	0,054
IAP	0,26	0,19	0,37	0,28	0,318	0,45	0,08	0,38	0,15	0,398	0,12	0,09	0,36	0,38	0,218
PCR	0,45	0,60	0,99	1,98	0,469	0,88	0,75	1,07	2,52	0,894	0,12	0,13	0,90	1,14	0,180

Legenda: HDL – *high density lipoprotein*; LDL – *low density lipoprotein*; IAP – índice aterogênico plasmático; PCR – proteína C reativa; DP – desvio-padrão. \* $p < 0,05$ , teste exato de Fisher ou qui-quadrado de Pearson.

Fonte: própria.

Analisando a população total, dividindo em casos e controles e a presença ou ausência do alelo E4, foi possível identificar que a maioria mantinha os níveis de triglicérides abaixo do valor desejável, tanto naqueles com E4 (58,1%) como naqueles sem o alelo (68,9%), não diferindo quanto ao polimorfismo ( $p = 0,285$ ), tanto em casos ( $p = 0,386$ ) como em controles ( $p = 0,806$ ) (**Tabela 15**).

Os achados quando os parâmetros de LDL também foram semelhantes na população geral, com a maioria acima do valor de 100mg/dL (cerca de 74% da população total), também sem diferença quando à presença do alelo E4 (**Tabela 15**).

Os índices de Castelli 1, 2 e o Índice Aterogênico Plasmático (IAP) também se comportaram de forma similar, sem diferença estatística considerando casos e controles e a presença ou ausência do alelo E4 (**Tabela 15**).

Entretanto, os achados em relação à classificação da proteína C reativa (PCR) foram significativamente diferentes em todas as categorias em relação à divisão por polimorfismo, tanto na população total ( $p = 0,000$ ), como em controles ( $p = 0,001$ ) e como em casos ( $p = 0,016$ ), apresentando maiores prevalências de risco moderado e elevado na maioria da população, principalmente na ausência de E4 (**Tabela 15**).

Não foi encontrada diferença estatística quando comparados por teste exato de Fisher ou qui-quadrado de Pearson, os valores médios e os desvios-padrões das variáveis bioquímicas e laboratoriais séricas da população ao ser classificada de acordo com a presença ou ausência de E4 (**Tabela 16**).

**Tabela 15** - Perfil bioquímico e laboratorial da população estudada, dos casos e dos controles de acordo com a presença ou ausência do alelo E4.

	Total				p	Controles				p	Casos				p
	Presença E4		Ausência E4			Presença E4		Ausência E4			Presença E4		Ausência E4		
<b>Triglicerídeos &gt; 150</b>															
Sim	13	41,9%	23	31,1%	0,285	7	50,0%	13	36,1%	0,368	10	58,8%	21	55,3%	0,806
Não	18	58,1%	51	68,9%		7	50,0%	23	63,9%		7	41,2%	17	44,7%	
<b>LDL &gt; 100</b>															
Sim	22	71,0%	53	74,6%	0,698	8	57,1%	26	76,5%	0,582	14	82,4%	27	73,0%	0,454
Não	9	29,0%	18	25,4%		6	42,9%	8	23,5%		3	17,6%	10	27,0%	
<b>Castelli 1</b>															
Sem risco	19	61,3%	45	60,8%	0,963	9	64,3%	19	52,8%	0,462	10	58,8%	26	68,4%	0,489
Com risco	12	38,7%	29	39,2%		5	35,7%	17	47,2%		7	41,2%	12	31,6%	
<b>Castelli 2</b>															
Sem risco	22	73,3%	50	70,4%	0,768	11	78,6%	20	58,8%	0,822	11	68,8%	30	81,1%	0,325
Com risco	8	26,7%	21	29,6%		3	21,4%	14	41,2%		5	31,3%	7	18,9%	
<b>IAP</b>															
Baixo risco	6	20,0%	6	8,5%	0,101	4	28,6%	2	5,9%	0,194	2	12,5%	4	10,8%	0,859
Risco elevado	24	80,0%	65	91,5%		10	71,4%	32	94,1%		14	87,5%	33	89,2%	
<b>PCR</b>															
Baixo risco	13	44,8%	8	11,6%	<b>0,000</b>	8	66,7%	4	11,4%	<b>0,001</b>	5	29,4%	4	11,8%	<b>0,016</b>
Risco elevado	16	55,2%	61	88,4%		4	33,3%	31	88,6%		12	70,6%	30	88,2%	

Legenda: IAP – índice aterogênico plasmático; PCR – proteína C reativa; \*p<0,05, teste exato de Fisher ou qui-quadrado de Pearson.

Fonte: própria.

**Tabela 16** - Valores médios e desvios-padrões de variáveis bioquímicas e laboratoriais na população total, casos e controles, em relação à presença ou ausência do alelo E4.

	Total				p	Controles				p	Casos				
	Presença E4		Ausência E4			Presença E4		Ausência E4			Presença E4		Ausência E4		
	Média	DP	Média	DP		Média	DP	Média	DP		Média	DP	Média	DP	
HDL	208,52	54,24	199,69	41,59	0,368	218,82	64,62	202,58	38,74	0,252	196,00	36,65	196,64	44,75	0,962
Triglicérides	52,71	12,24	49,05	10,79	0,131	52,24	10,73	51,00	9,66	0,674	53,29	14,26	47,00	11,65	0,114
LDL	157,39	96,45	138,15	98,75	0,361	160,24	117,91	129,76	72,50	0,244	153,93	65,82	147,00	120,94	0,841
Castelli 1	0,35	0,20	0,36	0,30	0,815	0,41	0,13	0,37	0,15	0,412	0,29	0,24	0,36	0,41	0,551
Castelli 2	124,24	48,66	123,16	32,75	0,896	136,93	53,81	123,74	32,48	0,275	109,74	38,95	122,53	33,51	0,258
IAP	2,44	0,93	2,50	1,10	0,794	2,66	0,80	2,40	0,83	0,300	2,19	1,04	2,61	1,33	0,304
PCR	4,09	1,14	4,26	1,26	0,536	4,26	1,08	4,10	1,10	0,635	3,90	1,22	4,42	1,40	0,228

Legenda: HDL – *high density lipoprotein*; LDL – *low density lipoprotein*; IAP – índice aterogênico plasmático; PCR – proteína C reativa; DP – desvio-padrão. \* $p < 0,05$ , teste exato de Fisher ou qui-quadrado de Pearson.

Fonte: própria.

#### 4.6 FATORES DE RISCO RELACIONADOS AO EXAME ULTRASSONOGRÁFICO DAS CARÓTIDAS

Placa ateromatosa na artéria carótida direita foi identificada em 19 indivíduos (13,5%) e 15 (10,6%) no lado esquerdo, sem diferença estatística entre casos e controles. A análise de correlação foi realizada entre os fatores de risco para doenças ateroscleróticas, para se verificar associação ou relação de risco entre os fatores de risco que possam estar correlacionados ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares e metabólicas de acordo com os resultados do exame ultrassonográfico de Doppler das carótidas e a espessura da camada mediointimal da carótida (EMI).

Entre as variáveis antropométricas, a circunferência da cintura mostrou uma forte e direta correlação com o aumento da EMI da carótida esquerda ( $r = 0,90$ ,  $p = 0,05$ ) nos portadores de E2 (**Figura 21 e Tabelas 17 a 21 – material suplementar**).

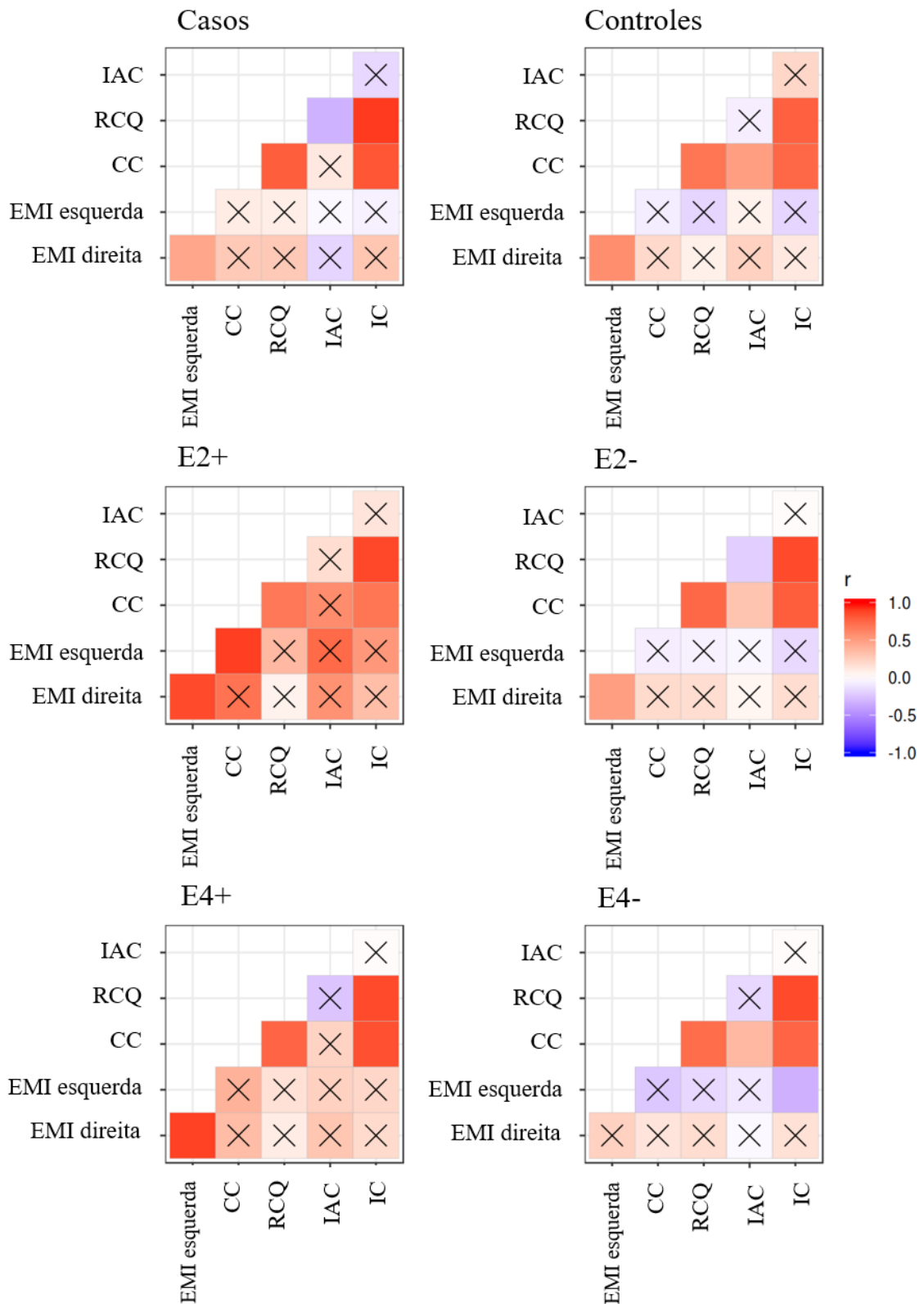
Não houve correlação entre os fatores de risco bioquímicos e laboratoriais com EMI na população total, nos casos e nos controles, entretanto, observou-se que o colesterol total se correlacionou moderadamente forte e direto com o LDL ( $r = 0,92$ ,  $p = 0,00$ ), triglicérides ( $r = 0,56$ ,  $p = 0,00$ ), índice de Castelli 1 ( $r = 0,53$ ,  $p = 0,00$ ) e Castelli 2 ( $r = 0,46$ ,  $p = 0,01$ ) e índice aterogênico plasmático ( $r = 0,57$ ,  $p = 0,00$ ), nos casos (**Figura 22 e Tabelas 17 a 21 – material suplementar**).

Em E4, o colesterol total também se correlacionou com os valores séricos de LDL ( $r = 0,94$ ,  $p = 0,00$ ), índice de Castelli 1 ( $r = 0,58$ ,  $p = 0,00$ ) e Castelli 2 ( $r = 0,65$ ,  $p = 0,00$ ) e índice aterogênico plasmático ( $r = 0,63$ ,  $p = 0,00$ ) (**Figura 22 e Tabelas 17 a 21 – material suplementar**).

Considerando apenas os casos, não foi possível identificar uma correlação significativa dos fatores de risco antropométricos com a EMI direita e esquerda, embora tenham apresentado correlações entre eles. Para os portadores de E4, o HDL foi inversamente correlacionado com a EMI direita ( $r = -0,75$ ,  $p = 0,07$ ) (**Figuras 23 e 24 e Tabelas 22 a 29 – material suplementar**).

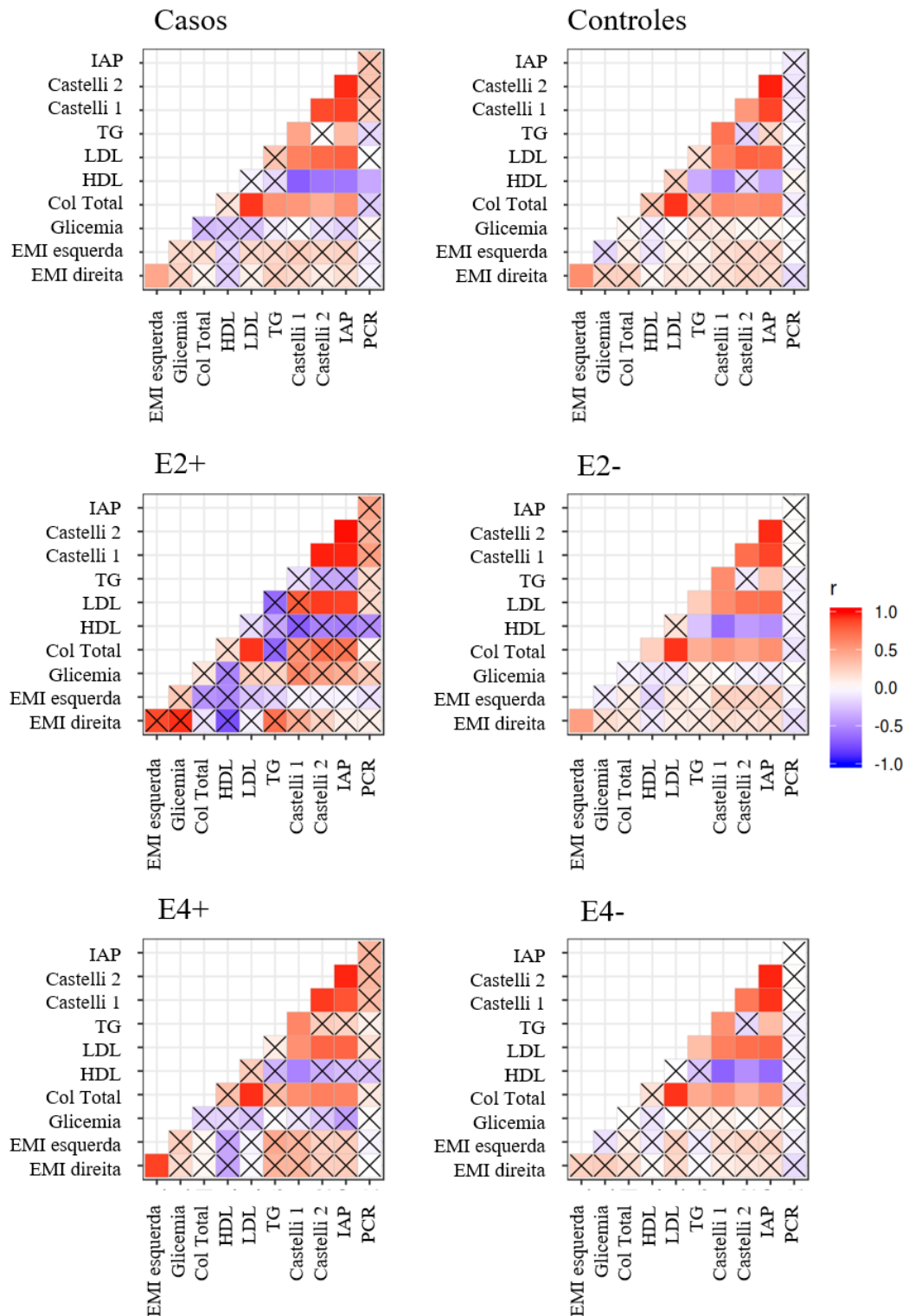


**Figura 21** - Mapas de calor de correlação de variáveis antropométricas de risco com valores de EMI das artérias carótidas direita e esquerda.



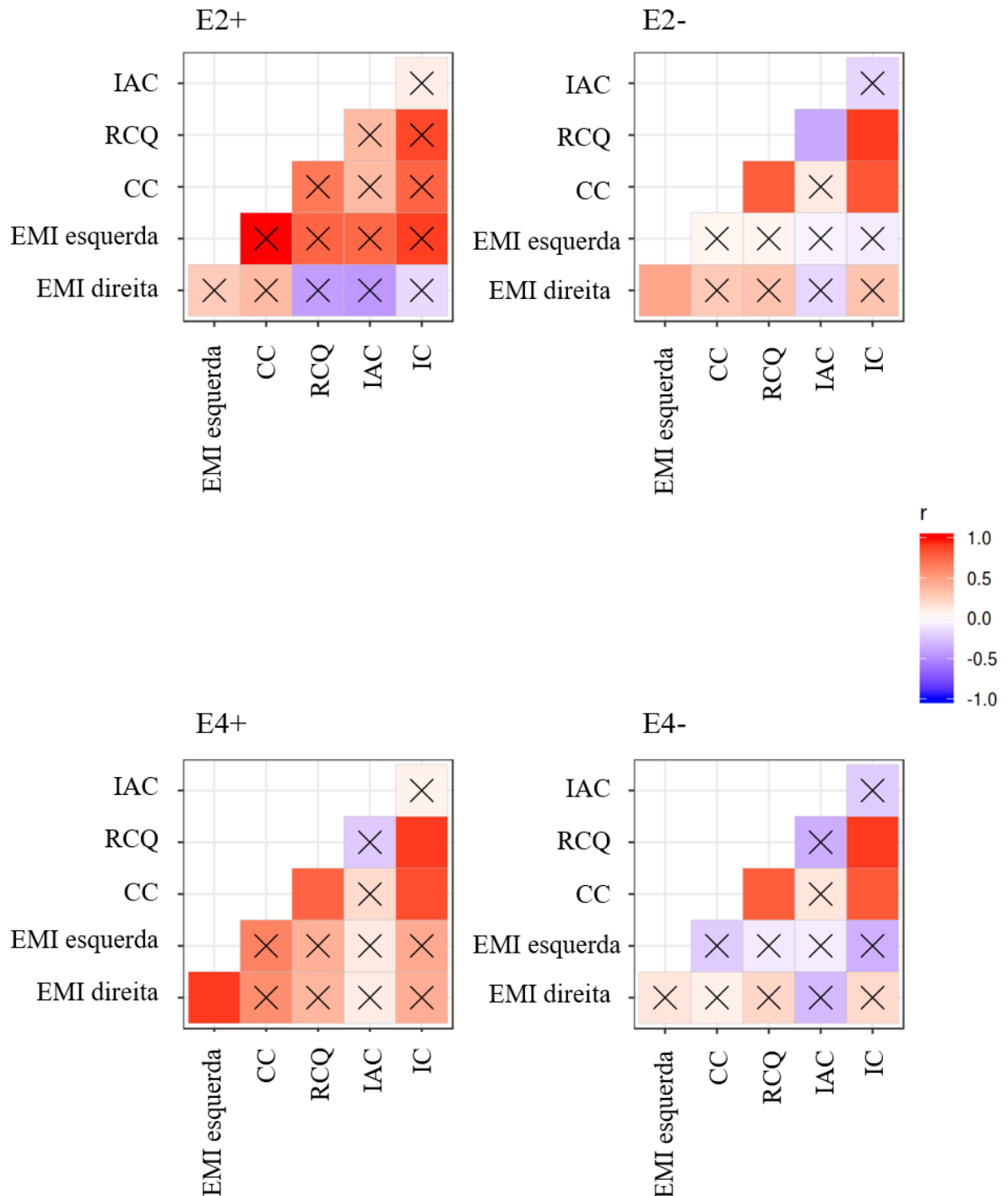
Legenda: IAC - índice de adiposidade corporal; DCT - dobra cutânea tricípital; RCQ - razão cintura quadril; CC - circunferência da cintura; EMI - espessura mediointimal da carótida; IC - índice de conicidade. E4+ e E2+: carreadores dos alelos E4 e E2, especificamente; E4- e E2-: não-carreadores dos alelos. X – não encontrada diferença significativa. Fonte: própria.

**Figura 22** - Mapas de calor de correlação das variáveis bioquímicas e laboratoriais com valores de EMI das artérias carótidas direita e esquerda.



Legenda: IAP - índice aterogênico do plasma; Castelli-2 - índice Castelli 2; Castelli-1 - índice Castelli 1; TG - triglicerídeos; LDL - lipoproteína de baixa densidade; HDL - lipoproteína de alta densidade; Col Total - colesterol total; EMI - espessura mediointimal da carótida; PCR - Proteína C reativa. E4+ e E2+: carreadores dos alelos E4 e E2, especificamente; E4- e E2-: não-carreadores dos alelos. Fonte: própria.

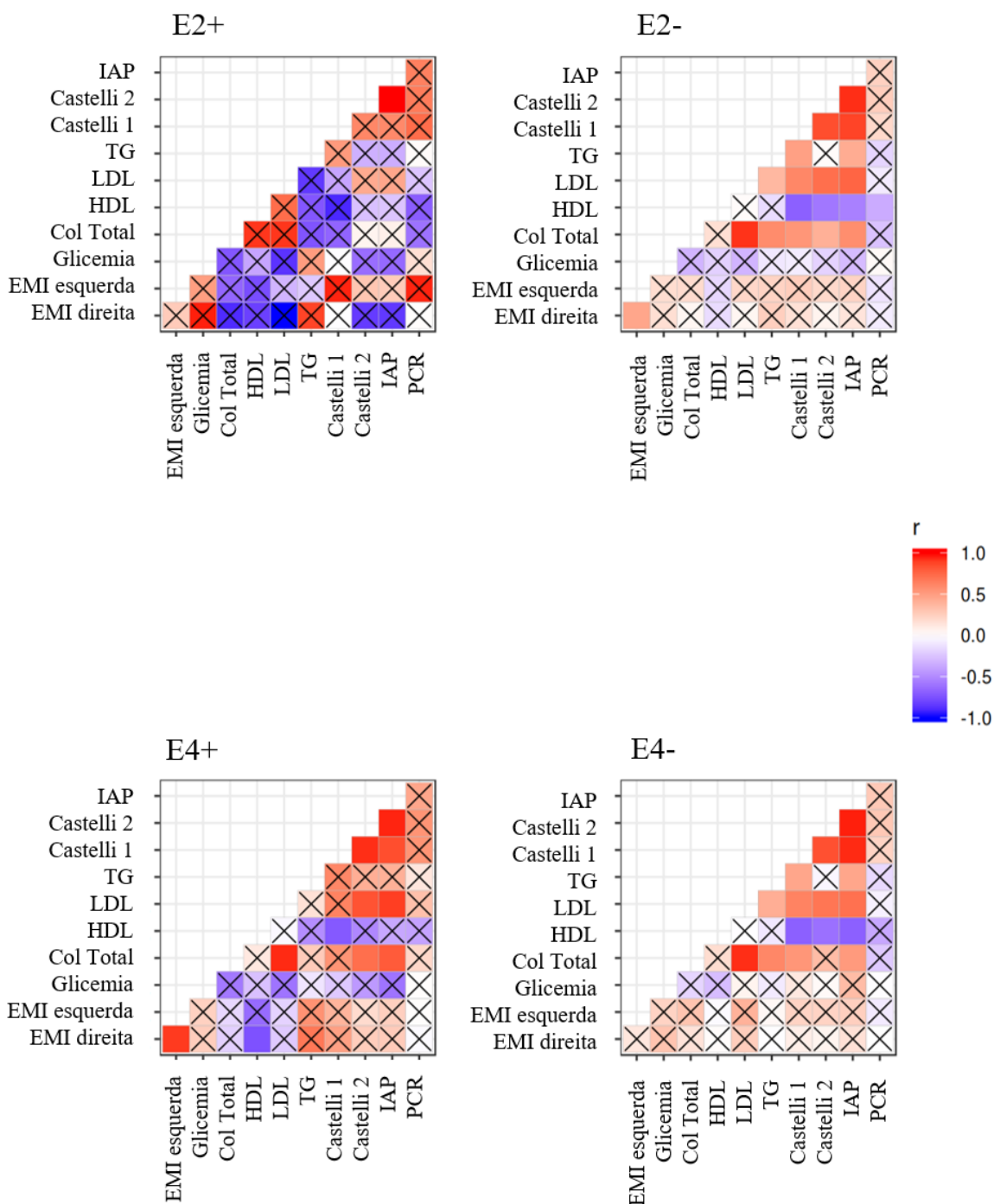
**Figura 23** - Mapas de calor de correlação de variáveis antropométricas de risco com valores de artéria carótida direita e esquerda da EMI nos casos.



Legenda: IAC - índice de adiposidade corporal; DCT - dobra cutânea tricípital; RCQ - razão cintura quadril; CC - circunferência da cintura; EMI - espessura mediointimal da carótida; IC - índice de conicidade. E4+ e E2+: carreadores dos alelos E4 e E2, especificamente; E4- e E2-: não-carreadores dos alelos.

Fonte: própria.

**Figura 24** - Mapas de calor de correlação das variáveis bioquímicas e laboratoriais com valores de artéria carótida direita e esquerda da EMI nos casos.



Legenda: IAP - índice aterogênico do plasma; Castelli-2 - índice Castelli 2; Castelli-1 - índice Castelli 1; TG - triglicerídeos; LDL - lipoproteína de baixa densidade; HDL - lipoproteína de alta densidade; Col Total - colesterol total; EMI - espessura mediointimal da carótida; PCR - Proteína C reativa. E4+ e E2+: carreadores dos alelos E4 e E2, especificamente; E4- e E2-: não-carreadores dos alelos.

Fonte: própria.

#### 4.7 ANÁLISE DE RISCO PARA ESPESSAMENTO DA EMI DE ACORDO COM O POLIMORFISMO DA APOE

Para os casos portadores de E4, foi possível identificar um risco 4,2 vezes maior de apresentar EMI igual ou acima de 1,0 mm, por meio da análise de regressão multilinear (OR = 4,17; IC95% = 1,17 - 14,95; e valor de p = 0,028), e entre os controles, esse risco é ainda maior (OR = 8,97; IC95% = 1,23 – 65,21; e valor de p = 0,030), quando comparados com os não portadores de E4 (**Tabela 30**).

Para os portadores de E2, o efeito protetor foi identificado apenas em controles (OR = 0,23; IC95% = 0,06 – 0,85; e valor de p = 0,028), não sendo possível identificar alteração no risco entre os casos com E2 (**Tabela 30**).

**Tabela 30.** Regressão entre controles e casos dos fatores de risco para doenças cardiovasculares, de acordo com a distribuição alélica da ApoE.

Regressão múltipla	EMI ≥ 1,0 mm									
	Controles				Casos					
	OR	p	IC95%	OR	p	IC95%	OR	p	IC95%	
<b>Perfil genético</b>										
APOE4+	8,97	0,030	1,23	65,21	4,17	0,028	1,17	14,95		
APOE2+	0,23	0,028	0,06	0,85	1,04	0,969	0,12	9,12		
<b>Perfil metabólico</b>										
Glicemia > 100 mg/dL	0,25	0,228	0,02	2,41	1,45	1,000	0,14	1,45		
LDL > 100 mg/dL	1,29	1,000	0,01	12,90	0,32	0,304	0,04	2,80		
HDL baixo	0,66	0,667	0,10	4,37	0,64	0,592	0,12	3,32		
Triglicerídeos > 150 mg/dL	1,06	0,949	0,16	7,27	0,46	0,455	0,06	3,52		
Colesterol total > 200 mg/dL	0,37	0,390	0,04	3,55	2,27	0,420	0,31	16,58		
<b>Risco aterogênico</b>										
Castelli 1 (risco)	2,80	0,495	0,15	53,71	1,32	0,834	0,10	18,11		
Castelli 2 (risco)	2,00	0,615	0,13	29,81	0,88	0,925	0,06	13,09		
IAP	1,65	1,000	0,16	16,50	6,32	1,000	0,63	16,32		
PCR	7,42	0,998	0,07	7,42	0,40	0,441	0,04	4,09		
Presença de placa	0,12	0,004	0,03	0,51	0,24	0,084	0,05	1,21		
<b>Parâmetros antropométricos</b>										
IMC > 25 Kg/m <sup>2</sup>	1,40	1,000	0,14	14,20	3,66	0,475	0,10	129,13		
CC (Risco alto)	2,52	1,000	0,02	20,20	0,17	0,311	0,01	5,14		
RCQ (Risco)	0,25	1,000	0,25	0,25	1,07	0,979	0,01	147,51		
IAC (Risco)	0,14	1,000	0,01	14,20	0,67	0,848	0,01	37,46		
Classificação IC	0,20	1,000	0,01	2,32	2,85	0,558	0,09	94,11		

*Continua...*

Continuação da Tabela 30.

Regressão	EMI $\geq$ 1,0 mm							
	Controles			Casos				
	OR	p	IC95%	OR	p	IC95%		
<b>Parâmetros periodontais</b>								
Presença de Sangramento gengival	1,18	0,797	0,33	4,17	0,92	0,905	0,25	3,36
Presença de mobilidade dentária	0,80	0,791	0,16	4,03	1,18	0,804	0,31	4,49
Profundidade Sondagem > 5 mm	1,23	1,00	0,32	1,92	0,61	1,00	0,14	2,25

Legenda: EMI – espessura da camada médio-intimal; O.R. – *odds ratio*; IC 95% - intervalo de confiança de 95%; IAP – índice aterogênico plasmático; PCR – proteína C reativa; IMC – índice de massa corporal; CC – circunferência da cintura; RCQ – relação cintura quadril; IAC – índice de adiposidade corporal; IC – índice de conicidade. Fonte: própria.



## 5 DISCUSSÃO

Neste estudo caso-controle transversal, foi possível identificar a frequência alélica da apolipoproteína E (ApoE) e correlacionar com fatores de risco para doenças cardiovasculares (DCV), sendo eles bioquímicos, nutricionais e clínicos, em pacientes com doença periodontal (DP), em relação aos controles sem DP, baseados no risco de desenvolver placa aterosclerótica com aumento da espessura mediointimal (EMI) das carótidas, por meio de exame de ultrassom modo B. Além disso, esse trabalho procurou investigar o efeito dos alelos da APOE como fator preditor de aterosclerose subclínica, numa população de meia idade (35-55 anos), com ou sem doença periodontal. Dessa forma, possibilitando identificar grupos de risco para intervenção precoce, com intuito de prevenir a progressão da doença aterosclerótica, seguindo as diretrizes das políticas públicas do Sistema Único de Saúde no Brasil.

Apesar de que muitos estudos documentarem que o alelo E4 da APOE é um preditor para aterosclerose subclínica, medida pela espessura da camada mediointimal das carótidas comuns, nenhum estudo foi encontrado até o momento, investigando o efeito do polimorfismo da APOE e sua relação com a aterosclerose subclínica em pacientes com doença periodontal.

Características sociodemográficas, fatores de risco antropométricos nutricionais (circunferência da cintura, razão cintura-quadril, percentual de gordura, índice de conicidade, entre outros), parâmetros lipídicos (colesterol total, LDL, triglicerídeos, além de índices de risco aterosclerótico, incluindo os índices de Castelli 1, 2 e o índice aterogênico plasmático) foram correlacionados com o polimorfismo da APOE em pacientes com doença periodontal e seus controles.

De acordo com uma meta-análise recentemente publicada (COLPANI et al., 2018)., incluindo 59 estudos de coorte envolvendo 5.358.902 mulheres, avaliando os fatores de estilo de vida modificáveis (fumo, atividade física, ingestão de álcool, e obesidade) com doenças cardiovasculares e mortalidade em mulheres de meia idade e idosas, verificou-se que cada 5,0 kg/m<sup>2</sup> de aumento nos valores de IMC foi associado a 24% de maior risco para todas as causas de mortalidade, fato importante ao considerar que a maioria (65,9%) da população no presente estudo apresentou valores de IMC elevados, característica de excesso de peso (sobrepeso e obesidade), independentemente da existência de doença periodontal, além de outros marcadores de obesidade visceral, como circunferência da cintura e razão cintura quadril elevados. Uma



meta-análise sistemática recente reforça que a obesidade é um fator de risco para doenças cardiovasculares agudas (ZHAO et al., 2017).

O estudo de Çalapkorur et al. (2017) não encontrou diferenças significativas em relação ao sexo, idade e índice de massa corporal (IMC), nem entre os parâmetros bioquímicos, entre os grupos que tinham doenças arteriais periféricas, associados à doença periodontal, entretanto, a análise de regressão logística revelou que a periodontite elevou a chance de risco para estas doenças em 5,84 vezes (IC 95% de 1,558-21,909), após correção pelos fatores de confusão. Variáveis clínicas periodontais, antropométricas e bioquímicas podem aumentar o risco para desenvolver doença arterial na presença de periodontite, o que já pode aumentar com uma higiene oral inadequada ou pobre, como descrito por Yu et al (YU et al., 2014).

Em um recente estudo de Goulart et al., avaliando fatores de risco cardiovascular em pacientes com doença periodontal (DP) em São Paulo – Brasil, não identificou associação significativa entre os fatores de risco cardiovascular e doença periodontal, apesar de ter encontrado entre todos os fatores de risco avaliados, a obesidade foi associada com periodontite (OR = 2,36) (GOULART et al., 2017).

Nesse estudo, a maioria dos indivíduos é portador de E3 (80,65%), alelo mais comum na população geral (THIFALT et al., 2013), sendo que o genótipo E3/E3 foi o mais prevalente, sem diferença entre os casos e controles estudados. Aproximadamente 15% dos adultos estudados apresentaram o alelo E4, também sem diferença significativa entre os casos e os controles. Essa prevalência é semelhante ao que foi encontrado por Oriá et al. (ORÍÁ et al., 2010), que avaliaram o polimorfismo da APOE em 123 crianças com diferentes morbidades para desnutrição e doenças diarreicas no Ceará. Esses autores identificaram uma frequência de 13,4% para o alelo E4.

A falta de associação significativa entre os alelos da APOE e parâmetros lipídicos de risco em pacientes com doença periodontal, desse estudo, são corroborados pela literatura. Um estudo caso-controle de Borilova Linhartova et al., envolvendo 469 indivíduos caucasianos, avaliou o polimorfismo da APOE em pacientes com doença periodontal, de acordo com o *International Workshop for the Classification of Periodontal Diseases and Conditions for Chronic Periodontitis* (ARMITAGE, 2004). Esse estudo avaliou 175 controles e 294 casos com DP, com média de idade de 43 e 50 anos, respectivamente. A frequência alélica encontrada de

E4 entre os controles foi de 10,3%, enquanto que nos casos foi de 9,9%, com a maioria de E3 (em torno de 83%) e minoria de E2 (em torno de 7%), sem diferença estatística entre casos e controles, semelhante ao encontrado neste estudo. Também não foi identificada uma associação entre os alelos da APOE e a periodontite; também não foi encontrada correlação entre os alelos da APOE e níveis séricos de LDL entre os controles e os casos (BORILOVA LINHARTOVA et al., 2014). Entretanto, existem poucos estudos que avaliaram o polimorfismo da APOE em pacientes com doença periodontal e sua associação com fatores de risco cardiovascular.

A presença do alelo E4 e sua relação com o edentulismo foram avaliadas por Bergdahl et al. (2008), com 1.860 indivíduos, maioria mulheres (58%), em um estudo coorte no Norte da Suécia, dentre eles 1.321 eram dentados e 539 edêntulos, esses últimos de maior faixa etária. A frequência alélica da APOE encontrada por Bergdahl et al. foi semelhante a este estudo, sendo que esses autores encontraram uma frequência de 76,4% para o alelo E3 e 15,8% para o alelo E4, na população total. Interessantemente, o alelo E4 foi encontrado em maior prevalência entre os edêntulos (18%) do que nos dentados (13,3%), sugerindo que os portadores do E4 têm maior risco de perda dentária, especialmente com o aumento da idade ( $\geq 65$  anos).

No presente estudo, apesar do polimorfismo da APOE não se correlacionar com o autorrelato de mobilidade dentária (significativamente mais relatadas entre os casos) em pacientes com doença periodontal, foi possível identificar maior prevalência do alelo E4 nos pacientes que relataram histórico familiar de doença periodontal.

O aumento da espessura da camada mediointimal das carótidas comuns (EMI) pode ser preditor da doença vascular periférica e eventos cardiovasculares (CHENG et al., 2002). Com auxílio da ultrassonografia no modo B, é possível a identificação precoce de pacientes com aterosclerose subclínica, conseqüentemente, o início do tratamento e prevenção da doença aterosclerótica. No presente estudo, o exame ultrassonográfico modo B permitiu identificar indivíduos assintomáticos com placa de ateroma nas carótidas direita (13,5%) e esquerda (10,6%), sem diferença estatística entre casos e controles. Esses pacientes foram encaminhados para o serviço especializado.

A associação do genótipo E4/E4 com espessura da camada mediointimal foi identificada por Wohlin et al. (2007), em 437 homens idosos (de 75 anos) ao serem avaliados por ultrassonografia modo B e encontraram valores médios maiores de EMI em homozigotos

E4 ( $0,86 \pm 0,16$  mm) quando comparados aos não carreadores de E4 ( $0,73 \pm 0,19$  mm) ( $p = 0,0001$ ). Desta forma, os resultados sugerem que é um alelo de risco para doença aterosclerótica. Corroborando o Wholin et al., foi observado risco aumentado em 4,17 e 8,97 vezes de apresentar  $EMI \geq 1,0$  mm nos casos e controles portadores do alelo E4, respectivamente, sugerindo que este efeito do alelo E4 independe da presença de doença periodontal.

Alguns trabalhos têm demonstrado que em portadores E4, os níveis séricos de HDL foram inversamente correlacionados com a EMI da carótida comum direita. Sabe-se que o perfil sérico das lipoproteínas (LDL e HDL) influencia diretamente no risco de desenvolver processos ateroscleróticos, e os triglicerídeos também carregam lipoproteínas, especialmente as LDL, que, quando pequenas e densas, tornam-se uma molécula altamente aterogênica, impactando no acúmulo dentro vasos sanguíneos e que podem estar relacionados ao aumento da espessura íntima-média carotídea (OLUSI; GEORGE, 2011; KHOVIDHUNKIT et al., 2004).

O estudo de Ukkola et al. em 526 indivíduos de meia-idade, identificou que os fenótipos da ApoE estavam associados significativamente com a idade ( $p < 0,01$  para a diferença entre E2<E3), colesterol total e LDL ( $p < 0,01$  entre E2 < E3 ou E4), HDL-colesterol ( $p < 0,05$  entre E2 > E4) e média de EMI das carótidas comuns ( $p < 0,01$  entre E2 < E3 ou E4), sendo que, após ajuste, o fenótipo ApoE não foi associado ao aumento da EMI (UKKOLA et al., 2009).

Um estudo recente de Natarajan et al. documentou que carreadores do alelo E2 (p.Arg176Cys) apresentaram uma reduzida calcificação da artéria coronariana medida por ultrassonografia em 22,3% ( $p < 0,000$ ) e uma redução de 1,4% na EMI da carótida comum ( $p < 0,000$ ) quando comparados aos não portadores de E2, sendo que, após ajustar pela concentração de LDL, essa associação se atenuou, mas permaneceu fortemente significativa, indicando ser um fator protetor para doença cardiovascular (OR 0,77) (NATARAJAN et al., 2016).

O efeito preditor do aumento da espessura mediointimal das carótidas pela presença do alelo E4 nesta população parecer ser indiferente à doença periodontal e às alterações dos parâmetros lipídicos. Também, não podemos refutar que uma combinação de fatores de risco independentes possa levar à aterosclerose subclínica. É importante salientar que a população

estudada apresenta vários indicadores de risco elevado para doença cardiovascular, independente de aspectos genéticos analisados, que podem estar associada com a obesidade (ZHAO et al., 2017) e/ou excesso de gordura corporal, aumentando o risco para infarto agudo do miocárdio (VÉGH et al., 2012), acidente vascular cerebral isquêmico (BUDZIKOWSKI; VESELI, 2017; ZHAO et al., 2017) ou doença arterial periférica (KOOPAL et al., 2016).

Analisar isoladamente a expressão do alelo E4 da ApoE pode ser insuficiente para encontrar associação forte para o aumento da EMI neste contexto, mesmo associando à outra doença de base inflamatória, como a doença periodontal, entretanto, indivíduos com E4 podem apresentar aumento da espessura da camada mediointimal da carótida independente de outros fatores como fatores demográficos e de risco cardiovascular, como os níveis séricos de LDL (DOLINER et al., 2018).

A literatura sugere que o risco para desenvolver doença coronariana é significativamente reduzido em indivíduos portadores de E2 em comparação aos não portadores desse alelo, em diferentes etnias. Os portadores do alelo E2 apresentam níveis mais baixos de colesterol total e triglicerídeos, dessa forma com menor risco cardiovascular. Entretanto, alguns indivíduos homozigotos E2/E2 podem desenvolver a hiperlipoproteinemia tipo III (BENNET et al., 2007). No presente estudo, corroborando com a literatura, identificamos maiores níveis séricos de LDL-c e índice de Castelli 1 e menores níveis de HDL-c, nos casos com doença periodontal sem E2 (mas não na população total e nem nos controles). Dessa forma, sugerindo que o alelo E2 é um fator protetor em pacientes com doença periodontal, nesses parâmetros de risco cardiovascular.

Os níveis séricos ou plasmáticos da proteína C-reativa ultrasensível (PCR-us) têm sido utilizados como marcador de inflamação sistêmica em diferentes populações (AARABI et al., 2015). A PCR-us é uma proteína de resposta de fase aguda no fígado, sendo elevada de forma inespecífica, em processos inflamatórios. Nesse estudo, foi observada uma maior frequência do alelo E4 em pacientes com níveis séricos de PCR-us, considerados de baixo de risco para doença cardiovascular tanto na população total, como em casos e controles. Esse resultado foi considerado inesperado, já que vários estudos têm demonstrado que a APOE4 tem efeito pró-inflamatório, levando a um pior prognóstico em pacientes com traumatismo craniano e doença de Alzheimer (MAHLEY, 2016). Entretanto, a presença do alelo E4 foi correlacionada negativamente aos níveis plasmáticos de PCR-us, mesmo quando ajustados para idade, sexo,

IMC e tabagismo ( $p = 0,033$ ), principalmente entre as mulheres de meia idade da população do estudo de coorte *Oulu Project Elucidating Risk of Atherosclerosis* (OPERA) (UKKOLA et al., 2009).

Um trabalho recente de Doliner e colaboradores, estudando uma subamostra de um estudo epidemiológico nos EUA, com 1243 indivíduos, média de idade de 70 anos, mostraram que o alelo APOE4 foi considerado um fator de risco para  $EMI \geq 1,0$  mm independentemente da existência de outras doenças inflamatórias e/ou associadas à alteração nos valores de PCR sérico e outros fatores de risco, como LDL (DOLINER et al., 2018).

O índice aterogênico plasmático (IAP), que é a transformação logarítmica do nível de triglicérides plasmáticos (TG) para o nível de lipoproteínas de alta densidade (HDL), tem sido sugerido como um importante marcador na identificação do risco de aterosclerose e pode ser usado como um indicador independente para aterosclerose subclínica em doenças inflamatórias crônicas, incluindo lúpus eritematoso sistêmico (ÍNDEKS; LUPUS; SUBKLINIK, 2017), diabetes mellitus tipo 2 (ZHU; DENG; LEI, 2014), doença renal crônica (YILDIZ et al., 2013), espondilite anquilosante (CURE et al., 2018) e preditor de eventos cardiovasculares e de alta pressão (KAYA; ONAT, 2010), como a aterosclerose (TUTTOLOMONDO et al., 2012).

No presente estudo, portadores de E2 na população total apresentaram correlação positiva com EMI da carótida comum esquerda com circunferência de cintura, entretanto, não houve diferença entre casos e controles, sugerindo que a existência de doença periodontal não é fortemente associada ao desenvolvimento de doença aterosclerótica subclínica nessa população. Em contrapartida, Koopal et al. (2016) demonstraram que o genótipo E2E2 foi significativamente associado a uma redução no índice de tornozelo-braço (OR 1,54; IC95% 1,01-2,17), além de apresentar alto risco para doença arterial periférica (OR 2,31; IC95% 1,29-4,12), comparado com  $\epsilon 3\epsilon 3$ , ao avaliar 7.418 pacientes do estudo *Secondary Manifestations of ARterial disease* (SMART), um estudo de coorte prospectivo para avaliar doença cardiovascular.

Demmer et al. (2008) estudando uma população de indivíduos no Norte da Alemanha, de 29-79 anos, encontraram uma associação com o aumento da EMI da carótida comum com perda de inserção ( $PI \geq 6,0$  mm) em homens. Entre as mulheres, percentual de

sítios de profundidade de bolsa  $\geq 5,0$  ou  $6,0$  mm teve uma maior correlação com a EMI. No presente estudo, não encontramos a correlação da EMI com a severidade da doença periodontal. Entretanto, o reduzido número de pacientes com profundidade de bolsa  $\geq 5,0$  ou  $6,0$  mm nesse estudo pode ter mascarado esse resultado.

Beilby et al. (2003) sugerem que a presença do alelo E4 foi significativa e positivamente associada aos níveis de LDL e ao aumento do risco de formação de placas na carótida. Existem relações diretas de genótipos de ApoE, principalmente E4, com níveis de LDL e risco coronariano (MAHLEY, 2016), também encontradas no presente estudo, já que a presença do E4 aumentou o risco para espessamento mediointimal da carótida, o que pode ser um indício do desenvolvimento de placa ateromatosa.

Em comparação com indivíduos com o genótipo E3E3, os portadores de E2 têm um risco 20% menor de doença coronariana e os portadores E4 têm um risco ligeiramente maior (BENNET et al., 2007), como identificado neste estudo, onde os casos de portadores de E4, o risco 4,2 vezes maior de apresentar EMI acima de 1,0 mm foi observado por análise de regressão.

O alelo E4, por estar associado a níveis séricos aumentados de colesterol total, LDL e apolipoproteína B, pode levar à ativação de células endoteliais e desencadear resposta inflamatória, recrutamento de macrófagos e formação de placa ateromatosa, levando à aterosclerose e outras doenças cardiovasculares (EICHNER et al., 2002), e pode ter esse processo intensificado na presença de outras doenças inflamatórias, como a doença periodontal (HUEBBE et al., 2011); mesmo na ausência de níveis séricos de risco para DCV, como valores de PCR séricos (TAPASHETTI et al., 2014), semelhante ao presente estudo.

Embora este estudo apresente como limitações os dados transversais de caso controle; um valor amostral relativamente reduzido, quando comparado a outros estudos envolvendo polimorfismos genéticos, ele apresenta pontos fortes, incluindo um banco de dados mais completo com todos testes e parâmetros avaliados e sua relação com achados ultrassonográficos em pacientes com doença periodontal. Além disso, é o único que realizou a genotipagem da APOE em pacientes no Ceará, e avaliou a relação de fatores de risco cardiovascular e sua associação com aterosclerose subclínica em pacientes com doença

periodontal. Outra limitação do estudo foi a ausência de informações associadas à menopausa no instrumento de coleta de dados.

São necessários, portanto, mais estudos clínicos com uma amostra maior de indivíduos e com acompanhamento longitudinal (estudo de coorte, por exemplo) para avaliar o efeito dos alelos da APOE em pacientes com doenças inflamatórias orais, como a doença periodontal, e relacionar com a severidade e sua associação com aterosclerose subclínica. Além disso, seria importante avaliar o efeito dos alelos da APOE na microbiota oral e sua associação com inflamação sistêmica e aterosclerose subclínica nesses pacientes.

Os resultados desse estudo podem ser utilizados para guiar o desenvolvimento de pesquisas futuras, para se investigar mais fortemente a associação dos polimorfismos da APOE e os fatores de risco para doenças cardiovasculares em pacientes que apresentem graus diferentes de doença periodontal.

Em suma, concluímos que seria importante destacar a inovação deste trabalho, em relação aos aspectos de prevenção e possível redução do custo hospitalar pela identificação de grupos de risco, inserindo na atenção básica recursos de triagem nutricional, para precocemente diagnosticar os indivíduos com riscos potenciais de desenvolver doenças cardiovasculares e metabólicas, dentre aqueles que são atendidos pela atenção básica em saúde bucal.

Como testes genéticos e de identificação de polimorfismos ainda não fazem parte da realidade no Sistema Único de Saúde (SUS), podemos, então, inserir estratégias de triagem pelos fatores de risco odontológicos e nutricionais, além da realização de exame ultrassonográficos prévios, quando possível, na tentativa de precocemente se estimar o risco de desenvolvimento de doença aterosclerótica em pacientes com doença periodontal moderada e severa.





## 6 CONCLUSÃO

Neste estudo caso controle transversal, avaliando o polimorfismo da ApoE com fatores de risco aterosclerótico em pacientes com doença periodontal, é possível chegar às seguintes achados:

- Foi possível identificar que a maioria era do sexo feminino, com idade média de 45 anos, predominantes da capital (Fortaleza/CE) e na maioria casados e/ou com união estável, sem diferença significativa entre casos e controles, excetuando em relação à renda mensal, que os controles apresentaram renda média maior do que os casos;
- O alelo E3 foi o mais prevalente, como esperado na população, com o genótipo E3/E3 prevalente em cerca de 67%, também sem diferença significativa entre os portadores de doença periodontal (casos) e os saudáveis (controles);
- Identificou-se uma mobilidade mais acentuada nos casos, enquanto que os portadores de E4 referiram, em proporção maior, terem sido submetidos à tratamento odontológico prévio, assim como também apresentaram maior prevalência com histórico familiar de doença periodontal;
- A maioria dos pacientes apresentava com excesso de peso (sobrepeso e obesidade), sem diferença entre casos e controles, assim como pelo polimorfismo da ApoE identificado, com a maior parte da população com a circunferência da cintura de risco para desenvolvimento de doenças cardiovasculares e com o índice de adiposidade corporal com excesso de peso na maioria da população estudada, sem diferença estatística entre casos e controles;
- Os valores do perfil bioquímico da população apresentaram LDL sérico acima de 100ml/dL e HDL abaixo dos valores desejáveis na maioria da população, sem diferença entre casos e controles, assim como não houve diferença entre os índices Castelli 1, 2 e o índice aterogênico plasmático (IAP), sendo este último com cerca de 88% da população com classificação de risco muito alto para desenvolvimento de processo aterosclerótico;
- Em relação ao polimorfismo da ApoE, os valores de proteína C reativa se apresentaram mais elevados em pacientes com E4, tanto nos casos como nos controles, apresentando maiores prevalências de risco moderado e elevado na maioria da população, demonstrando que o alelo pode influenciar na inflamação sistêmica e predizer o risco para desenvolvimento de eventos cardiovasculares, e que a presença de E2 pode ser

protetora, visto que foi encontrada uma maior parte da população com baixo risco nos indivíduos com doença periodontal e que carregavam o alelo E2;

- O HDL apresentou-se com valores médios maiores nos casos com E2, que também apresentaram valores de LDL reduzidos quando comparados aos que não tinham E2. Também foi possível identificar um menor valor médio do índice de Castelli 1 entre os casos com E2 do que entre aqueles sem E2;
- Foi identificada placa ateromatosa em 13,5% na carótida do lado esquerdo e 10,6% no lado direito, sendo que a circunferência da cintura mostrou uma forte e direta correlação com o aumento da espessura da camada íntima-média (EMI) esquerda em portadores de E2;
- Não foi encontrada correlação de risco nas variáveis bioquímicas e com o aumento da espessura da EMI, sendo encontradas apenas correlações entre as variáveis entre si, como o colesterol total com o LDL, triglicerídeos, índice de Castelli 1 e 2, e o IAP, nos casos e carreadores do alelo E4; e
- Neste estudo caso-controle, foi possível identificar que existe um risco quatro vezes maior nos casos de portadores de E4 para desenvolver aumento da espessura mediointimal, na carótida comum do lado esquerdo, além de correlação entre os fatores de risco laboratoriais.



## REFERÊNCIAS

- AARABI, G. et al. Interaction between periodontal disease and atherosclerotic vascular disease--Fact or fiction? **Atherosclerosis**, v. 241, n. 2, p. 555–60, ago. 2015.
- AARABI, G. et al. Genetic Susceptibility Contributing to Periodontal and Cardiovascular Disease. **Journal of Dental Research**, v. 96, n. 6, p. 610–617, 2017.
- ADAY, A. W. et al. Lipoprotein Particle Profiles, Standard Lipids, and Peripheral Artery Disease Incidence - Prospective Data from the Women's Health Study. **Circulation**, p. CIRCULATIONAHA.118.035432, 2018.
- AHN, Y. B. et al. Periodontitis is associated with the risk of subclinical atherosclerosis and peripheral arterial disease in Korean adults. **Atherosclerosis**, v. 251, p. 311–318, 2016.
- ALBANDAR, J. M. Aggressive periodontitis: Case definition and diagnostic criteria. **Periodontology 2000**, v. 65, n. 1, p. 13–26, 2014.
- ALLEN, L. et al. Socioeconomic status and non-communicable disease behavioural risk factors in low-income and lower-middle-income countries: a systematic review. **The Lancet Global Health**, v. 5, n. 3, p. e277–e289, 2017.
- AMARENCO, P. et al. Five-Year Risk of Stroke after TIA or Minor Ischemic Stroke. **New England Journal of Medicine**, v. 378, n. 23, p. 2182–2190, maio 2018.
- AMATO, M. C.; GUARNOTTA, V.; GIORDANO, C. Body composition assessment for the definition of cardiometabolic risk. **Journal of Endocrinological Investigation**, v. 36, n. 7, p. 537–43, 2013.
- ANGULO, V. M. et al. Análisis del polimorfismo de APOE en la población de Barranquilla, Colombia. **Biomédica**, v. 33, n. 4, p. 24, 2015.
- ARMITAGE, G. C. Periodontal diagnoses and classification of periodontal diseases. **Periodontology 2000**, v. 34, p. 9–21, 2004.

ARMITAGE, G. C.; CULLINAN, M. P. Comparison of the clinical features of chronic and aggressive periodontitis. **Periodontology** 2000, v. 53, n. 1, p. 12–27, jun. 2010.

ARRIFANO, G. D. P. F. et al. Role for apolipoprotein E in neurodegeneration and mercury intoxication. **Frontiers In Bioscience**, v. 4, n. 1, p. 229–241, 2018a.

ARRIFANO, G. P. F. et al. In the Heart of the Amazon : Noncommunicable Diseases and Apolipoprotein E4 Genotype in the Riverine Population. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 15, n. 1957, p. 1–15, 2018b.

AZEVEDO, O. G. R. et al. Apolipoprotein E COG 133 mimetic peptide improves 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis. **BMC Gastroenterology**, v. 12, 2012.

AZEVEDO, O. G. R. et al. Apolipoprotein e plays a key role against cryptosporidial infection in transgenic undernourished mice. **PLoS ONE**, v. 9, n. 2, 2014.

BALE, B. F.; DONEEN, A. L.; VIGERUST, D. J. High-Risk periodontal pathogens contribute to the pathogenesis of atherosclerosis. **Postgraduate Medical Journal**, v. 93, n. 1098, p. 215–220, 2017.

BARTOLD, P. M. et al. Effect of Porphyromonas gingivalis-induced inflammation on the development of rheumatoid arthritis. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 37, n. 5, p. 405–411, 2010.

BAUMER, Y. et al. Hyperlipidemia-induced cholesterol crystal production by endothelial cells promotes atherogenesis. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, 2017.

BEILBY, J. P. et al. Apolipoprotein E gene polymorphisms are associated with carotid plaque formation but not with intima-media wall thickening: Results from the Perth Carotid Ultrasound Disease Assessment Study (CUDAS). **Stroke**, v. 34, n. 4, p. 869–874, 2003.

BELSTRØM, D. et al. The atherogenic bacterium Porphyromonas gingivalis evades circulating phagocytes by adhering to erythrocytes. **Infection and Immunity**, v. 79, n. 4, p. 1559–1565, 2011.

- BENNET, A. M. et al. Association of Apolipoprotein E Genotypes With Lipid Levels and Coronary Risk. **JAMA**, v. 298, n. 11, 2007.
- BERGDAHL, M. et al. Difference in apolipoprotein e type 4 allele (APOE  $\epsilon$ 4) among dentate and edentulous subjects. **Gerodontology**, v. 25, n. 3, p. 179–186, 2008.
- BERGMAN, R. N. et al. A Better Index of Body Adiposity. **Obesity (Silver Spring)**, v. 19, n. 5, p. 1083–1089, 2011.
- BINDERMAN, I.; GADBAN, N.; YAFFE, A. Cytoskeletal disease: a role in the etiology of adult periodontitis. **Oral Diseases**, v. 20, n. 1, p. 10–16, jan. 2014.
- BLASCO-BAQUE, V. et al. Periodontitis induced by *Porphyromonas gingivalis* drives periodontal microbiota dysbiosis and insulin resistance via an impaired adaptive immune response. **Gut**, v. 0, p. 1–14, 2016.
- BORGNAKKE, W. S. Does Treatment of Periodontal Disease Influence Systemic Disease? **Dental Clinics of North America**, v. 59, n. 4, p. 885–917, 2015.
- BORILOVA LINHARTOVA, P. et al. Apolipoprotein e gene polymorphisms in relation to chronic periodontitis, periodontopathic bacteria, and lipid levels. **Archives of Oral Biology**, v. 60, n. 3, p. 456–462, 2014.
- BRANCHEREAU, M. et al. Periodontal dysbiosis linked to periodontitis is associated with cardiometabolic adaptation to high-fat diet in mice. **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 310, n. 11, p. G1091–G1101, 2016.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE SB Brasil 2010 Pesquisa Nacional de Saúde Bucal SB BRASIL 2010 Pesquisa Nacional de Saúde Bucal. [s.l: s.n.].
- BRASIL. **Vigitel Brazil 2016: surveillance of risk and protective factors for chronic diseases by telephone survey: estimates of sociodemographic frequency and distribution of risk and protective factors for chronic diseases in the capitals of the 26 Brazilian sta.** Brasilia: [s.n.].

- BROUWER, E. D. et al. Provider costs for prevention and treatment of cardiovascular and related conditions in low- and middle-income countries: A systematic review. **BMC Public Health**, v. 15, n. 1, p. 1–17, 2015.
- BUDZIKOWSKI, A. S.; VESELI, G. The Human Atrial Fibrosis Pathway in the Development of Atrial Fibrillation. **Cardiology**, v. 136, p. 77–78, 2017.
- BUHLIN, K. et al. Periodontal treatment influences risk markers for atherosclerosis in patients with severe periodontitis. **Atherosclerosis**, v. 206, n. 2, p. 518–522, 2009.
- ÇALAPKORUR, M. U. et al. Association of peripheral arterial disease with periodontal disease: analysis of inflammatory cytokines and an acute phase protein in gingival crevicular fluid and serum. **Journal of Periodontal Research**, v. 52, n. 3, p. 532–539, 2017.
- CALERO, O. et al. Apolipoprotein E genotyping method by Real Time PCR, a fast and cost-effective alternative to the TaqMan® and FRET assays. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 183, n. 2, p. 238–240, 2009.
- CASANOVA, L.; HUGHES, F. J.; PRESHAW, P. M. Diabetes and periodontal disease: a two-way relationship. **British Dental Journal**, v. 217, n. 8, p. 433–437, out. 2014.
- CEKICI, A. et al. Inflammatory and immune pathways in the pathogenesis of periodontal disease. **Periodontology 2000**, v. 64, n. 1, p. 57–80, 2014.
- CERAJEWSKA, T. L.; DAVIES, M.; WEST, N. X. Periodontitis: A potential risk factor for Alzheimer's disease. **British Dental Journal**, v. 218, n. 1, p. 29–34, 2015.
- CHAPPLE, I. L. C.; GENCO, R. Diabetes and periodontal diseases: Consensus report of the Joint EFP/AAP Workshop on Periodontitis and Systemic Diseases. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 40, n. Suppl. 14, p. S106–S112, 2013.
- CHATZISTAVRIANOU, D.; BLAIR, F. Diagnosis and management of chronic and aggressive periodontitis part 1: periodontal assessment and diagnosis. **Dental Update**, v. 44, n. 4, p. 306–315, abr. 2017.

CHENG, K. et al. A review of the carotid and femoral intima-media thickness as an indicator of the presence of peripheral vascular disease and cardiovascular risk factors. v. 54, p. 528–538, 2002.

CHISTIYAKOV, D. A. et al. Mechanisms of foam cell formation in atherosclerosis. **Journal of Molecular Medicine**, v. 95, n. 11, p. 1153–1165, 2017.

CHUANG, H.-H. et al. Correlation between body composition and risk factors for cardiovascular disease and metabolic syndrome. **BioFactors**, v. 38, n. 4, p. 284–291, jul. 2012.

COLPANI, V. et al. Lifestyle factors, cardiovascular disease and all-cause mortality in middle-aged and elderly women: a systematic review and meta-analysis. **European Journal of Epidemiology**, v. 33, n. 9, p. 831–845, 2018.

CURE, E. et al. Atherogenic index of plasma : a useful marker for subclinical atherosclerosis in ankylosing spondylitis. 2018.

DAMGAARD, C. et al. The complement system and its role in the pathogenesis of periodontitis: Current concepts. **Journal of Periodontal Research**, v. 50, n. 3, p. 283–293, 2015.

DEMMER, R. et al. Refining exposure definitions for studies of periodontal disease and systemic disease associations. **Community Dent Oral Epidemiol**, n. 15, p. 493–502, 2008.

DESVARIEUX, M. et al. Changes in clinical and microbiological periodontal profiles relate to progression of carotid intima-media thickness: the Oral Infections and Vascular Disease Epidemiology study. **Journal of the American Heart Association**, v. 2, n. 6, p. 1–11, 2013.

DI PIETRO, N.; FORMOSO, G.; PANDOLFI, A. Physiology and pathophysiology of oxLDL uptake by vascular wall cells in atherosclerosis. **Vascular Pharmacology**, v. 84, p. 1–7, 2016.

DOBIÁSOVÁ, M.; FROHLICH, J. The plasma parameter log (TG/HDL-C) as an atherogenic index: correlation with lipoprotein particle size and esterification rate in apoB-lipoprotein-



depleted plasma (FER(HDL)). **Clinical biochemistry**, v. 34, n. 7, p. 583–8, out. 2001.

DOLINER, B. et al. Apolipoprotein E Gene Polymorphism and Subclinical Carotid Atherosclerosis: The Northern Manhattan Study. **Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases**, v. 27, n. 3, p. 645–652, 2018.

EICHNER, J. E. et al. Human Genome Epidemiology ( HuGE ) Review. **American Journal of Epidemiology**, v. 155, n. 6, p. 487–495, 2002.

EINARSON, T. R. et al. Economic Burden of Cardiovascular Disease in Type 2 Diabetes: A Systematic Review. **Value in Health**, v. 21, n. 7, p. 881–890, 2018.

EKE, P. I. et al. Prevalence of periodontitis in adults in the united states: 2009 and 2010. **Journal of Dental Research**, v. 91, n. 10, p. 914–920, 2012.

EKE, P. I. et al. Periodontitis prevalence in adults  $\geq 65$  years of age, in the USA. **Periodontology 2000**, v. 72, n. 1, p. 76–95, 2016.

FERNÁNDEZ-ALVIRA, J. M. et al. Predicting Subclinical Atherosclerosis in Low-Risk Individuals: Ideal Cardiovascular Health Score and Fuster-BEWAT Score. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 70, n. 20, p. 2463–2473, 2017.

FLIOTSOS, M. et al. Body Mass Index From Early-, Mid-, and Older-Adulthood and Risk of Heart Failure and Atherosclerotic Cardiovascular Disease: MESA. **Journal of the American Heart Association**, v. 7, p. 1–17, 2018.

FREIRE, C. M. V. et al. Recomendação para a Quantificação pelo Ultrassom da Doença Aterosclerótica das Artérias Carótidas e Vertebrais: Grupo de Trabalho do Departamento de Imagem Cardiovascular da Sociedade Brasileira de Cardiologia – DIC - SBC. **Arquivos Brasileiros De Cardiologia - Imagem Cardiovascular**, v. 28, p. 1–64, 2015.

FRIEDEWALD, V. E. et al. *The American Journal of Cardiology and Journal of Periodontology* Editors' Consensus: Periodontitis and Atherosclerotic Cardiovascular Disease. **Journal of Periodontology**, v. 80, n. 7, p. 1021–1032, 2009.

GETZ, G. S.; REARDON, C. A. Animal Models of Atherosclerosis. **Animal Models for the Study of Human Disease: Second Edition**, p. 205–217, 2017.

GHEORGHE, A. et al. The economic burden of cardiovascular disease and hypertension in low- and middle-income countries: A systematic review. **BMC Public Health**, v. 18, n. 1, p. 1–11, 2018.

GONÇALVES, P. F. et al. Genetic polymorphisms and periodontal disease in populations of African descent: A review. **Journal of Periodontal Research**, v. 53, n. 2, p. 164–173, 2018.

GOULART, A. C. et al. Relationship between periodontal disease and cardiovascular risk factors among young and middle-aged Brazilians. Cross-sectional study. **Sao Paulo Medical Journal**, v. 135, n. 3, p. 226–233, jun. 2017.

GRAVES, D. T. et al. Animal Models to Study Host-Bacteria Interactions Involved in Periodontitis. In: **Frontiers of Oral Biology**. [s.l: s.n.]. v. 15p. 117–132.

GROOTAERT, M. O. J. et al. Vascular smooth muscle cell death , autophagy and senescence in atherosclerosis. n. January, 2018.

HAJISHENGALLIS, G. Periodontitis: From microbial immune subversion to systemic inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 15, n. 1, p. 30–44, 2015.

HAJISHENGALLIS, G.; DARVEAU, R.; CURTIS, M. The Keystone Pathogen Hypothesis. **Nature Reviews Microbiology**, v. 10, n. 10, p. 717–725, 2012.

HIGHFIELD, J. Diagnosis and classification of periodontal disease. **Australian Dental Journal**, v. 54, n. Suppl 1, p. S11-26, set. 2009.

HIRSCHLER, V. et al. Can waist circumference identify children with the metabolic syndrome? **Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine**, v. 159, n. 8, p. 740–4, ago. 2005.

HO, S. S. Y. Current status of carotid ultrasound in atherosclerosis. **Quantitative Imaging in Medicine and Surgery**, v. 6, n. 3, p. 285–296, 2016.

HOVLAND, A. et al. The complement system and toll-like receptors as integrated players in the pathophysiology of atherosclerosis. **Atherosclerosis**, v. 241, n. 2, p. 480–494, 2015.

HU, Z. et al. Effect of Helicobacter pylori infection on chronic periodontitis by the change of microecology and inflammation. **Oncotarget**, v. 7, n. 41, p. 66700–12, 2016.

HUEBBE, P. et al. APOE 4 is associated with higher vitamin D levels in targeted replacement mice and humans. **The FASEB Journal**, v. 25, n. 9, p. 3262–3270, 2011.

HUEBBE, P.; RIMBACH, G. Evolution of human apolipoprotein E (APOE) isoforms: Gene structure, protein function and interaction with dietary factors. **Ageing Research Reviews**, v. 37, p. 146–161, 2017.

HUSSAIN, M.; STOVER, C. M.; DUPONT, A. P. gingivalis in periodontal disease and atherosclerosis - Scenes of action for antimicrobial peptides and complement. **Frontiers in Immunology**, v. 6, n. FEB, p. 1–5, 2015.

INABA, Y.; CHEN, J. A.; BERGMANN, S. R. Carotid plaque, compared with carotid intima-media thickness, more accurately predicts coronary artery disease events: a meta-analysis. **Atherosclerosis**, v. 220, n. 1, p. 128–33, jan. 2012.

İNDEKS, P. A.; LUPUS, S.; SUBKLINIK, E. Plasma Atherogenic Index is an Independent Indicator of Subclinical Atherosclerosis in Systemic Lupus Erythematosus. p. 193–197, 2017.

JASPERS, L. et al. The global impact of non-communicable diseases on households and impoverishment: a systematic review. **European Journal of Epidemiology**, v. 30, n. 3, p. 163–188, 2014.

JOAQUIM, C. R. et al. The combined and individual impact of diabetes and smoking on key subgingival periodontal pathogens in patients with chronic periodontitis. **Journal of Periodontal Research**, n. September, p. 1–9, 2017.

JOSHIPURA, K. J. et al. Longitudinal association between periodontitis and development of diabetes. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 141, p. 284–293, 2018.

KAYA, H.; ONAT, A. ““ Atherogenic index of plasma ”” ( log 10 triglyceride / high-density lipoprotein 2 cholesterol ) predicts high blood pressure , diabetes , and vascular events. p. 89–98, 2010.

KAZI, M. M. A. G.; BHARADWAJ, R. Role of herpesviruses in chronic periodontitis and their association with clinical parameters and in increasing severity of the disease. **European Journal of Dentistry**, v. 11, n. 3, p. 299–304, 2017.

KHOVIDHUNKIT, W. et al. Effects of infection and inflammation on lipid and lipoprotein metabolism : mechanisms and consequences to the host 1. **Journal of Lipid Research**, v. 45, p. 1169–1196, 2004.

KIM, J. J.; KIM, C. J.; CAMARGO, P. M. Salivary biomarkers in the diagnosis of periodontal diseases. **Journal of the California Dental Association**, v. 41, n. 2, p. 119–24, fev. 2013.

KINANE, D. F.; STATHOPOULOU, P. G.; PAPAPANOU, P. N. Periodontal diseases. **Nature Publishing Group**, v. 3, p. 1–14, 2017.

KNOWLES, K. M. et al. Waist Circumference, Body Mass Index, and Other Measures of Adiposity in Predicting Cardiovascular Disease Risk Factors among Peruvian Adults. **International Journal of Hypertension**, v. 2011, p. 1–11, jan. 2011.

KOCH, W. et al. TaqMan systems for genotyping of disease-related polymorphisms present in the gene encoding apolipoprotein E. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 40, n. 11, p. 1123–1131, 2002.

KOOPAL, C. et al. The relation between apolipoprotein E (APOE) genotype and peripheral artery disease in patients at high risk for cardiovascular disease. **Atherosclerosis**, v. 246, p. 187–192, 2016.

KULKARNI, C.; KINANE, D. F. Host response in aggressive periodontitis. **Periodontology 2000**, v. 65, n. 1, p. 79–91, 2014.

KUNZ, W. G. et al. Cost-effectiveness of Endovascular Therapy for Acute Ischemic Stroke: A

Systematic Review of the Impact of Patient Age. **Radiology**, n. 19, p. 172886, 2018.

KURITA-OCHIAI, T.; YAMAMOTO, M. Periodontal pathogens and atherosclerosis: Implications of inflammation and oxidative modification of LDL. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.

LAINE, M. L.; CRIELAARD, W.; LOOS, B. G. Genetic susceptibility to periodontitis. **Periodontology 2000**, v. 58, n. 1, p. 37–68, 2012.

LANDRY, R. G.; JEAN, M. Periodontal Screening and Recording (PSR) Index: precursors, utility and limitations in a clinical setting. **International Dental Journal**, v. 52, p. 35–40, 2002.

LEITE, F. R. M. et al. Effect of Smoking on Periodontitis: A Systematic Review and Meta-regression. **American Journal of Preventive Medicine**, p. 1–11, 2018.

LIMA, W. A. Artigo de revisão MAIN FACTORS OF RISK RELATED TO THE. **International Journal of Obesity**, v. 21, n. 3, p. 96–104, 2010.

LOCKHART, P. B. et al. Periodontal disease and atherosclerotic vascular disease: Does the evidence support an independent association?: A scientific statement from the American heart association. **Circulation**, v. 125, n. 20, p. 2520–2544, 2012.

LONDON, S. J. et al. Collection of buccal cell DNA in seventh-grade children using water and a toothbrush. **Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology**, v. 10, n. 11, p. 1227–30, nov. 2001.

LORENZ, M. W. et al. Carotid intima-media thickening indicates a higher vascular risk across a wide age range: prospective data from the Carotid Atherosclerosis Progression Study (CAPS). **Stroke**, v. 37, n. 1, p. 87–92, jan. 2006.

LÖWE, L. C.; GASER, C.; FRANKE, K. The effect of the APOE genotype on individual BrainAGE in normal aging, Mild cognitive impairment, and Alzheimer's Disease. **PLoS**

**ONE**, v. 11, n. 7, p. 1–25, 2016.

LUNARDI, C. C.; PETROSKI, E. L. [Body Mass Index, Waist Circumference and skinfolds for predicting lipid abnormalities in 11 years old children]. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, v. 52, n. 6, p. 1009–1014, 2008.

LUNDBERG, C. et al. The relationship between carotid intima – media thickness and global atherosclerosis. **Clinical Physiology and Functional Imaging**, v. 34, n. 6, p. 457–462, 2014.

MAHLEY, R. W. Apolipoprotein E: from cardiovascular disease to neurodegenerative disorders. **Journal of Molecular Medicine**, v. 94, n. 7, p. 739–746, 2016.

MAÏGA, S. F.; KALOPISSIS, A. D.; CHABERT, M. Apolipoprotein A-II is a key regulatory factor of HDL metabolism as appears from studies with transgenic animals and clinical outcomes. **Biochimie**, v. 96, n. 1, p. 56–66, 2014.

MARCENES, W. et al. Global burden of oral conditions in 1990-2010: A systematic analysis. **Journal of Dental Research**, v. 92, n. 7, p. 592–597, 2013.

MARINHO, F. et al. Burden of disease in Brazil, 1990–2016: a systematic subnational analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. **The Lancet**, v. 392, 2018.

MATTILA, K. J. et al. Association between dental health and acute myocardial infarction. **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 298, n. 6676, p. 779–81, 1989.

MEDH, J. D. et al. Lipoprotein lipase- and hepatic triglyceride lipase- promoted very low density lipoprotein degradation proceeds via an apolipoprotein E-dependent mechanism. **J. Lipid Res**, v. 41, p. 1858–71, 2000.

MEYLE, J.; CHAPPLE, I. Molecular aspects of the pathogenesis of periodontitis. **Periodontology 2000**, v. 69, n. 1, p. 7–17, 2015.

MILLÁN, J. et al. Lipoprotein ratios: Physiological significance and clinical usefulness in cardiovascular prevention. **Vascular Health and Risk Management**, v. 5, p. 757–65, 2009.

MITEVA, K. et al. Innate and adaptive immunity in atherosclerosis. **Vascular Pharmacology**, v. 107, p. 67–77, abr. 2018.

MOORE, K. J.; TABAS, I. Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis. **Cell**, v. 145, n. 3, p. 341–355, 2011.

MORALES, A. et al. Microbiological and clinical effects of probiotics and antibiotics on nonsurgical treatment of chronic periodontitis: a randomized placebo- controlled trial with 9-month follow-up. **Journal of Applied Oral Science**, v. 26, n. 0, p. 1–9, 2018.

MOTAMED, N.; PERUMAL, D.; FHEA, M. Clinical Investigations Conicity Index and Waist-to-Hip Ratio Are Superior Obesity Indices in Predicting 10-Year Cardiovascular Risk Among Men and Women. **Clinical Cardiology**, v. 38, n. 9, p. 527–534, 2015.

MOUSOPOULOS, N. M.; LIONAKIS, M. S.; HAJISHENGALLIS, G. Inborn errors in immunity: Unique natural models to dissect oral immunity. **Journal of Dental Research**, v. 94, n. 6, p. 753–758, 2015.

MUKA, T. et al. The global impact of non-communicable diseases on healthcare spending and national income: a systematic review. **European Journal of Epidemiology**, v. 30, n. 4, p. 251–277, 2015.

NATARAJAN, P. et al. Multiethnic Exome-Wide Association Study of Subclinical Atherosclerosis. p. 511–520, 2016.

NAZIR, M. A. Prevalence of periodontal disease, its association with systemic diseases and prevention. **International Journal of Health Sciences**, v. 11, n. 2, p. 72–80, 2017.

OFFENBACHER, S. et al. Results From the Periodontitis and Vascular Events (PAVE) Study: A Pilot Multicentered, Randomized, Controlled Trial to Study Effects of Periodontal Therapy in a Secondary Prevention Model of Cardiovascular Disease. **Journal of Periodontology**, v. 80, n. 2, p. 190–201, 2009.

OGAWA, H. et al. Risk factors for periodontal disease progression among elderly people.

**Journal of Clinical Periodontology**, v. 29, n. 7, p. 592–7, jul. 2002.

OLUSI, S. O.; GEORGE, S. Prevalence of LDL atherogenic phenotype in patients with systemic lupus erythematosus. **Vascular Health and Risk Management**, n. 7, p. 75–80, 2011.

ORIÁ, R. B. et al. ApoE polymorphisms and diarrheal outcomes in Brazilian shanty town children. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 43, n. 3, p. 249–256, 2010.

PACKARD, R. R. S.; LICHTMAN, A. H.; LIBBY, P. Innate and adaptive immunity in atherosclerosis. **Seminars in Immunopathology**, v. 31, n. 1, p. 5–22, 2009.

PAJU, S.; SCANNAPIECO, F. A. Oral biofilms, periodontitis, and pulmonary infections. **Oral Diseases**, v. 13, n. 6, p. 508–512, 2007.

PEREIRA, L. C. et al. Archives of Oral Biology Apolipoprotein E , periodontal disease and the risk for atherosclerosis : a review. **Archives of Oral Biology**, v. 98, n. November 2018, p. 204–212, 2019.

PIHLSTROM, B. L.; MICHALOWICZ, B. S.; JOHNSON, N. W. Periodontal diseases. **Lancet**, v. 366, n. 9499, p. 1809–1820, 2005.

REBECK, G. W. The role of APOE on lipid homeostasis and inflammation in normal brains. **Journal of Lipid Research**, v. 58, p. 1493–1499, 2017.

RENVERT, S. et al. Analysis of periodontal risk profiles in adults with or without a history of myocardial infarction. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 31, n. 1, p. 19–24, 2004.

RHEU, G.-B. et al. Risk assessment for clinical attachment loss of periodontal tissue in Korean adults. **The Journal of Advanced Prosthodontics**, v. 3, n. 1, p. 25–32, mar. 2011.

ROHLFS, R. V; WEIR, B. S. Distributions of Hardy – Weinberg Equilibrium Test Statistics. **Genetics**, v. 180, n. November, p. 1609–1616, 2008.



ROMERO-VELARDE, E. et al. Circunferencia de cintura y su asociación con factores de riesgo cardiovascular en niños y adolescentes con obesidad. **Boletín Médico del Hospital Infantil de México**, v. 70, n. 5, p. 358–363, 2013.

ROSS, R. ATHEROSCLEROSIS — an Inflammatory Disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 340, n. 2, p. 115–126, 1999.

ROTH, G. A. et al. Global, Regional, and National Burden of Cardiovascular Diseases for 10 Causes, 1990 to 2015. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 70, n. 1, p. 1–25, 2017.

SANTOSH, A. B. R. et al. Epidemiology of Oral and Maxillofacial Infections. **Dental Clinics of North America**, v. 61, n. 2, p. 217–233, 2017.

SANZ, M.; VAN WINKELHOFF, A. J. Periodontal infections: Understanding the complexity - Consensus of the Seventh European Workshop on Periodontology. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 38, n. SUPPL. 11, p. 3–6, 2011.

SHIM, S.-H.; HAN, D.-H. Exposure to occupational noise and periodontitis in Korean workers. **Journal of Periodontology**, v. 89, n. 4, p. 431–439, 2018.

SUKA, M. et al. BMI, waist circumference, and clustering of cardiovascular risk factors in Japanese adults. **Environmental health and preventive medicine**, v. 16, n. 2, p. 90–6, mar. 2011.

TANG, E. Y. H. et al. Longitudinal Effect of Stroke on Cognition : A Systematic Review. **Journal of the American Heart Association**, n. 7:e006443, p. 1–9, 2018.

TAPASHETTI, R. P. et al. C-reactive Protein as Predictor of Increased Carotid Intima Media Thickness in Patients with Chronic Periodontitis. **Journal of international oral health : JIOH**, v. 6, n. 4, p. 47–52, 2014.

THIFAUULT, E. et al. Effects of Age , Sex , Body Mass Index and APOE Genotype on Cardiovascular Biomarker Response to an n-3 Polyunsaturated Fatty Acid Supplementation. v.

6, p. 73–82, 2013.

TORRES, N. et al. Nutrition and Atherosclerosis. **Archives of Medical Research**, v. 46, n. 5, p. 408–426, 2015.

TOUBOUL, P.-J. et al. Correlation between the Framingham risk score and intima media thickness: The Paroi Artérielle et Risque Cardio-vasculaire (PARC) study. **Atherosclerosis**, v. 192, n. 2, p. 363–369, jun. 2007.

TUOMAINEN, A. M. et al. Aggregatibacter actinomycetemcomitans induces MMP-9 expression and proatherogenic lipoprotein profile in apoE-deficient mice. **Microbial Pathogenesis**, v. 44, n. 2, p. 111–117, 2008.

TUTTOLOMONDO, A. et al. Atherosclerosis as an Inflammatory Disease. **Current Pharmaceutical Design**, v. 18, n. 28, p. 4266–4288, 2012.

UKKOLA, O. et al. ApoE phenotype is associated with inflammatory markers in middle-aged subjects. **Inflammation Research**, v. 58, n. 1, p. 54–59, 2009.

UNDERHILL, H. R. et al. A Noninvasive Imaging Approach to Assess Plaque Severity: The Carotid Atherosclerosis Score. **American Journal of Neuroradiology**, v. 31, n. 6, p. 1068–1075, jun. 2010.

VÉGH, C. et al. Connections between apolipoprotein E genotypes and the development cardiovascular diseases. **Orvosi Hetilap**, v. 153, n. 20, p. 2070–2076, 2012.

WHITMORE, S. E.; LAMONT, R. J. The pathogenic persona of community-associated oral streptococci. **Molecular Microbiology**, v. 81, n. 2, p. 305–314, 2011.

WHO, W. H. O. Obesity: preventing and managing the global epidemic. **report of a WHO consultation**, p. 268, 2000.

WHO, W. H. O. Media centre Obesity and overweight. **Geneva**, p. 2–5, 2015.

WILLERSHAUSEN, B. et al. Association between Chronic Dental Infection and Acute

Myocardial Infarction. **Journal of Endodontics**, v. 35, n. 5, p. 626–630, 2009.

WOHLIN, M. et al. Apolipoprotein E  $\epsilon$ 4 genotype is independently associated with increased intima-media thickness in a recessive pattern. **Lipids**, v. 42, n. 5, p. 451–456, 2007.

YILDIZ, G. et al. Evaluation of association between atherogenic index of plasma and intima-media thickness of the carotid artery for subclinic atherosclerosis in patients on maintenance hemodialysis. p. 397–405, 2013.

YIN, Y.-W. et al. Association between Apolipoprotein E Gene Polymorphism and the Risk of Coronary Artery Disease in Chinese Population: Evidence from a Meta-Analysis of 40 Studies. **PLoS ONE**, v. 8, n. 6, p. e66924, 2013.

YING, X. et al. Body mass index, waist circumference, and cardiometabolic risk factors in young and middle-aged Chinese women. **Journal of Zhejiang University SCIENCE B**, v. 11, n. 9, p. 639–646, set. 2010.

YU, H. et al. Association of carotid intima-media thickness and atherosclerotic plaque with periodontal status. **Journal of Dental Research**, v. 93, n. 8, p. 744–751, 2014.

YU, X. H. et al. Foam cells in atherosclerosis. **Clinica Chimica Acta**, v. 424, p. 245–252, 2013.

ZENG, X. T. et al. Periodontal disease and carotid atherosclerosis: A meta-analysis of 17,330 participants. **International Journal of Cardiology**, v. 203, p. 1044–1051, 2016.

ZHANG, L. et al. Lack of associations of ten candidate coronary heart disease risk genetic variants and subclinical atherosclerosis in four U.S. populations: The Population Architecture using Genomics and Epidemiology (PAGE) study. **Atherosclerosis**, v. 228, n. 2, p. 390–399, 2013.

ZHANG, Y. et al. Is Carotid Intima-Media Thickness as Predictive as Other Noninvasive Techniques for the Detection of Coronary Artery Disease? **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 34, n. July, p. 1341–1345, 2014.

ZHAO, L. et al. Apolipoprotein E polymorphisms are associated with ischemic stroke susceptibility in a Northwest China Han population. **Bioscience Reports**, v. 37, n. 6, p. BSR20171088, 2017.

ZHU, X.; DENG, F.; LEI, S. Meta-analysis of Atherogenic Index of Plasma and other lipid parameters in relation to risk of type 2 diabetes mellitus. **Primary Care Diabetes**, v. 9, n. 1, p. 60–67, 2014.

ZWIEBEL, W. J.; PELLERITO, J. S. Tricky and interesting carotid cases. **Ultrasound quarterly**, v. 21, n. 2, p. 113– 22; quiz 151, 153–4, jun. 2005.



**Tabela 17** - Valores de correlação (r) entre as variáveis antropométricas e bioquímicas/laboratoriais nos casos.

	<b>EMI direita</b>	<b>EMI esquerda</b>	<b>CC</b>	<b>RCQ</b>	<b>IAC</b>	<b>IC</b>	<b>Glic.</b>	<b>Col Total</b>	<b>HDL</b>	<b>LDL</b>	<b>TG</b>	<b>Castelli 1</b>	<b>Castelli 2</b>	<b>IAP</b>	<b>PCR</b>
<b>EMI direita</b>	1,00	0,46	0,28	0,28	-0,18	0,30	0,23	0,06	-0,20	0,08	0,24	0,19	0,10	0,17	-0,05
<b>EMI esquerda</b>	0,46	1,00	0,10	0,09	-0,03	-0,06	0,20	0,18	-0,19	0,20	0,21	0,26	0,21	0,23	-0,09
<b>CC</b>	0,28	0,10	1,00	0,79	0,12	0,82	0,25	0,15	-0,14	0,09	0,35	0,16	-0,04	0,17	-0,05
<b>RCQ</b>	0,28	0,09	0,79	1,00	-0,33	0,91	0,13	0,20	0,06	0,01	0,44	0,08	-0,18	0,00	-0,16
<b>IAC</b>	-0,18	-0,03	0,12	-0,33	1,00	-0,17	0,04	-0,08	-0,14	0,10	-0,26	0,01	0,17	0,13	0,27
<b>IC</b>	0,30	-0,06	0,82	0,91	-0,17	1,00	-0,60	0,34	0,15	0,36	0,25	0,13	0,11	0,40	-0,19
<b>Glicemia</b>	0,23	0,20	0,25	0,13	0,04	-0,60	1,00	-0,30	-0,26	-0,27	-0,08	-0,02	-0,13	-0,20	0,06
<b>Colesterol</b>	0,06	0,18	0,15	0,20	-0,08	0,34	-0,30	1,00	0,15	0,92	0,56	0,53	0,42	0,57	-0,22
<b>HDL</b>	-0,20	-0,19	-0,14	0,06	-0,14	0,15	-0,26	0,15	1,00	-0,05	-0,16	-0,70	-0,60	-0,59	-0,38
<b>LDL</b>	0,08	0,20	0,09	0,01	0,10	0,36	-0,27	0,92	-0,05	1,00	0,31	0,64	0,74	0,78	-0,01
<b>Triglicérides</b>	0,24	0,21	0,35	0,44	-0,26	0,25	-0,08	0,56	-0,16	0,31	1,00	0,47	0,02	0,36	-0,17
<b>Castelli 1</b>	0,19	0,26	0,16	0,08	0,01	0,13	-0,02	0,53	-0,70	0,64	0,47	1,00	0,86	0,89	0,25
<b>Castelli 2</b>	0,10	0,21	-0,04	-0,18	0,17	0,11	-0,13	0,42	-0,60	0,74	0,02	0,86	1,00	0,95	0,31
<b>IAP</b>	0,17	0,23	0,17	0,00	0,13	0,40	-0,20	0,57	-0,59	0,78	0,36	0,89	0,95	1,00	0,31
<b>PCR</b>	-0,05	-0,09	-0,05	-0,16	0,27	-0,19	0,06	-0,22	-0,38	-0,01	-0,17	0,25	0,31	0,31	1,00

Legenda: EMI – espessura da íntima da carótida; CC - circunferência da cintura; RCQ - razão cintura quadril; IAC - índice de adiposidade corporal; IC - índice de conicidade; Glic. – Glicose; Col Total - colesterol total; HDL - lipoproteína de alta densidade; LDL - lipoproteína de baixa densidade; TG - triglicérides; Castelli 1- índice Castelli 1; Castelli-2 - índice Castelli 2; IAP - índice aterogênico do plasma; PCR - Proteína C reativa.

Fonte: própria.

**Tabela 18** - Valores de p entre as variáveis antropométricas e bioquímicas/laboratoriais nos casos.

	<b>EMI direita</b>	<b>EMI esquerda</b>	<b>CC</b>	<b>RCQ</b>	<b>IAC</b>	<b>IC</b>	<b>Glic.</b>	<b>Col Total</b>	<b>HDL</b>	<b>LDL</b>	<b>TG</b>	<b>Castelli 1</b>	<b>Castelli 2</b>	<b>IAP</b>	<b>PCR</b>
<b>EMI direita</b>	0,00	0,01	0,18	0,18	0,43	0,16	0,32	0,80	0,40	0,75	0,29	0,42	0,69	0,45	0,85
<b>EMI esquerda</b>	0,01	0,00	0,66	0,71	0,88	0,80	0,41	0,43	0,41	0,40	0,38	0,24	0,39	0,33	0,71
<b>CC</b>	0,18	0,66	0,00	0,00	0,51	0,00	0,23	0,48	0,51	0,69	0,06	0,43	0,84	0,43	0,80
<b>RCQ</b>	0,18	0,71	0,00	0,00	0,04	0,00	0,51	0,38	0,80	0,95	0,01	0,71	0,42	0,99	0,43
<b>IAC</b>	0,43	0,88	0,51	0,04	0,00	0,39	0,86	0,72	0,51	0,66	0,20	0,95	0,43	0,53	0,19
<b>IC</b>	0,16	0,80	0,00	0,00	0,39	0,00	0,00	0,06	0,48	0,05	0,20	0,51	0,61	0,03	0,40
<b>Glicemia</b>	0,32	0,41	0,23	0,51	0,86	0,00	0,00	0,10	0,18	0,16	0,71	0,94	0,51	0,35	0,77
<b>Colesterol</b>	0,80	0,43	0,48	0,38	0,72	0,06	0,10	0,00	0,43	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,29
<b>HDL</b>	0,40	0,41	0,51	0,80	0,51	0,48	0,18	0,43	0,00	0,80	0,43	0,00	0,00	0,00	0,03
<b>LDL</b>	0,75	0,40	0,69	0,95	0,66	0,05	0,16	0,00	0,80	0,00	0,10	0,00	0,00	0,00	0,95
<b>Triglicerídeos</b>	0,29	0,38	0,06	0,01	0,20	0,20	0,71	0,00	0,43	0,10	0,00	0,00	0,94	0,04	0,43
<b>Castelli 1</b>	0,42	0,24	0,43	0,71	0,95	0,51	0,94	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,20
<b>Castelli 2</b>	0,69	0,39	0,84	0,42	0,43	0,61	0,51	0,01	0,00	0,00	0,94	0,00	0,00	0,00	0,11
<b>IAP</b>	0,45	0,33	0,43	0,99	0,53	0,03	0,35	0,00	0,00	0,00	0,04	0,00	0,00	0,00	0,12
<b>PCR</b>	0,85	0,71	0,80	0,43	0,19	0,40	0,77	0,29	0,03	0,95	0,43	0,20	0,11	0,12	0,00

Legenda: EMI – espessura da íntima da carótida; CC - circunferência da cintura; RCQ - razão cintura quadril; IAC - índice de adiposidade corporal; IC - índice de conicidade; Glic. – Glicose; Col Total - colesterol total; HDL - lipoproteína de alta densidade; LDL - lipoproteína de baixa densidade; TG - triglicerídeos; Castelli 1- índice Castelli 1; Castelli-2 - índice Castelli 2; IAP - índice aterogênico do plasma; PCR - Proteína C reativa.

Fonte: própria.

**Tabela 19** - Valores de correlação (r) entre as variáveis antropométricas e bioquímicas/laboratoriais nos controles.

	<b>EMI direita</b>	<b>EMI esquerda</b>	<b>CC</b>	<b>RCQ</b>	<b>IAC</b>	<b>IC</b>	<b>Glic.</b>	<b>Col Total</b>	<b>HDL</b>	<b>LDL</b>	<b>TG</b>	<b>Castelli 1</b>	<b>Castelli 2</b>	<b>IAP</b>	<b>PCR</b>
<b>EMI direita</b>	1,00	0,58	0,20	0,08	0,24	0,12	0,24	0,24	0,04	0,14	0,11	0,17	0,22	0,19	-0,15
<b>EMI esquerda</b>	0,58	1,00	-0,08	-0,18	0,07	-0,18	-0,18	0,10	-0,11	0,08	0,07	0,17	0,21	0,21	-0,02
<b>CC</b>	0,20	-0,08	1,00	0,69	0,50	0,75	0,37	0,04	0,02	-0,03	0,16	0,05	-0,09	-0,07	0,26
<b>RCQ</b>	0,08	-0,18	0,69	1,00	-0,07	0,78	0,17	-0,01	-0,01	-0,14	0,25	0,04	-0,22	-0,17	-0,04
<b>IAC</b>	0,24	0,07	0,50	-0,07	1,00	0,21	0,42	0,23	0,35	0,24	-0,13	-0,07	0,11	0,00	0,32
<b>IC</b>	0,12	-0,18	0,75	0,78	0,21	1,00	0,40	-0,01	0,03	-0,10	0,17	0,00	-0,19	-0,17	0,13
<b>Glicemia</b>	0,24	-0,18	0,37	0,17	0,42	0,40	1,00	0,05	-0,08	-0,02	0,12	0,11	0,05	0,05	0,00
<b>Colesterol</b>	0,24	0,10	0,04	-0,01	0,23	-0,01	0,05	1,00	0,30	0,93	0,31	0,60	0,58	0,62	-0,08
<b>HDL</b>	0,04	-0,11	0,02	-0,01	0,35	0,03	-0,08	0,30	1,00	0,25	-0,36	-0,54	-0,19	-0,40	0,05
<b>LDL</b>	0,14	0,08	-0,03	-0,14	0,24	-0,10	-0,02	0,93	0,25	1,00	0,18	0,64	0,77	0,75	-0,05
<b>Triglicérides</b>	0,11	0,07	0,16	0,25	-0,13	0,17	0,12	0,31	-0,36	0,18	1,00	0,70	-0,20	0,21	-0,03
<b>Castelli 1</b>	0,17	0,17	0,05	0,04	-0,07	0,00	0,11	0,60	-0,54	0,64	0,70	1,00	0,53	0,88	-0,08
<b>Castelli 2</b>	0,22	0,21	-0,09	-0,22	0,11	-0,19	0,05	0,58	-0,19	0,77	-0,20	0,53	1,00	0,97	-0,11
<b>IAP</b>	0,19	0,21	-0,07	-0,17	0,00	-0,17	0,05	0,62	-0,40	0,75	0,21	0,88	0,97	1,00	-0,09
<b>PCR</b>	-0,15	-0,02	0,26	-0,04	0,32	0,13	0,00	-0,08	0,05	-0,05	-0,03	-0,08	-0,11	-0,09	1,00

Legenda: EMI – espessura da íntima da carótida; CC - circunferência da cintura; RCQ - razão cintura quadril; IAC - índice de adiposidade corporal; IC - índice de conicidade; Glic. – Glicose; Col Total - colesterol total; HDL - lipoproteína de alta densidade; LDL - lipoproteína de baixa densidade; TG - triglicérides; Castelli 1- índice Castelli 1; Castelli-2 - índice Castelli 2; IAP - índice aterogênico do plasma; PCR - Proteína C reativa.

Fonte: própria.



**Tabela 20** - Valores de p entre as variáveis antropométricas e bioquímicas/laboratoriais nos controles.

	<b>EMI direita</b>	<b>EMI esquerda</b>	<b>CC</b>	<b>RCQ</b>	<b>IAC</b>	<b>IC</b>	<b>Glic.</b>	<b>Col Total</b>	<b>HDL</b>	<b>LDL</b>	<b>TG</b>	<b>Castelli 1</b>	<b>Castelli 2</b>	<b>IAP</b>	<b>PCR</b>
<b>EMI direita</b>	0,00	0,00	0,29	0,74	0,19	0,59	0,23	0,23	0,89	0,55	0,68	0,42	0,30	0,37	0,54
<b>EMI esquerda</b>	0,00	0,00	0,74	0,35	0,76	0,34	0,40	0,70	0,68	0,74	0,81	0,43	0,32	0,32	0,93
<b>CC</b>	0,29	0,74	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02	0,89	0,92	0,89	0,45	0,85	0,71	0,78	0,20
<b>RCQ</b>	0,74	0,35	0,00	0,00	0,74	0,00	0,40	0,95	0,95	0,56	0,20	0,89	0,29	0,40	0,88
<b>IAC</b>	0,19	0,76	0,00	0,74	0,00	0,20	0,01	0,23	0,03	0,23	0,57	0,78	0,68	0,99	0,07
<b>IC</b>	0,59	0,34	0,00	0,00	0,20	0,00	0,01	0,97	0,89	0,68	0,40	0,99	0,35	0,40	0,59
<b>Glicemia</b>	0,23	0,40	0,02	0,40	0,01	0,01	0,00	0,87	0,74	0,94	0,59	0,68	0,85	0,87	0,99
<b>Colesterol</b>	0,23	0,70	0,89	0,95	0,23	0,97	0,87	0,00	0,09	0,00	0,07	0,00	0,00	0,00	0,77
<b>HDL</b>	0,89	0,68	0,92	0,95	0,03	0,89	0,74	0,09	0,00	0,20	0,02	0,00	0,37	0,01	0,87
<b>LDL</b>	0,55	0,74	0,89	0,56	0,23	0,68	0,94	0,00	0,20	0,00	0,40	0,00	0,00	0,00	0,85
<b>Triglicerídeos</b>	0,68	0,81	0,45	0,20	0,57	0,40	0,59	0,07	0,02	0,40	0,00	0,00	0,32	0,30	0,91
<b>Castelli 1</b>	0,42	0,43	0,85	0,89	0,78	0,99	0,68	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,77
<b>Castelli 2</b>	0,30	0,32	0,71	0,29	0,68	0,35	0,85	0,00	0,37	0,00	0,32	0,00	0,00	0,00	0,68
<b>IAP</b>	0,37	0,32	0,78	0,40	0,99	0,40	0,87	0,00	0,01	0,00	0,30	0,00	0,00	0,00	0,74
<b>PCR</b>	0,54	0,93	0,20	0,88	0,07	0,59	0,99	0,77	0,87	0,85	0,91	0,77	0,68	0,74	0,00

Legenda: EMI – espessura da íntima da carótida; CC - circunferência da cintura; RCQ - razão cintura quadril; IAC - índice de adiposidade corporal; IC - índice de conicidade; Glic. – Glicose; Col Total - colesterol total; HDL - lipoproteína de alta densidade; LDL - lipoproteína de baixa densidade; TG - triglicerídeos; Castelli 1- índice Castelli 1; Castelli-2 - índice Castelli 2; IAP - índice aterogênico do plasma; PCR - Proteína C reativa.

Fonte: própria.

**Tabela 21** - Valores de correlação (r) entre as variáveis antropométricas e bioquímicas/laboratoriais nos E2+.

	<b>EMI direita</b>	<b>EMI esquerda</b>	<b>CC</b>	<b>RCQ</b>	<b>IAC</b>	<b>IC</b>	<b>Glic.</b>	<b>Col Total</b>	<b>HDL</b>	<b>LDL</b>	<b>TG</b>	<b>Castelli 1</b>	<b>Castelli 2</b>	<b>IAP</b>	<b>PCR</b>
<b>EMI direita</b>	1,00	0,86	0,70	0,07	0,56	0,34	0,94	-0,12	-0,76	-0,06	0,71	0,43	0,23	0,09	0,08
<b>EMI esquerda</b>	0,86	1,00	0,90	0,37	0,74	0,53	0,29	-0,47	-0,52	-0,26	-0,19	-0,05	-0,06	-0,05	-0,12
<b>CC</b>	0,70	0,90	1,00	0,68	0,59	0,69	0,40	-0,35	-0,48	-0,08	-0,09	0,19	0,16	0,18	0,24
<b>RCQ</b>	0,07	0,37	0,68	1,00	0,18	0,87	-0,15	-0,11	-0,13	0,04	-0,33	0,04	0,09	0,19	0,28
<b>IAC</b>	0,56	0,74	0,59	0,18	1,00	0,14	0,04	-0,10	-0,79	0,21	0,07	0,57	0,49	0,59	0,62
<b>IC</b>	0,34	0,53	0,69	0,87	0,14	1,00	-0,19	-0,25	0,11	-0,17	-0,34	-0,23	-0,17	-0,09	0,35
<b>Glicemia</b>	0,94	0,29	0,40	-0,15	0,04	-0,19	1,00	0,13	-0,53	0,26	0,24	0,61	0,49	0,42	0,27
<b>Colesterol</b>	-0,12	-0,47	-0,35	-0,11	-0,10	-0,25	0,13	1,00	0,18	0,93	-0,66	0,57	0,72	0,69	0,06
<b>HDL</b>	-0,76	-0,52	-0,48	-0,13	-0,79	0,11	-0,53	0,18	1,00	-0,15	-0,39	-0,70	-0,54	-0,56	-0,50
<b>LDL</b>	-0,06	-0,26	-0,08	0,04	0,21	-0,17	0,26	0,93	-0,15	1,00	-0,64	0,79	0,91	0,89	0,20
<b>Triglicerídeos</b>	0,71	-0,19	-0,09	-0,33	0,07	-0,34	0,24	-0,66	-0,39	-0,64	1,00	-0,14	-0,38	-0,38	0,19
<b>Castelli 1</b>	0,43	-0,05	0,19	0,04	0,57	-0,23	0,61	0,57	-0,70	0,79	-0,14	1,00	0,97	0,96	0,50
<b>Castelli 2</b>	0,23	-0,06	0,16	0,09	0,49	-0,17	0,49	0,72	-0,54	0,91	-0,38	0,97	1,00	0,99	0,40
<b>IAP</b>	0,09	-0,05	0,18	0,19	0,59	-0,09	0,42	0,69	-0,56	0,89	-0,38	0,96	0,99	1,00	0,47
<b>PCR</b>	0,08	-0,12	0,24	0,28	0,62	0,35	0,27	0,06	-0,50	0,20	0,19	0,50	0,40	0,47	1,00

Legenda: E2+ - presença do alelo E2; EMI – espessura da íntima da carótida; CC – circunferência da cintura; RCQ - razão cintura quadril; IAC - índice de adiposidade corporal; IC - índice de conicidade; Glic. – Glicose; Col Total - colesterol total; HDL - lipoproteína de alta densidade; LDL - lipoproteína de baixa densidade; TG - triglicerídeos; Castelli 1- índice Castelli 1; Castelli-2 - índice Castelli 2; IAP - índice aterogênico do plasma; PCR - Proteína C reativa.

Fonte: própria.

**Tabela 22** - Valores de p entre as variáveis antropométricas e bioquímicas/laboratoriais nos E2+.

	<b>EMI direita</b>	<b>EMI esquerda</b>	<b>CC</b>	<b>RCQ</b>	<b>IAC</b>	<b>IC</b>	<b>Glic.</b>	<b>Col Total</b>	<b>HDL</b>	<b>LDL</b>	<b>TG</b>	<b>Castelli 1</b>	<b>Castelli 2</b>	<b>IAP</b>	<b>PCR</b>
<b>EMI direita</b>	0,00	0,09	0,35	0,94	0,56	0,86	0,11	0,94	0,49	0,94	0,56	0,86	0,94	0,94	0,94
<b>EMI esquerda</b>	0,09	0,00	0,05	0,84	0,27	0,60	0,94	0,84	0,81	0,94	0,94	0,94	0,94	0,94	0,94
<b>CC</b>	0,35	0,05	0,00	0,13	0,27	0,11	0,81	0,85	0,67	0,94	0,94	0,94	0,94	0,94	0,94
<b>RCQ</b>	0,94	0,84	0,13	0,00	0,94	0,01	0,94	0,94	0,94	0,94	0,86	0,94	0,94	0,94	0,94
<b>IAC</b>	0,56	0,27	0,27	0,94	0,00	0,94	0,94	0,94	0,18	0,94	0,94	0,56	0,65	0,56	0,50
<b>IC</b>	0,86	0,60	0,11	0,01	0,94	0,00	0,94	0,94	0,94	0,94	0,86	0,94	0,94	0,94	0,85
<b>Glicemia</b>	0,11	0,94	0,81	0,94	0,94	0,94	0,00	0,94	0,60	0,94	0,94	0,52	0,65	0,81	0,94
<b>Colesterol</b>	0,94	0,84	0,85	0,94	0,94	0,94	0,94	0,00	0,94	0,02	0,43	0,56	0,31	0,35	0,94
<b>HDL</b>	0,49	0,81	0,67	0,94	0,18	0,94	0,60	0,94	0,00	0,94	0,82	0,34	0,60	0,56	0,65
<b>LDL</b>	0,94	0,94	0,94	0,94	0,94	0,94	0,94	0,02	0,94	0,00	0,45	0,19	0,04	0,05	0,94
<b>Triglicerídeos</b>	0,56	0,94	0,94	0,86	0,94	0,86	0,94	0,43	0,82	0,45	0,00	0,94	0,84	0,84	0,94
<b>Castelli 1</b>	0,86	0,94	0,94	0,94	0,56	0,94	0,52	0,56	0,34	0,19	0,94	0,00	0,00	0,01	0,65
<b>Castelli 2</b>	0,94	0,94	0,94	0,94	0,65	0,94	0,65	0,31	0,60	0,04	0,84	0,00	0,00	0,00	0,81
<b>IAP</b>	0,94	0,94	0,94	0,94	0,56	0,94	0,81	0,35	0,56	0,05	0,84	0,01	0,00	0,00	0,67
<b>PCR</b>	0,94	0,94	0,94	0,94	0,50	0,85	0,94	0,94	0,65	0,94	0,94	0,65	0,81	0,67	0,00

Legenda: E2+ - presença do alelo E2; EMI – espessura da íntima da carótida; CC - circunferência da cintura; RCQ - razão cintura quadril; IAC - índice de adiposidade corporal; IC - índice de conicidade; Glic. – Glicose; Col Total - colesterol total; HDL - lipoproteína de alta densidade; LDL - lipoproteína de baixa densidade; TG - triglicerídeos; Castelli 1- índice Castelli 1; Castelli-2 - índice Castelli 2; IAP - índice aterogênico do plasma; PCR - Proteína C reativa.

Fonte: própria.

**Tabela 23** - Valores de correlação (r) entre as variáveis antropométricas e bioquímicas/laboratoriais nos E2-.

	<b>EMI direita</b>	<b>EMI esquerda</b>	<b>CC</b>	<b>RCQ</b>	<b>IAC</b>	<b>IC</b>	<b>Glic.</b>	<b>Col Total</b>	<b>HDL</b>	<b>LDL</b>	<b>TG</b>	<b>Castelli 1</b>	<b>Castelli 2</b>	<b>IAP</b>	<b>PCR</b>
<b>EMI direita</b>	1.00	0.50	0.19	0.18	0.05	0.18	0.18	0.13	-0.09	0.09	0.11	0.18	0.16	0.18	-0.13
<b>EMI esquerda</b>	0.50	1.00	-0.07	-0.06	-0.04	-0.16	-0.08	0.10	-0.18	0.12	0.08	0.24	0.23	0.24	-0.06
<b>CC</b>	0.19	-0.07	1.00	0.75	0.31	0.79	0.29	0.10	-0.02	0.02	0.24	0.10	-0.09	0.03	0.14
<b>RCQ</b>	0.18	-0.06	0.75	1.00	-0.21	0.86	0.15	0.10	0.06	-0.07	0.34	0.05	-0.22	-0.11	-0.09
<b>IAC</b>	0.05	-0.04	0.31	-0.21	1.00	0.02	0.31	0.11	0.15	0.19	-0.18	-0.04	0.13	0.05	0.29
<b>IC</b>	0.18	-0.16	0.79	0.86	0.02	1.00	-0.13	0.22	0.13	0.21	0.19	0.10	0.05	0.28	0.01
<b>Glicemia</b>	0.18	-0.08	0.29	0.15	0.31	-0.13	1.00	-0.06	-0.10	-0.10	0.06	0.02	-0.06	-0.08	0.01
<b>Colesterol</b>	0.13	0.10	0.10	0.10	0.11	0.22	-0.06	1.00	0.25	0.93	0.42	0.54	0.46	0.57	-0.11
<b>HDL</b>	-0.09	-0.18	-0.02	0.06	0.15	0.13	-0.10	0.25	1.00	0.15	-0.26	-0.63	-0.43	-0.49	-0.06
<b>LDL</b>	0.09	0.12	0.02	-0.07	0.19	0.21	-0.10	0.93	0.15	1.00	0.26	0.59	0.70	0.73	-0.05
<b>Triglicerídeos</b>	0.11	0.08	0.24	0.34	-0.18	0.19	0.06	0.42	-0.26	0.26	1.00	0.59	-0.09	0.31	-0.06
<b>Castelli 1</b>	0.18	0.24	0.10	0.05	-0.04	0.10	0.02	0.54	-0.63	0.59	0.59	1.00	0.72	0.88	0.01
<b>Castelli 2</b>	0.16	0.23	-0.09	-0.22	0.13	0.05	-0.06	0.46	-0.43	0.70	-0.09	0.72	1.00	0.95	0.02
<b>IAP</b>	0.18	0.24	0.03	-0.11	0.05	0.28	-0.08	0.57	-0.49	0.73	0.31	0.88	0.95	1.00	0.01
<b>PCR</b>	-0.13	-0.06	0.14	-0.09	0.29	0.01	0.01	-0.11	-0.06	-0.05	-0.06	0.01	0.02	0.01	1.00

Legenda: E2- - ausência do alelo E2; EMI – espessura da íntima da carótida; CC - circunferência da cintura; RCQ - razão cintura quadril; IAC - índice de adiposidade corporal; IC - índice de conicidade; Glic. – Glicose; Col Total - colesterol total; HDL - lipoproteína de alta densidade; LDL - lipoproteína de baixa densidade; TG - triglicerídeos; Castelli 1- índice Castelli 1; Castelli-2 - índice Castelli 2; IAP - índice aterogênico do plasma; PCR - Proteína C reativa.

Fonte: própria.

**Tabela 24** - Valores de p entre as variáveis antropométricas e bioquímicas/laboratoriais nos E2-.

	<b>EMI direita</b>	<b>EMI esquerda</b>	<b>CC</b>	<b>RCQ</b>	<b>IAC</b>	<b>IC</b>	<b>Glic.</b>	<b>Col Total</b>	<b>HDL</b>	<b>LDL</b>	<b>TG</b>	<b>Castelli 1</b>	<b>Castelli 2</b>	<b>IAP</b>	<b>PCR</b>
<b>EMI direita</b>	0.00	0.00	0.16	0.17	0.72	0.17	0.21	0.39	0.56	0.56	0.49	0.22	0.30	0.21	0.43
<b>EMI esquerda</b>	0.00	0.00	0.63	0.70	0.76	0.25	0.64	0.54	0.21	0.47	0.63	0.08	0.10	0.08	0.72
<b>CC</b>	0.16	0.63	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.51	0.89	0.89	0.06	0.51	0.56	0.83	0.34
<b>RCQ</b>	0.17	0.70	0.00	0.00	0.06	0.00	0.30	0.53	0.70	0.65	0.00	0.72	0.10	0.49	0.58
<b>IAC</b>	0.72	0.76	0.00	0.06	0.00	0.90	0.01	0.47	0.30	0.18	0.18	0.79	0.37	0.73	0.02
<b>IC</b>	0.17	0.25	0.00	0.00	0.90	0.00	0.38	0.10	0.39	0.13	0.16	0.53	0.73	0.03	0.94
<b>Glicemia</b>	0.21	0.64	0.01	0.30	0.01	0.38	0.00	0.69	0.50	0.50	0.67	0.88	0.70	0.57	0.92
<b>Colesterol</b>	0.39	0.54	0.51	0.53	0.47	0.10	0.69	0.00	0.03	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.49
<b>HDL</b>	0.56	0.21	0.89	0.70	0.30	0.39	0.50	0.03	0.00	0.27	0.03	0.00	0.00	0.00	0.69
<b>LDL</b>	0.56	0.47	0.89	0.65	0.18	0.13	0.50	0.00	0.27	0.00	0.03	0.00	0.00	0.00	0.72
<b>Triglicerídeos</b>	0.49	0.63	0.06	0.00	0.18	0.16	0.67	0.00	0.03	0.03	0.00	0.00	0.54	0.01	0.69
<b>Castelli 1</b>	0.22	0.08	0.51	0.72	0.79	0.53	0.88	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.94
<b>Castelli 2</b>	0.30	0.10	0.56	0.10	0.37	0.73	0.70	0.00	0.00	0.00	0.54	0.00	0.00	0.00	0.90
<b>IAP</b>	0.21	0.08	0.83	0.49	0.73	0.03	0.57	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.94
<b>PCR</b>	0.43	0.72	0.34	0.58	0.02	0.94	0.92	0.49	0.69	0.72	0.69	0.94	0.90	0.94	0.00

Legenda: E2- - ausência do alelo E2; EMI – espessura da íntima da carótida; CC - circunferência da cintura; RCQ - razão cintura quadril; IAC - índice de adiposidade corporal; IC - índice de conicidade; Glic. – Glicose; Col Total - colesterol total; HDL - lipoproteína de alta densidade; LDL - lipoproteína de baixa densidade; TG - triglicerídeos; Castelli 1- índice Castelli 1; Castelli-2 - índice Castelli 2; IAP - índice aterogênico do plasma; PCR - Proteína C reativa.

Fonte: própria.

**Tabela 25** - Valores de correlação (r) entre as variáveis antropométricas e bioquímicas/laboratoriais nos E4+.

	<b>EMI direita</b>	<b>EMI esquerda</b>	<b>CC</b>	<b>RCQ</b>	<b>IAC</b>	<b>IC</b>	<b>Glic.</b>	<b>Col Total</b>	<b>HDL</b>	<b>LDL</b>	<b>TG</b>	<b>Castelli 1</b>	<b>Castelli 2</b>	<b>IAP</b>	<b>PCR</b>
<b>EMI direita</b>	1.00	0.89	0.35	0.10	0.30	0.19	0.19	0.05	-0.39	-0.03	0.39	0.38	0.25	0.26	0.00
<b>EMI esquerda</b>	0.89	1.00	0.40	0.16	0.24	0.21	0.25	0.05	-0.39	-0.05	0.45	0.38	0.24	0.26	-0.05
<b>CC</b>	0.35	0.40	1.00	0.76	0.23	0.84	0.35	0.04	-0.32	0.00	0.34	0.31	0.17	0.18	-0.25
<b>RCQ</b>	0.10	0.16	0.76	1.00	-0.25	0.86	0.11	0.02	-0.24	-0.06	0.38	0.23	0.04	0.08	-0.23
<b>IAC</b>	0.30	0.24	0.23	-0.25	1.00	0.02	0.33	0.39	0.17	0.42	-0.03	0.14	0.26	0.26	-0.04
<b>IC</b>	0.19	0.21	0.84	0.86	0.02	1.00	-0.73	0.31	0.10	0.37	0.20	0.27	0.39	0.58	-0.28
<b>Glicemia</b>	0.19	0.25	0.35	0.11	0.33	-0.73	1.00	-0.19	-0.18	-0.26	-0.02	-0.10	-0.24	-0.42	0.02
<b>Colesterol</b>	0.05	0.05	0.04	0.02	0.39	0.31	-0.19	1.00	0.33	0.94	0.36	0.58	0.65	0.63	0.12
<b>HDL</b>	-0.39	-0.39	-0.32	-0.24	0.17	0.10	-0.18	0.33	1.00	0.27	-0.32	-0.54	-0.35	-0.28	-0.27
<b>LDL</b>	-0.03	-0.05	0.00	-0.06	0.42	0.37	-0.26	0.94	0.27	1.00	0.10	0.57	0.76	0.76	0.17
<b>Triglicerídeos</b>	0.39	0.45	0.34	0.38	-0.03	0.20	-0.02	0.36	-0.32	0.10	1.00	0.61	0.26	0.23	0.08
<b>Castelli 1</b>	0.38	0.38	0.31	0.23	0.14	0.27	-0.10	0.58	-0.54	0.57	0.61	1.00	0.91	0.83	0.35
<b>Castelli 2</b>	0.25	0.24	0.17	0.04	0.26	0.39	-0.24	0.65	-0.35	0.76	0.26	0.91	1.00	0.96	0.38
<b>IAP</b>	0.26	0.26	0.18	0.08	0.26	0.58	-0.42	0.63	-0.28	0.76	0.23	0.83	0.96	1.00	0.38
<b>PCR</b>	0.00	-0.05	-0.25	-0.23	-0.04	-0.28	0.02	0.12	-0.27	0.17	0.08	0.35	0.38	0.38	1.00

Legenda: E4+ - presença do alelo E4; EMI – espessura da íntima da carótida; CC - circunferência da cintura; RCQ - razão cintura quadril; IAC - índice de adiposidade corporal; IC - índice de conicidade; Glic. – Glicose; Col Total - colesterol total; HDL - lipoproteína de alta densidade; LDL - lipoproteína de baixa densidade; TG - triglicerídeos; Castelli 1- índice Castelli 1; Castelli-2 - índice Castelli 2; IAP - índice aterogênico do plasma; PCR - Proteína C reativa.

Fonte: própria.

**Tabela 26** - Valores de p entre as variáveis antropométricas e bioquímicas/laboratoriais nos E4+.

	<b>EMI direita</b>	<b>EMI esquerda</b>	<b>CC</b>	<b>RCQ</b>	<b>IAC</b>	<b>IC</b>	<b>Glic.</b>	<b>Col Total</b>	<b>HDL</b>	<b>LDL</b>	<b>TG</b>	<b>Castelli 1</b>	<b>Castelli 2</b>	<b>IAP</b>	<b>PCR</b>
<b>EMI direita</b>	0.00	0.00	0.16	0.73	0.25	0.44	0.49	0.91	0.16	0.93	0.16	0.16	0.37	0.36	0.99
<b>EMI esquerda</b>	0.00	0.00	0.11	0.51	0.35	0.40	0.36	0.91	0.16	0.91	0.10	0.16	0.38	0.36	0.91
<b>CC</b>	0.16	0.11	0.00	0.00	0.30	0.00	0.16	0.91	0.21	0.99	0.17	0.22	0.50	0.48	0.35
<b>RCQ</b>	0.73	0.51	0.00	0.00	0.28	0.00	0.71	0.93	0.36	0.86	0.14	0.36	0.91	0.79	0.37
<b>IAC</b>	0.25	0.35	0.30	0.28	0.00	0.93	0.18	0.13	0.49	0.09	0.92	0.61	0.31	0.32	0.91
<b>IC</b>	0.44	0.40	0.00	0.00	0.93	0.00	0.00	0.20	0.71	0.15	0.40	0.28	0.14	0.00	0.28
<b>Glicemia</b>	0.49	0.36	0.16	0.71	0.18	0.00	0.00	0.43	0.45	0.30	0.93	0.71	0.34	0.09	0.93
<b>Colesterol</b>	0.91	0.91	0.91	0.93	0.13	0.20	0.43	0.00	0.17	0.00	0.15	0.00	0.00	0.00	0.69
<b>HDL</b>	0.16	0.16	0.21	0.36	0.49	0.71	0.45	0.17	0.00	0.28	0.18	0.01	0.16	0.27	0.28
<b>LDL</b>	0.93	0.91	0.99	0.86	0.09	0.15	0.30	0.00	0.28	0.00	0.71	0.00	0.00	0.00	0.49
<b>Triglicerídeos</b>	0.16	0.10	0.17	0.14	0.92	0.40	0.93	0.15	0.18	0.71	0.00	0.00	0.29	0.36	0.81
<b>Castelli 1</b>	0.16	0.16	0.22	0.36	0.61	0.28	0.71	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.16
<b>Castelli 2</b>	0.37	0.38	0.50	0.91	0.31	0.14	0.34	0.00	0.16	0.00	0.29	0.00	0.00	0.00	0.15
<b>IAP</b>	0.36	0.36	0.48	0.79	0.32	0.00	0.09	0.00	0.27	0.00	0.36	0.00	0.00	0.00	0.15
<b>PCR</b>	0.99	0.91	0.35	0.37	0.91	0.28	0.93	0.69	0.28	0.49	0.81	0.16	0.15	0.15	0.00

Legenda: E4+ - presença do alelo E4; EMI – espessura da íntima da carótida; CC - circunferência da cintura; RCQ - razão cintura quadril; IAC - índice de adiposidade corporal; IC - índice de conicidade; Glic. – Glicose; Col Total - colesterol total; HDL - lipoproteína de alta densidade; LDL - lipoproteína de baixa densidade; TG - triglicerídeos; Castelli 1- índice Castelli 1; Castelli-2 - índice Castelli 2; IAP - índice aterogênico do plasma; PCR - Proteína C reativa.

Fonte: própria.

**Tabela 27** - Valores de correlação (r) entre as variáveis antropométricas e bioquímicas/laboratoriais nos E4-.

	<b>EMI direita</b>	<b>EMI esquerda</b>	<b>CC</b>	<b>RCQ</b>	<b>IAC</b>	<b>IC</b>	<b>Glic.</b>	<b>Col Total</b>	<b>HDL</b>	<b>LDL</b>	<b>TG</b>	<b>Castelli 1</b>	<b>Castelli 2</b>	<b>IAP</b>	<b>PCR</b>
<b>EMI direita</b>	1.00	0.24	0.14	0.18	-0.03	0.16	0.26	0.18	0.03	0.20	-0.02	0.10	0.14	0.16	-0.15
<b>EMI esquerda</b>	0.24	1.00	-0.24	-0.17	-0.10	-0.34	-0.13	0.10	-0.09	0.23	-0.08	0.17	0.22	0.22	-0.06
<b>CC</b>	0.14	-0.24	1.00	0.73	0.37	0.76	0.33	0.10	0.03	0.03	0.20	0.05	-0.14	0.01	0.24
<b>RCQ</b>	0.18	-0.17	0.73	1.00	-0.17	0.86	0.17	0.12	0.13	-0.06	0.31	0.01	-0.27	-0.13	-0.04
<b>IAC</b>	-0.03	-0.10	0.37	-0.17	1.00	0.02	0.31	-0.04	0.07	0.04	-0.22	-0.09	0.10	-0.02	0.36
<b>IC</b>	0.16	-0.34	0.76	0.86	0.02	1.00	0.31	0.09	0.20	-0.11	0.27	-0.08	-0.31	-0.21	0.09
<b>Glicemia</b>	0.26	-0.13	0.33	0.17	0.31	0.31	1.00	0.01	-0.11	-0.01	0.09	0.08	0.02	0.08	-0.01
<b>Colesterol</b>	0.18	0.10	0.10	0.12	-0.04	0.09	0.01	1.00	0.16	0.93	0.44	0.56	0.41	0.56	-0.11
<b>HDL</b>	0.03	-0.09	0.03	0.13	0.07	0.20	-0.11	0.16	1.00	-0.01	-0.25	-0.68	-0.49	-0.64	-0.04
<b>LDL</b>	0.20	0.23	0.03	-0.06	0.04	-0.11	-0.01	0.93	-0.01	1.00	0.34	0.65	0.72	0.75	-0.06
<b>Triglicerídeos</b>	-0.02	-0.08	0.20	0.31	-0.22	0.27	0.09	0.44	-0.25	0.34	1.00	0.57	-0.17	0.35	-0.06
<b>Castelli 1</b>	0.10	0.17	0.05	0.01	-0.09	-0.08	0.08	0.56	-0.68	0.65	0.57	1.00	0.68	0.93	0.00
<b>Castelli 2</b>	0.14	0.22	-0.14	-0.27	0.10	-0.31	0.02	0.41	-0.49	0.72	-0.17	0.68	1.00	0.96	0.02
<b>IAP</b>	0.16	0.22	0.01	-0.13	-0.02	-0.21	0.08	0.56	-0.64	0.75	0.35	0.93	0.96	1.00	0.00
<b>PCR</b>	-0.15	-0.06	0.24	-0.04	0.36	0.09	-0.01	-0.11	-0.04	-0.06	-0.06	0.00	0.02	0.00	1.00

Legenda: E4- - ausência do alelo E4; EMI – espessura da íntima da carótida; CC - circunferência da cintura; RCQ - razão cintura quadril; IAC - índice de adiposidade corporal; IC - índice de conicidade; Glic. – Glicose; Col Total - colesterol total; HDL - lipoproteína de alta densidade; LDL - lipoproteína de baixa densidade; TG - triglicerídeos; Castelli 1- índice Castelli 1; Castelli-2 - índice Castelli 2; IAP - índice aterogênico do plasma; PCR - Proteína C reativa.

Fonte: própria.



**Tabela 28** - Valores de p entre as variáveis antropométricas e bioquímicas/laboratoriais nos E4-.

	<b>EMI direita</b>	<b>EMI esquerda</b>	<b>CC</b>	<b>RCQ</b>	<b>IAC</b>	<b>IC</b>	<b>Glic.</b>	<b>Col Total</b>	<b>HDL</b>	<b>LDL</b>	<b>TG</b>	<b>Castelli 1</b>	<b>Castelli 2</b>	<b>IAP</b>	<b>PCR</b>
<b>EMI direita</b>	0.00	0.10	0.42	0.26	0.93	0.34	0.09	0.30	0.92	0.24	0.97	0.63	0.48	0.39	0.42
<b>EMI esquerda</b>	0.10	0.00	0.10	0.29	0.62	0.01	0.51	0.63	0.65	0.17	0.70	0.34	0.20	0.20	0.83
<b>CC</b>	0.42	0.10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.02	0.63	0.91	0.91	0.21	0.87	0.42	0.98	0.15
<b>RCQ</b>	0.26	0.29	0.00	0.00	0.22	0.00	0.30	0.55	0.46	0.79	0.03	0.98	0.08	0.51	0.88
<b>IAC</b>	0.93	0.62	0.00	0.22	0.00	0.93	0.03	0.89	0.71	0.88	0.17	0.65	0.63	0.95	0.01
<b>IC</b>	0.34	0.01	0.00	0.00	0.93	0.00	0.03	0.65	0.22	0.57	0.07	0.68	0.03	0.21	0.65
<b>Glicemia</b>	0.09	0.51	0.02	0.30	0.03	0.03	0.00	0.98	0.57	0.98	0.65	0.65	0.95	0.70	0.98
<b>Colesterol</b>	0.30	0.63	0.63	0.55	0.89	0.65	0.98	0.00	0.33	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.57
<b>HDL</b>	0.92	0.65	0.91	0.46	0.71	0.22	0.57	0.33	0.00	0.98	0.09	0.00	0.00	0.00	0.90
<b>LDL</b>	0.24	0.17	0.91	0.79	0.88	0.57	0.98	0.00	0.98	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.83
<b>Triglicerídeos</b>	0.97	0.70	0.21	0.03	0.17	0.07	0.65	0.00	0.09	0.01	0.00	0.00	0.29	0.01	0.78
<b>Castelli 1</b>	0.63	0.34	0.87	0.98	0.65	0.68	0.65	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.99
<b>Castelli 2</b>	0.48	0.20	0.42	0.08	0.63	0.03	0.95	0.00	0.00	0.00	0.29	0.00	0.00	0.00	0.97
<b>IAP</b>	0.39	0.20	0.98	0.51	0.95	0.21	0.70	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.99
<b>PCR</b>	0.42	0.83	0.15	0.88	0.01	0.65	0.98	0.57	0.90	0.83	0.78	0.99	0.97	0.99	0.0

Legenda: E4- - ausência do alelo E4; EMI – espessura da íntima da carótida; CC - circunferência da cintura; RCQ - razão cintura quadril; IAC - índice de adiposidade corporal; IC - índice de conicidade; Glic. – Glicose; Col Total - colesterol total; HDL - lipoproteína de alta densidade; LDL - lipoproteína de baixa densidade; TG - triglicerídeos; Castelli 1- índice Castelli 1; Castelli-2 - índice Castelli 2; IAP - índice aterogênico do plasma; PCR - Proteína C reativa.

Fonte: própria.

**Tabela 29** - Valores de correlação (r) entre as variáveis antropométricas e bioquímicas/laboratoriais nos casos com o alelo E4+.

	<b>EMI direita</b>	<b>EMI esquerda</b>	<b>CC</b>	<b>RCQ</b>	<b>IAC</b>	<b>IC</b>	<b>Glic.</b>	<b>Col Total</b>	<b>HDL</b>	<b>LDL</b>	<b>TG</b>	<b>Castelli 1</b>	<b>Castelli 2</b>	<b>IAP</b>	<b>PCR</b>
<b>EMI direita</b>	1.00	0.91	0.58	0.38	0.10	0.42	0.26	-0.20	-0.75	-0.23	0.68	0.49	0.26	0.27	-0.02
<b>EMI esquerda</b>	0.91	1.00	0.63	0.41	0.11	0.44	0.24	-0.17	-0.64	-0.19	0.56	0.39	0.19	0.25	0.01
<b>CC</b>	0.58	0.63	1.00	0.76	0.19	0.85	0.54	0.27	-0.50	0.27	0.54	0.53	0.44	0.47	0.32
<b>RCQ</b>	0.38	0.41	0.76	1.00	-0.23	0.91	0.25	0.56	-0.38	0.46	0.61	0.58	0.51	0.56	0.28
<b>IAC</b>	0.10	0.11	0.19	-0.23	1.00	0.07	0.09	0.04	-0.01	0.05	-0.01	-0.08	-0.05	0.00	-0.26
<b>IC</b>	0.42	0.44	0.85	0.91	0.07	1.00	-0.83	0.73	0.17	0.71	0.41	0.37	0.54	0.73	0.13
<b>Glicemia</b>	0.26	0.24	0.54	0.25	0.09	-0.83	1.00	-0.58	-0.27	-0.60	-0.11	-0.23	-0.44	-0.60	0.01
<b>Colesterol</b>	-0.20	-0.17	0.27	0.56	0.04	0.73	-0.58	1.00	0.12	0.95	0.27	0.55	0.72	0.80	0.21
<b>HDL</b>	-0.75	-0.64	-0.50	-0.38	-0.01	0.17	-0.27	0.12	1.00	-0.03	-0.49	-0.72	-0.52	-0.38	-0.40
<b>LDL</b>	-0.23	-0.19	0.27	0.46	0.05	0.71	-0.60	0.95	-0.03	1.00	0.16	0.63	0.83	0.90	0.33
<b>Triglicerídeos</b>	0.68	0.56	0.54	0.61	-0.01	0.41	-0.11	0.27	-0.49	0.16	1.00	0.61	0.42	0.41	0.13
<b>Castelli 1</b>	0.49	0.39	0.53	0.58	-0.08	0.37	-0.23	0.55	-0.72	0.63	0.61	1.00	0.94	0.85	0.55
<b>Castelli 2</b>	0.26	0.19	0.44	0.51	-0.05	0.54	-0.44	0.72	-0.52	0.83	0.42	0.94	1.00	0.96	0.55
<b>IAP</b>	0.27	0.25	0.47	0.56	0.00	0.73	-0.60	0.80	-0.38	0.90	0.41	0.85	0.96	1.00	0.46
<b>PCR</b>	-0.02	0.01	0.32	0.28	-0.26	0.13	0.01	0.21	-0.40	0.33	0.13	0.55	0.55	0.46	1.00

Legenda: E4+ - presença do alelo E4; EMI – espessura da íntima da carótida; CC - circunferência da cintura; RCQ - razão cintura quadril; IAC - índice de adiposidade corporal; IC - índice de conicidade; Glic. – Glicose; Col Total - colesterol total; HDL - lipoproteína de alta densidade; LDL - lipoproteína de baixa densidade; TG - triglicerídeos; Castelli 1- índice Castelli 1; Castelli-2 - índice Castelli 2; IAP - índice aterogênico do plasma; PCR - Proteína C reativa.

Fonte: própria.

**Tabela 27** - Valores de p entre as variáveis antropométricas e bioquímicas/laboratoriais nos casos com o alelo E4+.

	EMI direita	EMI esquerda	CC	RCQ	IAC	IC	Glic.	Col Total	HDL	LDL	TG	Castelli 1	Castelli 2	IAP	PCR
EMI direita	0.00	0.71	0.82	0.50	0.28	0.53	0.27	0.67	0.97	0.41	0.99	0.80	0.87	0.66	0.99
EMI esquerda	0.71	0.00	0.50	0.80	0.80	0.19	0.47	0.27	0.97	0.12	0.94	0.47	0.47	0.45	0.80
CC	0.82	0.50	0.00	0.00	0.66	0.00	0.48	0.73	0.94	0.82	0.21	0.80	0.63	0.73	0.99
RCQ	0.50	0.80	0.00	0.00	0.10	0.00	0.65	0.73	0.53	0.74	0.06	0.94	0.19	0.63	0.65
IAC	0.28	0.80	0.66	0.10	0.00	0.41	0.99	0.74	0.53	0.74	0.21	0.94	0.43	0.62	0.15
IC	0.53	0.19	0.00	0.00	0.41	0.00	0.95	0.74	0.46	0.71	0.11	0.74	0.15	0.50	0.74
Glicemia	0.27	0.47	0.48	0.65	0.99	0.95	0.00	0.53	0.27	0.87	0.79	0.71	0.94	0.14	0.99
Colesterol	0.67	0.27	0.73	0.73	0.74	0.74	0.53	0.00	0.53	0.00	0.00	0.00	0.12	0.01	0.42
HDL	0.97	0.97	0.94	0.53	0.53	0.46	0.27	0.53	0.00	0.99	0.74	0.00	0.00	0.00	0.09
LDL	0.41	0.12	0.82	0.74	0.74	0.71	0.87	0.00	0.99	0.00	0.06	0.00	0.00	0.00	0.85
Triglicerídeos	0.99	0.94	0.21	0.06	0.21	0.11	0.79	0.00	0.74	0.06	0.00	0.02	0.91	0.03	0.60
Castelli 1	0.80	0.47	0.80	0.94	0.94	0.74	0.71	0.00	0.00	0.00	0.02	0.00	0.00	0.00	0.42
Castelli 2	0.87	0.47	0.63	0.19	0.43	0.15	0.94	0.12	0.00	0.00	0.91	0.00	0.00	0.00	0.24
IAP	0.66	0.45	0.73	0.63	0.62	0.50	0.14	0.01	0.00	0.00	0.03	0.00	0.00	0.00	0.29
PCR	0.99	0.80	0.99	0.65	0.15	0.74	0.99	0.42	0.09	0.85	0.60	0.42	0.24	0.29	0.00

Legenda: E4+ - presença do alelo E4; EMI – espessura da íntima da carótida; CC - circunferência da cintura; RCQ - razão cintura quadril; IAC - índice de adiposidade corporal; IC - índice de conicidade; Glic. – Glicose; Col Total - colesterol total; HDL - lipoproteína de alta densidade; LDL - lipoproteína de baixa densidade; TG - triglicerídeos; Castelli 1- índice Castelli 1; Castelli-2 - índice Castelli 2; IAP - índice aterogênico do plasma; PCR - Proteína C reativa.

Fonte: própria.

**Tabela 28** - Valores de correlação (r) entre as variáveis antropométricas e bioquímicas/laboratoriais nos casos com o alelo E2+.

	EMI direita	EMI esquerda	CC	RCQ	IAC	IC	Glic.	Col Total	HDL	LDL	TG	Castelli 1	Castelli 2	IAP	PCR
EMI direita	1.00	0.27	0.36	-0.42	-0.44	-0.16	0.97	-0.90	-0.82	-1.00	0.88	-0.01	-0.84	-0.85	0.01
EMI esquerda	0.27	1.00	1.00	0.76	0.75	0.90	0.50	-0.66	-0.77	-0.32	-0.23	0.96	0.30	0.27	0.96
CC	0.36	1.00	1.00	0.68	0.36	0.76	0.57	-0.63	-0.49	-0.41	-0.04	0.34	0.22	0.20	0.84
RCQ	-0.42	0.76	0.68	1.00	0.36	0.87	-0.19	-0.04	-0.14	0.32	-0.58	0.30	0.76	0.75	0.80
IAC	-0.44	0.75	0.36	0.36	1.00	0.09	-0.18	-0.50	-0.76	-0.13	0.18	0.93	0.83	0.82	0.86
IC	-0.16	0.90	0.76	0.87	0.09	1.00	0.11	0.02	0.12	0.24	-0.68	-0.11	0.36	0.35	0.59
Glicemia	0.97	0.50	0.57	-0.19	-0.18	0.11	1.00	-0.73	-0.39	-0.87	0.51	-0.01	-0.63	-0.65	0.17
Colesterol	-0.90	-0.66	-0.63	-0.04	-0.50	0.02	-0.73	1.00	0.92	0.92	-0.74	-0.67	0.06	0.08	-0.61
HDL	-0.82	-0.77	-0.49	-0.14	-0.76	0.12	-0.39	0.92	1.00	0.73	-0.73	-0.91	-0.27	-0.25	-0.70
LDL	-1.00	-0.32	-0.41	0.32	-0.13	0.24	-0.87	0.92	0.73	1.00	-0.85	-0.39	0.44	0.46	-0.25
Triglicerídeos	0.88	-0.23	-0.04	-0.58	0.18	-0.68	0.51	-0.74	-0.73	-0.85	1.00	0.52	-0.34	-0.35	0.02
Castelli 1	-0.01	0.96	0.34	0.30	0.93	-0.11	-0.01	-0.67	-0.91	-0.39	0.52	1.00	0.61	0.60	0.73
Castelli 2	-0.84	0.30	0.22	0.76	0.83	0.36	-0.63	0.06	-0.27	0.44	-0.34	0.61	1.00	1.00	0.66
IAP	-0.85	0.27	0.20	0.75	0.82	0.35	-0.65	0.08	-0.25	0.46	-0.35	0.60	1.00	1.00	0.64
PCR	0.01	0.96	0.84	0.80	0.86	0.59	0.17	-0.61	-0.70	-0.25	0.02	0.73	0.66	0.64	1.00

Legenda: E2+ - presença do alelo E2; EMI – espessura da íntima da carótida; CC - circunferência da cintura; RCQ - razão cintura quadril; IAC - índice de adiposidade corporal; IC - índice de conicidade; Glic. – Glicose; Col Total - colesterol total; HDL - lipoproteína de alta densidade; LDL - lipoproteína de baixa densidade; TG - triglicerídeos; Castelli 1- índice Castelli 1; Castelli-2 - índice Castelli 2; IAP - índice aterogênico do plasma; PCR - Proteína C reativa.

Fonte: própria.

**Tabela 29** - Valores de p entre as variáveis antropométricas e bioquímicas/laboratoriais nos casos com o alelo E2+.

	EMI direita	EMI esquerda	CC	RCQ	IAC	IC	Glic.	Col Total	HDL	LDL	TG	Castelli 1	Castelli 2	IAP	PCR
EMI direita	0.00	0.97	0.97	0.97	0.97	0.97	0.81	0.85	0.85	0.40	0.85	0.99	0.85	0.85	0.99
EMI esquerda	0.97	0.00	0.59	0.88	0.89	0.85	0.97	0.93	0.87	0.97	0.97	0.81	0.97	0.97	0.81
CC	0.97	0.59	0.00	0.84	0.93	0.81	0.87	0.85	0.91	0.96	0.99	0.97	0.97	0.97	0.81
RCQ	0.97	0.88	0.84	0.00	0.93	0.59	0.97	0.99	0.97	0.97	0.87	0.97	0.85	0.85	0.84
IAC	0.97	0.89	0.93	0.93	0.00	0.97	0.97	0.91	0.85	0.97	0.97	0.59	0.81	0.81	0.81
IC	0.97	0.85	0.81	0.59	0.97	0.00	0.97	0.99	0.97	0.97	0.85	0.97	0.97	0.97	0.86
Glicemia	0.81	0.97	0.87	0.97	0.97	0.97	0.00	0.85	0.97	0.81	0.91	0.99	0.85	0.85	0.97
Colesterol	0.85	0.93	0.85	0.99	0.91	0.99	0.85	0.00	0.65	0.65	0.85	0.85	0.99	0.99	0.85
HDL	0.85	0.87	0.91	0.97	0.85	0.97	0.97	0.65	0.00	0.85	0.85	0.65	0.97	0.97	0.85
LDL	0.40	0.97	0.96	0.97	0.97	0.97	0.81	0.65	0.85	0.00	0.81	0.97	0.93	0.93	0.97
Triglicerídeos	0.85	0.97	0.99	0.87	0.97	0.85	0.91	0.85	0.85	0.81	0.00	0.91	0.97	0.97	0.99
Castelli 1	0.99	0.81	0.97	0.97	0.59	0.97	0.99	0.85	0.65	0.97	0.91	0.00	0.85	0.86	0.85
Castelli 2	0.85	0.97	0.97	0.85	0.81	0.97	0.85	0.99	0.97	0.93	0.97	0.85	0.00	0.01	0.85
IAP	0.85	0.97	0.97	0.85	0.81	0.97	0.85	0.99	0.97	0.93	0.97	0.86	0.01	0.00	0.85
PCR	0.99	0.81	0.81	0.84	0.81	0.86	0.97	0.85	0.85	0.97	0.99	0.85	0.85	0.85	0.00

Legenda: E2+ - presença do alelo E2; EMI – espessura da íntima da carótida; CC - circunferência da cintura; RCQ - razão cintura quadril; IAC - índice de adiposidade corporal; IC - índice de conicidade; Glic. – Glicose; Col Total - colesterol total; HDL - lipoproteína de alta densidade; LDL - lipoproteína de baixa densidade; TG - triglicerídeos; Castelli 1- índice Castelli 1; Castelli-2 - índice Castelli 2; IAP - índice aterogênico do plasma; PCR - Proteína C reativa.

Fonte: própria.



**ANEXO 1. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS**

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

**Projeto: FATORES DE RISCO E PREVENÇÃO DA DOENÇA ATEROSCLERÓTICA EM PACIENTES COM PERIODONTITE NO CEARÁ**

**Introdução** Você está sendo convidado (a) a participar de uma pesquisa. Antes de decidir, é importante que você entenda o porquê da realização desta pesquisa e o que ela envolve. Por favor, dedique um tempo para ler cuidadosamente as informações seguintes e, se preferir, discutir com seus familiares, amigos ou com seu médico. Pergunte-nos se houver alguma coisa que não esteja clara ou se precisar de mais informações.

**Para ser lido para ou por todos os participantes do estudo** As informações a seguir descrevem o estudo e os seus direitos como participante. Além do que for aqui esclarecido, o entrevistador poderá responder qualquer questão que você tenha referente ao estudo. Por favor, leia ou ouça com atenção e sempre que achar necessário interrompa para perguntar.

**Justificativa e objetivos do estudo** A periodontite é uma doença que se caracteriza por uma inflamação e perda do osso que envolve os dentes, levando ao amolecimento dos dentes, mau hálito e, até mesmo, ao comprometimento da saúde geral da pessoa. O estudo das células e moléculas envolvidas no processo inflamatório e de reabsorção óssea será importante para compreender melhor a atividade dessa doença e seus fatores de risco. O estudo visa relacionar a doença periodontal com a expressão de genes em humanos correlacionando com alterações ateroscleróticas. Os resultados nos ajudarão a ter uma melhor compreensão desta doença e poderão possibilitar um crescimento científico relacionado a este tema.

**O objetivo deste trabalho:** Avaliar a relação da doença periodontal com o gene de risco para doença aterosclerótica (gordura e entupimento dos vasos) para prevenir o avanço da doença.

**Procedimentos** Serão realizados: preenchimento de questionários com perguntas sobre sua saúde e seus hábitos de higiene da boca; exames para diagnóstico da doença periodontal realizados por dentistas (consiste na introdução indolor de uma sonda no sulco gengival); Será feita coleta de células bucais por através de uma simples escovação e bochecho com água potável, colhendo o expectorado em um tubo estéril para análise em laboratório e de sangue por punção venosa por um método indolor e de mínimo risco para purificação de DNA genômico (que confere as suas características hereditárias) e estudo dos níveis de gordura no sangue e para construir um perfil genético. Além disso, você será avaliado por ultrassom com doppler (método indolor e não invasivo) no hospital universitário, acompanhado por um médico, para avaliar a gordura na carótida e seu coração.

**Os desconfortos ou riscos esperados** Durante a coleta você não sentirá nenhum ou pouco desconforto, as células do sangue e bucais coletadas envolve mínimo risco, sendo um método eficaz de purificação do DNA genômico. Os resultados dos dados genéticos serão mantidos em sigilo através de estudo duplo cego, sendo mantidos em armário fechado com segredo, apenas com acesso dos pesquisadores principais do estudo. Todas as amostras serão codificadas e a confidencialidade dos resultados mantidos. Existe um pequeno risco de vazamento de informação sigilosa, apesar de todo cuidado com a codificação, prática de confidencialidade e barreira eletrônica dos arquivos com senha, contudo os benefícios potenciais desse estudo superam esse mínimo risco.

**Os benefícios que pode ter** Participando dessa pesquisa, você não receberá nenhum benefício direto como dinheiro, mas estará contribuindo para a elaboração de um trabalho científico que poderá proporcionar benefícios futuros à sociedade. Independente da sua decisão de participar ou não desta pesquisa, o seu plano de tratamento seguirá conforme estabelecido e de acordo com o cronograma de atividades proposto e será instruído em relação aos cuidados com a sua higiene oral.

**Garantia de resposta a qualquer pergunta** A qualquer momento, você poderá fazer perguntas sobre esta pesquisa com a garantia de que estas serão respondidas.

**Liberdade de abandonar a pesquisa sem prejuízo para si** A qualquer momento, você poderá entrar em contato com os pesquisadores desta pesquisa e pedir que os seus dados sejam retirados da mesma. A concordância em participar deste estudo não implica em qualquer modificação no seu tratamento.

**Garantia de privacidade** Os dados obtidos neste estudo, bem como fotografias que possam ser tiradas, serão apresentados em congressos e encontros da comunidade científica e poderão ser publicados em revistas especializadas. No entanto, a sua identidade nunca será revelada. E seu rosto nunca será mostrado totalmente nas fotografias. As informações obtidas serão analisadas



em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente. As amostras serão codificadas e as fichas e registros médicos mantidos em armários com segredo de acesso limitado apenas aos pesquisadores principais do projeto. A confidencialidade e gerenciamento dos dados serão mantidos por arquivos com dupla digitação fechados com uso de senhas.

**Garantia de acesso aos resultados** Você poderá ter acesso aos dados obtidos pelos pesquisadores, e, a qualquer momento, ficar atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas.

**Despesas e compensações** Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

**Contato:** as dúvidas não esclarecidas ou o não cumprimento do que foi acordado podem ser informados ao responsável pelo estudo, ao pesquisador Dr. Reinaldo Barreto Oriá.

**Responsável pela pesquisa: Prof. Dr. Reinaldo Barreto Oriá**

**Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1315, Rodolfo Teófilo, Fortaleza-CE**

**Telefones: 33668239**

**E-mail: [oria@ufc.br](mailto:oria@ufc.br)**

Além disso, se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, ou quiser informar qualquer questionamento durante a sua participação no estudo, entre em contato com:

- **Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará**

**Rua Coronel Nunes de Melo, 1127, Rodolfo Teófilo**

**Telefone: 3366-8344**

- **Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual do Ceará**

**Av. Paranjana, 1700, Conj. Itaperi**

**Telefone: 3101-9890**

- **Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Walter Cantídio**

**Rua Cap. Francisco Pedro, 1290 - Rodolfo Teófilo**

**Telefone: 3366-8045**

**DECLARAÇÃO DO PARTICIPANTE, OU DO RESPONSÁVEL**

Eu, \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_ anos, portador(a) do  
RG n° \_\_\_\_\_ e CPF n° \_\_\_\_\_,  
\_\_\_\_\_, após leitura cuidadosa do documento acima,  
declaro minha participação voluntária no “**FATORES DE RISCO E PREVENÇÃO DA  
DOENÇA ATEROSCLERÓTICA EM PACIENTES COM PERIODONTITE NO  
CEARÁ**”. Tenho conhecimento dos objetivos e métodos de estudo a serem utilizados, dos meus  
direitos, das minhas responsabilidades, dos riscos e benefícios e de que me submeterei à  
realização de exames clínicos e laboratoriais. Tenho liberdade para recusar minha participação,  
assim como retirar meu consentimento em qualquer fase da pesquisa. Ser-me-á assegurado o  
sigilo quanto aos meus dados envolvidos no estudo. POR FIM, DOU O MEU  
CONSENTIMENTO SEM QUE PARA ISSO EU TENHA SIDO FORÇADO OU  
OBRIGADO.

Fortaleza, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 201\_\_\_\_.

\_\_\_\_\_  
(Assinatura ou digital do participante ou responsável)

\_\_\_\_\_  
Testemunha

\_\_\_\_\_  
Membro da Equipe de Pesquisa

## ANEXO 2 – QUESTIONÁRIO ODONTOLÓGICO

**QUESTIONÁRIO ODONTOLÓGICO****Plataforma Brasil: CAAE: 18220713.1.0000.5054**

Avaliação Odontológica “**FATORES DE RISCO E PREVENÇÃO DA DOENÇA ATEROSCLERÓTICA EM PACIENTES COM PERIODONTITE NO CEARÁ**” para dentistas do CEO. **Aprovado em 05/08/2014 (versão 1.0)**

**TÍTULO:** Questionário para avaliação odontológica no projeto “Fatores de risco e prevenção da doença aterosclerótica em pacientes com periodontite no Ceará” para dentistas do CEO

**OBJETIVO:** Avaliar o quadro odontológico e para identificação dos pacientes do grupo com periodontite e sem periodontite.

Código do paciente:

--	--	--	--

**1. Histórico Odontológico**

Motivo da consulta atual		
Última visita ao dentista	Quando:	O que realizou:
Tratamento periodontal prévio	Quando:	O que realizou:
Sangramento da gengiva	( ) sim ( ) não	( ) estimulado ( ) espontâneo
Dores nas gengivas	( ) sim ( ) não	Frequência da dor:
Mobilidade nos dentes	( ) sim ( ) não	( ) localizada ( ) vários dentes
Gosto desagradável na boca	( ) sim ( ) não	( ) sempre ( ) frequentemente ( ) às vezes ( ) nunca
Hálito desagradável	( ) sim ( ) não	( ) sempre ( ) frequentemente ( ) às vezes ( ) nunca
Sensibilidade nos dentes	( ) sim ( ) não	( ) sempre ( ) frequentemente ( ) às vezes ( ) nunca Quando:
Ingere alimentos ácidos/ refrigerantes/ sucos cítricos	( ) sim ( ) não	Qual:                      Frequência:
Hábitos	( ) roer unhas ( ) pressão lingual ( ) morder objetos ( ) morder lábios ( ) ranger dentes	

Respiração	( ) nariz ( ) boca	Dorme de boca aberta ( ) sim ( ) não
Ronco ao dormir	( ) sim ( ) não	( ) sempre ( ) frequentemente ( ) às vezes ( ) nunca
Ingere alimentos entre as refeições	( ) sim ( ) não	Quais:
Realizou tratamento ortodôntico	( ) sim ( ) não	Quando:
Removeu alguma lesão da boca	( ) sim ( ) não	Qual: Quando:
Familiar com doença periodontal	( ) sim ( ) não	Quem:
Outros hábitos		

## 2. Recursos de Higiene Bucal

Escovação dental	Frequência/dia	( ) sempre ( ) frequentemente ( ) às vezes ( ) nunca
Recebeu orientação de higiene	( ) sim ( ) não	Quando:
Qual tipo de escova dental	( ) dura ( ) média ( ) macia	Quanto tempo está com a escova:
Creme dental que utiliza		Motivo:
Utiliza fio dental	( ) sim ( ) não	Motivo: ( ) sempre ( ) frequentemente ( ) às vezes ( ) nunca
Utiliza palito dental	( ) sim ( ) não	Motivo: ( ) sempre ( ) frequentemente ( ) às vezes ( ) nunca
Utiliza outro recurso de limpeza	Qual:	( ) sempre ( ) frequentemente ( ) às vezes ( ) nunca
Considera higiene adequada	( ) sim ( ) não	



**5. Registro dos procedimentos executados**

<b>Data</b>	<b>Região</b>	<b>Procedimentos Executados</b>	<b>Ass. Prof.</b>	<b>Ass. Pac.</b>

Fortaleza, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 201\_\_\_\_.

\_\_\_\_\_  
Nome por extenso do membro da Equipe de Pesquisa

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Membro da Equipe de Pesquisa

### ANEXO 3 – FICHA DE AVALIAÇÃO NUTRICIONAL



Plataforma Brasil: CAAE: 18220713.1.0000.5054

Título: “FATORES DE RISCO E PREVENÇÃO DA DOENÇA ATEROSCLERÓTICA EM PACIENTES COM PERIODONTITE NO CEARÁ”

Aprovado em 05/08/2014 (versão 1.0)

### FICHA DE AVALIAÇÃO NUTRICIONAL

Data \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Código do Paciente:

--	--	--	--

#### 1. DADOS PESSOAIS:

- 1.1. Nome: \_\_\_\_\_
- 1.2. Sexo: Feminino ( ) Masculino ( )
- 1.3. Data de nascimento: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_. Idade: \_\_\_\_\_
- 1.4. Estado civil: \_\_\_\_\_
- 1.5. Endereço: \_\_\_\_\_
- Bairro: \_\_\_\_\_ Complemento: \_\_\_\_\_
- CEP: \_\_\_\_\_ cidade: \_\_\_\_\_ UF: \_\_\_\_\_
- 1.6. Telefone residencial: \_\_\_\_\_. Celular: \_\_\_\_\_
- 1.7. E-mail: \_\_\_\_\_
- 1.8 Profissão: \_\_\_\_\_

OBS: \_\_\_\_\_

#### 2. HISTÓRICO CLÍNICO

- 2.1. Funcionamento do intestino: \_\_\_\_\_
- 2.2. Diurese: \_\_\_\_\_
- 2.3. Sono (horas por dia): \_\_\_\_\_
- 2.4. Alergias: \_\_\_\_\_
- 2.5. Cirurgias: \_\_\_\_\_
- 2.6. Uso de medicamentos: \_\_\_\_\_
- 2.7 Tabagismo: \_\_\_\_\_
- 2.8: Bebidas alcoólicas: \_\_\_\_\_
- 2.9: Patologias: \_\_\_\_\_

OBS: \_\_\_\_\_

#### 3. MEDIDAS ANTROPOMÉTRICAS

##### A) Anamnese

##### 1) Peso corpóreo

Mudou nos últimos 6 meses ( ) sim ( ) não

Continua perdendo atualmente ( ) sim ( ) não

Peso atual \_\_\_\_\_ kg  
 Peso habitual \_\_\_\_\_ kg  
 Perda de peso (PP) \_\_\_\_\_ % Se > 10% ( )  
 Se < 10% ( )

Altura: \_\_\_\_\_ m

IMC:  $P / A^2 =$  \_\_\_\_\_ Kg/m<sup>2</sup>

CB: \_\_\_\_\_ cm % CB: \_\_\_\_\_ Classificação: \_\_\_\_\_

DCT: \_\_\_\_\_ % DCT: \_\_\_\_\_ Classificação: \_\_\_\_\_

CMB: \_\_\_\_\_ cm % CMB: \_\_\_\_\_ Classificação: \_\_\_\_\_

Circ. Cintura: \_\_\_\_\_ cm Classificação: \_\_\_\_\_

Circ. Quadril: \_\_\_\_\_ cm

RCQ: CC/ CQ: \_\_\_\_\_ Classificação: \_\_\_\_\_

Circ. Abdominal: \_\_\_\_\_ cm Classificação: \_\_\_\_\_

D. Cut.Sub-escapular: \_\_\_\_\_

D.Cut.Coxa: \_\_\_\_\_

D.Cut. Abdominal: \_\_\_\_\_

D.Cut. Supra Iliaca: \_\_\_\_\_

Fortaleza, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 201\_\_\_\_.

---

Nome por extenso do membro da Equipe de Pesquisa

---

Assinatura do Membro da Equipe de Pesquisa



## ANEXO 4 - QUESTIONÁRIO SOCIODEMOGRÁFICO



## QUESTIONÁRIO SOCIODEMOGRÁFICO

Plataforma Brasil: CAAE: 18220713.1.0000.5054

Título: “FATORES DE RISCO E PREVENÇÃO DA DOENÇA ATEROSCLERÓTICA EM PACIENTES COM PERIODONTITE NO CEARÁ”

## AVALIAÇÃO SOCIODEMOGRÁFICA

Código do paciente:

--	--	--	--

## IDENTIFICAÇÃO E DADOS SOCIOECONÔMICOS

Código da paciente	
Nome	Telefone
Data de Nascimento	
Idade	
Procedência: 1. Capital 2. Interior, especificar	
Endereço atual (Não esquecer o Bairro) Ponto de referência	
Estado civil: 1. Casado/união consensual 2. Solteiro 3. divorciado 4. viúvo	
Ocupação: 1. Trabalhador autônomo 2. Comerciante 3. Funcionário público 4. Economia informal 5. outro, especificar	
Escolaridade: 1. Analfabeto 2. nunca estudou 3. 1º grau incompleto 4. 1º grau completo 5. 2º grau incompleto 6. 2º grau completo 7. Graduação 8. Outros, especificar  * em caso de 1º ou 2º graus incompletos, registrar a série em que interrompeu o estudo, para que a escolaridade possa ser convertida para anos de estudo no momento da análise	

Quantas pessoas moram na casa?	
Das pessoas que moram na casa, quantas ajudam no sustento da família?	
Qual a renda aproximada da família* (número de salários mínimos)? *Salário mínimo por ocasião da pesquisa de campo: R\$ 380.00	
Quanto tempo mora nesse endereço? _____(meses)	
Fumante? 1. sim 2. não 3. ex-fumante 4. fumante passivo (se reside ou trabalha no mesmo ambiente que outros fumantes)	
Nº de cigarros por dia:	
Diabético? 1. Sim 2. Não Algum diabético na família? 1. Sim 2. Não	
Hipertenso? 1. Sim 2. Não Informar PA no momento do recrutamento: História de hipertensão na família: 1. Sim 2 Não	
Bebida alcoólica: 1. não 2. deixei de beber 3. sim, raramente 4. sim, só nos fins de semana 5. sim, frequentemente	

Fortaleza, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 201 \_\_\_\_.

\_\_\_\_\_  
Nome por extenso do membro da Equipe de Pesquisa

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Membro da Equipe de Pesquisa

## ANEXO 5 – APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ (PROPESQ-UFC)

UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
CEARÁ/ PROPESQ



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** FATORES DE RISCO E PREVENÇÃO DA DOENÇA ATEROSCLERÓTICA EM PACIENTES COM PERIODONTITE NO CEARÁ

**Pesquisador:** Reinaldo Barreto Oriá

**Área Temática:** Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP);

**Versão:** 2

**CAAE:** 18220713.1.0000.5054

**Instituição Proponente:** UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 562.697

**Data da Relatoria:** 20/03/2014

#### Apresentação do Projeto:

Projeto de pesquisa do Prof. Reinaldo Barreto Oriá baseado na relação entre doença cardiovascular e doença periodontal, visto que as duas são de natureza crônica, com participação de elementos inflamatórios e ocorrendo, predominantemente, em adultos. Serão realizados avaliação clínica cardiológica do paciente além de exames hematológicos, bioquímicos e imaginológicos, sendo acrescida a coleta de sangue periférico para estudo de polimorfismo de genes codificadores para os fatores envolvidos no metabolismo lipídico, provavelmente associados às doenças cardiovasculares (apolipoproteína E, lipase hepática e NO sintase endotelial). Os pacientes serão submetidos a exames clínicos odontológicos para avaliação da saúde bucal e identificação da doença periodontal. Também, será realizada a coleta de células bucais descamadas para biologia molecular. Os dados serão analisados através de softwares para análise estatística, incluindo SPSS (SPSS, Inc, Chicago, IL) e GraphPad Prism (versão 3.0) e considerado nível de significância de  $p < 0,05$ .

#### Objetivo da Pesquisa:

Objetivo primário:

Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1127

Bairro: Rodolfo Teófilo

CEP: 60.430-270

UF: CE

Município: FORTALEZA

Telefone: (85)3366-8344

Fax: (85)3223-2003

E-mail: [comep@ufc.br](mailto:comep@ufc.br)

Continuação do Protocolo: 502.007

Estudar a relação da doença periodontal com fatores de risco genético e nutricional nas alterações ateroscleróticas.

**Objetivo Secundário:**

1. Identificar a prevalência de genes de risco para doença aterosclerótica e correlacionar com marcadores clínicos e nutricionais.
2. Determinar a possível presença de alterações do fluxo sanguíneo (pico sistólico e diastólico) e espessamento da túnica íntima-média das carótidas, relação do pico sistólico tomazelo-braço, alterações ecocardiográficas e outros parâmetros clínicos da doença aterosclerótica em pacientes com periodontite.
3. Identificar a prevalência de genes de risco para doença aterosclerótica e correlacionar com o grau de severidade da periodontite.
4. Correlacionar os níveis de colesterol total e suas frações com o desenvolvimento da periodontite em pacientes com risco para doença aterosclerótica.
5. Relacionar o polimorfismo da apoE com alterações nos níveis de colesterol total em pacientes com periodontite e risco para doença aterosclerótica.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

A pesquisa é de risco moderado visto que parte da população do estudo é portadora de doença cardiovascular. No entanto as metodologias propostas são realizadas rotineiramente no acompanhamento destes pacientes, como exames de imagem e coleta de sangue. A avaliação odontológica sugerida é de baixo risco.

Quanto aos benefícios, a pesquisa poderá contribuir na identificação da prevalência de genes de risco para doença aterosclerótica e sua correlação com a periodontite.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

A pesquisa é de relevância clínica e os resultados poderão reduzir o impacto econômico, no sistema de saúde, do tratamento das doenças cardiovasculares, possibilitando a implementação de medidas preventivas em população com vulnerabilidade a essas doenças, a partir de exames bucais não-invasivos.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

O pesquisador apresentou a este comitê: folha de rosto, cronograma, orçamento, currículo lattes, carta de encaminhamento, declaração de concordância de apoio à realização do projeto, autorizações dos laboratórios parceiros, declaração de autorização da SESA (CEOs), anuência do cirurgião-dentista, TCLE corrigido.

Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1127

Bairro: Rodolfo Teófilo

CEP: 60.430-270

UF: CE

Município: FORTALEZA

Telefone: (85)3366-8344

Fax: (85)3223-2903

E-mail: [comape@ufc.br](mailto:comape@ufc.br)

UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
CEARÁ/ PROPESQ



Continuação do Parecer: 562.697

**Recomendações:**

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Não há pendências documentais.

Na última versão do projeto cadastrado na Plataforma Brasil não há menção de participação da Clínica de Periodontia do Curso de Odontologia da FFOE, sendo assim dispensada a declaração de autorização.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

FORTALEZA, 20 de Março de 2014

---

Assinador por:  
FERNANDO ANTONIO FROTA BEZERRA  
(Coordenador)

Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1127

Bairro: Rodolfo Teófilo

CEP: 60.430-270

UF: CE

Município: FORTALEZA

Telefone: (85)3366-8344

Fax: (85)3223-2003

E-mail: [conep@ufc.br](mailto:conep@ufc.br)





Contents lists available at ScienceDirect

Archives of Oral Biology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/archoralbio](http://www.elsevier.com/locate/archoralbio)

## Apolipoprotein E, periodontal disease and the risk for atherosclerosis: a review



L.C. Pereira<sup>a</sup>, J.C.R. Nascimento<sup>a</sup>, J.M.C. Rêgo<sup>a</sup>, K.M. Canuto<sup>a</sup>, M.E. Crespo-Lopez<sup>d</sup>,  
J.I. Alvarez-Leite<sup>c</sup>, A. Baysan<sup>b</sup>, R.B. Oriá<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> *Laboratory of the Biology of Tissue Healing, Ontogeny and Nutrition, Department of Morphology and Institute of Biomedicine, School of Medicine, Federal University of Ceara, Fortaleza, CE, Brazil*

<sup>b</sup> *Institute of Dentistry, Barts and the London, School of Medicine and Dentistry, Queen Mary University, London, UK*

<sup>c</sup> *Institute of Biological Sciences, Department of Biochemistry and Immunology, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil*

<sup>d</sup> *Laboratory of Molecular Pharmacology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Para, Belém, PA, Brazil*

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Apolipoprotein E  
Periodontal disease  
Oral microbiota  
Inflammation  
Atherosclerosis

### ABSTRACT

The association between cardiovascular and periodontal diseases is characterized by chronic inflammatory processes, with a high prevalence worldwide and complex genetic-environment interactions. Although apolipoprotein E4 (ApoE4), one of the isoforms coded by a polymorphic APOE gene, has been widely recognized as a risk factor for cardiovascular diseases and as an immunoinflammatory factor, less is known regarding how ApoE4 affects atherosclerosis in periodontitis patients. The aim of this review was to investigate the potential underlying mechanisms related to APOE4 that could increase the risk of periodontal disease and, ultimately, of atherosclerosis. There have only been a few studies addressing apoE polymorphisms in patients with chronic periodontitis. To date, no studies have been performed that have assessed how ApoE4 affects atherosclerotic disease in chronic periodontitis patients. Although clinical studies are warranted, experimental studies have consistently documented the presence of periodontal pathogens, which are usually found in the oral cavity and saliva, in the atherosclerotic plaques of ApoE-deficient mice. In addition, in this review, the potential role of the APOE4 allele as an example of antagonistic pleiotropy during human evolution and its relation to oral health is discussed.

### 1. Introduction

Periodontal disease (PD) is a multifactorial, chronic, inflammatory disease, associated with bacterial plaque, gingival bleeding, edema and increased crevicular fluid formation that results from endotoxin bacteria-driven host immune responses. PD is characterized by the inflammation and destruction of tooth-supporting connective tissues in response to subgingival infection by various periodontal pathogens (Kinane, Stathopoulou, & Papapanou, 2017). Periodontitis pathophysiology is associated with a myriad of pro-inflammatory cytokines, skewed towards Th1/Th17 responses (de Vries, Andreotta, Loos, & Nicu, 2017) and induced osteolysis (Goncalves et al., 2014), the latter of which has been found to be reduced by simvastatin treatment (a cholesterol-lowering drug) (Dalcico et al., 2013).

Due to its chronic inflammatory etiology, a potential link between the occurrence of periodontal disease and atherosclerosis has been

investigated (Cardoso, Reis, & Manzaneres-Céspedes, 2018). Pioneer studies from Mattila and colleagues have suggested associations between myocardial infarction and poor oral health, which could be facilitated by chronic low grade bacterial infections (such as dental caries and chronic periodontitis) (Mattila et al., 1989). However, the determination of a causative effect has been hampered because patients with chronic illnesses (including metabolic syndrome and diabetes) are also likely to be affected by periodontitis. However, in the studies reported by Mattila, poor oral health was a predictor of myocardial infarction, even after adjusting for age, social class, hypertension, serum lipid and lipoprotein concentrations, smoking, the presence of diabetes, and serum C peptide concentrations (Mattila et al., 1989).

The complications associated with atherosclerosis and metabolic syndrome are recognized as worrisome public health problems in developing countries and may especially affect populations with nutritional and immunoinflammatory disorders, with the likelihood of

\* Corresponding author: Institute of Biomedicine and Department of Morphology, School of Medicine, Federal University of Ceara Rua Cel. Nunes de Melo, 1315-Rodolfo Teófilo, Fortaleza, 60430-270, Ceará, Brazil.

E-mail addresses: [rbo5u@virginia.edu](mailto:rbo5u@virginia.edu), [oria@ufc.br](mailto:oria@ufc.br) (R.B. Oriá).

<https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2018.11.009>

Received 14 July 2018; Received in revised form 25 September 2018; Accepted 10 November 2018  
0003-9969/ © 2018 Published by Elsevier Ltd.

increased fatalities (DeBoer et al., 2012; Teo & Dokainish, 2017). The systemic inflammatory processes (even those that are low-grade) induced by chronic periodontal disease (Cardoso et al., 2018) may be related to peripheral arterial (and endothelial) inflammatory conditions (Calapkorur, Alkan, Tasdemir, Alkali, & Saatci, 2017), which may further elevate the risks of atherosclerosis, coronary disease, myocardial infarction, and death.

Cardiovascular (CVD) and periodontal diseases share genetic bases of susceptibility and important behavioral components, such as diet, plaque control and smoking-related habits. Studies have shown that both conditions increase with age, lower socioeconomic strata and poor educational background, especially for males, the diabetic population, and individuals undergoing psychological stress or who have a significant genetic predisposition (Nazir, 2017).

Apolipoprotein E (ApoE = protein; APOE = gene) is a glycoprotein synthesized in the liver that plays a key role in the catabolism of triglycerides and cholesterol. In addition, ApoE plays a pivotal role in different inflammatory conditions (Azevedo et al., 2014, 2012). In animal models, an ApoE deficiency can lead to increased lipid levels in the bloodstream, even under chow diet conditions. In addition, APOE null mice have been extensively used as animal models for atherosclerosis, as these mice accumulate atheroma in the aortae when chronically fed with cholesterol-enriched diets (Getz & Reardon, 2016).

In this review, recent findings were discussed, highlighting how different ApoE isotypes may affect atherosclerosis in patients with periodontal disease, and discuss about the use of APOE knockout mice as tool for understanding how oral pathogens can be translocated and their effects on the atherosclerotic plaque. Finally, it was speculated that the APOE4 allele may play a potential role as an example of antagonistic pleiotropy during human evolution in relation to oral health. Antagonistic pleiotropy is an evolutionary theory (Gaillard & Lemaître, 2017) that postulates that certain genes or alleles may differentially impact fitness during the lifespan of an organism (Tuminello & Han, 2011).

## 2. Periodontal and cardiovascular diseases

Teeth are supported by a connective tissue attachment apparatus (periodontal ligament), which is partly inserted into the outer layer of the root surface (root cementum) and partly into the bone of the maxillary or mandibular alveolar processes, and, to a lesser extent, by the gingival tissues that surround the teeth (Cho & Garant, 2000).

In periodontal disease, inflammatory processes induced by microbes result in the formation of a periodontal pocket with the apical migration of both the gingival attachment to the root surface and the plaque biofilm, gingival recession and alveolar bone resorption (Hajishengallis & Sahingur, 2014).

According to the WHO, severe periodontal disease affects 15%–20% of the middle-aged global population (35–44 years of age) and may cause 5%–15% of total tooth loss. Approximately 50% of periodontal diseases have been attributed to genetic variance (Rajendra Santosh, Ogle, Williams, & Woodbine, 2017).

Atherosclerosis or atherosclerotic vascular disease is a chronic inflammatory process characterized by the progressive accumulation of atheroma plaques in the vessel endothelium, which originate from inflammatory responses and immune system activation (Nguyen, Kim, Quan, Nguyen, & Tran, 2015).

Oral infections may interfere with vascular, endothelial, and smooth muscle cell biology, which could cause predisposition to atherosclerosis (Chistiakov, Orekhov, & Bobryshev, 2016). Oral pathogen-related inflammation can promote pro-coagulant effects, followed by greater scavenger receptor (SR) A and CD36 expression and activity by macrophages. (Baer, Huang, & Gibson, 2009) The uptake of cholesterol-rich LDL was also related to the increased expression of cell-adhesion molecules (such as integrin CD49c ( $\alpha 3$ -subunit) in monocytes) (Escate, Padro, & Badimon, 2016). In addition, smooth muscle cell proliferation,

migration and anti-apoptosis machinery can be upregulated after exposure to certain oral pathogens, such as *Porphyromonas gingivalis*, which are known to induce pro-inflammatory cytokines in periodontal tissues (Naruishi & Nagata, 2018; Teles & Wang, 2011). Furthermore, oral pathogens may exert pro-atherosclerotic effects by activating the uptake of oxidized LDL (LDLox) and the production of pro-inflammatory cytokines (such as TNF, IL-6 and IL-1 $\beta$ ) and transforming macrophages in "foam cells". The migration of other leukocyte subtypes (such as lymphocytes) contributes to the increased inflammatory status and leads to atherosclerotic plaque instability and rupture (Nguyen et al., 2015).

Chronic inflammatory processes driven by the periodontal biofilm may be facilitated by complex host-pathogen interactions (e.g., worsened by immunosuppression and pathogenic virulence). Multiple risk factors, such as age, CVD familial history, dyslipidemia, smoking, systemic arterial hypertension, sedentary lifestyle, diabetes mellitus and being overweight may debilitate the host and create an appropriate scenario for a pro-atherogenic effect that is spread by oral pathogens (Chistiakov et al., 2016; Lockhart et al., 2012).

The American Heart Association's Committee on Rheumatic Fever, Endocarditis, and Kawasaki Disease (1992) reviewed several risk factors and found a strong association between atherosclerotic vascular disease (ASVD) and PD that was independent of known confounders. However, it was not possible to demonstrate causality between these two disorders. Therefore, therapeutic interventions for PD cannot be considered to prevent ASVD-related events at this stage (Lockhart et al., 2012). In a robust meta-analysis of 15 observational studies involving 17,330 patients, Zeng et al. (Zeng et al., 2016) found that periodontal disease was an independent risk factor for atherosclerosis, although these authors reported substantial statistical heterogeneity in their studies.

Ahn and colleagues (Ahn et al., 2016) studied the association between PD and atherosclerosis in an adult Korean population, using carotid intima-media thickness (cIMT) and ankle-brachial index (ABI) as markers of central arterial and lower extremity stenosis, respectively. The authors observed that periodontitis was associated with subclinical atherosclerosis and peripheral arterial disease after adjusting for age, gender, education level, smoking, drinking, exercise, central obesity, triglycerides, HDL, LDL, hs-CRP, diabetes and hypertension (Ahn et al., 2016). These results are consistent with previous studies showing independent associations between periodontitis and both subclinical atherosclerosis (SA) and peripheral arterial disease (PAD), which represent early atherosclerotic vascular changes (Ahn et al., 2016).

The biological mechanism through which PD contributes to atherosclerosis may involve direct bacterial effects on platelets, autoimmune responses, the bacterial invasion of endothelial cells and the systemic upregulation of pro-inflammatory mediators (Gurav, 2014). Periodontal infection may result in a chronic low-grade bacteremia, which may induce both local (at the blood vessel wall) and systemic inflammatory cytokine upregulation, such as IL-1 $\beta$ , IL-12, IL-18 and TNF- $\alpha$ , causing the increased expression of adhesion molecules and the release of leukocyte chemotactic chemokines, such as MCP-1/CCL2, by the endothelium (Teles & Wang, 2011). The subsequent chemoattracted leukocyte infiltration and cytokine release into the vessel wall can lead to endothelial dysfunction, increasing the likelihood of atherosclerotic plaque formation, which can be detected at the early stages of an atherosclerotic lesion by the thickening of the carotid wall and the decreased patency of arteries in extremities (Ahn et al., 2016). Hence, longer and more severe chronic periodontitis increases the risks of experiencing an atherogenic effect (Ahn et al., 2016) in predisposed and at-risk individuals.

In a cohort of 106 patients with a diagnosis of ischemic stroke or transient ischemic attack (TIA) that were screened for periodontal disease, 27 reported recurrent vascular events (16 with TIA or ischemic stroke) at the 24-month follow-up. However, a survey demonstrated that there was an important association between increased aortic arch



atheroma (AA) plaque thickness and calcification in patients with advanced PD (Sen et al., 2017). Thus, in this study, the authors concluded that, in patients with TIA or ischemic stroke, PD at an advanced stage is associated with an increase in the AA plaque thickness and is therefore, an important risk factor for recurrent vascular events (Sen et al., 2017).

### 3. ApoE, periodontal disease and atherosclerosis

ApoE is a 34 kDa glycoprotein, discovered in 1970, composed of 299 amino acids and synthesized primarily by the liver and exported to the plasma. ApoE is an important component of all lipoproteins, except LDL, and is involved in the redistribution of triglycerides and cholesterol in various tissues (Mahley, 2016). ApoE, similar to other apoproteins, helps to stabilize and solubilize lipoproteins while circulating in the blood. In general, the role of ApoE in lipid metabolism includes maintaining the integrity of the lipoprotein structure and acting as a ligand for lipoprotein receptors (Mahley, 2016).

The APOE gene is polymorphic, with the three most common alleles being the epsilons E2, E3 and E4 (Huebbe & Rimbach, 2017). Point mutations in the codons result in either a cysteine or arginine residue at positions 112 and 158. In the E2 allele-coded ApoE, cysteine amino acids are found at both positions; in the E3 allele-coded ApoE, there is a cysteine at position 112 and an arginine at position 158; and in the E4 allele-coded ApoE, arginine is found at both positions. The frequency of the E2, E3 and E4 alleles vary widely between different populations, although the E3 allele is the most common, followed by E4 and E2 (Mendes-Lana et al., 2007; Riemenschneider et al., 2002). The E4 allele is considered to be the ancestral allele. In addition to these 3 isotypes, there are other rarer ApoE variants, such as E1, E5 and E7 (Gerdes, 2003).

These modifications of the ApoE isoforms are able to differentially influence lipid metabolism. Due to the tertiary structural conformations of the ApoE molecules (E3 = cys-112, arg-158; E3 = cys-112, arg-158; E4 = arg-112, arg-158), distinct binding forces exist for the ApoE isoforms, either with the LDL receptor or with heparan sulfate proteoglycans (HSPGs), which are important for cholesterol metabolism. These interactions affect lipid levels, with the ApoE4 allele being more associated with increased total cholesterol (rather than ApoE3 and ApoE3) and increasing the risk for cardiovascular diseases. Helix 4 of the ApoE structure contains the LDL-receptor binding region (residues 136–150). In the ApoE 3 and 4 isoforms, the arginine at residue 158 builds a salt bridge with the aspartate at residue 154, allowing the arginine at residue 150 to remain in the highly basic region of the receptor binding site. A diagram of the ApoE isoforms is depicted in Fig. 1. Conversely, in the ApoE2 isoform, the cysteine at residue 158 does not bind to aspartate and, therefore, aspartate is allowed to bind to the arginine at residue 150, which is external to the binding site. As a consequence, the ApoE2 isoform has the lowest binding affinity to the LDL receptor.

Kesaniemi and colleagues were the first to report that the E4 phenotype is associated with an increased intestinal absorption of cholesterol (Kesaniemi, Ehnholm, & Miettinen, 1987). APOE4 is associated with increased cholesterol, low-density lipoprotein (LDL) and apolipoprotein B levels, effects which can lead to atherosclerosis, hyperlipidemia and cardiovascular diseases (Eichner et al., 2002). An increase in the level of LDL in the systemic circulation can activate endothelial cells and build an inflammatory response, which culminates in macrophage recruitment and atherosclerosis formation. This process is accelerated by an adjacent inflammatory disease, such as PD (Finch & Morgan, 2007; Huebbe et al., 2011).

In a meta-analysis, including 4564 coronary artery disease (CAD) cases and 3985 controls, Yin et al. (2013) documented an association between the E4 allele and an increase in the CAD risk of a Chinese population, accumulating valid evidence (Yin et al., 2013).

Bergdahl, Bergdahl, Nyberg, and Nilsson, (2008) reported on dentate and edentulous individuals and related sociodemographic data,

including years of education, age and living conditions. These authors found that APOE4 was found significantly more frequently in the edentulous group (Bergdahl et al., 2008). However, in a Chinese case/control study, Gao and colleagues found that individuals expressing APOE-rs429358-CC/CT had decreased odds for generalized aggressive periodontitis when compared with individuals expressing the APOE-rs429358-TT polymorphism, after controlling for age, sex, BMI and smoking status (Gao et al., 2015).

These results have raised questions regarding whether genetic factors, such as APOE4, might contribute to an increased risk of developing complex dental diseases that lead to tooth loss, which is an undesirable outcome for any individuals.

Interestingly, vitamin D deficiency has been associated with chronic periodontitis (Abreu et al., 2016). Vitamin D is considered an important immunomodulatory factor, regulating immune responses in the gingival epithelium and influencing the degree of host responses to *P. gingivalis* (De et al., 2017; Huebbe et al., 2011).

In addition, APOE4 has been associated with an improvement in urinary vitamin D reuptake and a more efficient UVB-induced conversion of pro-vitamin D in the skin (Gerdes, 2003). Because APOE4 carriers have been found to have high levels of vitamin D, it can be speculated that APOE4 could protect against periodontal diseases in vitamin D-deficient endemic areas (Huebbe et al., 2011).

Although the relationships between APOE4 and cardiovascular diseases are better known, the existence of an APOE4 risk factor for stroke is controversial (Tang et al., 2018); however, this allele has been associated with subclinical atherosclerotic changes (Doliner et al., 2018) and stroke-related mortality (Rajan et al., 2016).

A model of the potential interactions between APOE4, periodontitis and atherosclerosis is shown in Fig. 2.

### 4. Oral infection and risk factors for atherosclerosis in animal models

Studies in atherosclerotic-prone mice have suggested that oral pathogens influence the onset and progression of atherosclerosis (Chukkapalli et al., 2014), as shown by increased lipid accumulation in the arterial wall, macrophage infiltration, atheroma plaques, and inflammatory responses (Kebuschull, Demmer, & Papapanou, 2010; Tuomainen et al., 2008).

The intraoral inoculation of *Treponema denticola* in 12- and 24-week-old ApoE<sup>-/-</sup> mice causes chronic oral infection and, consequently, chronic periodontitis, which shows that this pathogen has a strong relationship with periodontal disease and the progression of atherosclerotic disease (Chukkapalli et al., 2014).

Decreased HDL levels and increased total and LDL cholesterol serum levels, along with systemic inflammatory markers, such as C-reactive protein (CRP) and interleukin-6 (IL-6), may increase the risk of atherosclerosis (Ferri, Paoletti, & Corsini, 2006; Hermus, Lefrandt, Tio, Breek, & Zeebregts, 2010). In the ApoE<sup>-/-</sup> mouse model, mice subjected to a hyperlipidemic diet and treated with *Fusobacterium nucleatum* showed significantly higher CRP, LDL and IL-6 plasma levels, as well as lower levels of HDL, when compared with controls without *F. nucleatum* administration (Lee, Jun, Kim, Lee, & Choi, 2012). However, oral pathogens, such as *P. gingivalis*, altered vascular responsiveness, mediated by alpha-adrenoceptors, which may not only cause periodontitis but also atherosclerosis (Gibson et al., 2004; Lalla et al., 2003; Miyauchi et al., 2012; Pereira, Vasquez, Stefanon, & Meyrelles, 2011).

Some authors have indicated that the development of atherosclerosis in ApoE-deficient mice infected with *P. gingivalis* could be prevented and inhibited by the employment of vaccination and human  $\beta$ -defensin-3 (Gibson et al., 2004; Li, Messas, Batista, Levine, & Amar, 2002). In another study, using the same experimental model, a significant 40% increase in the area of the atherosclerotic lesion was identified in the aortic sinus when compared with the uninfected group (Lalla et al., 2003). The advancement of atherosclerosis was also

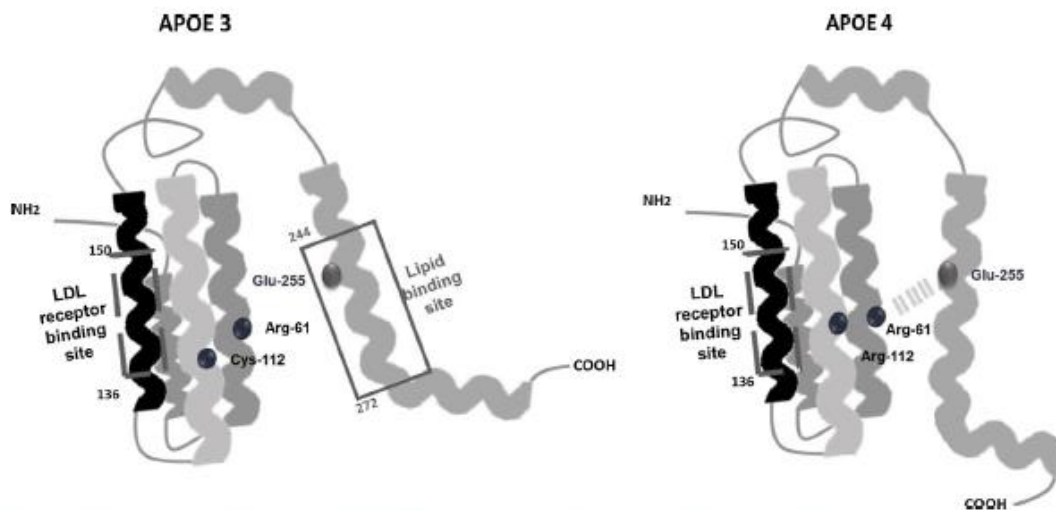


Fig. 1. Schematic of the ApoE3 and ApoE4 molecules. The difference between these molecules is the presence of an arginine residue, (Arg)-112 in ApoE4 (Arg-112, Arg-158), while ApoE3 has a cysteine (Cys) in this position (Cys-112, Arg-158). Note the interaction domain where a salt bridge occurs between Arg-61 and glutamate-255 in ApoE4 but not in ApoE3 (nor in ApoE2, not shown in this figure). This interaction is responsible for an increased affinity for very-low density lipoproteins (VLDL) for ApoE4 instead of the increased affinity for high-density lipoproteins (HDL) that is observed for ApoE3 (and ApoE2).

present in an ApoE-deficient murine model infected with this bacterium (Li et al., 2002).

The immune response of polybacterial infections (*P. gingivalis*, *T. denticola*, *T. forsythia* and *F. nucleatum*) in ApoE null mouse models is different from those observed for individual (monobacterial) infections (Rivera et al., 2013). Polybacterial infections exhibited synergism, inducing a significant increase in plasma risk factors, such as oxidized LDL, nitric oxide, altered lipid profiles and the formation of aortic

plaques (Chukkapalli et al., 2014; Velsko et al., 2015).

In another study, using the same mice models and polymicrobial infections, three of these bacterial strains, with the exception of *F. nucleatum*, were found to result in a significant association between PD and atherosclerotic disease, and the presence of a polymicrobial infection by both areas of the aorta was identified in several of the infected mice through the PCR analysis of thoracic and abdominal aorta samples (Cui, Li, Lei, Chen, & Yan, 2016; Rivera et al., 2013),

#### APOE 4 effect on oral microbiota???

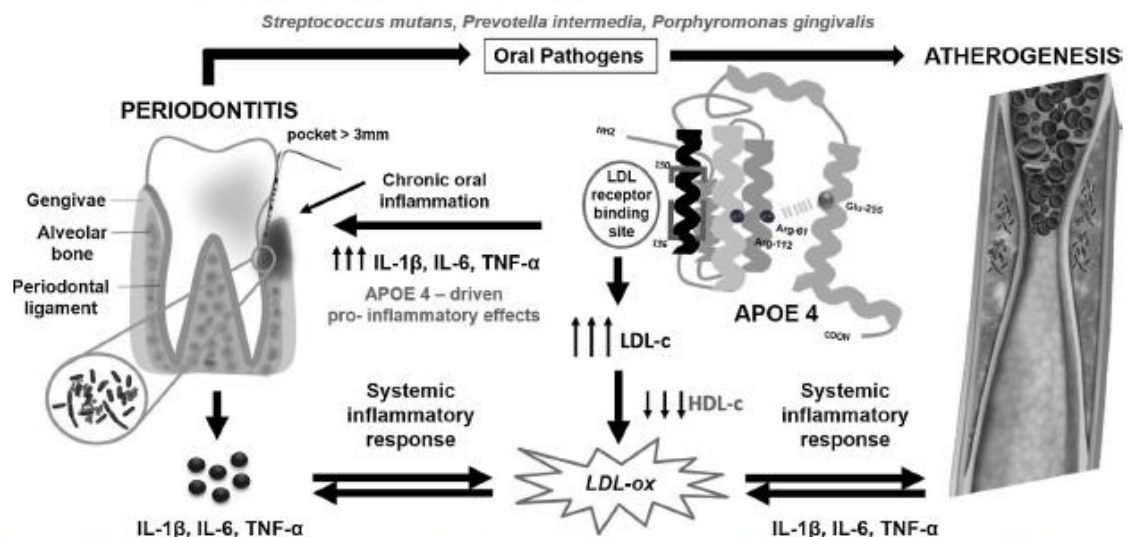


Fig. 2. A model for potential interactions among ApoE4, periodontal disease (PD) and atherosclerosis. APOE4 is associated with increased levels of circulating cholesterol, low-density lipoprotein (LDL) and pro-inflammatory cytokines. The increased in LDL levels in the systemic circulation may favor the formation of LDL-oxidation, generating LDL-ox, which is known to activate endothelial cells and vascular inflammatory responses, which may culminate in monocyte-macrophage recruitment and differentiation and potentially atherosclerosis. This process may be accelerated by a coexistent chronic inflammatory disease, such as PD, and may be associated with other comorbidities and risk factors, such as a western life style. ApoE4 may have a key influence on the oral microbiota (although this effect remains unexplored in the literature). Periodontitis may also favor atherosclerosis, through the translocation of oral pathogens to the atherosclerotic plate and a further increase in the systemic inflammatory response.

**Table 1**  
Effects of periodontitis pathogens on atherosclerotic disease in apoE-deficient mice.

Recipient mice	Pathogen	Findings	Title	Reference
ApoE(-/-)	<i>P. gingivalis</i>	ApoE(-/-) mice challenged with wild-type <i>P. gingivalis</i> presented with increased levels of atherosclerotic plaque and expressed the innate immune response markers Toll-like receptor (TLR)-2 and TLR-4 in aortic tissue.	Innate immune recognition of invasive bacteria accelerated atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice.	Gibson et al. (2004)
ApoE(-/-)	does not identify	Non-surgical periodontal treatment (NSPT) reduced alveolar bone loss (ABL), lipid profile and inhibited systemic inflammation with reduced interleukin (IL-6), as well as decreased inflammation in the arterial wall, showing reduced expression of vascular cell adhesion molecules and reduced adhesion of macrophages.	Non-surgical periodontal treatment reduced aortic inflammation in ApoE(-/-) mice with periodontitis.	Cut et al. (2016)
ApoE(-/-)	<i>P. gingivalis</i>	Infected rats showed improved vascular activation, as suggested by the increased aortic expression of vascular cell adhesion molecule 1 and tissue factor.	Oral infection with a periodontal pathogen accelerated early atherosclerosis in Apolipoprotein E-null mice	Lalla et al. (2003)
ApoE(-/-)	<i>P. gingivalis</i>	Increased proliferation and IgG production in response to <i>P. gingivalis</i> was observed in the infected group.	Oral infection with <i>Porphyromonas gingivalis</i> and systemic cytokine profile was observed in C57BL/6, KOR-ApoE(-/-) mice.	Miyachi et al. (2012)
ApoE(-/-)	<i>P. gingivalis</i> , <i>T. denticola</i> and <i>T. forsythia</i>	Development of periodontal disease was observed primarily for <i>P. gingivalis</i> and <i>T. denticola</i> . Polymicrobial infection demonstrated increased levels of aortic plaque, with the accumulation of macrophages and increased levels of cholesterol and triglycerides.	Polymicrobial infection with major periodontal pathogens induced periodontal disease and aortic atherosclerosis in hyperlipidemic ApoE(-/-) null mice.	Rivem et al. (2013)
ApoE(+/-)	<i>P. gingivalis</i>	Within 10 weeks, the animals treated with the pathogen had more advanced atherosclerotic lesions, and all of the lesions were rich in macrophages, indicating an association between periodontal disease and atherosclerosis.	<i>Porphyromonas gingivalis</i> infection accelerated the progression of atherosclerosis in a heterozygous Apolipoprotein E-deficient murine model.	Li et al. (2002)
ApoE(-/-)	<i>F. nucleatum</i>	GroB1 induced chemokine expression and tissue factor activity and reduced tissue factor pathway inhibitor activity. It has also been observed in the formation of foam cells, indicating that the host's response to the GroB1 expressed by periodontal pathogens, such as <i>F. nucleatum</i> , may be a mechanism involved in atherosclerosis, supporting the association between periodontitis and systemic infection.	<i>Fusobacterium nucleatum</i> GroB1 induced risk factors of atherosclerosis in human microvascular endothelial cells and ApoE(-/-) mice.	Lee et al. (2012)
ApoE(-/-)	<i>T. denticola</i>	<i>T. denticola</i> infections were related to altered gene expression and were involved in atherosclerotic development, increased atherosclerotic plaque area, serum low-density lipoprotein (LDL) levels of serum nitric oxide (NO) levels.	Invasion of oral and aortic tissues by oral spirochete <i>Treponema denticola</i> in ApoE(-/-) mice causally linked periodontal disease and atherosclerosis.	Chakrapalli et al. (2014)
ApoE(-/-)	<i>P. gingivalis</i>	<i>P. gingivalis</i> altered the vascular responsiveness mediated by alpha adrenoceptors	Oral <i>P. gingivalis</i> infection altered the vascular reactivity in healthy and spontaneously atherosclerotic mice	Pereira et al. (2011)
ApoE(-/-)	<i>A. actinomycetemcomitans</i>	<i>A. actinomycetemcomitans</i> induced changes in serum C-reactive protein (CRP) levels, proatherogenic lipoprotein profiles, such as very low density (VLDL) and low density (LDL), known to promote the development of atherosclerosis and high-density lipoprotein (HDL) fractions.	Aggregatibacter actinomycetemcomitans induced MMP-9 expression and proatherogenic lipoprotein profile in apoE-deficient mice.	Tuomaimen et al. (2008)

**Table 2**  
Apolipoprotein E polymorphisms in oral disease.

Research Design	Sample	Findings	Title	Reference
case-control study	469 subjects	This investigation did not show a significant association between ApoE polymorphisms and CP; however, patients presented increased levels of low density lipoprotein (LDL) and total cholesterol (TC).	Apolipoprotein E gene polymorphisms in relation to chronic periodontitis, periodontopathic bacteria, and lipid levels	Borlyon Linhartova et al. (2015)
case-control study	323 subjects	Individuals with combined polymorphisms (LRP5-rs682429-AA and APOE-rs429358-CC/CT) had higher levels of low-density lipoprotein cholesterol, higher levels of TC and decreased odds of generalized aggressive periodontitis.	Associations of apolipoprotein E and low-density lipoprotein receptor-related protein 5 polymorphisms with dyslipidemia and generalized aggressive periodontitis in a Chinese population	Guo et al. (2015)
case-control study	1,860 subjects	ApoE3 is found most frequently in this population. Patient's age, life condition, years of education and APOE E4 were significant covariates in edentulous subjects.	Difference in apolipoprotein E type 4 allele (APOE e4) among dentate and edentulous subjects	Berglahl et al. (2008)

demonstrating that periodontitis caused by binding in experimental models may trigger an inflammatory response in the vascular wall and that nonsurgical periodontal treatment during the early stages of atherosclerosis can reduce systemic inflammation, improving the lipid profile (Cui et al., 2016).

To date, preclinical studies have consistently demonstrated that periodontal pathogens are able to translocate from the oral microbiota to atherosclerotic plaques in ApoE-deficient mice (see Table 1 for a summary of the revised literature relating periodontitis pathogens and atherosclerotic lesions). However, only three studies have reported on the effects of APOE polymorphisms in individuals with oral diseases and their associations with cardiovascular risk (Table 2).

### 5. APOE4, a candidate gene for antagonistic pleiotropy in oral infections?

Cohort studies in Brazilian shantytown communities with poor hygiene and sanitation have highlighted a protective role for the APOE4 allele in children with a history of heavy diarrhea illnesses during the first years of life in areas endemic for enteric infections and malnutrition (Oria et al., 2010, 2005). The APOE4 allele was associated with improved cognitive scores (in a subset of children with heavy diarrheal burdens), even though APOE4 is considered to be deleterious and to increase the risk of developing Alzheimer's disease later in life (Kim, Basak, & Holtzman, 2009; Strittmatter, 2001; Yamazaki, Painter, Bu, & Kanekiyo, 2016). These initial studies were supported by findings from the Bolivian Tsimane populations, which are highly exposed to enteric infections, where APOE4 was associated with lower C-reactive protein (CRP) serum levels (Vasunilashorn et al., 2011), which is a marker of systemic inflammation, suggesting reduced infection-driven inflammatory responses.

In another study from the same group, non-APOE4 carriers with a high parasite burden (those with high IgE serum levels) showed a reduction in cognitive performance, which was not observed in APOE4 carriers (Trumble et al., 2017). These studies suggest that APOE4 might display an antagonistic pleiotropy effect, which means it may be helpful early in life during environmental challenges, such as enteric infections and malnutrition (which prevail in nonindustrialized human civilization). This idea suggests that APOE4 is better fitted for traits related to protection against pathogens and improved fertility (van et al., 2017); however, later in life, it is known to be detrimental during aging-related diseases (Finch & Morgan, 2007). This same premise may be applied to oral infections. Precivilized meat hunters were likely afflicted with severe dental diseases (and enteric diseases) and oral microbiota changes (Weyrich et al., 2017) but did not live long enough to develop age-related cardiovascular and Alzheimer's diseases. Therefore, it can be speculated that APOE4 might have played a significant role in this protection. The relationships between APOE4 carriers and the oral microbiota and dental diseases, both during early life and with aging, require further investigation, particularly in regard to western diets. In addition, the associations between APOE4, periodontal diseases and Alzheimer's disease still require further research. One study has documented associations between a low number of teeth, a low level of APOE4 and lower delayed word recall scores in elderly patients in Milwaukee, WI, USA (Stein, Kryscio, Desrosiers, Donegan, & Gibbs, 2010).

The interactions between chronic cardiovascular disease, Alzheimer's disease and periodontitis still remain an unexplored field, and research initiatives are unfortunately unrepresented in worldwide populations, especially in the developing world. A diagram of these relationships is shown in Fig. 3.

### 6. Summary

The direct causality between atherosclerosis and periodontal diseases is challenging to dissect, due to common etiological roots, such as

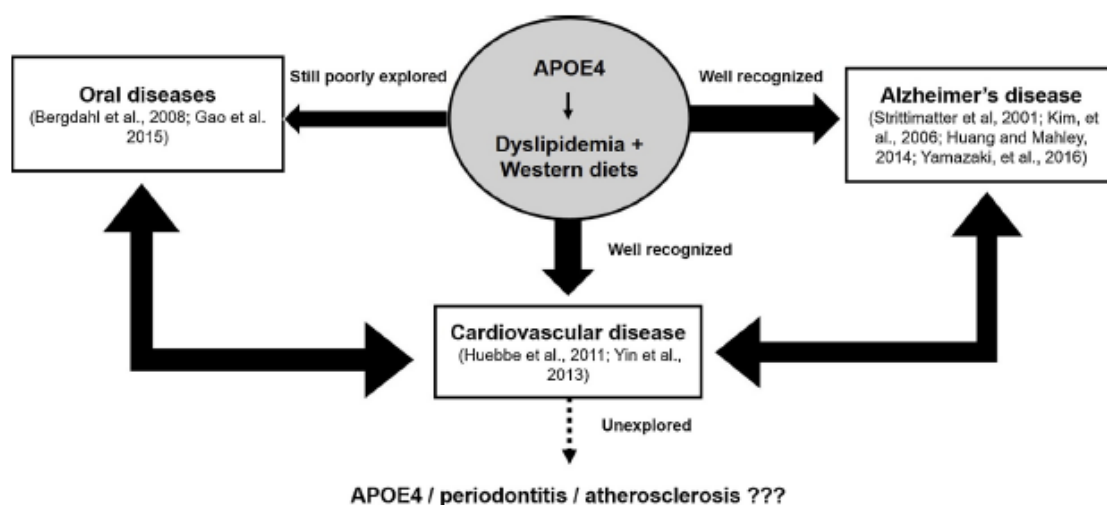


Fig. 3. A schematic diagram depicting the up-to-date, recognized interactions with ApoE4, along with cardio-metabolic risk factors (dyslipidemia and western diet), that are associated with cardiovascular, Alzheimer's and oral diseases.

aging, life-style (diet, sedentarism), and immune-inflammatory and genetic factors. Apolipoprotein E4 (APOE4) is an attractive gene because it has been extensively associated with increased risks and worse outcomes for cardiovascular diseases.

In human evolution, APOE4 is considered to be the ancestral APOE allele, and its preservation in our genetic pool may be related to its role in improving infectious diseases, which were ubiquitous in the pre-industrialized era (Oria, Patrick, Blackman, Lima, & Guerrant, 2007; Trumble et al., 2017). Therefore, the occurrence of APOE4 might be an example of antagonistic pleiotropy, as this gene may be protective under heavy burdens of enteric infections and an adverse environment (by raising innate immunity and inflammation (Gale et al., 2014)) early in life (Oria et al., 2005; van et al., 2017), while being deleterious during aging, contributing to atherosclerosis if one lives long enough in western societies. The antagonistic pleiotropy of genes related to worse CAD outcomes (such as APOE4) are designed for adverse environments during human evolution, which have been reported previously (Corbett, Courtiol, Lummaa, Moorad, & Stearns, 2018; van et al., 2017).

Early human populations were also often afflicted with chronic dental diseases and related-oral infections (in the preantimicrobial therapy era), for which APOE4 would be potentially protective (this unexplored area deserves attention in future studies); however, with this trade-off, individuals become more prone to later cardiovascular diseases if one lives long enough, as we have observed in modern times in western societies. The lack of long-term cohorts and clinical studies examining APOE polymorphisms, especially in deprived countries, have hampered the understanding of how APOE4 affects oral pathogens and related inflammatory responses and how these affects could be associated with atherosclerotic plaques. Studies performed in both clinical settings and using APOE4 target-replacement mice are required. Long-term cohort studies with larger sample numbers in developing countries and humanized APOE4 knock-in mice are warranted to evaluate the causal association between APOE4, PD and atherosclerosis, especially when considering the periodontal biofilm and its potential atherogenic effects.

In addition, currently, clinicians aim for minimally invasive strategies to manage dental diseases. Over the years, when older patients enter a restorative cycle, as a consequence of a series of traditionally invasive approaches, and present a high disease burden, early detection and prevention are the keys to managing dental diseases. APOE4 could be a marker for both dental and chronic systematic disease outcomes. Therefore, further laboratory and clinical studies are required to

investigate these effects.

#### Conflicts of interest

The authors declare no conflict of interests regarding the publication of this paper.

#### Acknowledgments

The authors would like to thank Raul S. Freitas for helping with the manuscript preparation. This work was supported by the Foundation of Support to the Scientific and Technological Development of the State of Ceara/Brazil (FUNCAP) PPSUS grant, the Brazilian Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) Procad (071/2013 # 144494), and by the National Council for Science and Technological Development (CNPq) (grant number 467143/2014-5).

#### References

- Abreu, O. J., Tatakis, D. N., Elias-Boneta, A. R., Lopez, D., Hernandez, R., Pousa, M. S., et al. (2016). Low vitamin D status strongly associated with periodontitis in Puerto Rican adults. *BMC Oral Health*, 16(1), 89.
- Ahn, Y. B., Shin, M. S., Han, D. H., Sukhbaatar, M., Kim, M. S., Shin, H. S., et al. (2016). Periodontitis is associated with the risk of subclinical atherosclerosis and peripheral arterial disease in Korean adults. *Atherosclerosis*, 251, 311–318.
- Azevedo, O. G., Bolick, D. T., Roche, J. K., Pinkerton, R. F., Lima, A. A., Vittek, M. P., et al. (2014). Apolipoprotein E plays a key role against cryptosporidial infection in transgenic undernourished mice. *PLoS One*, 9(2), e89562.
- Azevedo, O. G., Oliveira, R. A., Oliveira, B. C., Zaja-Milatovic, S., Araujo, C. V., Wong, D. V., et al. (2012). Apolipoprotein E OGG 133 mimetic peptide improves 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis. *BMC Gastroenterology*, 12(35).
- Baer, M. T., Huang, N., & Gibson, F. C., III (2009). Scavenger receptor A is expressed by macrophages in response to *Porphyromonas gingivalis*, and participates in TNF- $\alpha$  expression. *Oral Microbiology and Immunology*, 24(6), 456–463.
- Bergdahl, M., Bergdahl, J., Nyberg, L., & Nilsson, L. G. (2008). Difference in apolipoprotein E type 4 allele (APOE epsilon 4) among dentate and edentulous subjects. *Gerodontology*, 25(3), 179–186.
- Borilova Linhartova, P., Bartova, J., Poskerova, H., Machal, J., Vokurka, J., Fassmann, A., et al. (2015). Apolipoprotein E gene polymorphisms in relation to chronic periodontitis, periodontopathic bacteria, and lipid levels. *Arch Oral Biology*, 60(3), 456–462.
- Calapkorur, M. U., Alkan, B. A., Tasdemir, Z., Akcali, Y., & Saatci, E. (2017). Association of peripheral arterial disease with periodontal disease: Analysis of inflammatory cytokines and an acute phase protein in gingival crevicular fluid and serum. *Journal of Periodontal Research Supplement*, 52(3), 532–539.
- Cardoso, E. M., Reis, C., & Manzaneres-Céspedes, M. C. (2018). Chronic periodontitis, inflammatory cytokines, and interrelationship with other chronic diseases. *Postgraduate Medicine*, 130(1), 98–104.
- Chistiakov, D. A., Orekhov, A. N., & Bobryshev, Y. V. (2016). Links between

- atherosclerotic and periodontal disease. *Experimental and Molecular Pathology*, 100(1), 220–235.
- Cho, M. I., & Garant, P. R. (2000). Development and general structure of the periodontium. *Periodontology*, 24(2000), 9–27.
- Chukkappalli, S. S., Rivera, M. F., Velsko, I. M., Lee, J. Y., Chen, H., Zheng, D., et al. (2014). Invasion of oral and aortic tissues by oral spirochete *Treponema denticola* in ApoE(-/-) mice causally links periodontal disease and atherosclerosis. *Infection and Immunity*, 82(5), 1959–1967.
- Corbett, S., Courtiol, A., Lummaa, V., Moorad, J., & Stearns, S. (2018). The transition to maturity and chronic disease: Mismatch and natural selection. *Nature Reviews Genetics*.
- Cui, D., Li, H., Lei, L., Chen, C., & Yan, F. (2016). Nonsurgical periodontal treatment reduced aortic inflammation in ApoE(-/-) mice with periodontitis. *Springerplus*, 5(1) 940.
- Dalcico, R., de Menezes, A. M., Deodéciano, O. B., Oria, R. B., Vale, M. L., Ribeiro, R. A., et al. (2013). Protective mechanisms of simvastatin in experimental periodontal disease. *Journal of Periodontology*, 84(8), 1145–1157.
- De, F. A., Fiorentino, M., Guida, L., Annunziata, M., Nastro, L., & Rizzo, A. (2017). Vitamin D reduces the inflammatory response by Porphyromonas gingivalis infection by modulating human beta-defensin-3 in human gingival epithelium and periodontal ligament cells. *International Immunopharmacology*, 47, 106–117.
- de Vries, T. J., Andreatta, S., Loos, B. G., & Niku, E. A. (2017). Genes critical for developing periodontitis: Lessons from mouse models. *Frontiers in Immunology*, 8 1395.
- DeBoer, M. D., Lima, A. A., Oria, R. B., Scharf, R. J., Moore, S. R., Luna, M. A., et al. (2012). Early childhood growth failure and the developmental origins of adult disease: do enteric infections and malnutrition increase risk for the metabolic syndrome? *Nutrition Reviews*, 70(11), 642–653.
- Doliner, B., Dong, C., Blanton, S. H., Gardener, H., Elkind, M. S. V., Sacco, R. L., et al. (2018). Apolipoprotein E gene polymorphism and subclinical carotid atherosclerosis: The northern manhattan study. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*, 27(3), 645–652.
- Eichner, J. E., Dunn, S. T., Perveen, G., Thompson, D. M., Stewart, K. E., & Stroehla, B. C. (2002). Apolipoprotein E polymorphism and cardiovascular disease: A HuGE review. *American Journal of Epidemiology*, 155(6), 487–495.
- Escate, R., Padro, T., & Badimon, L. (2016). LDL accelerates monocyte to macrophage differentiation: Effects on adhesion and anoxia. *Atherosclerosis*, 246, 177–186.
- Ferri, N., Paoletti, R., & Corsini, A. (2006). Biomarkers for atherosclerosis: Pathophysiological role and pharmacological modulation. *Current Opinion in Lipidology*, 17(5), 495–501.
- Finch, C. E., & Morgan, T. E. (2007). Systemic inflammation, infection, ApoE alleles, and Alzheimer disease: A position paper. *Current Alzheimer Research*, 4(2), 185–189.
- Gaillard, J. M., & Lemaître, J. F. (2017). The Williams' legacy: A critical reappraisal of his nine predictions about the evolution of senescence. *Evolution*, 71(12), 2768–2785.
- Gale, S. C., Gao, L., Mikacenic, C., Coyle, S. M., Rafaels, N., Murray, D. T., et al. (2014). APOε5polymorphism is associated with enhanced in vivo innate immune responses in human subjects. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 134(1), 127–134.
- Gao, H., Tian, Y., Meng, H., Hou, J., Xu, L., Zhang, L., et al. (2015). Associations of apolipoprotein E and low-density lipoprotein receptor-related protein 5 polymorphisms with dyslipidemia and generalized aggressive periodontitis in a Chinese population. *Journal of Periodontal Research*, 50(4), 509–518.
- Gerdes, L. U. (2003). The common polymorphism of apolipoprotein E: Geographical aspects and new pathophysiological relations. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 41(5), 628–631.
- Getz, G. S., & Reardon, C. A. (2016). Do the ApoE(-/-) and Ldlr(-/-) Mice Yield the Same Insight on Atherogenesis? *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 36(9), 1734–1741.
- Gibson, F. C., Hong, C., III, Chou, H. H., Yumoto, H., Chen, J., Lien, E., et al. (2004). Innate immune recognition of invasive bacteria accelerates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation*, 109(22), 2801–2806.
- Goncalves, D. C., Evangelista, R. C., da Silva, R. R., Santos, M. J., Silva, F. S., Jr., Aragao, K. S., et al. (2014). Infliximab attenuates inflammatory osteolysis in a model of periodontitis in Wistar rats. *Experimental Biology and Medicine (Maywood, NJ)*, 239(4), 442–453.
- Gurav, A. N. (2014). The implication of periodontitis in vascular endothelial dysfunction. *European Journal of Clinical Investigation*, 44(10), 1000–1009.
- Hajishengallis, G., & Sahingur, S. E. (2014). Novel inflammatory pathways in periodontitis. *Advances in Dental Research*, 26(1), 23–29.
- Hermus, L., Lefrandt, J. D., Tio, R. A., Breek, J. C., & Zeebregts, C. J. (2010). Carotid plaque formation and serum biomarkers. *Atherosclerosis*, 213(1), 21–29.
- Huebbe, P., & Rimbach, G. (2017). Evolution of human apolipoprotein E (APOE) isoforms: Gene structure, protein function and interaction with dietary factors. *Ageing Research Reviews*, 37, 146–161.
- Huebbe, P., Nebel, A., Siebert, S., Moehring, J., Boesch-Saadatmandi, C., Most, E., et al. (2011). APOE ε5polymorphism is associated with higher vitamin D levels in targeted replacement mice and humans. *FASEB Journal*, 25(9), 3262–3270.
- Kebschull, M., Demmer, R. T., & Papanou, P. N. (2010). "Gum bug, leave my heart alone!"—epidemiologic and mechanistic evidence linking periodontal infections and atherosclerosis. *Journal of Dental Research*, 89(9), 879–902.
- Kesaniemi, Y. A., Ehnholm, C., & Miettinen, T. A. (1987). Intestinal cholesterol absorption efficiency in man is related to apolipoprotein E phenotype. *The Journal of Clinical Investigation*, 80(2), 578–581.
- Kim, J., Basak, J. M., & Holtzman, D. M. (2009). The role of apolipoprotein E in Alzheimer's disease. *Neuron*, 63(3), 287–303.
- Kinane, D. F., Stathopoulou, P. G., & Papanou, P. N. (2017). Periodontal diseases. *Nature Reviews Disease Primers*, 3 17038.
- Lalla, E., Lamster, I. B., Hofmann, M. A., Bucciarelli, L., Jerud, A. P., Tucker, S., et al. (2003). Oral infection with a periodontal pathogen accelerates early atherosclerosis in apolipoprotein E-null mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 23(8), 1405–1411.
- Lee, H. R., Jun, H. K., Kim, H. D., Lee, S. H., & Choi, B. K. (2012). Fusobacterium nucleatum GroEL induces risk factors of atherosclerosis in human microvascular endothelial cells and ApoE(-/-) mice. *Molecular Oral Microbiology*, 27(2), 109–123.
- Li, L., Messias, E., Batista, E. L., Jr., Levine, R. A., & Amar, S. (2002). Porphyromonas gingivalis infection accelerates the progression of atherosclerosis in a heterozygous apolipoprotein E-deficient murine model. *Circulation*, 105(7), 861–867.
- Lockhart, P. B., Bolger, A. F., Papanou, P. N., Osimbawale, O., Trevisan, M., Levison, M. E., et al. (2012). Periodontal disease and atherosclerotic vascular disease: Does the evidence support an independent association? A scientific statement from the American Heart Association. *Circulation*, 125(20), 2520–2544.
- Mahley, R. W. (2016). Apolipoprotein E: From cardiovascular disease to neurodegenerative disorders. *Journal of Molecular Medicine*, 94(7), 739–746.
- Mattila, K. J., Nieminen, M. S., Valttonen, V. V., Rasi, V. P., Kesaniemi, Y. A., Syrjala, S. L., et al. (1989). Association between dental health and acute myocardial infarction. *BMJ*, 298(6676), 779–781.
- Mendes-Lana, A., Pena, G. G., Freitas, S. N., Lima, A. A., Nicolato, R. L., Nascimento-Neto, R. M., et al. (2007). Apolipoprotein E polymorphism in Brazilian dyslipidemic individuals: Ouro preto study. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 40(1), 49–56.
- Miyachi, S., Maekawa, T., Aoki, Y., Miyazawa, H., Tabeta, K., Nakajima, T., et al. (2012). Oral infection with Porphyromonas gingivalis and systemic cytokine profile in C57BL/6.KOR-ApoE sh1 mice. *Journal of Periodontal Research Supplement*, 47(3), 402–408.
- Narishi, K., & Nagata, T. (2018). Biological effects of interleukin-6 on Gingival Fibroblasts: Cytokine regulation in periodontitis. *Journal of Cellular Physiology*.
- Nazir, M. A. (2017). Prevalence of periodontal disease, its association with systemic diseases and prevention. *International Journal of Health Science (Qassim)*, 11(2), 72–80.
- Nguyen, C. M., Kim, J. W., Quan, V. H., Nguyen, B. H., & Tran, S. D. (2015). Periodontal associations in cardiovascular diseases: The latest evidence and understanding. *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*, 5(3), 203–206.
- Oria, R. B., Patrick, P. D., Blackman, J. A., Lima, A. A., & Guerrant, R. L. (2007). Role of apolipoprotein E4 in protecting children against early childhood diarrhea outcomes and implications for later development. *Medical Hypotheses*, 68(5), 1099–1107.
- Oria, R. B., Patrick, P. D., Oria, M. O., Lortz, B., Thompson, M. R., Azevedo, O. G., et al. (2010). ApoE polymorphisms and diarrheal outcomes in Brazilian shanty town children. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 43(3), 249–256.
- Oria, R. B., Patrick, P. D., Zhang, H., Lortz, B., de Castro Costa, C. M., Brito, G. A., et al. (2005). APOE4 protects the cognitive development in children with heavy diarrhea burdens in Northeast Brazil. *Pediatric Research*, 57(2), 310–316.
- Pereira, R. B., Vasquez, E. C., Steffan, I., & Meyrelles, S. S. (2011). Oral P. Gingivalis infection alters the vascular reactivity in healthy and spontaneously atherosclerotic mice. *Lipids in Health and Disease*, 10 80.
- Rajan, K. B., Aggarwal, N. T., Schneider, J. A., Wilson, R. S., Everson-Rose, S. A., & Evans, D. A. (2016). Role of APOE ε5polymorphism and incident stroke on cognitive decline and mortality. *Alzheimer Disease and Associated Disorders*, 30(4), 318–323.
- Rajendra Santosh, A. B., Ogle, O. E., Williams, D., & Woodbine, E. F. (2017). Epidemiology of oral and maxillofacial infections. *Dental Clinics of North America*, 61(2), 217–233.
- Riemenschneider, M., Schwarz, S., Wagenpfeil, S., Diehl, J., Müller, U., Forstl, H., et al. (2002). A polymorphism of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is associated with Alzheimer's disease in patients lacking the Apolipoprotein E ε5polymorphism. *Molecular Psychiatry*, 7(7), 782–785.
- Rivera, M. F., Lee, J. Y., Aneja, M., Goswami, V., Liu, L., Velsko, I. M., et al. (2013). Polymicrobial infection with major periodontal pathogens induced periodontal disease and aortic atherosclerosis in hyperlipidemic ApoE(mdl) mice. *PLoS One*, 8(2) e57178.
- Sen, S., Chung, M., Duda, V., Giamberardino, L., Hinderliter, A., & Offenbacher, S. (2017). Periodontal disease associated with aortic arch atheroma in patients with stroke or transient ischemic attack. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases: the Official Journal of National Stroke Association*, 26(10), 2137–2144.
- Stein, P. S., Kryscio, R. J., Desrosiers, M., Donegan, S. J., & Gibbs, M. B. (2010). Tooth loss, apolipoprotein E, and decline in delayed word recall. *Journal of Dental Research*, 89(5), 473–477.
- Strittmatter, W. J. (2001). Apolipoprotein E and Alzheimer's disease: Signal transduction mechanisms. *Biochemical Society Symposium*, 67, 101–109.
- Tang, E. Y., Amiesimaka, O., Harrison, S. L., Green, E., Price, C., Robinson, L., et al. (2018). Longitudinal effect of stroke on cognition: A systematic review. *Journal of the American Heart Association*, 7(2).
- Teles, R., & Wang, C. Y. (2011). Mechanisms involved in the association between periodontal diseases and cardiovascular disease. *Oral Diseases*, 17(5), 450–461.
- Teo, K. K., & Dokainish, H. (2017). The emerging epidemic of cardiovascular risk factors and atherosclerotic disease in developing countries. *The Canadian Journal of Cardiology*, 33(3), 358–365.
- (1992). Guidelines for the diagnosis of rheumatic fever. Jones Criteria, 1992 update. Special Writing Group of the Committee on Rheumatic Fever, Endocarditis, and Kawasaki Disease of the Council on Cardiovascular Disease in the Young of the American Heart Association. *JAMA*, 268(15), 2069–2073.
- Trumble, B. C., Stieglitz, J., Blackwell, A. D., Allayee, H., Beheim, B., Finch, C. E., et al. (2017). Apolipoprotein E4 is associated with improved cognitive function in Amazonian forager-horticulturalists with a high parasite burden. *FASEB Journal*, 31(4), 1508–1515.
- Tuminello, E. R., & Han, S. D. (2011). The apolipoprotein e antagonistic pleiotropy

- hypothesis: Review and recommendations. *International Journal of Alzheimer's Disease* (2011) 726197.
- Tuomainen, A. M., Jauhiainen, M., Kovanen, P. T., Metso, J., Paju, S., & Pussinen, P. J. (2008). Aggregatibacter actinomycetemcomitans induces MMP-9 expression and proatherogenic lipoprotein profile in apoE-deficient mice. *Microbial Pathogenesis*, 44(2), 111–117.
- van, E. E., Koopman, J. J. E., Bodegom, D. V., Meij, J. J., Knijff, P., Ziem, J. B., et al. (2017). Effect of APOE epsilon4 allele on survival and fertility in an adverse environment. *PLoS One*, 12(7) e0179497.
- Vasunilashorn, S., Finch, C. E., Crimmins, E. M., Vikman, S. A., Stieglitz, J., Gurven, M., et al. (2011). Inflammatory gene variants in the Tsimane, an indigenous Bolivian population with a high infectious load. *Biodemography and Social Biology*, 57(1), 33–52.
- Vekko, I. M., Chukkappalli, S. S., Rivera-Kweh, M. F., Chen, H., Zheng, D., Bhattacharyya, I., et al. (2015). *Fusobacterium nucleatum* alters atherosclerosis risk factors and enhances inflammatory markers with an atheroprotective immune response in ApoE (null) mice. *PLoS One*, 10(6) e0129795.
- Weyrich, L. S., Duchene, S., Soubrier, J., Arriola, L., Llamas, B., Breen, J., et al. (2017). Neanderthal behaviour, diet and disease inferred from ancient DNA in dental calculus. *Nature*, 544(7650), 357–361.
- Yamazaki, Y., Painter, M. M., Bu, G., & Kanekiyo, T. (2016). Apolipoprotein e as a therapeutic target in Alzheimer's disease: A review of basic research and clinical evidence. *CNS Drugs*, 30(9), 773–789.
- Yin, Y. W., Sun, Q. Q., Zhang, B. B., Hu, A. M., Liu, H. L., Wang, Q., et al. (2013). Association between apolipoprotein E gene polymorphism and the risk of coronary artery disease in Chinese population: Evidence from a meta-analysis of 40 studies. *PLoS One*, 8(6) e66924.
- Zeng, X. T., Leng, W. D., Lam, Y. Y., Yan, B. P., Wei, X. M., Weng, H., et al. (2016). Periodontal disease and carotid atherosclerosis: A meta-analysis of 17,330 participants. *International Journal of Cardiology*, 203, 1044–1051.








Review

## Modulation of Intestinal Immune and Barrier Functions by Vitamin A: Implications for Current Understanding of Malnutrition and Enteric Infections in Children

Pedro Henrique Q. S. de Medeiros <sup>1,2</sup>, Daniel V. Pinto <sup>3</sup>, Juliana Zani de Almeida <sup>3</sup>, Juliana M. C. Régo <sup>3,4</sup>, Francisco A. P. Rodrigues <sup>1</sup> , Aldo Ângelo M. Lima <sup>1</sup>, David T. Bolick <sup>2</sup>, Richard L. Guerrant <sup>2</sup> and Reinaldo B. Oriá <sup>2,3,\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratory of Infectious Diseases, Institute of Biomedicine, School of Medicine, Federal University of Ceara, Fortaleza 60430-270 CE, Brazil; phquintela@hotmail.com (P.H.Q.S.d.M.); delvarefap@gmail.com (E.A.P.R.); alima@ufc.br (A.Â.M.L.)

<sup>2</sup> Division of Infectious Diseases and International Health, Department of Medicine, University of Virginia School of Medicine, Charlottesville, VA 22908, USA; dtb5w@virginia.edu (D.T.B.); rlg9a@virginia.edu (R.L.G.)

<sup>3</sup> Laboratory of Tissue Healing, Ontogeny and Nutrition, Department of Morphology and the Institute of Biomedicine, School of Medicine, Federal University of Ceara, Fortaleza 60430-270 CE, Brazil; danielvieirapinto@gmail.com (D.V.P.); juliana\_zani@yahoo.com.br (J.Z.d.A.); nutrijulianarego@gmail.com (J.M.C.R.)

<sup>4</sup> Department of Nutrition, Christus University Center, Fortaleza 60190-060 CE, Brazil

\* Correspondence: oria@ufc.br

Received: 12 July 2018; Accepted: 17 August 2018; Published: 21 August 2018



**Abstract:** The micronutrient vitamin A refers to a group of compounds with pleiotropic effects on human health. These molecules can modulate biological functions, including development, vision, and regulation of the intestinal barrier. The consequences of vitamin A deficiency and supplementation in children from developing countries have been explored for several years. These children live in an environment that is highly contaminated by enteropathogens, which can, in turn, influence vitamin A status. Vitamin A has been described to modulate gene expression, differentiation and function of diverse immune cells; however, the underlying mechanisms are not fully elucidated. This review aims to summarize the most updated advances on elucidating the vitamin A effects targeting intestinal immune and barrier functions, which may help in further understanding the burdens of malnutrition and enteric infections in children. Specifically, by covering both clinical and *in vivo/in vitro* data, we describe the effects of vitamin A related to gut immune tolerance/homeostasis, intestinal barrier integrity, and responses to enteropathogens in the context of the environmental enteric dysfunction. Some of the gaps in the literature that require further research are also highlighted.

**Keywords:** vitamin A supplementation; vitamin A deficiency; intestinal immune response; intestinal barrier function; enteric infections

### 1. Introduction

Vitamin A derivatives (or retinoids) are major nutrients for human health and modulate several functions, such as cell differentiation, proliferation, and apoptosis [1,2]. Retinoids are used for xerophthalmia and blindness prevention [3], and abnormal levels may be associated with teratogenic alterations [4,5]. Retinoids are also key micronutrients for improving malnutrition and enteric illnesses

and related child mortality and morbidity (aged <5 years old) in endemic areas of the developing world, even being formerly called an “anti-infective agent” [6]. However, vitamin A beneficial effects may be dependent on pathogen-driven immune response [7] and genetic background [8]. Although much progress has been made on elucidating the vitamin A effects on intestinal barrier function, many gaps remain in our understanding of its interactions with the intestinal microbiota, mucosal immune system, and epithelial junctional proteins, which have been the subject of recent research. In this review, we summarize recent data on vitamin A effects on intestinal epithelial barrier proteins and mucosal barrier function and underlying immune responses both in preclinical and clinical studies of enteric infections and malnutrition.

## 2. Cellular and Molecular Mechanisms of Vitamin A in the Gut Crosstalk of Immune and Inflammatory Responses

Vitamin A is the term encompassing a group of fat-soluble compounds (retinol, retinal, and retinoic acid). It is an essential nutrient and the primary dietary sources of vitamin A consist of carotenoids (provitamin A from plants) and retinyl esters (preformed vitamin A from animal sources). The major examples of carotenoids are  $\alpha$ -carotene,  $\beta$ -carotene, and  $\beta$ -cryptoxanthin, while retinylpalmitate is the most predominant ester [9,10]. Provitamin A carotenoids are cleaved into all-trans retinoic acid (RA), which is the most biologically active form of vitamin A [11]. The majority of retinyl esters are deposited in the liver (in stellated cells), where they are hydrolyzed to retinol and then bound to retinol-binding protein (RBP). The uptake of vitamin A from the RBP was recently described to rely on the expression of stimulated retinoic acid gene 6 (Stra6), which functions as a receptor for RBP [12]. All *trans*-retinoic acid binds to retinoic acid receptors (RARs) and retinoid X receptors (RXRs) from the nuclear hormone receptor family [13]. RAR/RXR heterodimers bind to consensus promoter DNA sequences, called retinoic acid response elements (RAREs), and they act as transcription factors for several genes.

The effective implementation of vitamin A policies to treat malnutrition and enteric diseases depends on better understanding of its biological functions. While the classical direct antioxidant action of vitamin A is well known, other effects targeting intestinal immune cells, intestinal epithelium, and microbiota have been described in the past few years. It has been recognized that several pathways are influenced by retinoids in the gut, mainly through gene expression modulation [14], with the regulation of several mediators of the immune system, including both pro-inflammatory and anti-inflammatory responses.

The intestine is considered an important site of antigenic interaction, since it is in constant interface with commensal, pathogenic microorganisms, as well as molecules derived from ingested foods. The intestinal immune system comprises both innate and adaptive factors, such as T and B lymphocytes (IgA secreting cells), dendritic cells (DC), macrophages, together with the commensal microbiota, mucus, and antimicrobial substances that were produced by intestinal cells, all that interact to provide the steady balance between physiological and pathogenic agents residing in this microenvironment [15].

Major advances during the past few years have shed light on the understanding of how retinoic acids regulate intestinal immune tolerance to commensal bacteria/food antigens [16,17] and anti-inflammatory responses by T-cell modulation [11]. CD103<sup>+</sup>-DC-derived RA has been shown to induce gut-homing receptors ( $\alpha$ 4 $\beta$ 7-integrin and the chemokine receptor, CCR9) on T cells [18], which may improve the efficacy of oral vaccines [19]. In addition, RA derived from DCs can promote IL-10 producing-T cells [20], with the involvement of Toll-like receptors [21], functioning as suppressive Foxp3<sup>+</sup> T regulatory (Treg) cells. The evidence of vitamin A mucosal protective effects involving T-lymphocytes (which may be important to control chronic inflammatory conditions, such as the T-cell driven-environmental enteric dysfunction (EED) in children) [22,23] has been accumulating. RA-preconditioned human Tregs displayed almost complete resistance to Th1 and Th17 conversion and sustain Foxp3 expression (suppressive function), following IL-1 and

IL-6 stimulation [24]. In addition, the transfer of pretreated Treg cells with RA further enhances anti-inflammatory effects on xenograft-vs-host disease [24]. Indeed, the potential use of natural Treg cells primed with RA has been suggested for treatment of chronic immune-mediated diseases [25]. High concentrations of RA or vitamin D metabolites, as well as thymic stromal lymphopoietin or TGF- $\beta$ , activate signaling programs in dendritic cells, which result in the priming of Treg cell responses [26]. Conversely, vitamin A deficiency may alter the intestinal microbiota and impair Th17 differentiation [27,28], which may compromise enteric pathogen clearance.

After being absorbed by the intestinal mucosa, the retinol is converted into retinaldehyde by retinol dehydrogenase (RDH). Retinal becomes RA by retinaldehyde dehydrogenase activity [29] in dendritic cells [30], but also in intestinal epithelial and a subset of lamina propria stromal cells [31,32]. In addition, RA can be degraded through the action of cytochrome P450 family 26 enzymes (CYP26) [27]. Dendritic cells secrete more TGF- $\beta$  when stimulated by RA, favoring the Treg cell differentiation in the intestine under homeostasis [16,33]. TGF- $\beta$  is a key cytokine regulating intestinal mucosal IgA secreting cells [34]. In addition, RA that is derived from gut associated lymphoid tissue (GALT)-DCs can induce mucosal IgA secretion in the small intestine under IL-6 or IL-5 modulation [35].

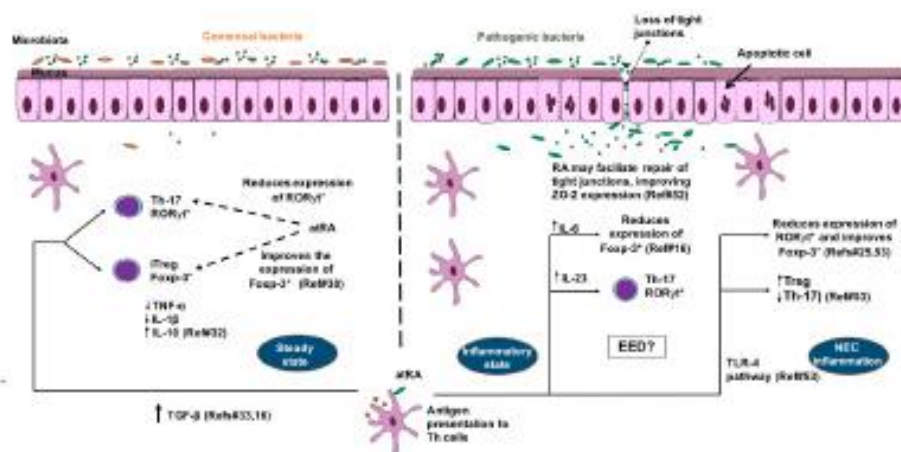
RA also binds to the retinoic acid receptors (RAR) in CD4<sup>+</sup> T cell nucleus for upregulating  $\alpha 4\beta 7$  integrin expression, while activated RAR/RXR heterodimers bind to RARE for increasing expression of CCR9 on the lipid membrane surface of T-cells [36]. CCL25-induced lymphocyte adhesion to MadCAM-1 is mediated by  $\alpha 4\beta 7$ -integrin in response to intestinal inflammation [37]. RA can also block the expression of ROR $\gamma$ t nuclear receptor in Th17 cells [24], and enhance extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1 and two pathways that rise Foxp3<sup>+</sup> expression [38], favoring Treg cells and reducing Th17 differentiation.

RA ameliorates inflammation in a murine colitis model through IL-10 induction in T cells and Treg cells, which depends on toll-like receptor-2 binding [39]. In addition, vitamin A showed protective anti-inflammatory effects in a colitis model in rats, potentially through the preservation of mitochondrial activity [40]. Vitamin A also prevented colitis and colon cancer in a mouse model [41]. Moreover, Penny and colleagues showed that familial adenomatous polyposis in humans and mice resulted in reduced intestinal RA concentrations. Conversely, restoration of RA *in vivo* and *in vitro* led to increases in the number of Treg cells [42].

Arts and colleagues, while using monocytes from healthy volunteers, showed that vitamin A reduces cytokine production and this effect was mediated by histone methylation modifications [43], indicating epigenetic modulation as well. Whether the anti-inflammatory mechanisms of vitamin A supplementation are beneficial or not in the context of children exposed to malnutrition and enteric infections require further research.

Liu and colleagues showed that vitamin A could improve intestinal immune response in the offspring of gestational vitamin A deficient rats when given during the early postnatal period. This was characterized by increased levels of secretory immunoglobulin A (sIgA) and CD8<sup>+</sup> lymphocytes and dendritic cells. Of note, this effect was not observed with supplementation on later postnatal periods [44]. In addition, *in utero* maternal levels of RA control the size of secondary lymphocyte pools and the efficiency of immune responses in the offspring [37]. These observations have great relevance for further considerations of supplementing children with vitamin A deficiency, as the optimal time window for intervention is still a matter of debate.

Altogether these studies provide important knowledge on how vitamin A may be essential for intestinal barrier function through immune modulatory responses, especially with anti-inflammatory effects, which may be helpful in chronic pro-inflammatory states, such as in children with EED. Figure 1 shows a model for the potential benefit of vitamin A-derived RA in this condition.



**Figure 1.** Model for the benefits of retinoic acid on intestinal barrier function in T-cell mediated inflammatory conditions such as environmental enteric dysfunction (EED) and neonatal necrotizing enterocolitis (NEC) in children. In steady state all-trans retinoic acid (RA) stimulates CD 103<sup>+</sup> dendritic cells (DC) to produce more TGF- $\beta$ , which favors Foxp-3<sup>+</sup> T-reg differentiation rather than Th17- retinoic acid receptor-related orphan receptor-gamma (ROR- $\gamma$ <sup>t</sup>) cells. Foxp-3<sup>+</sup> T-reg cells produce more anti-inflammatory cytokines (including IL-10) and less pro-inflammatory cytokines (TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ ). In intestinal inflammation, RA is also important for Th17 ROR- $\gamma$ <sup>t</sup> for clearance of enteropathogens, with involvement of IL-6 and IL-23. In NEC inflammation, RA-TLR-4 pathway activation may reduce the expression of ROR- $\gamma$ <sup>t</sup> and favors Foxp-3<sup>+</sup> differentiation rather than Th-17. RA may facilitate repair of tight junctions by improving ZO-2 expression during inflammatory conditions. Microbiota dysbiosis is a key factor in regulating RA effects under inflammatory conditions.

### 3. Interactions with Intestinal Epithelial Barrier, Enteric Pathogens and Microbiota

An important function of the intestinal mucosa is to act as a barrier between luminal contents and the underlying immune system. The physical epithelial barrier confers the property of selective permeability to the intestinal mucosa, which is tightly regulated in homeostasis and disrupted during disease. Intestinal permeability is a marker of intestinal barrier dysfunction [45]. The molecular structure of apical surface of the epithelium forms a single, continuous border as a result of the precise alignment of abutting cells from an apical to basal direction; the intercellular epithelial junctions are the tight junction (ZO; zonula occludens), adherens junction (zonula adherens), and the desmosome. The tight junction is the primary regulator of paracellular permeability, maintained by the interaction between transmembrane claudins, occludins with ZO proteins to apical cytoskeletal proteins [46]. Although not yet fully understood, the influence of immunological components in regulating this epithelial protein complex has been accumulating. It has been recognized that intestinal inflammatory disorders (e.g., enteric infections, autoimmune diseases, among others) stimulate the production of TNF- $\alpha$ , a key etiologic mediator of intestinal barrier dysfunction [47]. Reduced intestinal mucosal Treg numbers have been associated with disrupted epithelial tight junctions [48].

Despite many studies have described the beneficial effects of vitamin A for regulation of immune response and intestinal epithelium (stimulating migration and proliferation) [49], little is known regarding how vitamin A directly modulates intestinal barrier function. Increased intestinal permeability is reported in the context of enteric infections and infant malnutrition (which can lead to vitamin A deficiency) associated with dysfunction of the intestinal epithelium barrier [50,51]. Recently, while using in vitro and pre-clinical studies, Li and colleagues showed that RA enhances ZO-2 expression, through TLR-4 activation to improve intestinal barrier function [52]. Furthermore,

in a murine model of necrotizing enterocolitis (NEC), RA was able to reduce the severity of NEC by downregulating TLR-4-induced IL-17 and to improve Tregs numbers and repopulation of LGR5<sup>+</sup> intestinal stem cells [53,54]. TLR-4-mediated IL-17 activation causes loss of tight junctions in mice with NEC. These observations suggest that vitamin A should be further investigated in the context of EED in children from developing countries, in which the intestinal barrier function is compromised [55].

It is noteworthy that vitamin A regulates IL-22 responses, a major cytokine involved in intestinal barrier function homeostasis and repair and affecting epithelial tight junction's claudin-2-related permeability [56]. RA induces IL-22 binding protein expression in dendritic cells, promoting intestinal homeostasis [57]. In addition, RA attenuates colon inflammation induced by dextran sodium sulfate treatment or *Citrobacter rodentium* infection with increased  $\gamma\delta$  T cells-derived IL-22 [58]. The interactions between intestinal immune and epithelial cells, which involve IL-22 and other mediators, are thus highly influenced by RA concentrations.

Recently, the use of retinoids on specific enteric infections using both in vitro and in vivo approaches has been tested. Interestingly, the studies show differential effects depending on the type of pathogen. Cabrera and colleagues, using a murine model of Shiga toxin producing *E. coli* infection, found that vitamin A deficiency, while worsening intestinal damage during infection, improves survival. This unexpected finding may be related to the increased population of polymorphonuclear cells triggered by vitamin A, which enhances Shiga toxin effects [59]. In addition, McDaniel and colleagues showed that vitamin A-deficient mice infected with *Citrobacter rodentium*, a model for human *E. coli* infections, could become asymptotically colonized if they do not succumb to premature lethality. In this model, RA supplementation improved pathogen clearance [60]. This study supports that vitamin A is important for defenses against *E. coli*-like pathogens, while reinforcing that vitamin A deficiency may contribute to asymptomatic colonization states. However, there is no data about direct antimicrobial effects of vitamin A molecules. Other studies have shown vitamin A deficiency impairs T and B responses to rotavirus vaccine in gnotobiotic piglet model [61,62].

While vitamin A modulation of the immune system is beneficial in some infections, it could be detrimental to others. Guerra-Perez and colleagues have described the potential worsening effects of vitamin A in the context of HIV infection. Dendritic cells supplemented with RA showed increased expression of the cell adhesion molecule MadCAM-1, which was correlated with increased HIV replication. In addition, blocking MadCAM-1 partially inhibited HIV replication [63]. This biological mechanism may help to explain why vitamin A supplementation may not be beneficial in endemic HIV+ populations.

A major advance in understanding vitamin A transport during exposure to pathogens was made by the work of Derebe and colleagues [64]. They reported that serum amyloid A (SAA), induced during infections, functions as retinol binding proteins in both humans and mice. In an experimental murine model of enteric infection (*Salmonella typhimurium*), SAAs bound tightly to retinol in response to infection. Further, SAA-retinol binding sites were successfully identified by crystallographic analysis [64]. These observations add another link between immune system and vitamin A metabolism in the context of infections and suggest that more research should be focused on SAA [65].

Regarding the potential association of vitamin A effects with gut microbiota, little is known. Nevertheless, in an elegant study investigating the modulation of different micronutrients (vitamin A, folate, iron, and zinc) on gut microbiota, Hibberd and colleagues, while using gnotobiotic mice, found that vitamin A deficiency had the largest effect on microbial community and meta-transcriptome with increases in *Bacteroides vulgatus* in the context of vitamin A deprivation, results that could have important implications on bile acid metabolism [66]. These authors pointed out the need of more studies assessing vitamin A supplementation on gut microbiota of undernourished children. Another study showed that vitamin A exerts antiviral effects in vivo and in vitro against norovirus, and these effects were correlated with increases in *Lactobacillus* abundance in the gut [67]. Moreover, the effects of vitamin A on gut microbiota may explain other diseases.

Xiao and colleagues have shown RA protection against necrotizing enterocolitis through intestinal microbiota and improved intestinal barrier function with increased protein expression of claudin-1, occludin, and ZO-1 [68]. Neonatal colitis has not received enough attention as a disease that may be impacted by vitamin A, a cause of mortality in preterm, undernourished newborns, and likely grossly under-diagnosed in low income societies where most births still occur at home. In addition, vitamin A supplementation has been shown to reduce infant mortality due to diarrhea in endemic areas of vitamin deficiency [69].

#### 4. Clinical Evidence of Vitamin A for Enteric Diseases in Children: Adjusting Classical Paradigms and Facing New Challenges

According to WHO guidelines, vitamin A deficiency is defined as a severe public health problem in a setting where 20% of children aged 6–71 months have a serum retinol concentration  $<0.7 \mu\text{mol/L}$  [10,70]. It is estimated that 90 million pre-school children present with subclinical vitamin A deficiency [10]. Although further research is needed on biomarker development for vitamin A status, serum retinol is the most common laboratory measure [71].

Vitamin A deficiency and supplementation have been investigated more consistently in different settings in the past decades and these studies helped to guide major public health interventions in the developing world [72]. However, the general strong statement that vitamin A high dose supplementation should be prioritized for effectively reducing mortality of children aged six months to five years is now being questioned by some groups [73–75]. This debate should take into account the changing in the mortality rates of diarrheal diseases with sustained decline in the last decades, albeit with increasing morbidity of non-diarrheal EED, associated with enteric pathogens early in life, in the developing world [23,76]. This can be particularly important as this intervention is reported to cover more than 80% of total children population in developing countries [77].

A study by Fisker and colleagues evaluating the effects of vitamin A supplementation on children in a randomized double-blind trial at routine vaccination contacts in Guinea-Bissau showed no overall protective effect on mortality within six months of follow-up, however with an interaction between vitamin A supplementation and gender [78]. Gender differences have not been observed in either preschool aged children [79,80] or newborns [81,82] in trials in South Asia. Of note, the well-known benefit vitamin A supplementation had on child mortality reduction occurred in a time when vaccination programs could not reach high coverage and vitamin A deficiency rates were higher. Conversely, a recent pooled analysis of population-based surveys from the past two decades (1991–2013) reported that vitamin A deficiency is still prevalent in south Asia and sub-Saharan Africa, but has substantially declined in many countries from Southeast Asia, Oceania, Latin America, and the Caribbean. Mortality related to vitamin A deficiency in these settings has also declined throughout the past decades [74]. Nevertheless, vitamin A supplementation should consider the prevalence and burden of vitamin A deficiency within each country that could be uneven. In addition, poor diet diversification and heavy exposure to infections could explain why vitamin A deficiency was not reduced in some settings of south Asia and sub-Saharan Africa [74].

Overall, there is a great debate about the heterogeneity of vitamin A effects in clinical studies, and several hypotheses have been raised. It is accepted that the previous immunological state of the subjects should be considered, as infections can decrease vitamin A concentrations in the body as part of the acute-phase response. Thus, some authors suggest adjustment for these acute-phase markers, although there is no consensus on this matter [71,83]. There is also emerging evidence by genome-wide association studies supporting the existence of single nucleotide polymorphisms associated with vitamin A status, which suggest a contribution of genetic factors for the inter-individual variability in vitamin A status [84].

Recent large randomized clinical trials assessed the effects of neonatal vitamin A supplementation (children below six months of age) on mortality and morbidity outcomes. Two placebo-controlled studies that were performed in Tanzania and Ghana did not support vitamin A supplementation

to young children [85,86]. However, trials in India and in Bangladesh found evidence of benefit for survival to 6 months of age [81,82,87]. The 10% reduction in mortality seen in the Mazumder's India trial [87], although apparently modest, is epidemiologically important as a large proportion of deaths occur before supplementation is possible.

Hamer and Keusch suggest that vitamin A supplementation policies should now focus on the reduction of deficiency itself rather than diarrhea morbidity or mortality as the outcome [88]. These observations corroborate the idea of rethinking vitamin A supplementation policies depending on the local epidemiology and risk of deficiency, as suggested by Stevens and colleagues (2015) [74]. Concerns related to potential adverse effects and correct dose are also raised by recent studies [89]. Furthermore, strategies targeting maternal vitamin A status as well as investments in social determinants should be made for addressing this issue [90]. Importantly, this crucial time-window in life may be characterized by heavy exposure to enteropathogens in children from developing countries, as recently shown by the Malnutrition and Enteric Diseases (MAL-ED) network cohort study [91].

Regarding studies on vitamin A effects in children older than 5 years, Thornton and colleagues assessed children aged 5–12 years from Colombia prospectively for one year. The study found that vitamin A deficiency (plasma retinol <10 µg/dL) was associated with an increased risk of diarrhea with vomiting and cough with fever. Consistently, these effects held after adjusting for sociodemographic characteristics and hemoglobin concentrations [92].

While the overall burden of vitamin A deficiency in public health is likely in part related to diarrhea and enteric infections, there are few studies that evaluated vitamin A deficiency or supplementation when comparing with the outcomes of specific enteric infections in children. In a randomized controlled trial in a Malaysian community with high endemicity of intestinal infections, a single high-dose of vitamin A supplementation was not able to protect against soil-transmitted helminth reinfections in children [93], and the authors suggested that more long-term interventions may be necessary to eliminate some parasites. While this may hold true, vitamin A may otherwise be associated with worsening infection outcomes. Interestingly, moderate to severe retinol deficiency was associated with reduced risk of incidence of EAEC and EPEC diarrhea in underweight and normal-weight children from urban Bangladesh [94].

Previously, vitamin A supplementation increased the duration of enteropathogenic *E. coli* infections in children aged 5–15 months from Mexico, possibly by decreasing IL-8 and monocyte chemoattractant protein-1 levels. On the other hand, vitamin A supplemented children showed shorter enterotoxigenic *E. coli* infections in association with fecal TNF-α and IL-6 concentrations [7]. Although not fully conclusive, altogether these findings corroborate that impairment of Th2 response (while favoring of Th1 profile) in the vitamin A deficiency state may harm the response against extracellular bacterial infections [92].

Another study with the same Mexican children revealed vitamin A modulates cytokine responses to norovirus infections, depending on the genogroup [7]. In addition, vitamin A supplementation reduced *Giardia* spp. infections in a double-blind, randomized placebo-controlled trial in children from northeastern Brazil [50]. Although it is well accepted that vitamin A differentially regulates the immune system and in turn can be beneficial and detrimental depending on the pathogen, more studies have to be done for understanding the complex immune response in which vitamin A plays. Overall these findings support the major role immune system plays in the response to vitamin A supplementation and could explain some inconsistent effects of vitamin A on diarrheal diseases outcomes, depending on the host immunologic profile.

Recent studies have demonstrated the impact of EED for these populations, which is described as morphological and functional intestinal alterations in asymptomatic subjects living in highly contaminated environments [22,95]. This condition has been associated with impaired intestinal barrier function, leading to malnutrition, impaired intestinal absorption, vaccine response failure, and cognitive deficits in children [22]. Investigating how vitamin A interacts with EED is important, however, not many studies have addressed this issue properly.

A recent study by Hossain and colleagues investigated children aged 6–24 months from Bangladesh and found plasma retinol was moderately associated with altered intestinal permeability [96]. Previously, low serum carotenoids, such as lutein, but not retinol, were suggested as good markers for the intestinal barrier function in children from an urban community in Fortaleza, Brazil. Further, serum retinol was correlated with acute-phase serum proteins [97]. However, vitamin A supplementation did not correlate with improved intestinal barrier function in children less than nine years old [50]. Of note, vitamin A status is also influenced by zinc levels, which is another major micronutrient that is associated with reduced risk of enteropathy and infections in children [71]. It is clear that more research assessing vitamin A interplay with intestinal microbiome and coinfections is needed in EED.

The changing epidemiology seen in child populations from developing countries must revise our understanding of vitamin A interventions in public health. While child mortality due to diarrhea is declining in many countries, we now recognize the detrimental consequences of EED for child's health [98]. Elucidating how vitamin A deficiency is involved in EED is required. The recent progress of studies on the microbiome and its relationship with environmental and nutritional factors further support the idea that different populations may require different interventions. In this context, it is important that future clinical studies aim to characterize children's vitamin A levels, immune response, infections status, and vitamin A interactions with other factors, such as intestinal microbiome, specific enteropathogens, and other micronutrients. These interactions might also contribute to the complexity of the current study findings.

## 5. Conclusions

Recent advances in our understanding of vitamin A signaling show that it is essential for intestinal function in children and sometimes has paradoxical effects. Both clinical and *in vivo/in vitro* vitamin A studies show complex effects on intestinal homeostasis. Importantly, vitamin A may lead to anti-inflammatory effects through lymphocyte modulation. Several factors may in turn modulate responses to vitamin A, such as the dose proposed for a given vitamin A status, the inflammatory/infectious conditions, and the gut microbiota. Moreover, it is clear that vitamin A plays differential roles in different enteric infections, depending on the type of immune response activated. Finally, further research using more integrative approaches, while considering inflammation/gut microbiome status and vitamin A measurements should be performed for better understanding the critical role vitamin A plays in enteropathy in children.

**Author Contributions:** All authors have equally contributed with this review.

**Funding:** The authors would like to thank the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) and the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) funding. R.B.O. was supported in part by the Bill and Melinda Gates Foundation grant# OPP1137923. P.H.Q.S.d.M. was supported by NIH award number U19 AI109776 (CETR, Centers for Excellence for Translational Research).

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Gutierrez-Mazariegos, J.; Theodosiou, M.; Campo-Paysaa, E.; Schubert, M. Vitamin A: A multifunctional tool for development. *Semin. Cell. Dev. Biol.* **2011**, *22*, 603–610. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Kanungo, J. Retinoic Acid Signaling in P19 Stem Cell Differentiation. *Anticancer Agents Med. Chem.* **2017**, *17*, 1184–1198. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Sommer, A. Preventing blindness and saving lives: The centenary of vitamin A. *JAMA Ophthalmol.* **2014**, *132*, 115–117. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Paganelli, A.; Grazzo, V.; Acosta, H.; Lopez, S.L.; Carrasco, A.E. Glyphosate-based herbicides produce teratogenic effects on vertebrates by impairing retinoic acid signaling. *Chem. Res. Toxicol.* **2010**, *23*, 1586–1595. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



5. Robinson, J.F.; Verhoeve, A.; Pennings, J.L.; Pronk, T.E.; Piersma, A.H. A comparison of gene expression responses in rat whole embryo culture and in vivo: Time-dependent retinoic acid-induced teratogenic response. *Toxicol. Sci.* **2012**, *126*, 242–254. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Green, H.N.; Mellanby, E. Vitamin A as an anti-infective agent. *Br. Med. J.* **1928**, *2*, 691–696. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Long, K.Z.; Santos, J.L.; Rosado, J.L.; Estrada-Garcia, T.; Haas, M.; Al, M.A.; DuPont, H.L.; Nanthakumar, N.N. Vitamin A supplementation modifies the association between mucosal innate and adaptive immune responses and resolution of enteric pathogen infections. *Am. J. Clin. Nutr.* **2011**, *93*, 578–585. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Mitter, S.S.; Oria, R.B.; Kvalsund, M.P.; Pamplona, P.; Joventino, E.S.; Mota, R.M.; Goncalves, D.C.; Patrick, P.D.; Guerrant, R.L.; Lima, A.A. Apolipoprotein E4 influences growth and cognitive responses to micronutrient supplementation in shantytown children from northeast Brazil. *Clinics (Sao Paulo)* **2012**, *67*, 11–18. [[CrossRef](#)]
9. World Health Organization (WHO). *Vitamin and Mineral Requirements in Human Nutrition*, 2nd ed.; WHO: Geneva, Switzerland, 2005.
10. World Health Organization (WHO). *Global Prevalence of Vitamin A Deficiency in Populations at Risk 1995–2005*; WHO Global Database on Vitamin A Deficiency; WHO: Geneva, Switzerland, 2009.
11. Raverdeau, M.; Mills, K.H. Modulation of T cell and innate immune responses by retinoic acid. *J. Immunol.* **2014**, *192*, 2953–2958. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Amengual, J.; Zhang, N.; Kemerec, M.; Maeda, T.; Palczewski, K.; von, L.J. STRA6 is critical for cellular vitamin A uptake and homeostasis. *Hum. Mol. Genet.* **2014**, *23*, 5402–5417. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Blomhoff, R.; Blomhoff, H.K. Overview of retinoid metabolism and function. *J. Neurobiol.* **2006**, *66*, 606–630. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Rubin, L.P.; Ross, A.C.; Stephensen, C.B.; Bohn, T.; Tanumihardjo, S.A. Metabolic Effects of Inflammation on Vitamin A and Carotenoids in Humans and Animal Models. *Adv. Nutr.* **2017**, *8*, 197–212. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Mowat, A.M.; Agace, W.W. Regional specialization within the intestinal immune system. *Nat. Rev. Immunol.* **2014**, *14*, 667–685. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Omenetti, S.; Pizarro, T.T. The Treg/Th17 axis: A dynamic balance regulated by the gut microbiome. *Front. Immunol.* **2015**, *6*, 639. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Scott, C.L.; Aumeunier, A.M.; Mowat, A.M. Intestinal CD103+ dendritic cells: Master regulators of tolerance? *Trends Immunol.* **2011**, *32*, 412–419. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Iwata, M.; Hirakiyama, A.; Eshima, Y.; Kagechika, H.; Kato, C.; Song, S.Y. Retinoic acid imprints gut-homing specificity on T cells. *Immunity* **2004**, *21*, 527–538. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Mwarwa-Lisulo, M.; Chomba, M.S.; Chama, M.; Besa, E.C.; Funjika, E.; Zyambo, K.; Banda, R.; Imikendu, M.; Sianongo, S.; Hancock, R.E.W.; et al. Retinoic acid elicits a coordinated expression of gut homing markers on T lymphocytes of Zambian men receiving oral Vivotif, but not Rotarix, Dukoral or OPVERO vaccines. *Vaccine* **2018**, *36*, 4134–4141. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Sun, C.M.; Hall, J.A.; Blank, R.B.; Bouladoux, N.; Oukda, M.; Mora, J.R.; Belkaid, Y. Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 Treg cells via retinoic acid. *J. Exp. Med.* **2007**, *204*, 1775–1785. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Bakdash, G.; Vogelhoe, L.T.; van Capel, T.M.; Kapsenberg, M.L.; de Jong, E.C. Retinoic acid primes human dendritic cells to induce gut-homing, IL-10-producing regulatory T cells. *Mucosal Immunol.* **2015**, *8*, 265–278. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Watanabe, K.; Petri, W.A., Jr. Environmental enteropathy: Elusive but significant subclinical abnormalities in developing countries. *EBioMedicine* **2016**, *10*, 25–32. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Guerrant, R.L.; Leite, A.M.; Pinkerton, R.; Medeiros, P.H.; Cavalcante, P.A.; DeBoer, M.; Kosek, M.; Duggan, C.; Gewirtz, A.; Kagan, J.C.; et al. Biomarkers of environmental enteropathy, inflammation, stunting, and impaired growth in children in northeast Brazil. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0158772. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Lu, L.; Lan, Q.; Li, Z.; Zhou, X.; Gu, J.; Li, Q.; Wang, J.; Chen, M.; Liu, Y.; Shen, Y.; et al. Critical role of all-trans retinoic acid in stabilizing human natural regulatory T cells under inflammatory conditions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, E3432–E3440. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

25. Zhou, X.; Kong, N.; Wang, J.; Fan, H.; Zou, H.; Horwitz, D.; Brand, D.; Liu, Z.; Zheng, S.G. Cutting edge: All-trans retinoic acid sustains the stability and function of natural regulatory T cells in an inflammatory milieu. *J. Immunol.* **2010**, *185*, 2675–2679. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Ruedemele, F.M.; Garnier-Lengline, H. Transforming growth factor and intestinal inflammation: The role of nutrition. *Nestle Nutr. Inst. Workshop Ser.* **2013**, *77*, 91–98. [[PubMed](#)]
27. Cha, H.R.; Chang, S.Y.; Chang, J.H.; Kim, J.O.; Yang, J.Y.; Kim, C.H.; Kwon, M.N. Downregulation of Th17 cells in the small intestine by disruption of gut flora in the absence of retinoic acid. *J. Immunol.* **2010**, *184*, 6799–6806. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Elias, K.M.; Laurence, A.; Davidson, T.S.; Stephens, G.; Karno, Y.; Shevach, E.M.; O’Shea, J.J. Retinoic acid inhibits Th17 polarization and enhances Foxp3 expression through a Stat-3/Stat-5 independent signaling pathway. *Blood* **2008**, *111*, 1013–1020. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Duester, G. Families of retinoid dehydrogenases regulating vitamin A function: Production of visual pigment and retinoic acid. *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267*, 4315–4324. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Sandell, L.L.; Sanderson, B.W.; Moiseyev, G.; Johnson, T.; Mushegian, A.; Young, K.; Rey, J.P.; Ma, J.X.; Staehling-Hampton, K.; Trainor, P.A. RDH10 is essential for synthesis of embryonic retinoic acid and is required for limb, craniofacial, and organ development. *Genes Dev.* **2007**, *21*, 1113–1124. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Vicente-Suarez, L.; Larange, A.; Reardon, C.; Matho, M.; Feau, S.; Chodaczek, G.; Park, Y.; Obata, Y.; Gold, R.; Wang-Zhu, Y.; et al. Unique lamina propria stromal cells imprint the functional phenotype of mucosal dendritic cells. *Mucosal Immunol.* **2015**, *8*, 141–151. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Czarnewski, P.; Das, S.; Parigi, S.M.; Villablanca, E.J. Retinoic acid and its role in modulating intestinal innate immunity. *Nutrients* **2017**, *9*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Coombes, J.L.; Siddiqui, K.R.; Arancibia-Carcamo, C.V.; Hall, J.; Sun, C.M.; Belkaid, Y.; Powrie, F. A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism. *J. Exp. Med.* **2007**, *204*, 1757–1764. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Macpherson, A.J.; Slack, E. The functional interactions of commensal bacteria with intestinal secretory IgA. *Curr. Opin. Gastroenterol.* **2007**, *23*, 673–678. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Mora, J.R.; Iwata, M.; Eksteen, B.; Song, S.Y.; Junt, T.; Senman, B.; Otipoby, K.L.; Yokota, A.; Takeuchi, H.; Ricciardi-Castagnoli, P.; et al. Generation of gut-homing IgA-secreting B cells by intestinal dendritic cells. *Science* **2006**, *314*, 1157–1160. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Bono, M.R.; Tejon, G.; Flores-Santibanez, E.; Fernandez, D.; Rosenblatt, M.; Sauma, D. Retinoic acid as a modulator of T cell immunity. *Nutrients* **2016**, *8*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Van de Pavert, S.A.; Ferreira, M.; Domingues, R.G.; Ribeiro, H.; Molenaar, R.; Moreira-Santos, L.; Almeida, F.F.; Ibiza, S.; Barbosa, I.; Goverse, G.; et al. Maternal retinoids control type 3 innate lymphoid cells and set the offspring immunity. *Nature* **2014**, *508*, 123–127. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Lu, L.; Ma, J.; Li, Z.; Lan, Q.; Chen, M.; Liu, Y.; Xia, Z.; Wang, J.; Han, Y.; Shi, W.; et al. All-trans retinoic acid promotes TGF-beta-induced Tregs via histone modification but not DNA demethylation on Foxp3 gene locus. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e24590. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Nguyen, V.; Pearson, K.; Kim, J.H.; Kamdar, K.; DePaolo, R.W. Retinoic acid can exacerbate T cell intrinsic TLR2 activation to promote tolerance. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0118875. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Reifen, R.; Levy, E.; Berkovich, Z.; Tirosh, O. Vitamin A exerts its antiinflammatory activities in colitis through preservation of mitochondrial activity. *Nutrition* **2015**, *31*, 1402–1407. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Okayasu, I.; Hana, K.; Nemoto, N.; Yoshida, T.; Saegusa, M.; Yokota-Nakatsuma, A.; Song, S.Y.; Iwata, M. Vitamin A inhibits development of dextran sulfate sodium-induced colitis and colon cancer in a mouse model. *Biomol. Res. Int.* **2016**, *2016*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Penry, H.L.; Prestwood, T.R.; Bhattacharya, N.; Sun, F.; Kenkel, J.A.; Davidson, M.G.; Shen, L.; Zuniga, L.A.; Seeley, E.S.; Pai, R.; et al. Restoring retinoic acid attenuates intestinal inflammation and tumorigenesis in APCMin/+ mice. *Cancer Immunol. Res.* **2016**, *4*, 917–926. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Arts, R.J.; Blok, B.A.; van, C.R.; Joosten, L.A.; Aaby, P.; Berni, C.S.; Netea, M.G. Vitamin A induces inhibitory histone methylation modifications and down-regulates trained immunity in human monocytes. *J. Leukoc. Biol.* **2015**, *98*, 129–136. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Liu, X.; Cui, T.; Li, Y.; Wang, Y.; Wang, Q.; Li, X.; Bi, Y.; Wei, X.; Liu, L.; Li, T.; et al. Vitamin A supplementation in early life enhances the intestinal immune response of rats with gestational vitamin A deficiency by increasing the number of immune cells. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e114934. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

45. Turner, J.R. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* **2009**, *9*, 799–809. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Yano, T.; Kanoh, H.; Tamura, A.; Tsukita, S. Apical cytoskeletons and junctional complexes as a combined system in epithelial cell sheets. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2017**, *1405*, 32–43. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Haines, R.J.; Beard, R.S., Jr.; Eitner, R.A.; Chen, L.; Wu, M.H. TNF $\alpha$ /IFN $\gamma$  mediated intestinal epithelial barrier dysfunction is attenuated by MicroRNA-93 downregulation of PTK6 in mouse colonic epithelial cells. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0154351. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Mao, J.W.; Tang, H.Y.; Zhao, T.; Tan, X.Y.; Bi, J.; Wang, B.Y.; Wang, Y.D. Intestinal mucosal barrier dysfunction participates in the progress of nonalcoholic fatty liver disease. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **2015**, *8*, 3648–3658. [[PubMed](#)]
49. Maciel, A.A.; Oria, R.B.; Braga-Neto, M.B.; Braga, A.B.; Carvalho, E.B.; Lucena, H.B.; Brito, G.A.; Guerrant, R.L.; Lima, A.A. Role of retinol in protecting epithelial cell damage induced by *Clostridium difficile* toxin A. *Toxicol.* **2007**, *50*, 1027–1040. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Lima, A.A.; Soares, A.M.; Lima, N.L.; Mota, R.M.; Maciel, B.L.; Kvalsund, M.P.; Barrett, L.J.; Fitzgerald, R.P.; Blaser, W.S.; Guerrant, R.L. Effects of vitamin A supplementation on intestinal barrier function, growth, total parasitic, and specific *Giardia* spp. infections in Brazilian children: A prospective randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **2010**, *50*, 309–315. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Mondal, D.; Minak, J.; Alam, M.; Liu, Y.; Dai, J.; Korpe, P.; Liu, L.; Haque, R.; Petri, W.A., Jr. Contribution of enteric infection, altered intestinal barrier function, and maternal malnutrition to infant malnutrition in Bangladesh. *Clin. Infect. Dis.* **2012**, *54*, 185–192. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Li, Y.; Gao, Y.; Cui, T.; Yang, T.; Liu, L.; Li, T.; Chen, J. Retinoic acid facilitates Toll-Like Receptor 4 expression to improve intestinal barrier function through retinoic acid receptor Beta. *Cell. Physiol. Biochem.* **2017**, *42*, 1390–1406. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Egan, C.E.; Sodhi, C.P.; Good, M.; Lin, J.; Jia, H.; Yamaguchi, Y.; Lu, P.; Ma, C.; Branca, M.F.; Weyandt, S.; et al. Toll-like receptor 4-mediated lymphocyte influx induces neonatal necrotizing enterocolitis. *J. Clin. Invest.* **2016**, *126*, 495–508. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Nino, D.E.; Sodhi, C.P.; Egan, C.E.; Zhou, Q.; Lin, J.; Lu, P.; Yamaguchi, Y.; Jia, H.; Martin, L.Y.; Good, M.; et al. Retinoic Acid improves incidence and severity of necrotizing enterocolitis by lymphocyte balance restitution and repopulation of LGR5+ intestinal stem cells. *Shock* **2017**, *47*, 22–32. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Crane, R.J.; Jones, K.D.; Berkley, J.A. Environmental enteric dysfunction: An overview. *Food Nutr. Bull.* **2015**, *36*, S76–S87. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Wang, Y.; Mumm, J.B.; Herbst, R.; Kolbeck, R.; Wang, Y. IL-22 Increases permeability of intestinal epithelial tight junctions by enhancing Claudin-2 expression. *J. Immunol.* **2017**, *199*, 3316–3325. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Martin, J.C.; Beriou, G.; Heslan, M.; Chauvin, C.; Utraiainen, L.; Aumeunier, A.; Scott, C.L.; Mowat, A.; Cerovic, V.; Houston, S.A.; et al. Interleukin-22 binding protein (IL-22BP) is constitutively expressed by a subset of conventional dendritic cells and is strongly induced by retinoic acid. *Mucosal Immunol.* **2014**, *7*, 101–113. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Mielke, L.A.; Jones, S.A.; Raverdeau, M.; Higgs, R.; Stefanska, A.; Groom, J.R.; Misiak, A.; Dungan, L.S.; Sutton, C.E.; Steubel, G.; et al. Retinoic acid expression associates with enhanced IL-22 production by gammadelta T cells and innate lymphoid cells and attenuation of intestinal inflammation. *J. Exp. Med.* **2013**, *210*, 1117–1124. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Cabrera, G.; Fernandez-Brando, R.J.; Abrey-Recalde, M.J.; Baschkier, A.; Pinto, A.; Goldstein, J.; Zotta, E.; Meiss, R.; Rivas, M.; Palermo, M.S. Retinoid levels influence enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection and Shiga toxin 2 susceptibility in mice. *Infect. Immun.* **2014**, *82*, 3948–3957. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. McDaniel, K.L.; Restori, K.H.; Dodds, J.W.; Kennett, M.J.; Ross, A.C.; Cantorna, M.T. Vitamin A-deficient hosts become nonsymptomatic reservoirs of *Escherichia coli*-like enteric infections. *Infect. Immun.* **2015**, *83*, 2984–2991. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. Chattha, K.S.; Vlasova, A.N.; Kandasamy, S.; Esseli, M.A.; Siegmund, C.; Rajashekara, G.; Saif, I.J. Probiotics and colostrum/milk differentially affect neonatal humoral immune responses to oral rotavirus vaccine. *Vaccine* **2013**, *31*, 1916–1923. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Vlasova, A.N.; Chattha, K.S.; Kandasamy, S.; Siegmund, C.S.; Saif, I.J. Prenatally acquired vitamin A deficiency alters innate immune responses to human rotavirus in a gnotobiotic pig model. *J. Immunol.* **2013**, *190*, 4742–4753. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

63. Guerra-Pérez, N.; Frank, I.; Veglia, F.; Aravantinou, M.; Goode, D.; Blanchard, J.L.; Gettie, A.; Robbiani, M.; Martinelli, E. Retinoic acid imprints a mucosal-like phenotype on dendritic cells with an increased ability to fuel HIV-1 infection. *J. Immunol.* **2015**, *194*, 2415–2423. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Derebe, M.G.; Zlatkov, C.M.; Gattu, S.; Rubin, K.A.; Vaishnava, S.; Diehl, G.E.; MacMillan, J.B.; Williams, N.S.; Hooper, L.V. Serum amyloid A is a retinol binding protein that transports retinol during bacterial infection. *PLoS One* **2014**, *9*, e03206. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Esterhazy, D.; Mucida, D. Serum amyloid A proteins take retinol for a ride. *Trends Immunol.* **2014**, *35*, 505–506. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Hibberd, M.C.; Wu, M.; Rodionov, D.A.; Li, X.; Cheng, J.; Griffin, N.W.; Barratt, M.J.; Giannone, R.J.; Hettich, R.L.; Osterman, A.L.; et al. The effects of micronutrient deficiencies on bacterial species from the human gut microbiota. *Sci. Transl. Med.* **2017**, *9*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Lee, H.; Ko, G. Antiviral effect of vitamin A on norovirus infection via modulation of the gut microbiome. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 25835. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Xiao, S.; Li, Q.; Hu, K.; He, Y.; Ai, Q.; Hu, L.; Yu, J. Vitamin A and retinoic acid exhibit protective effects on necrotizing enterocolitis by regulating intestinal flora and enhancing the intestinal epithelial barrier. *Arch. Med. Res.* **2018**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
69. Tielsch, J.M.; Rahmathullah, L.; Thulasiraj, R.D.; Katz, J.; Coles, C.; Sheeladevi, S.; John, R.; Prakash, K. Newborn vitamin A dosing reduces the case fatality but not incidence of common childhood morbidities in South India. *J. Nutr.* **2007**, *137*, 2470–2474. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. Black, R.E.; Victora, C.G.; Walker, S.P.; Bhutta, Z.A.; Christian, P.; de, O.M.; Ezzati, M.; Grantham-McGregor, S.; Katz, J.; Martorell, R.; et al. Maternal and child undernutrition and overweight in low-income and middle-income countries. *Lancet* **2013**, *382*, 427–451. [[CrossRef](#)]
71. Tanumihardjo, S.A.; Russell, R.M.; Stephensen, C.B.; Gannon, B.M.; Craft, N.E.; Haskell, M.J.; Lietz, G.; Schulze, K.; Raiteri, D.J. Biomarkers of nutrition for development (BOND)-vitamin A review. *J. Nutr.* **2016**, *146*, 1816S–1848S. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Imdad, A.; Mayo-Wilson, E.; Hezzer, K.; Bhutta, Z.A. Vitamin A supplementation for preventing morbidity and mortality in children from six months to five years of age. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2017**, *3*, CD008524. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Berr, C.S.; Aaby, P.; Arts, R.J.; Jensen, K.J.; Netta, M.G.; Fisker, A.B. An enigma: Why vitamin A supplementation does not always reduce mortality even though vitamin A deficiency is associated with increased mortality. *Int. J. Epidemiol.* **2015**, *44*, 906–918. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Stevens, G.A.; Bennett, J.E.; Hennocq, Q.; Lu, Y.; De-Regil, L.M.; Rogers, L.; Danaei, G.; Li, G.; White, R.A.; Flaxman, S.R.; et al. Trends and mortality effects of vitamin A deficiency in children in 138 low-income and middle-income countries between 1991 and 2013: A pooled analysis of population-based surveys. *Lancet Glob. Health* **2015**, *3*, e528–e536. [[CrossRef](#)]
75. Mason, J.B.; Berr, C.S.; Sachdev, H.; West, K.P., Jr.; Palmer, A.C.; Sommer, A. Should universal distribution of high dose vitamin A to children cease? *BMJ* **2018**, *360*, k927. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. GBD Diarrhoeal Diseases Collaborators. Estimates of global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of diarrhoeal diseases: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet Infect. Dis.* **2017**, *17*, 909–948. [[CrossRef](#)]
77. Mason, J.; Grainger, T.; Shrimpton, R.; Sanders, D.; Yukich, J. Vitamin A policies need rethinking. *Int. J. Epidemiol.* **2015**, *44*, 283–292. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
78. Fisker, A.B.; Bale, C.; Rodrigues, A.; Balde, I.; Fernandes, M.; Jorgensen, M.J.; Danneskiold-Samsøe, N.; Hornshøj, L.; Rasmussen, J.; Christensen, E.D.; et al. High-dose vitamin A with vaccination after 6 months of age: A randomized trial. *Pediatrics* **2014**, *134*, e739–e748. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
79. Sommer, A.; Tarwofo, I.; Djunædi, E.; West, K.P., Jr.; Loeden, A.A.; Tilden, R.; Mele, L. Impact of vitamin A supplementation on childhood mortality. A randomised controlled community trial. *Lancet* **1986**, *1*, 1169–1173. [[CrossRef](#)]
80. West, K.P., Jr.; Pokhrel, R.P.; Katz, J.; LeClerq, S.C.; Khatri, S.K.; Shrestha, S.R.; Pradhan, E.K.; Tielsch, J.M.; Pandey, M.R.; Sommer, A. Efficacy of vitamin A in reducing preschool child mortality in Nepal. *Lancet* **1991**, *338*, 67–71. [[CrossRef](#)]

81. Rahmadhullah, L.; Tielisch, J.M.; Thulasiraj, R.D.; Katz, J.; Coles, C.; Devi, S.; John, R.; Prakash, K.; Sadanand, A.V.; Edwin, N.; et al. Impact of supplementing newborn infants with vitamin A on early infant mortality: Community based randomised trial in southern India. *BMJ* **2003**, *327*, 254. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
82. Klemm, R.D.; Labrique, A.B.; Christian, P.; Rashid, M.; Shamim, A.A.; Katz, J.; Sommer, A.; West, K.P., Jr. Newborn vitamin A supplementation reduced infant mortality in rural Bangladesh. *Pediatrics* **2008**, *122*, e242–e250. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Beesmahar, K.A.; Tintantihardjo, S.A. Undernutrition, the acute phase response to infection, and its effects on micronutrient status indicators. *Adv. Nutr.* **2014**, *5*, 702–711. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Bond, P.; Desmarchelier, C. Genetic variations associated with vitamin A status and vitamin A bioavailability. *Nutrients* **2017**, *9*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Edmond, K.M.; Newton, S.; Shannon, C.; O'Leary, M.; Hurt, L.; Thomas, G.; Amenga-Etego, S.; Tawiah Aggrey, C.; Grant, L.; Hurt, C.N.; et al. Effect of early neonatal vitamin A supplementation on mortality during infancy in Ghana (Newvita): A randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* **2015**, *385*, 1315–1323. [[CrossRef](#)]
86. Masanja, H.; Smith, E.R.; Muhibi, A.; Briegleb, C.; Mshamu, S.; Ruben, J.; Noor, R.A.; Khudyakov, P.; Yoshida, S.; Martinez, J.; et al. Effect of neonatal vitamin A supplementation on mortality in infants in Tanzania (Newvita): A randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* **2015**, *385*, 1324–1332. [[CrossRef](#)]
87. Mazumder, S.; Taneja, S.; Bhatia, K.; Yoshida, S.; Kaur, J.; Dube, B.; Toteja, G.S.; Bahl, R.; Fontaine, O.; Martinez, J.; et al. Efficacy of early neonatal supplementation with vitamin A to reduce mortality in infancy in Haryana, India (Newvita): A randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* **2015**, *385*, 1333–1342. [[CrossRef](#)]
88. Hamer, D.H.; Kausch, G.T. Vitamin A deficiency: Slow progress towards elimination. *Lancet Glob. Health* **2015**, *3*, e502–e503. [[CrossRef](#)]
89. Benn, C.S.; Diness, B.R.; Bakke, I.; Rodrigues, A.; Lausch, K.R.; Martins, C.L.; Fiske, A.B.; Aaby, P. Two different doses of supplemental vitamin A did not affect mortality of normal-birth-weight neonates in Guinea-Bissau in a randomized controlled trial. *J. Nutr.* **2014**, *144*, 1474–1479. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
90. Haider, B.A.; Bhatta, Z.A. Neonatal vitamin A supplementation: Time to move on. *Lancet* **2015**, *385*, 1268–1271. [[CrossRef](#)]
91. Platts-Mills, J.A.; Babji, S.; Bodhidatta, I.; Gratz, J.; Haque, R.; Havi, A.; McCormick, B.J.; McGrath, M.; Chortoghi, M.P.; Samie, A.; et al. Pathogen-specific burdens of community diarrhoea in developing countries: A multisite birth cohort study (MAL-ED). *Lancet Glob. Health* **2015**, *3*, e564–e575. [[CrossRef](#)]
92. Thornton, K.A.; Mora-Plazas, M.; Marin, C.; Villamor, E. Vitamin A deficiency is associated with gastrointestinal and respiratory morbidity in school-age children. *J. Nutr.* **2014**, *144*, 496–503. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. Al-Mekhlafi, H.M.; Anwar, T.S.; Al-Zabedi, E.M.; Al-Maktari, M.T.; Mahdy, M.A.; Ahmed, A.; Sallam, A.A.; Abdullah, W.A.; Moktar, N.; Surin, J. Does vitamin A supplementation protect schoolchildren from acquiring soil-transmitted helminthiasis? A randomized controlled trial. *Parasit. Vectors* **2014**, *7*, 367. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
94. Ahmed, A.M.; Soares Magalhães, R.J.; Long, K.Z.; Ahmed, T.; Alam, M.A.; Hossain, M.I.; Islam, M.M.; Mahfaz, M.; Mondal, D.; Haque, R.; et al. Association of vitamin D status with incidence of enterotoxigenic, enteropathogenic and enterosaggregative *Escherichia coli* diarrhoea in children of urban Bangladesh. *Trop. Med. Int. Health* **2016**, *21*, 973–984. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
95. Kosick, M.; Oberhelman, R.A. Unraveling the contradictions of vitamin A and infectious diseases in children. *J. Infect. Dis.* **2007**, *195*, 965–967. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
96. Hossain, M.I.; Haque, R.; Mondal, D.; Mahfaz, M.; Ahmed, A.S.; Islam, M.M.; Gaurangi, R.L.; Petri, W.A., Jr.; Ahmed, T. Undernutrition, Vitamin A and Iron Deficiency Are Associated with Impaired Intestinal Mucosal Permeability in Young Bangladeshi Children Assessed by Lactulose/Mannitol Test. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0164447. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

97. Vieira, M.M.; Paik, J.; Blaser, W.S.; Soares, A.M.; Mota, R.M.; Guerrant, R.L.; Lima, A.A. Carotenoids, retinol, and intestinal barrier function in children from northeastern Brazil. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **2008**, *47*, 652–659. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
98. Guerrant, R.L.; De Boer, M.D.; Moore, S.R.; Scharf, R.J.; Lima, A.A. The impoverished gut—A triple burden of diarrhoea, stunting and chronic disease. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2013**, *10*, 220–229. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2018 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).