ENDRIGO SPERTO RODRIGUES DOS SANTOS

**CORRELAÇÃO ENTRE DOENÇA ATEROSCLERÓTICA, DIETA
HIPERCOLESTEROLÊMICA E AS PERDAS DENTAIS: ESTUDO EM
MODELO ANIMAL**

São Paulo
2009

Endrigo Sperto Rodrigues dos Santos

**Correlação entre doença aterosclerótica, dieta hipercolesterolêmica
e as perdas dentais: estudo em modelo animal**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, para obter o título de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas.

Área de Concentração: Clínica Integrada

Orientador: Prof. Dr. José Leonardo Simone

São Paulo
2009

Catálogo-na-Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Santos, Endrigo Sperto Rodrigues dos

Correlação entre doença aterosclerótica, dieta hipercolesterolêmica e as perdas dentais: estudo em modelo animal / Endrigo Sperto Rodrigues dos Santos; orientador José Leonardo Simone. -- São Paulo, 2009.

76p. : tab., fig., graf. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas. Área de Concentração: Clínica Integrada) -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

1. Modelo animal (Coelhos) – Arteriosclerose – Cavidade bucal – Alterações 2. Modelo animal (Coelhos) – Dietas hipercolesterolêmicas – Cavidade bucal – Alterações 3. Perda de dente – Dietas – Doenças - Correlação

CDD 616.07:D
617.63

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE E COMUNICADA AO AUTOR A REFERÊNCIA DA CITAÇÃO.

São Paulo, ____/____/____

Assinatura:

E-mail:

FOLHA DE APROVAÇÃO

Santos ESR. Correlação entre doença aterosclerótica, dieta hipercolesterolêmica e as perdas dentais: estudo em modelo animal [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2009.

São Paulo, / /

Banca Examinadora

1) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

2) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

3) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

À Deus, pela força, física, mental, espiritual e cuidado de PAI em cada momento da minha vida.

A minha esposa Luciana e ao João Vitor (“Pilurito”), pelo carinho, amor, atenção e a alegria de uma família.

Aos meus pais pela educação e empenho em minha formação como pessoa.

Aos meus familiares que de certa forma estiveram sempre presentes em minha vida.

Aos Professores da Disciplina de Clínica Integrada da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, pela amizade e convivência científica compartilhada.

Aos colegas do Curso de Pós-Graduação em Clínica Integrada, pela amizade e companheirismo.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. José Leonardo Simone, pelos ensinamentos, convivência, amizade e carinho neste caminhar da pós-graduação.

A Professora Dra. Maria de Lourdes Higuchi, pelo empenho, dedicação e co-orientação do trabalho.

Ao Professor Dr. Rodney Garcia Rocha, pelos ensinamentos de vida e todo o cuidado de “Pai”.

Ao Dr. Joaquim Raposo Fernandes Filho, por ceder parte do material do trabalho, e ser um grande incentivador da pesquisa.

A Dra. Rosely Levi, por nos fornecer parte do material de pesquisa do nosso trabalho.

Aos Colegas de Pós-Graduação, Andreia Perrella, Estevam Rubens Utumi, Irineu Gregnanin Pedron e Leopoldo P. Nucci, que sempre estiveram ao meu lado.

As Secretárias da Disciplina de Clínica Integrada, Vilma e Regina, pela atenção e carinho nestes anos de convivência.

A secretaria do Departamento de estomatologia da FOU SP, Vera, pela atenção, carinho e disposição sempre.

As Bibliotecárias do SDO da FOU SP, Glauci e Vânia, pelas orientações e correções dos volumes.

A Secretaria da Pós Graduação, Katia, Alessandra, Donata e Miriam.

As Biologistas do InCor HCFMUSP, Adriana, Joyce, Marcia, Nadia, Renata, Solange e Suely, pelos ensinamentos e ajuda em NOSSO trabalho.

Aos Médicos patologistas do Laboratório de anatomia patológica do InCor.

Aos funcionários do laboratório de anatomia patológica do InCor, em especial ao Gerson, Denis e Wagner, pela atenção.

Aos Funcionários da Clínica da FOU SP.

À CAPES pela bolsa de Mestrado no programa Demanda Social.

Santos ESR. Correlação entre doença aterosclerótica, dieta hipercolesterolêmica e as perdas dentais: estudo em modelo animal [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2009.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi de avaliar em Modelo animal, coelhos (raça Nova Zelândia) divididos em três grupos randomizados, (jovem com 60 dias (G1), um idoso com aterosclerose e ingestão de colesterol (G2) e um idoso com aterosclerose e sem ingestão do colesterol (G3)) se, a dieta rica em colesterol e a idade, causam lesões de aterosclerose e placas ateroscleróticas nos animais, alterações nos comprimentos dos dentes, aumento ou diminuição dos espaços periapicais dos dentes, perda óssea alveolar na maxila e mandíbula. Através da metodologia descrita e após as análises histológicas e morfológicas, verificou-se diferença estatisticamente significativa, nas variáveis dos comprimentos dos dentes 1º pré-molares superiores entre os grupos **G3** versus **G1** $p<5\%$. médias de **1247,88** ($p=0,017$) e **G3** versus **G2**, com diferença das médias de **1190,85** ($p=0,025$) ou seja o comprimento dos dentes fora diferente no grupo G2. Com relação à variável, espessura do osso alveolar, não ocorreu significância estatística, porém tendências de que este esteja sendo alterado. Com relação a variável espessura do espaço periapical fora verificado significância estatística com $p=0,017$ em relação ao **G1**, na região dos 1º Pré-molares, apresentando a diferença das médias (**403,42**) a favor do **G2**, ou seja aumento do espaço periapical. A variável da área de placa de aterosclerose, correlacionada, com os comprimentos dos dentes e espessura do osso alveolar, também teve resultado significativo na região 1º e 2º pré-molares entre

G2 e G3. com **$p=0,025$ e $r=0,476$** . Confirmando assim a correlação da aterosclerose, dietas hiperclesterolêmicas e as alterações da cavidade bucal e estrutura de sustentação dos dentes.

Palavras-Chave: Doenças cardiovasculares, Aterosclerose, Perda de dente, Perdas Óssea alveolar, Dieta hipercolesterolêmica, Modelos animais.

Santos ESR. Relationship between atherosclerosis, hypercholesterolemic fat diet and tooth loss: Study in animal model [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2009.

ABSTRACT

The aim of this study is, to evaluate on animal model (New Zealand rabbits), on different and randomized groups (G1 a young group, G2 an older rabbit, with atherosclerosis and ingesting hypercholesterolemic fat diet and another group G3, just an older group) investigated than the hypercholesterolemic fat diet induced atherosclerotic lesions and plaques in ascendant aorta, bone loss in maxillary and jaw, alterations on length of the tooth, alterations on tooth periapical spaces. By the methodology described and applied, before the histological and morphological analysis, was verified significant statistical variance in the length of the first premolar tooth and second premolar on maxillary region, the length of this tooth is reduced in **G2 – ($p < 5\%$)**. The medias are 1247,88 (**$p = 0,017$**) and 1190,85 (**$p = 0,025$**). Analyzing another variable on the alveolar bone thickness, was not found any statistical significance, but tendencies that this event may occur. According to another variable of the thickness found on the periapical space, it was verified a significant variable statistic such as **$p = 0,017$** related on **G1**, on first premolar region, suggesting a different statistic, between medias, favoring **G2** meaning the increase of periapical space. The variable on the atherosclerosis plaque area, related to the teeth length and alveolar bone thickness, also showed significant results on first and second premolars regions between **G2** and **G3**, with **$p = 0,025$** and **$r = 0,476$** . That confirms the atherosclerosis correlations and hypercholesterolemic fat diet, also alterations in oral cavity and teeth implantation structure.

Keywords: Cardiovascular disease, Atherosclerosis, Tooth loss, Alveolar bone loss, Hypercholesterolemic fat diet, Animal Model

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 2.1 – Utilização do metacrilato para evidenciar vasos da cabeça e pescoço do coelho, ramos ascendentes, descendentes e terminais.....	29
Figura 4.1 – Foto da maxila, vista por oclusal, elementos no arco, antecedendo o corte do hemi-arco.....	33
Figura 4.2 – Foto da maxila, vista por oclusal, elementos no arco antecedendo o corte do hemi-arco.....	34
Figura 4.3 – Foto da mandíbula, antecedendo a hemimandibulectomia.....	35
Figura 4.4 – Foto da maxila após o corte do hemi-arco, com aproximação da região dos elementos do arco superior.....	36
Figura 4.5 – Foto da lamina em HE, para tomada do comprimento dos dentes da maxila e das outras variáveis.....	40
Figura 4.6 – Foto da maxila após o corte do hemi-arco, com aproximação da região dos elementos do arco superior.....	41
Figura 4.7– Foto do 1º pré molar superior esquerdo em microscópio para fluorescência, com aumento de 2.5X.....	42
Figura 4.8– Foto do 1º molar superior esquerdo em microscópio para fluorescência, com aumento de 2,5X.....	42
Figura 4.9 – Foto do 1º pré molar superior esquerdo em microscópio para fluorescência, com aumento de 2.5X.....	43
Figura 4.10 – Foto do corte histológico corado em HE, da aorta ascendente de coelho, com aumento de 2,5X , utilizado para medida da variável da área de placa da aorta.....	44

LISTA DE TABELAS E GRÁFICOS

Tabela 5.1 - Média e desvio padrão (dp) dos comprimentos (μm) das raízes dos dentes analisados na maxila.....	46
Tabela 5.2 - Média e desvio padrão (dp) das Medidas da espessura dos espaços periapicais, da região dos dentes superiores (maxila), 1° pré-molar, 2° pré-molar, 1° molar e 2° molar, em HE, imagens captadas no Microscópio para Fluorescência (n=12).....	48
Tabela 5.3 - Medidas do espessura dos espaços periapicais, da região dos dentes superiores (maxila) do 2° Pré Molar (n=12).....	49
Tabela 5.4 - Comparações de dois grupos medidas da espessura dos espaços periapicais, da região dos dentes superiores (maxila) 1° Molar.....	51
Tabela 5.5 - Comparações entre os 3 grupos das Medidas do osso compacto da maxila, da região dos dentes 1° pré-molar, em HE, imagens captadas no Microscópio para Fluorescência Espessura do Osso Compacto.....	52
Tabela 5.6 - Comparações a cada dois grupos das Medidas da espessura do osso compacto da maxila, da região dos dentes 1° pré-molar, em HE, imagens captadas no Microscópio para Fluorescência, Espessura do Osso Compacto.....	52
Tabela 5.7 - Comparações dos 3 grupos Medidas da espessura do osso compacto da maxila, da região dos dentes 1° molar, em HE, imagens captadas no Microscópio para Fluorescência, Espessura do Osso Compacto.....	53
Tabela 5.8 - Comparações dos 3 grupos das medidas da espessura do espaço periapical na região dos dentes 1° Pré-molar superior.....	53
Tabela 5.9 - Comparações múltiplas de “Holm Sidak” dois a dois das medidas da espessura do espaço periapical na região dos dentes, 1° Pré-molar superior.....	53
Tabela 5.10 - Comparações a cada dois grupos das medidas da espessura do espaço periapical na região dos dentes, do 1° Pré-molar superior....	54
Tabela 5.11 - Comparações dos 3 grupos, das medidas da espessura do espaço periapical, na região dos dentes, do 2° Pré molar.....	55
Tabela 5.12 - Comparações dois a dois dos grupos, da espessura do espaço periapical na região dos dentes , 2° Pré molar.....	55
Tabela 5.13 - Comparações dos 3 grupos, das medidas do espessura do espaço periapical na região dos dentes 1° Molar.....	56

Tabela 5.14 - Comparações dois a dois, da espessura do espaço periapical, na região dos dentes do 1º Molar.....	56
Tabela 5.15 - Comparações dos 3 grupos das medidas da Espessura do osso compacto da Mandíbula.....	58
Tabela 5.16 - Comparações dos 3 grupos das medidas da espessura osso compacto da mandíbula.....	58
Tabela 5.17 - Correlação entre área de placa e os grupos G2 e G3.....	58
Tabela 5.18 - Correlação entre área de placa e os grupos G2 e G3.....	58
Tabela 5.19 - Correlação entre área de placa e os grupos G2 e G3.....	59
Tabela 5.20 - Correlação entre área de placa e os grupos G2 e G3.....	59
Gráfico 5.1 – Intervalo de 95% confiança da média (média +/- 2 dp).....	48
Gráfico 5.2 - Medias das medidas dos espaços periapicais, 2ºpré-molar superior ..	50
Gráfico 5.3 - Médias das medidas dos espaços periapicais no 1º molar.....	50
Gráfico 5.4 - Médias, espessura dos espaços periapicais 1º pré-molar.....	54
Gráfico 5.5 - Intervalo de 95% de confiança da média.....	55
Gráfico 5.6 - Medianas dos grupos G1, G2 e G3, espessura dos espaços periapicais na região do 1º molar	56
Gráfico 5.7- Média da espessura do osso compacto na mandíbula.....	57

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

DCV	Doença Cardiovascular
DP	Doença Periodontal
PG	<i>Phorphyromonas gingivalis</i>
EI	Endocardite infecciosa
AVC	Acidente vascular cerebral
IAM	Infarto agudo do miocárdio
INVEST	Oral infections and vascular disease epidemiology
RACR	Raspagem e alisamento corono-radicular
CRP	Proteína C-Reativa (C-reactive protein)
TNF α	Fator de necrose tumoral alfa
LP	Ligamento Periodontal
IL-6	Interleucina 6
HDL	High cholesterol density
LDL	Low cholesterol density
SLI	Índice de placa de LOE

SUMÁRIO

	p.
1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DA LITERATURA	17
3 PROPOSIÇÃO	30
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	31
5 RESULTADOS	46
6 DISCUSSÃO	60
7 CONCLUSÕES	68
REFERÊNCIAS	69
ANEXOS.....	75

1 INTRODUÇÃO

O termo *Medicina Oral* foi utilizado pela primeira vez por Bunket em 1954, em referência aos padrões fisiológicos de homeostase entre o sistema estomatognático e os demais sistemas e órgãos do corpo. Foi a partir da década de 70, que algumas pesquisas começaram a elucidar as correlações entre as alterações orais e sistêmicas, relacionando as manifestações bucais com as patologias sistêmicas como: doenças respiratórias obstrutivas, doenças cardiovasculares, diabetes mélitus, parto pré-termo entre outras (TYLDESLEY, 1973).

A doença cardiovascular é uma das principais causas de morte nos países desenvolvidos e também no Brasil, ficando somente atrás do câncer, e a doença periodontal também é um dos principais problemas de saúde pública hoje no Brasil e no mundo, por isto, diversos estudos têm descrito a associação entre a doença periodontal e as doenças cardiovasculares (KIM; AMAR, 2006; SPAHR et al., 2006). Considerável importância vem sendo dada à doença periodontal e seu envolvimento com as doenças cardiovasculares, somado ao fato de que as infecções crônicas desempenham papel relevante no desenvolvimento da aterosclerose através da estimulação e produção de citocinas, ativação dos monócitos e aumento da coagulação, conforme Haraszthy et. al. (2006).

Bacteremias também são bem comuns em pacientes submetidos a procedimentos odontológicos, convencionais, como exodontias, tratamento endodôntico e cirurgias periodontais (LI et al., 2002). Através de procedimentos

odontológicos rotineiros como as exodontias, RACR (raspagem e alisamento-corono-radicular) endodontia, entre outros na cavidade bucal, ficou demonstrado que os microorganismos podem atingir o coração, pulmões e sistema periférico capilar em poucos minutos como descreveu Kilian (1982).

Por outro lado, a pesquisa epidemiológica também tem evoluído significativamente com o advento das pesquisas moleculares e genômicas, porque, além de detectar a distribuição/ prevalência das patologias entre as diferentes populações, também começou a detectar as substâncias químicas e celulares diretamente relacionadas com a comunicação intersistêmica/individual, estudados por Baelun e Lopez (2004).

Nessa mesma linha de raciocínio, um amplo estudo epidemiológico foi feito denominado "INVEST" (Oral Infections and Vascular Disease Epidemiology) cujo desenho foi idealizado para avaliar a hipótese de que infecções periodontais predispõem a uma progressão acelerada da aterosclerose de carótida e incidência de infarto cerebral e do miocárdico. A partir deste estudo, numerosos trabalhos foram realizados. Em um deles, Desvarieux et al. (2004), comparou nos indivíduos idosos, se a maior perda de dentes estava relacionada com a periodontite, e qual a sua relação com aterosclerose de carótida. O estudo demonstrou que a periodontite prévia era cumulativa e ainda estava presente nos pacientes com maior perda de dentes nos arcos. No entanto, um dado de maior relevância foi obtido no estudo "INVEST", que foi uma maior prevalência de placa aterosclerótica em carótida dos indivíduos com perda de mais de 10 dentes ($p < 0.05$), comparados com indivíduos sem perda ou com perda de menos de 10 dentes. Em outro trabalho, Engbreton et al. (2005), derivado deste mesmo levantamento epidemiológico, verificou que entre indivíduos dentados com intensa

perda óssea periodontal, a espessura média da placa de carótida foi, significativamente maior do que entre os indivíduos com menor perda óssea. Intensa perda óssea periodontal esteve associada a quase 4 vezes maior risco de presença de placa aterosclerótica na carótida. Ou seja, a intensa perda óssea periodontal está associada independentemente, da existência de aterosclerose da carótida. Pelo fato de estes e de outros trabalhos sugerirem fortemente uma relação entre saúde oral / medicina periodontal / perda dental e doença cardiovascular (DCV), acreditamos ser importante aprofundar esses estudos nestas linhas de raciocínio. Revisando a literatura, observamos que praticamente todos os trabalhos procuram interpretar a relação entre as perdas dentais, perda óssea e desenvolvimento de placa aterosclerótica, pela presença da periodontite (doença periodontal), os agentes infecciosos ou ainda fatores não evidenciados até o momento. No entanto, uma possibilidade que acreditamos, deva ser levada em consideração, é que o processo de perda de dentes e a perda óssea se devam, à diminuição de fluxo por ateromas, na região da cabeça, mandíbula e maxila, causando desta forma uma isquemia crônica regional e localizada. Assim, nos locais mais distais de irrigação, poderia ocorrer uma fibrose com perda óssea e vulnerabilidade à implantação dos elementos dentais. Ainda sobre esta hipótese, a infecção poderia ser um fator – digamos - secundário pelo fato da isquemia proporcionar um ambiente favorável ao desenvolvimento dos microorganismos. Para aprofundar este tema, procuramos estudar, e desenvolver pesquisas primeiramente com modelo animal, específico para o desenho do nosso projeto.

É sabido que as perdas dentais aumentam com o avançar da idade (senilidade) no ser humano (PLASSCHAERT et al., 1978; SHEIHAN; HOBDELL,

1969) também é sabido que estas perdas são incrementadas através da DP e da perda dos elementos de sustentação do periodonto, através da periodontite, que altera as condições locais e teciduais, implicando nas perdas dentais. O tecido periodontal envolve os dentes, incluindo osso alveolar, ligamento periodontal (PL), cemento do dente, a gengiva livre, a gengiva marginal, e os ligamentos periodontais que ancoram as raízes dentais ao osso alveolar. O elemento mais importante do ligamento (PL), são as fibras principais, de colágeno, e estão arranjadas em grupos e feixes, e a porção terminal destas, estão inseridas no cemento e no osso alveolar, tendo como principal função suporte e sustentação dos dentes, também é importante na regeneração do próprio PL, osso alveolar e do cemento, mantendo a homeostase dos tecidos de suporte (AUKHIL et al., 1986; GOTTLOW et al., 1984; IGLHAUT et al., 1988). Diversos estudos descrevem as alterações do PL em função da idade/senilidade, porém as investigações histológicas ainda são limitadas (SEVERSON et al., 1978; STAHL; FLECHER; WYMAN, 1977; VAN DER VELDEN et al., 1984).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Aterosclerose, doença periodontal e a presença de agentes infecciosos

Aterosclerose é um dos maiores problemas de saúde pública da atualidade, cujo maior fator de risco é a idade (LAKATTA; LEVY, 2003). Entretanto, muitas pessoas alcançam uma idade avançada sem evidências da doença. Outra explicação seria o caráter epidêmico das doenças cardiovasculares isto é, vários fatores de risco aumentam em número ou gravidade com a idade. Uma proposição mais atrativa é a possibilidade da longevidade contribuir para uma maior exposição aos fatores de risco tempo-dependentes. Assim, o tempo indiretamente conferiria um risco aumentado para a ocorrência e maior gravidade das manifestações fisiopatológicas dessas doenças. Agentes infecciosos poderiam, neste contexto, ter papel fundamental, seja por infecção sub-clínica, seja por re-infecções, sendo a idade, fator decisivo no acúmulo de patógenos, de lesões e alterações por eles induzidas, explicando a maior incidência e gravidade da doença com o envelhecimento.

Nesse contexto de maior infecção crônica com o envelhecimento, podemos ter como exemplo um aspecto inquestionável: a doença periodontal e a perda de dentes que ocorrem de forma crônica e progressiva com o avançar da idade (SHIP, 2004). A infecção tem sido recentemente postulada como um fator que pode induzir, acelerar ou agravar a aterosclerose, em paralelo com a presença de marcadores

inflamatórios. Assim, verificamos que inúmeras publicações na literatura envolvendo *C.pneumoniae* e aterosclerose foram realizadas, com resultados contraditórios, permanecendo o assunto ainda em debate. Microorganismos como *C.pneumoniae*, herpes vírus e patógenos periodontais podem induzir ou agravar a aterosclerose em animais experimentais (FONG, 1999; GIBSON III et al., 2005; LI et al., 2002), e têm sido encontrados nas placas ateroscleróticas humanas também, conforme Gibson III et al. (2006).

Associação de microorganismos vem sendo progressivamente mostrada nas doenças crônico-degenerativas, inclusive na doença periodontal como a *Porphyromonas gingivalis* (PG) e o *Treponema denticola* (GIBSON III et al., 2006).

Um estudo longitudinal envolvendo ultra-sonografia de carótida e análise das condições bucais, mostrou após 16 anos espessamento intimal significativamente maiores em pacientes com doença periodontal, do que nos pacientes pertencentes ao grupo controle. Pacientes com doença periodontal mostraram risco 25% maior de manifestar doença aterosclerótica coronariana, sendo que no grupo de homens com menos de 50 anos esse índice é maior que 70%, segundo Li et al. (2002) e Mattilla, Pussinen e Paju (2005).

A teoria da infecção pode ser verdadeira, quando da existência de uma bacteremia periodontal, onde o foco é liderado por inoculação de patógenos nas placas de aterosclerose, podendo ter resposta imune ao patógeno ou então progressão da doença aterosclerótica (BECK et al., 2005; DESVARIEUX et al., 2004).

2.2 Aterosclerose, perda de dentes, periodontite e a perda óssea

O osso alveolar tem papel fundamental na manutenção do suporte do dente, que está ancorado por fibras desmodontais. Mecanismos de estimulação do osso alveolar durante a mastigação são cruciais na manutenção da saúde dos dentes e do osso. Perda de dente resulta em reabsorção irreversível do osso alveolar, sendo que a doença periodontal não tratada causa lise (perda/reabsorção) do osso alveolar, posteriormente, levando à perda do dente. As fibras desmodontais (fibras do ligamento periodontal - LP) ligam-se à parede interna do alvéolo. Doença periodontal pode resultar em marcada reabsorção do osso, com desligamento das fibras desmodontais, porém o contrário também é verdadeiro: a diminuição do osso alveolar pode resultar em perda do dente.

É conhecido o fato de que a extração de um dente pode ser seguida da reabsorção do osso alveolar. Entretanto, acredita-se que, independentemente dos fatores que levam à lise do osso alveolar, as características de base do osso têm papel crucial. Ou seja, o paciente cujo osso alveolar se apresenta adequado em quantidade e qualidade ao tempo da perda óssea, apresenta menores consequências adversas de reabsorção do osso (SHIP, 2004).

Idade avançada e fumo estão associados à maior gravidade da doença periodontal, fatores estes também associados à maior incidência de aterosclerose. Apesar de se saber que doença aterosclerótica do coração e osteoporose são doenças da idade, é controverso o fato da osteoporose afetar a intensidade de doença periodontal (MERCADO; MARSHALL; BARTOLD, 2003; PERSSON et al., 1998; PERSSON et al., 2002).

A periodontite é uma das causas da perda do tecido conjuntivo, reabsorção óssea e formação de bolsas periodontais, que podem levar à perda da inserção dos dentes, sendo um dos fatores mais comumente atribuídos à perda dental em adultos. O risco de desenvolvimento da doença periodontal varia de indivíduo para indivíduo, dependendo de alguns fatores como: idade, hereditariedade, condições sistêmicas, higiene oral precária ou ausente e tabagismo (LAKATTA; LEVY, 2003; WILLIAMS, 2002), que se assemelha muito aos fatores do desenvolvimento das doenças cardiovasculares. Durante muito tempo acreditou-se que a doença periodontal era uma consequência inevitável do envelhecimento. Hoje se sabe, que ela pode ser evitada ou tratada, precocemente as perdas dentais (LAKATTA; LEVY, 2003).

A intensidade da doença periodontal pode ser avaliada por diversos parâmetros clínicos que refletem através da inflamação, sangramento, quantidade de placa e profundidade de bolsa. Várias doenças metabólicas podem induzir reabsorção do osso alveolar, resultando na perda dental, como por exemplo, o hiperparatireoidismo, doença de Paget, idade e infecções. As mudanças do osso alveolar variam muito entre os indivíduos e podem estar ligadas a fatores locais (DEVLIN; HORNER, 2002; DEVLIN; HORNER, 1991; FORD et al., 2005).

Muitos estudos têm investigado associações potenciais entre osso alveolar e massa de osso em outros sítios do esqueleto, para avaliar a evolução da doença periodontal, reabsorção do osso alveolar pós-extração e densidade mineral óssea em vários sítios da mandíbula, com resultados conflitantes possivelmente pela diversidade de metodologia.

Estudos prospectivos radiológicos têm procurado esclarecer o debate, se existe e como ocorre a ligação entre doença aterosclerótica vascular, doença óssea

e as perdas de dentais. Um estudo radiográfico realizado com 203 indivíduos, sem AVC, com idades entre 54 e 94 anos, durante avaliação basal (Baseline) do projeto “INVEST” mostrou que a perda de osso periodontal está associada de forma independente à aterosclerose de carótida (ENGEBRESTSON et al., 2005). A periodontite se correlacionou com o espessamento da túnica médio-intimal da carótida, independentemente de outros fatores de risco tradicionais, incluindo o fumo, como fora citado por Beck e Offenbacher (2003).

Nesse sentido, não se pode descartar a hipótese de que o colesterol possa estar atuando na alteração do tecido colágeno e nas perdas ósseas. Por outro lado, conforme já referimos acima, perda óssea e alterações nos tecidos relacionados à implantação do dente podem estar relacionados à isquemia crônica devido à presença de placa obstruindo a luz vascular. Sabe-se que as estatinas são potentes inibidores da síntese de colesterol e são muito usadas no tratamento da aterosclerose (HORIUCHI; MAEDA, 2006).

Estudos clínicos não mostraram efeito da estatina no tratamento da densidade de mineralização do osso em quadril ou coluna. Entretanto, as estatinas parecem influenciar nos tecidos ósseos orais. Administração de estatina em combinação com tratamento para osteoporose, parece melhorar a arquitetura do osso alveolar em mandíbulas de ratos, pós extração de molares. Estatinas continuam a ser considerados potenciais agentes terapêuticos no tratamento de osteoporose e doença periodontal, mostrando capacidade de aumentar e induzir a formação de osso (HORIUCHI; MAEDA, 2006; WHITNEY et al., 2004).

Isto não afasta o fato de que o mecanismo seja de obstrução da luz pela redução e de placas de ateroma com conseqüente aumento da perfusão sanguínea.

Em trabalho com humanos, procurou-se verificar a relação entre o número de dentes perdidos e estenose de artéria carótida, detectada por índice de perdas dentais conforme redução de obstrução da carótica e estenose da artéria carótida em pacientes desdentados (SCHILLINGER et al., 2006). É sabido que a doença periodontal e dental tem significativa associação com a progressão da aterosclerose da carótida. O DMFT (índice de perda dental por arco) é uma medida global do status dental, e o SLI (índice de placa de LÖE), um indicador da placa dental. Ambos são indicadores de uma predileção, prevalência e progressão da doença. Existem muitas evidências de associação entre a DP e o desenvolvimento e progressão da aterosclerose que pode estar ligada aos fatores já conhecidos, os fatores de risco tradicionais comuns a ambas as doenças, como o tabagismo, obesidade e diabetes. Além disto, os aspectos socio-econômicos também podem influenciar a doença dental e na aterosclerose podem refletir na susceptibilidade individual de desenvolver a doença, em resposta a estímulos endógenos e exógenos.

A inflamação do tecido periodontal, pode exacerbar a doença vascular, promover a progressão da aterosclerose, porém no estudo, os índices dentais não foram associados nos resultados finais, porém os marcadores inflamatórios tiveram significativa correlação com a inflamação e com a progressão da doença em alguns estudos, conforme Schillinger et al. (2006) e Sabeti et al. (2005). Infelizmente, os níveis de patógenos ou os níveis de resposta imune não foram avaliados nesses pacientes.

A associação entre as perdas dentais e a aterosclerose, foi positiva dependendo do número de dentes perdidos e da progressão da doença. Isto fora reportado previamente em pacientes com morbidade cardiovascular, perdas dentais

e os marcadores da doença periodontal. Nesse trabalho, as perdas dentais foram encontradas quando da presença da placa de carótida (DESVARIEUX et al., 2004).

O SLI (Índice de Placa de LÖE) mostrou significativa associação entre a prevalência e a progressão da aterosclerose da carótida. A infecção periodontal, pode desencadear, inflamação sistêmica. Por outro lado, esta inflamação sistêmica já fora previamente correlacionada com a espessura da íntima que é um marcador de aterosclerose, segundo Desvarieux et al. (2004) e Schillinger et al. (2006).

2.3 Modelo animal, aterosclerose, idade e dieta hipercolesterolêmica

É sabido que a idade por si só, torna-se fator de risco para as doenças cardiovasculares, porém ainda não está muito clara esta relação. Diversos estudos vêm sendo realizados para explicar esta relação, acreditando-se que a idade pode resultar em intrínsecas alterações das paredes dos vasos. Duas variáveis: intensidade e duração da exposição aos fatores de risco podem estar influenciando (SPAGNOLI et al., 1991). O trabalho comparou 2 grupos de coelhos da raça Nova Zelândia, de diferentes idades: um com 46 semanas e outro com 4 semanas. Os animais idosos receberam dieta enriquecida com colesterol, por 18 semanas, e os animais jovens não receberam. Utilizando métodos morfológicos e morfométricos detectaram prevalência de marcadores fibromatosos nas placas, maior extensão das lesões na aorta, do que nos coelhos jovens, sem dieta hipercolesterolêmica, presença de placas fibroateromatosas na região de carótida.

Também estudos epidemiológicos em animais, demonstram a relação entre idade e aterosclerose, como foi o estudo feito por Gore et al. (1962). Lesões de aterosclerose são mais frequentes em animais idosos segundo Weingand et al. (1986). Em coelhos, dietas curtas e longas de colesterol (hipercolesterolemia) foram utilizadas para respectivamente induzir a formação da placa aterosclerótica e o seu agravamento como descreveram Cavallero, Turdla e Ricevuti (1971) e Still (1963), e a formação de lesões fibroateromatosas em coelhos descrita por Adams et al. (1982), Constantinides, Booth e Carlson (1960), Wilson et al. (1982).

O coelho tem sido o modelo animal de escolha, comumente utilizado para estudos com aterosclerose, desde 1908, com Ignatowski (1908), Finking e Hanke (1997). Dentre os animais, o coelho é o que mais apresenta tendência a desenvolver hipercolesterolemia, após administração de alta concentração de colesterol na dieta como estudaram Bocan et al. (1994). Os trabalhos com este modelo animal segundo Adams et al. (1982), não devem ser prolongados, pois a hepatotoxicidade faz com que o animal venha a óbito. Este trabalho ainda sugeriu, que as afecções comumente encontradas em humanos são muito parecidas com as que acometeram os animais quando da ingestão prolongada do colesterol. Segundo Kolodgie et al. (1996), o modelo animal apresenta lesões mais avançadas, não por causa da ingestão continua de colesterol, mas por consumo longo de dieta aterogênica mesmo que não seja diário. Outro fato importante que foi relatado por Gupta, Tandon e Ramalingaswami (1970) do uso de coelho para estudo de lesões ateroscleróticas, é que é o modelo que dentre os animais apresenta a menor taxa de regressão das lesões ateroscleróticas. Coelhos idosos com idade entre 3,4 e 5 anos, apresentaram placas com fibrose maior do que os coelhos jovens como descreveu Spagnoli et al. (1991) e Yanni (2004).

2.4 Modelo animal, reabsorção óssea, lesões periapicais, periodontite e bacteremias

As bactérias podem induzir destruição e alterações ósseas, dentre as muitas que encontramos na literatura, periodontite, lesões periapicais, periodontite marginal, osteomielite entre outras doenças ósseas segundo De Rossi, Rocha e Rossi (2007) e Nair et al. (1996). As lesões periapicais, podem ser uma reação de defesa a algum hospedeiro, a uma bacteremia, a componentes tóxicos, trauma, defesa imunológica segundo De Rossi, Rocha e Rossi (2007). Diversos estudos vêm utilizando-se do modelo animal para verificar as lesões periapicais, alterações e perdas ósseas, os mecanismos isolados de destruição óssea e os mecanismos da patogenia da doença e o seu restrito desenvolvimento e as inter-relações com as manifestações sistêmicas.

Hasturk et al. (2006), descreveu que a forma mais comum da DP é observada em indivíduos adultos, através da sua forma crônica como confirmou estudo de Brook (2003).

Diversos estudos têm focado suas pesquisas, nos componentes celulares da inflamação, precocemente, e os eventos de mediadores celulares críticos são de difícil entendimento. Os mastócitos celulares, são componentes importantes na resposta inflamatória, juntamente com os grânulos citoplasmáticos que contém substâncias críticas e tóxicas como a histatina, substâncias de reação anafilática, heparina, fatores quimiotáticos de eosinofilia, bradicinina destruindo o interior do tecido periodontal como descreveu Lagunoff et al. (1964).

Outros estudos como os de, Ashih et al. (2003) e outros grupos de trabalho, demonstraram e reproduziram a DP, as perdas ósseas, as degenerações teciduais do periodonto, em modelo animal, através de trabalhos experimentais, onde foram feitas ligaduras com fio de sutura em seda, acompanhado de aplicação tópica de microorganismos (patógenos) periodontais específicos, *P. gingivalis*, Ashih et al. (2003). Já em outra pesquisa, Serhan et al. (2003), fez a associação da PG com microorganismos gram-negativos pigmentados em preto, que levaram a maior patogenia no desenvolvimento da periodontite, perdas ósseas e destruições periodontais em coelhos. Em estudo realizado em modelo animal, coelhos Nova Zelândia, Hasturk et al. (2006), avaliou se os efeitos da aplicação tópica da cimetidina associado com a PG e a ligadura, com sutura no periodonto dos animais, induzindo DP, aumentariam as alterações histológicas e morfológicas, fora feito o acompanhamento radiográfico, e através da análise morfométrica, as alterações, e manifestações nos animais foram verificadas. Neste trabalho com modelo animal, foram utilizados 21 coelhos nova zelândia, divididos em 6 grupos: Grupo A) recebeu somente a ligadura com sutura no periodonto,; B) Ligadura , mais a PG; C) Ligadura, PG e o veículo lipossomo; D) Ligadura, PG e a cimetidina com 0,1mg sitio; E) Ligadura, PG e a cimetidina a 1,0 mg sitio; F) Ligadura, PG e a cimetidina a 10,0 mg sitio. A DP fora induzida através da ligadura com sutura de seda 3,0 ao redor do 2º pré-molar inferior dos quadrantes mandibulares e inoculação de PG como descrito por Ashih et al. (2003). A análise morfométrica foi feita como segue; após eutanásia, as mandíbulas foram dissecadas, retirada a musculatura, e os tecidos moles, mantendo a gengiva inserida intacta junto ao osso, a mandíbula fora seccionada em duas hemi-mandíbulas, na região de incisivo centrais / sínfise mandibular. Uma hemi-mandíbula, foi destinada para a análise morfométrica, e a outra para

histológica. A destinada a morfometria, fora incluída em peróxido de hidrogênio à 10% por 4 dias, em temperatura ambiente, o tecido mole foi removido cuidadosamente, a mandíbula foi incluída no azul de metileno, para maior distinção das estruturas dentais e as ósseas. Em seguida, o osso ao redor do 2 pré-molar inferior foi medido, com uma sonda periodontal de 0,5mm. As medidas foram feitas em três pontos, tanto na lingual como por vestibular, para verificar os níveis ósseos da crista alveolar. Uma média do osso ao redor do elemento foi calculada. Similarmente, os níveis ósseos proximais também foram medidos, tanto por mesial quanto por distal do 2 pré-molar inferior, e uma média foi calculada. Os níveis ósseos foram quantificados através do analisador de imagens (Image Pro plus 4.0, Media Cybernetics, Springer, MD). A mandíbula foi "montada" e fotografada, usando um microscópio invertido, com aumento de 10X. A imagem foi capturada e analisada, e a média da crista óssea ao redor dos segundos pré-molares foi tomada em milímetros. Na análise histológica, a outra porção da hemi-mandíbula, fora descalcificada em solução descalcificadora (Immunocal), esta fora trocada diariamente, durante 2 semanas. A descalcificação fora confirmada através de tomadas radiográficas. Após descalcificação, passaram em água corrente por 3 minutos, para remoção dos excessos, neutralização do pH no tecido, com objetivo de manter as características do tecido e parar com a descalcificação. O tecido foi colocado em água destilada, por 3 minutos, em seguida em formalina por 24 horas, para ser parafinado em seguida. Foram feitos os cortes, de 5µm, e fixados em hematoxilina e eosina, para identificar a composição celular do infiltrado inflamatório e detectar a atividade osteoclástica. Para as análises foram feitos 5 cortes dentre 20 amostras e as medias das medidas foram calculadas (HASTURK et al., 2006).

2.5 Lesões de atrofia induzidas por isquemia devido a aterosclerose e fenômenos de roubo e perdas ósseas

Obstruções causadas por aterosclerose em ramos arteriais levam a isquemia do tecido irrigado pelo mesmo, causando fibrose, atrofia, infiltração gordurosa localizada. Estas lesões são denominadas de miocardioesclerose (quando acometendo o coração), nefroesclerose (quando acometendo os rins) ou esclerose cerebral (quando acometendo o cérebro) (BRASILEIRO, FILHO, 2006). Além disso, lesões isquêmicas podem ser agravadas pela presença do chamado fenômeno de roubo, aonde ocorre desvio da irrigação normal de uma região pela presença de placas obstrutivas localizadas, principalmente em território ascendente, com derivação e desvio do fluxo de sangue para o ramo descendente, como descreveram Fregni et al. (2003), Horowitz et al. (1993).

Análise que fizemos coordenada pela Prof. Dra Maria de Lourdes Higuchi, em estudo não publicado (parceria com o Museu de Anatomia do InCor-HCFMUSP) da irrigação e vascularização dos dentes dos coelhos mostrou que, assim como no homem ela se faz por ramos da carótida.

Figura 2.1 - Utilização do metacrilato para evidenciar vasos da cabeça e pescoço do coelho, ramos ascendentes, descendentes e terminais

A arcada superior é irrigada por um ramo em posição ascendente, cuja porção terminal irriga a região dos 1º. Pré-molares. Já o ramo que irriga a arcada inferior sai em posição descendente ou em ângulo reto à artéria carótida de origem. Obstruções devido a placas de aterosclerose podem levar a isquemia e placas localizadas na artéria que irriga a arcada superior, desta forma podem provocar fenômeno de roubo com desvio do sangue para a arcada inferior. Desta forma, alterações degenerativas de atrofia da raiz do dente, alterações ósseas, aumento das lesões periapicais, aumento dos espaços periapicais, diminuição da cortical óssea com aumento de osso medular, podem ocorrer por isquemia e aterosclerose na arcada superior, principalmente nas regiões dos 1º e 2º Pré-molares.

3 PROPOSIÇÃO

O presente trabalho tem como propósito, estudar em modelo animal experimental, divididos em grupos randomizados, se a dieta crônica prolongada rica em colesterol, pode levar simultaneamente ao desenvolvimento de placas de aterosclerose nas artérias e a alterações degenerativas das raízes dos dentes, dos seus tecidos de suporte e de implantação – espaço periapical, osso alveolar, osso compacto, ligamento periodontal e também os dentes, em regiões mais susceptíveis à isquemia regional pela aterosclerose.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

O presente trabalho, foi realizado utilizando cabeças e aortas ascendente de coelhos da raça Nova Zelândia (White New Zealand), um grupo de animais jovens, 11 animais com 60 dias, provenientes do Biotério Central da Universidade Barão de Mauá em Riberão Preto - SP e dois grupos de animais idosos, 22 animais com 11 meses, provenientes da Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP – EPM.

O protocolo de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq da Diretoria Clínica do HC-FMUSP e Comissão Científica e de Ética do Instituto do Coração sob o número P 029/04 de 27/04/2006 (Anexo A) e recebeu parecer favorável do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo - CEP FOUSP (Anexo B).

4.2 Métodos

4.2.1 Elaboração da dieta

Os animais foram alimentados inicialmente de ração para coelhos Nuvilab®; Laboratório Nuvital – Curitiba, PR, Brasil. Para obter a dieta hipercolesterolêmica, foi

adicionado 10g de colesterol em pó (Sigma – C 8503 – 95% de pureza USP) a cada quilo de ração comercial. O colesterol fora dissolvido em uma mistura de 50 ml de éter etílico, e 100ml de álcool etílico 70, em seguida pulverizado à ração. A ração ficou em cubas apropriadas para evaporação do conteúdo volátil da mistura durante 24 horas. Cada animal recebeu diariamente 150 g de ração, aproximadamente, com consumo controlado por pesagem diária. Sendo que esta dieta hipercolesterolêmica fora administrada aos animais durante os nove (9) meses necessários e previamente estabelecidos.

4.2.2 Eutanásia dos animais

A eutanásia foi realizada após a pesagem dos animais, com injeção prévia de anestésicos (Ketamina 25-50 mg/kg associado a Xilazina 2-5 mg/kg via intramuscular), cuja ação foi exacerbada com barbitúrico (Tiopental) e administração de cloreto de potássio 3ml via intracardíaca.

Os animais foram submetidos imediatamente a necropsia, sendo removida a cabeça e pescoço e as estruturas necessárias para nosso estudo.

4.2.3 Estudo anatomopatológico – representação do espécime

1. Após sacrifício, cabeça do animal foi fixada em solução de formol à 10%; (com identificação devida dos grupos).
2. Foi feita a remoção da pele, tecidos moles e, partes ósseas não diretamente relacionadas com a cavidade bucal e os dentes

Figura 4.1- Foto da maxila, vista por oclusal, elementos no arco, antecedendo o corte do hemi arco

Figura 4.2- Maxila, vista por oclusal, elementos no arco antecedendo o corte do hemi arco

Figura 4.3 - Mandíbula, antecedendo a hemimandibulectomia

3. O segmento foi colocado em solução descalcificadora – Ácido Nítrico – (80ml de Ácido Nítrico 65%, mais 920ml de Água Destilada) por cerca de 2 semanas, até o material estar descalcificado.
4. Sendo as peças descalcificadas, foram retiradas da solução de ácido nítrico, lavadas em água corrente, tanto a maxila quanto a mandíbula, fora feita a separação das arcadas em duas hemi-arcadas, direita e esquerda, com corte sagital no sentido perpendicular ao centro da maxila (papila incisal e incisivos centrais) e mandíbula no seu centro perpendicularmente, (região de incisivos centrais inferiores região de sínfise de mandíbula utilizando lâminas de micrótomo. Obteve-se assim os dois hemi-arcos mandibulares e os dois hemi-arcos maxilares;

5. Em posse dos dois hemi-arcos, maxilares e mandibulares, partimos para os próximos cortes, que foram feitos perpendicularmente ao longo eixo dos dentes tanto da maxila como da mandíbula, no sentido ocluso-apical, separando o hemi-arco da maxila e da mandíbula em 2 porções, vestibular e lingual, sempre perpendicularmente ao longo eixo dos dentes;

Figura 4.4 - Maxila após o corte do hemi-arco, com aproximação da região dos elementos do arco superior

A partir destes fragmentos, vestibular e lingual de cada hemi-arco, foi feito mais um corte com espessura de cerca de 4mm desta estrutura, com os elementos dentais, osso alveolar e as estruturas de implantação dos dentes, estes fragmentos foram acondicionados nos cassetes devidamente identificados e tabulados com os dados das estruturas neles contidas e o número da respectiva pesquisa, mantidos em solução de formol tamponado 10% , em partiram para o processamento no Laboratório de Anatomia Patológica do InCor-HCFMUSP.

4.2.4 Processamento laboratorial do material em Laboratório de Anatomia Patológica

1. Processamento e inclusão em parafina

Após o corte da peça e acondicionamento no cassete, estes ficam em solução de formol tamponado 10%, em seguida encaminhado para o Laboratório de Anatomia Patológica do InCor. Na sequência os cassetes passam por um aparelho chamado processador de tecidos (Leica TP-1020, Germany), onde permanecem em um ciclo apropriado para nossa pesquisa, de 12 horas. Neste, o tecido é desidratado em solução de álcool 95% em seguida solução de álcool absoluto (100%), para término da desidratação, passando por fim para a solução de xilol, com a finalidade de diafanizar a peça, para melhor absorção da parafina.

Após o processamento dos tecidos, os segmentos seguem para o emblocamento, em parafina, utilizando uma central de inclusões (Leica EG-1160, Germany), onde são confeccionados os blocos.

2. Microtomia

Estando emblocadas os segmentos, os blocos seguem para o Micrótopo (Leica RT-2125, Germany), onde são trimados fazendo-se a nivelção do tecido incluso no bloco e retirada da parafina excedente.

Os blocos são encaminhados a um freezer com temperatura de, -5°C, por cerca de 17 minutos. Neste mesmo tempo, as lâminas que serão utilizadas, passam por um processo de limpeza em álcool 70% e preparo em solução de Silano à 2% e Acetona PA.

Em seguida, os blocos seguem para o micrótomo (Leica RM-2145, Germany), onde os cortes são confeccionados com espessura de $0,5\mu$, estes submetidos a um banho de água fria e em seguida “banho maria” ($\pm 58^{\circ}\text{C}$), os cortes são “pescados” com a lâmina, e colocados na estufa a 60°C , permanecendo por 12hs.

3. Desparafinização, hidratação e coloração das lâminas

As lâminas seguem para os banhos; 4 cubas de xilol, 4 cubas de álcool absoluto (100%), 3 cubas de álcool 95%, uma de álcool 70% e água corrente. Seguem para a solução de corante nuclear de hematoxilina por 7 minutos e em seguida água corrente para remoção dos excessos do corante. Após diferenciação, mergulho em álcool 80%, mergulho em solução alcoólica de eosina, álcool 70%, 2 cubas de álcool 95%, 4 cubas de álcool absoluto e em seguida 4 cubas de xilol para diafanização.

4. Diferenciação

As lâminas são mergulhadas 2 vezes em solução alcoólica de ácido clorídrico 1% e em seguida água corrente para remover excessos.

5. Montagem das lâminas

As lâminas já coradas, serão montadas, com lamínula e resina (Entellan, Merck – Germany), permanecendo em temperatura ambiente, por 6 horas para secagem.

4.2.5 Técnica de Microscopia óptica e Microscopia por Fluorescência para análise histológica e morfometria

Após o processamento, as lâminas foram limpas com solução de álcool e éter.

Utilizamos 2 microscópios para analisar as imagens das lâminas em HE. Um microscópio convencional Carl Zeiss, para microscopia óptica acoplado a uma Lupa Zeiss Stemi SV6, com o programa Leica Qwin Standard (Microsystems Imaging Solutions – England- UK - analisador de imagens, para medições manuais e automáticas, incluindo filtros de estruturas por forma, cor e tamanho) e outro para Microscopia por Fluorescência, Axioskop 2 – Plus (Zeiss, Germany) com software para captação de imagens Carl Zeiss Axio Vision 3.1 (Germany) e Câmera acoplada para fotos em microscopia por fluorescência, AxioCam – Carl Zeiss.

Após a captura das imagens e estas sendo salvas, identificadas por estrutura e número da pesquisa, foram analisadas nos Programas Leica Qwin standard e no Programa Image Tool 3.00 (Programa Analisador de Imagens para área da Saúde), sendo este específico e destinado para análise de histologia, morfologia e morfometria em ciências da saúde.

4.2.6 Variáveis medidas nos cortes histológicos corados em HE, da maxila e mandíbula dos coelhos dos grupos G1, G2 e G3 e da aorta ascendente dos coelhos dos grupos G2 e G3

1. Comprimento dos dentes, partindo do ápice da raiz até a coroa dos dentes superiores (maxila) 1º pré-molar, 2º pré-molar, 1º molar e 2º molar, em HE, imagens feitas/captadas pela lupa Zeiss Stemi SV6 com aumento de 0,8X e imagens analisadas e medidas no ImageTool – 3.00, medidas em micrômetros.

Figura 4.5- Lâmina em HE, para tomada do comprimento dos dentes da maxila e das outras variáveis

2. Medidas da espessura dos espaços periapicais, da região dos dentes superiores (maxila), 1º pré-molar, 2º pré-molar, 1º molar e 2º molar, em HE, imagens captadas no Microscópio para Fluorescência Axioscop2 Carl Zeiss, com

aumento de 2,5X, e a quantificação e análise das imagens feitas no Quantimet Qwin Standard Leica 500, medidas em micrômetros.

Figura 4.6- Maxila após o corte do hemi-arco, com aproximação da região dos elementos do arco superior

3. Espessura do osso compacto da maxila, da região dos dentes 1° pré-molar e 1° molar superiores, em HE, imagens captadas no Microscópio para Fluorescência Axioscop2 Carl Zeiss, com aumento de 2,5X, e a análise das imagens feitas/captadas no Quantimet Qwin Standard Leica 500, medidas em micrômetros.

Figura 4.7- 1° pré molar superior esquerdo em microscópio para fluorescência, com aumento de 2.5X

Figura 4.8- 1° molar superior esquerdo em microscópio para fluorescência, com aumento de 2,5X

Figura 4.9- 1º pré molar superior esquerdo em microscópio para fluorescência, com aumento de 2.5X

4. Espessura do osso compacto da mandíbula, região do 1º pré-molar inferior, em HE, na região logo abaixo ao local de implantação do elemento citado, imagens feitas/captadas na Lupa Zeiss Stemi SV6, com aumento de 0,8X e analisadas no programa ImageTool – 3.00, medidas em micrômetros.

5. Medidas da espessura dos espaços periapicais, na região do 1º pré-molar inferior, em HE, imagens feitas/captadas na Lupa Zeiss Stemi SV6, com aumento de 0,8X e analisadas no programa ImageTool – 3.00, medidas em micrômetros.

6. Medidas da espessura dos espaços periapicais, na região de 1º molar inferior, em HE, imagens feitas/captadas na Lupa Zeiss Stemi SV6, com aumento de 0,8X e analisadas no programa ImageTool – 3.00, medidas em micrômetros.

7. Area de placa de aterosclerose da aorta ascendente, em HE, imagens captadas, na Lupa Zeiss Stemi SV6, com aumento de 1,0X e analisadas no programa ImageTool – 3.00, medidas em micrômetros.

Figura 4.10- Corte histológico corado em HE, da aorta ascendente de coelho, com aumento de 2,5X , utilizado para medida da variável da área de placa da aorta

4.2.7 Análise estatística

Os resultados foram analisados pelo sistema estatístico **SIGMA**, através dos testes estatísticos de análise de variância e testes de correlação de Pearson ou Spearman, conforme a presença ou não de distribuição normal dos resultados.

5 RESULTADOS

As médias e desvios padrão das diferentes variáveis estudadas, e tabelas. O resultado de **p** refere-se a análise de variância entre os 3 grupos G1, G2 e G3. O resultado do **test T** que é apresentado na tabela refere-se ao teste que foi positivo comparando-se dois a dois os grupos, no caso da comparação simultânea dos 3 grupos pelo teste de **ANOVA** ter mostrado somente uma tendência ($p < 0,10$).

Tabela 5.1 - Média e desvio padrão (dp) dos comprimentos (μm) das raízes dos dentes analisados na maxila

Grupos	n	1° Pré-Molar Superior	2° Pré-Molar Superior	1° Molar Superior	2° Molar Superior
		media +/- dp	media +/- dp	media +/- dp	media +/- dp
Grupo 1 (coelho jovem)	10	10281,92 +/- 837,774	9524,94 +/- 3445,092	12619,33 +/- 749,274	12294,27 +/- 888,485
Grupo 2 (coelho idoso+Aterosclerose +Colesterol)	13	10338,95 +/- 1120,684	9957,64 +/- 1540,141	11485,54 +/- 12873,12	11708,31 +/- 2295,334
Grupo 3 (coelho idoso sem colesterol)	16	11529,80 +/- 666,801	10152,87 +/- 1709,654	11782,96 +/- 2528,711	11717,30 +/- 1870,265
p (*)		0,005 (**)	0,807	0,353	0,719

Comprimento dos dentes, partindo do ápice da raiz até a coroa dos dentes superiores.

(*) Teste paramétrico One Way Analysis of Variance, este teste faz comparações das médias entre os 3 grupos.

(**) Estatisticamente significativo ($p < 5\%$), isto é, pelo menos um dos grupos é diferente, quando $p > 5\%$ há uma indicação de não haver diferença entre os grupos.

Nota - p (nível descritivo) é estatisticamente significativo quando for menor que 0,05 (α = nível de significância), isto é, quando há diferença significativa entre grupos.

Pelo teste de One Way Anova, apresenta que há diferença significativa em pelo menos um dos grupos, no caso do 1° Pré-Molar Superior, isto é, $p < 5\%$. Para encontrar qual o grupo diferente foi aplicando o teste Holm-Sidak (1) de comparações múltiplas. Esse teste aponta haver diferença significativa entre os grupos:

- grupo 3 versus grupo 1 com diferença das médias de 1247,88 ($p=0,017$).
- grupo 3 versus grupo 2 com diferença das médias de 1190,85 ($p=0,025$).

Ele, também, aponta haver uma tendência ($p=0,05$) entre os grupos 2 versus 1, com a diferença das médias de 57,03, a favor do grupo 2 (com colesterol), então foi aplicado o teste t, para verificar se existe diferença entre os grupos 1 versus 2, apresentou $p=0,902$, apontando não haver diferença significativa entre os grupos 1 versus 2.

Saída do teste t SigmaStat (variável 1º pré molar)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
1Gr1PMol	10	1	10281,922	837,774	279,258
2Gr 1PMol	13	3	10338,953	1120,684	354,391
Difference		-57,031			
t = -0,124 with 17 degrees of freedom. (P = 0,902)					
95 percent confidence interval for difference of means: -1024,092 to 910,031

Gráfico 5.1 – Intervalo de 95% confiança da média (média +/- 2 dp)

Tabela 5.2 - Média e desvio padrão (dp) das Medidas da espessura dos espaços periapicais, da região dos dentes superiores (maxila), 1° pré-molar, 2° pré-molar, 1° molar e 2° molar, em HE, imagens captadas no Microscópio para Fluorescência (n=12)

Grupos	1° Pré-Molar Superior	2° Pré-Molar Superior	1° Molar Superior	2° Molar Superior
	media +/- dp	media +/- dp	mediana	mediana
Grupo 1 (coelho jovem)	118,065 +/- 66,875	308,855 +/- 205,367	212,845	173,815
Grupo 2 (coelho idoso+Aterosclerose +Colesterol)	272,275 +/- 127,941	495,831 +/- 300,673	394,270	204,115
Grupo 3 (coelho idoso sem colesterol)	239,359 +/- 106,946	496,421 +/- 262,118	307,280	216,905
P	0,002 (*)	0,182 (*)	0,060 (†)	0,603 (†)

(*) Teste paramétrico One Way Analysis of Variance, este teste faz comparações das médias entre os 3 grupos.

(**) Estatisticamente significativo ($p < 5\%$), isto é, pelo menos um dos grupos é diferente, quando $p > 5\%$ há uma indicação de não haver diferença entre os grupos.

(†) Teste Não paramétrico Kruskal-Wallis

Pelo teste de One Way Anova, apresenta que há diferença significativa em pelo menos um dos grupos, no caso do 1° Pré-Molar, isto é, $p < 5\%$. Para encontrar

qual o grupo diferente foi aplicando o teste Holm-Sidak (1) de comparações múltiplas. Esse teste aponta haver diferença significativa entre os grupos:

- grupo 2 versus grupo 1 com diferença das médias de 154,210 ($p=0,017$), as medidas do comprimento dos espaços periapicais, da região dos dentes superiores (maxila) esta a favor do grupo 2 em relação ao grupo1.
- grupo 3 versus grupo 1 com diferença das médias de 121,294 ($p=0,025$), as medidas do comprimento dos espaços periapicais, da região dos dentes superiores (maxila) esta a favor do grupo 3 em relação ao grupo1.

Ele, também, aponta haver uma tendência ($p=0,05$) entre os grupos 2 versus 3, com a diferença das médias de 32,916, a favor do grupo 2 (com colesterol), então foi aplicado o teste t, para verificar se existe diferença entre os grupos 2 versus 3, apresentou $p=0,513$, apontando não haver diferença significativa entre os grupos 2 versus 3.

Para o 2º pré-Molar, pelo teste da Anova, não apresentou diferença entre os grupos ($p=0,182$). Aplicando teste de comparações dois a dois, vide tabela 5.3, temos que o grupo G3, quando comparado com o G1, apresentou uma tendência ($p=0,06$) a favor dele, isto é, apresenta maior comprimento dos espaços periapicais, da região dos dentes superiores (maxila) que o grupo jovem (vide gráfico 5.2). As demais comparações não apresentaram significância estatística.

Tabela 5.3 - Medidas da espessura dos espaços periapicais, da região dos dentes superiores (maxila) do 2º Pré Molar (n=12)

Grupos	Média (dp)	Mediana	25%	75%	P
G1-2Pre Espaço Peri	308,855 (205,367)	292,553	172,175	326,340	0,060 (†)
G3-2Pre Espaço Peri	496,421 (262,118)	493,810	305,895	576,902	
G1-2Pre Espaço Peri	308,855 (205,367)	292,553	172,175	326,340	0,111(*)
G2-2Pre Espaço Peri	495,831 (300,673)	430,952	215,387	785,188	
G3-2Pre Espaço Peri	496,421 (262,118)	493,810	305,895	576,902	0,996 (*)
G2-2Pre Espaço Peri	495,831 (300,673)	430,952	215,387	785,188	

(†) Teste Não Paramétrico Mann Whitney

(*) Teste paramétrico – Teste t Student

Gráfico 5.2 - Medias das medidas dos espaços periapicais, 2ºpré-molar superior

Para o 1º Molar, pelo teste Kruskal-Wallis, não apresentou diferença entre os grupos ($p=0,06$). Aplicando teste de comparações dois a dois, (vide tabela 5.4), temos que o grupo G1, quando comparado com o G2, apresentou uma indicação de diferença entre os grupos estatisticamente significativa ($p=0,023$) a favor do grupo G2, isto é, apresenta maior alteração das medidas da espessura do espaço periapical, no microscópio para fluorescência do que no grupo dos idosos com colesterol, no 1º molar, em relação ao grupo jovem essas medidas tem maior variabilidade (vide gráfico 5.3). As demais comparações não apresentaram significância estatística.

Tabela 5.4 – Comparações de dois grupos medidas da espessura dos espaços periapicais, da região dos dentes superiores (maxila) 1º Molar (n=12)

Grupos	Mediana	25%	75%	p
G1-1Molar Espaço Peri	212,845	171,455	258,000	0,023 (†)
G2-1Molar Espaço Peri	394,270	224,906	965,329	
G1-1Molar Espaço Peri	212,845	171,455	258,000	0,287 (†)
G3-1Molar Espaço Peri	307,280	190,901	474,430	
G2-1Molar Espaço Peri	394,270	224,906	965,329	0,216 (†)
G3-1Molar Espaço Peri	307,280	190,901	474,430	

(†) Teste Não Paramétrico Mann Whitney

Gráfico 5.3 - Médias das medidas dos espaços periapicais no 1º molar

Para o 2º Molar, pelo teste Kruskal-Wallis, não apresentou diferença entre os grupos ($p=0,603$). As demais comparações não apresentaram significância estatística.

Para as medidas do pré-molar, espessura do osso compacto nos 3 grupos aplicamos o teste não paramétrico (Kruskal Wallis) apresentando $p=0,052$, indicando uma tendência de haver algum dos grupos que possa ser diferente dos demais (vide tabela 5.5). Para verificar se existe diferença entre os grupos aplicamos as

comparações dois a dois utilizando testes paramétricos e não paramétricos conforme o caso.

Tabela 5.5 - Comparações entre os 3 grupos das Medidas do osso compacto da maxila, da região dos dentes 1º pré-molar, em HE, imagens captadas no Microscópio para Fluorescência Espessura do Osso Compacto

Grupo	n	Mediana	25%	75%	P
G1-Pré Espessura Osso Compacto	15	93,656	72,304	127,904	0,052 (†)
G2-Pré Espessura Osso Compacto	12	54,616	40,189	87,006	
G3-Pré Espessura Osso Compacto	8	87,058	73,117	105,530	

(†) Teste Não paramétrico Kruskal-Wallis

Nas comparações dois a dois verificou-se, que há uma indicação de diferença significativa ($p=0,016$) entre os grupos G1 e G2, apontando que o grupo G2, tem uma média menor (61,47) em relação ao Grupo G1 (96,78), sugerindo haver a influência do colesterol no G2, que pode estar alterando a espessura do osso Compacto (vide tabela 5.5), na comparação do grupo jovem com o idoso não foi apresentado diferença estatisticamente significativa.

E notamos que o valor da mediana do grupo 3 Idoso, foi maior (87,06), que o valor da mediana do Grupo 2 Idoso Colesterol (54,62), com $p= 0,055$, apresentando uma tendência de que o fator idade, por si só não causaria alterações neste osso (comprimento), mostrando uma tendência de que o colesterol, possa estar influenciando na alteração e conformação deste osso e nas suas medidas.

Tabela 5.6 - Comparações a cada dois grupos das Medidas da espessura do osso compacto da maxila, da região dos dentes 1º pré-molar, em HE, imagens captadas no Microscópio para Fluorescência, Espessura do Osso Compacto

Grupo	n	Mediana	Média	Desvio Padrão	P
G1-Pré Espessura Osso Compacto	15	93,656	96,776	39,667	0,016 (*)
G2-Pré Espessura Osso Compacto	12	54,616	61,467	28,454	
G1-Pré Espessura Osso Compacto	15	93,656	96,776	39,667	0,592 (*)
G3-Pré Espessura Osso Compacto	8	87,058	109,426	65,891	
G2-Pré Espessura Osso Compacto	12	54,616	61,467	28,454	0,055 (†)
G3-Pré Espessura Osso Compacto	8	87,058	109,426	65,891	

(*) Teste paramétrico – Teste t Student

(†) Teste Não Paramétrico Mann Whitney

Para as medidas do molar da espessura do osso compacto nos 3 grupos aplicamos o teste de comparação dos grupos (ANOVA) apresentando $p=0,526$, indicando uma não haver diferença significativa entre os grupos (vide tabela 5.6).

Tabela 5.7 - Comparações dos 3 grupos Medidas da espessura do osso compacto da maxila, da região dos dentes 1º molar, em HE, imagens captadas no Microscópio para Fluorescência, Espessura do Osso Compacto

Grupos	n	Média	desvio padrão	p
G1-Molar Espessura Osso Compacto	15	96,267	26,729	0,526
G2-Molar Espessura Osso Compacto	12	76,476	55,320	
G3-Molar Espessura Osso Compacto	8	91,911	48,034	

Para comparar o espaço periapical do 1º Pré Molar dos 3 grupos foi realizado o teste ANOVA. Verificou-se que existia dentre os grupos pelo menos um diferente ($p=0,007$), (vide tabela 5.7).

Para identificar quais os grupos diferentes aplicou-se o teste de comparações múltiplas, (Holm-Sidak Test) que apontou que o grupo G2 apresentou haver diferença significativa ($p=0,017$) em relação ao G1 na medida da espessura dos espaços periapicais na região do 1º Pré molar, apresentando a diferença das médias (403,42) a favor do grupo G2. E verificou-se que pode existir uma tendência a favor do G2 em relação ao G3, com a diferença das médias (221,97) e tb uma tendência a favor do G3 em relação ao G1 com diferença das médias de (181,45), significando que o G1 pelo fato de ser o grupo jovem, possa estar ainda em crescimento/desenvolvimento, por isto apresenta um menor espaço periapical. (vide gráfico 5.3, tabela 5.8).

Continuando aplicamos teste de dois a dois individualmente para verificar a existência ou não de diferenças entre os grupos.

Tabela 5.8 - Comparações dos 3 grupos das medidas da espessura do espaço periapical na região dos dentes 1º Pré-molar superior

Grupos	n	Média	Desvio Padrão	p
G1-1º pre molar	10	249,974	130,120	0,007
G2-1º pre molar	9	653,391	370,551	
G3-1º pre molar	10	431,422	207,998	

Tabela 5.9 - Comparações múltiplas de “Holm Sidak” dois a dois das medidas da espessura do espaço periapical na região dos dentes, 1º Pré-molar superior

Comparações múltiplas dois a dois	Diferença de médias	Estatística t	P
G2-1º pre molar vs. G1-1º pre molar	403,417	3,474	0,017
G2-1º pre molar vs. G3-1º pre molar	221,969	1,863	0,025
G3-1º pre molar vs. G1-1º pre molar	181,447	1,562	0,050

Tabela 5.10 - Comparações a cada dois grupos das medidas da espessura do espaço periapical na região dos dentes, do 1º Pré-molar superior

Group	n	Média	desvio padrão	Mediana	p
G3-1º pre molar	10	431,422	207,998	403,340	0,251 (†)
G2-1º pre molar	9	653,391	370,551	610,470	
G1-1º pre molar	10	249,974	130,120	234,028	0,034 (*)
G3-1º pre molar	10	431,422	207,998	403,340	

(*) Teste paramétrico – Teste t Student

(†) Teste Não Paramétrico Mann Whitney

Gráfico 5.4 - Médias, espessura dos espaços periapicais 1 pré-molar

Tabela 5.11 - Comparações dos 3 grupos, das medidas da espessura do espaço periapical, na região dos dentes, do 2º Pré-molar

Grupo	N	Média	Desvio Padrão	p
G1-2º premolar	9	499,794	438,848	0,052
G2-2º pre molar	9	1156,770	671,187	
G3-2º pre molar	10	877,232	404,849	

Tabela 5.12 - Comparações dois a dois dos grupos, da espessura do espaço periapical na região dos dentes , 2º Pré-molar

Group	N	Media (dp)	Mediana	p
G1-2º pre molar	9	499,794 (438,848)	314,875	0,014 (†)
G2-2º pre molar	9	1156,770 (671,187)	804,510	
G1-2º pre molar	9	499,794 (438,848)	314,875	0,085 (*)
G3-2º pre molar	10	877,232 (404,849)	942,141	
G2-2º pre molar	9	1156,770 (671,187)	804,510	0,301 (*)
G3-2º pre molar	10	877,232 (404,849)	942,141	

(*) Teste paramétrico – Teste t Student

(†) Teste Não Paramétrico Mann Whitney

Gráfico 5.5 - Intervalo de 95% de confiança da média

Tabela 5.13 - Comparações dos 3 grupos, das medidas do espessura do espaço periapical na região dos dentes 1º Molar

Grupo	n	Mediana	25%	75%	p
G1-1º molar	10	325,675	289,416	437,694	0,063
G2-1º molar	9	560,210	414,782	1861,445	
G3-1º molar	8	702,877	402,123	938,358	

Tabela 5.14 - Comparações dois a dois, da espessura do espaço periapical, na região dos dentes 1º Molar

Grupo	n	Mediana	Média (dp)	p
G1-1º molar	10	325,675	402,137 (209,134)	0,026 (†)
G2-1º molar	9	560,210	1117,990 (874,566)	
G1-1º molar	10	325,675	402,137 (209,134)	0,080 (*)
G3-1º molar	8	702,877	681,524 (378,477)	
G2-1º molar	9	560,210	1117,990 (874,566)	0,249 (*)
G3-1º molar	8	702,877	681,524 (378,477)	

(*) Teste paramétrico – Teste t Student

(†) Teste Não Paramétrico Mann Whitney

Gráfico 5.6 – Medianas dos grupos G1, G2 e G3, espessura dos espaços periapicais na região do 1º molar

O gráfico apresenta uma tendência crescente das medianas (325, 560, 702), porém no grupo G2 apresenta uma maior variabilidade em relação aos demais grupos. Notamos pelo teste que existe diferença entre os grupos G1 e G2, mas não apresentou diferença significativa entre os grupos G1 e G3 apesar da mediana ser maior, isso pode ser explicado pela variabilidade das medidas no grupo com colesterol, pois nesse grupo o colesterol apresenta maior variância.

Gráfico 5.7- Média da espessura do osso compacto na mandíbula

Tabela 5.15 - Comparações dos 3 grupos das medidas da Espessura do osso compacto da Mandíbula

Grupo	N	Mediana	25%	75%	p
G1 Espessura osso inferior	13	1247,880	1095,385	1741,026	0,336
G2 Espessura osso inferior	16	1109,103	981,538	1461,795	
G3 Espessura osso inferior	13	1258,974	1016,192	1552,115	

Tabela 5.16 - Comparações dos 3 grupos das medidas da espessura osso compacto da mandíbula

Group Name	N	Mean	Std Dev	p
G1 osso inferior	13	7600,809	3020,857	0,303
G2 osso inferior	16	6724,833	1622,532	
G3 osso inferior	13	8195,265	2560,118	

Tabela 5.17 – Correlações G2 e G3

		Comprimento Raiz 1 pre	Início osso compacto 1 pre	Espessura osso compacto 1 pre
Comprimento Raiz 1 pre	Correlações	1	,211	-,136
	P		,359	,592
	N	30	21	18
Início osso compacto 1 pre	Correlações	,211	1	-,097
	P	,359		,659
	N	21	30	23
Espessura osso compacto 1 pre	Correlações	-,136	-,097	1
	P	,592	,659	
	N	18	23	24

Tabela 5.18 – Correlações G2 e G3

		Comprimento Raiz 2 pre	Início osso compacto 2 pre
Comprimento Raiz 2 pre	Correlações	1	,476(*)
	P		,025
	N	34	22
Início osso compacto 2 pre	Correlações	,476(*)	1
	P	,025	
	N	22	28

*(Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed)).

Tabela 5.19 – Correlações G2 e G3

		Compriment o Raiz 1 molar	Início osso compacto 1 molar	Espessura osso compacto 1 molar
Comprimento Raiz 1 molar	Correlações	1	,323	,198
	P		,154	,417
	N	36	21	19
Início osso compacto 1 molar	Correlações	,323	1	,017
	P	,154		,951
	N	21	24	16
Espessura osso compacto 1 molar	Correlações	,198	,017	1
	P	,417	,951	
	N	19	16	22

Tabela 5.20 – Correlações G2 e G3

		Compriment o Raiz 2 molar	Início osso compacto 2 molar
Comprimento Raiz 2 molar	Correlações	1	-,188
	P		,539
	N	31	13
Início osso compacto 2 molar	Correlações	-,188	1
	P	,539	
	N	13	20

7 DISCUSSÃO

Com informações a respeito da inflamação de origem periodontal na cavidade bucal, que pode sim segundo alguns autores exacerbar a DCV, verificamos que alguns falaram a respeito destas, porém nosso trabalho não está focado na infecção, acreditamos por bem citar, estas possíveis inter-relações, pois estão em evidência na literatura (SABETI et al. 2005; SCHILLINGER et al., 2005) Alguns fatores já tradicionalmente conhecidos, como adjuvantes a DP, perdas dentais e a aterosclerose, foram citados, são eles a idade avançada, o fumo, etilismo, obesidade e outras doenças sistêmicas que interferem de forma direta ou indireta (LAKATTA; LEVY, 2003; PERSON et al., 1998; PERSON et al., 2002; WILLIAMS, 2002).

De forma a elaborar, modelos de estudo convenientes, para observações precisava-mos lançar mão de modelos, consagrados na literatura, revisada anteriormente, procuramos seguir estes já existentes sobre o assunto, para elaborar assim o nosso modelo animal de trabalho, nestes trabalhos foram verificadas as perdas ósseas nas regiões dos dentes 2º pré-molares inferiores, análise morfométrica, histológica e macroscópica, onde na metodologia verificamos que os pesquisadores, realizaram amarras com fios de sutura no periodonto do animal, induzindo a DP, e as perdas ósseas, com alterações morfológicas e histológicas, com significância de $p < 5\%$, para perdas ósseas na região dos 2º pré-molares inferiores, nos tecidos de sustentação dos dentes, já no nosso modelo, não induzimos doença, e não inoculamos patógenos, somente foi induzida a hipercolesterolemia associada com a aterosclerose, e verificamos alterações nos cortes histológicos, estes foram descritos e mensurados, comprimento dos dentes,

espessura do osso alveolar e espessura dos espaços periapicais (ASHIH et al., 2003; HASTURK et al., 2006; SERHAN et al., 2003).

As lesões periapicais, também não distantes do nosso estudo, tem sido foco de trabalhos recentes, com o objetivo de verificar sua patogenia e aprimorar as formas de tratamento, e sua prevenção nos tratamentos nos pacientes, pois estas também levam a perda dos suportes dentais (NAIR et al., 1996; DE ROSSI; ROCHA; ROSSI, 2007). As perdas ósseas alveolares, ou do osso de sustentação dos elementos dentais, são fenômenos que estão diretamente relacionados às perdas dentais. Estas perdas ósseas, não ocorrem isoladamente, são sim multifatoriais, de origem sistêmica, através da DP, fenômenos de roubo, após exodontias (SHIP, 2004), por doenças sistêmicas (BECK; OFFENBACHER, 2003; DEVLIN; HORNER, 1991; DEVLIN; HORNER, 2002; FORD et al., 2005; PERSON et al., 1998; PERSON et al., 2002) e outros fatores locais descritos (BECK; OFFENBACHER, 2003; DEVLIN; HORNER, 2002; DEVLIN; HORNER, 1991; FORD et al., 2005).

Os animais idosos alimentados com colesterol apresentaram alterações significantes quando comparados, com o grupo jovem e idoso sem colesterol, na variável do comprimento dos dentes. Isto se deve ao fato do que comentamos e revimos na literatura, anteriormente a respeito dos diversos fatores, que existem e influenciam de forma direta ou indiretamente para ocorrência destas alterações nos tecidos de sustentação e na cavidade bucal – neste caso podemos falar de isquemia regional, diminuição do fluxo pela aterosclerose e isquemia, fenômenos de perda e roubo (BRASILEIRO FILHO, 2006), com neoformação e possibilidade de redirecionamento vascular – de vasos regionais (FREGNI et al., 2003; HOROWITZ et al., 1993). Pode-se especular que a isquemia causada por obstrução da aorta e dos ramos principais poderia estar ocasionando apoptose o que, explicaria a

alteração do comprimento da raiz dos dentes, alteração do osso alveolar da maxila e da matriz de implantação dos elementos no arco.

No caso na região do 1º Pré-Molar Superior, foi a que apresentou valor com significância, isto é, $p < 5\%$. Com o teste **Holm-Sidak** de comparações múltiplas, este apontou haver diferença significativa entre os grupos: **G3** versus **G1**, com diferença das médias de **1247,88** ($p=0,017$) e **G3** versus **G2**, com diferença das médias de **1190,85** ($p=0,025$). A partir destes dados, podemos notar que as diferenças das médias esta a favor do **G3** (dos idosos), apontando que o grupo jovem **G1**, pode não ter o seu comprimento terminado e no **G2** o colesterol pode estar interferindo diretamente no seu desenvolvimento.

Na região do 1º pré-molar superior, com relação a variável espessura do osso compacto na maxila, comparados os 3 grupos, aplicamos o teste não paramétrico de **Kruskal Wallis**, apresentando $p=0,052$, indicando uma tendência, de que um dos grupos seja diferente dos demais (tabela 5.5). Para verificar se existe diferença entre os grupos aplicamos as comparações dois a dois utilizando testes paramétricos e não paramétricos conforme o caso. Nas comparações dois a dois verificou-se, que há uma indicação de diferença significativa ($p=0,016$) entre os grupos **G1** e **G2**, apontando que o grupo **G2**, tem uma média menor (**61,47**) em relação ao Grupo **G1** (**96,78**), sugerindo haver a influência do colesterol no **G2**, que pode estar alterando a espessura do osso compacto da maxila do coelho (tabela 5.5), na comparação do grupo jovem com o idoso não foi apresentado diferença estatisticamente significativa. E notamos que o valor da mediana do **G3**, foi maior (**87,06**), que o valor da mediana do **G2** (**54,62**), com $p= 0,055$, apresentando uma tendência de que o fator idade, por si só não causaria as alterações na espessura deste osso, demonstrando uma tendência de que o colesterol, poderia influenciar na

alteração e conformação deste osso e nas suas medidas, talvez esta ingestão de colesterol por um período maior, possa demonstrar maiores e relevantes alterações nesta estrutura, se prolongarmos o tempo de exposição destes animais ao fator colesterol, e a idade, possam aumentar estas médias. Para as medidas da espessura do osso compacto da maxila, região dos dentes 1º molares, nos 3 grupos aplicamos o teste de comparação dos grupos **ANOVA**, apresentando **p=0,526**, indicando assim não haver diferença significativa entre os grupos (tabela 5.6). Através destes resultados, podemos verificar que em nenhum dos grupos avaliados no nosso estudo, não ocorreram alterações significantes e a relação foi negativa para os testes estatísticos realizados.

Na tabela 5.14, estão às comparações dos 3 grupos, com a comparação das variáveis em relação à espessura do osso compacto da mandíbula entre 1º pré-molares inferiores e 1º molares inferiores, utilizou o teste não paramétrico **Kruskal Wallis**, onde apresentou não haver diferença significativa.

Mostramos às comparações dos 3 grupos das medidas da espessura do osso compacto da mandíbula, na tabela 5.15, utilizamos o teste paramétrico **ANOVA**, onde apresentou não haver diferença significativa.

Tomando por base os resultados expostos a cima, e com as análises estatísticas realizadas, sem significância, pode-se verificar, que tanto no osso compacto da mandíbula, como no da maxila as alterações não foram relevantes, talvez isto deva-se ao fato da relação tempo e ingestão de colesterol ter sido pequena, talvez também pelo fato de, em nossa metodologia, não induzirmos lesões ósseas com amarras de sutura ou cirurgias de acesso com osteotomia, nem inocularmos nenhum agente infeccioso na corrente sanguínea dos nossos animais, ou ainda não termos aplicado nenhuma substância tópica no periodonto destes

animais, como fizeram outros trabalhos que revisamos como base para o nosso e demonstraram que através destes artifícios utilizados conseguiram perdas ósseas, lesões periodontais, perda da crista óssea alveolar, com significância estatística (ASHIH et al., 2003; DAVÉ; VAN DYKE, 2008; HASTURK, 2006; LI et al., 2002), todos estes induziram as lesões e doença nos animais na região periodontal e na cavidade bucal. Outro artifício que fora utilizado também por um dos autores revisados fora a imagem radiológica, que o favoreceu na verificação destas perdas ósseas (ASHIH et al., 2003). Sendo assim necessitamos de mais estudos, e dar continuidade ao nosso trabalho, afim de, elucidar estas relações da ingestão do colesterol com as perdas ósseas na cavidade bucal, com outros elementos e dados e diferentes metodologias.

Espessuras do espaço periapical da região dos dentes 1º Pré- Molares da maxila, dos 3 grupos foi realizado o teste **ANOVA**. Verificou-se que existia dentre os grupos pelo menos um com diferença (**p=0,007**), (tabela 5.7). Através do Teste **Holm-Sidak Test** que apontou que, **G2** apresentou diferença significativa (**p=0,017**) em relação ao **G1** na medida das espessuras dos espaços periapicais na região do 1º Pré-molar, apresentando a diferença das médias (**403,42**) a favor do **G2**. Verificou-se que pode existir uma tendência a favor do **G2** em relação ao **G3**, com a diferença das médias (**221,97**) e também uma tendência a favor do **G3** em relação ao **G1** com diferença das médias de (**181,45**), significando que o **G1** pelo fato de ser o grupo jovem, possa estar ainda em crescimento / desenvolvimento, por isto apresenta uma menor espessura do espaço periapical (gráfico 5.3 e tabela 5.8). Com base nestes dados estatísticos, podemos falar que existe uma possibilidade razoável de que a ingestão do colesterol, a aterosclerose e a idade, podem sim estarem associadas e causando estas alterações na região do espaço periapical,

com possibilidade de lesões periapicais, porém estas ainda não foram o foco do nosso trabalho, mas citamos, como um dos fatores predisponentes para as perdas dentais e também para as perdas dos tecidos de sustentação dos dentes (NAIR et al., 1996; DE ROSSI; ROCHA; ROSSI, 2007). Já com relação aos animais jovens, podemos dizer que tanto a estrutura óssea é jovem e em processo de formação, com presença de osteoblastos, como também as estruturas de suporte dos dentes seguem esta mesma linha – em formação e desenvolvimento. Os outros trabalhos revisados que induziram lesões ósseas e periodontais (ASHIH et al., 2003; DAVÉ; VAN DYKE, 2008; LI et al., 2002), não verificaram as condições e lesões periapicais dos dentes.

Já na região dos 2º pré-molares superiores, esta apontou não haver diferença estatisticamente significativa e sim uma tendência, a **tabela 5.11**, que apresenta diferença significativa do **G1** versus **G2** a favor do **G2** em relação a **G1** e **G3** apresenta uma tendência (**p=0,085**) a favor do **G3** (gráfico 5.4). Com base nestes resultados, podemos dizer que a região dos 2º pré-molares superiores, não apresentou alteração no espaço periapical, as possíveis explicações seriam a quantidade de colesterol ingerida, o tempo de vida dos animais talvez um tempo maior de exposição ao colesterol faça com que estas lesões venham ser aparentes nesta região de 2º pré-molar superior, ou então ainda se nos próximos estudos, induzir-mos lesões nesta região ou nos animais em geral como fizeram outros trabalhos (ASHIH et al., 2003; DAVÉ et al., 2008; LI et al., 2002).

Na região dos dentes 1º molares superiores, a espessura do espaço periapical, fora mediada também. Aplicamos o teste não paramétrico **Kruskal Wallis**, esse apresentou uma tendência, ou seja, um dos grupos pode ser diferente e também notamos que as medianas são crescentes quando observamos **G1** para

G3. Fora aplicado o teste de comparação dois a dois (tabela 5.13). Realizado teste **Mann Whitney** (não paramétrico), verificou-se haver diferença estatisticamente significativa (**p=0,026**) que, a espessura do espaço periapical da região dos 1º molares superiores esteja aumentado em relação ao **G1**, sendo assim podemos acreditar mais uma vez que o colesterol possa ser o agente modificador / carreador de alterações desta região dos 1º molares superiores. Existiu uma maior variabilidade no **G2** em relação ao **G3** (gráfico 5.6). Com isso percebemos que há diferença significativa no **G1** em relação ao **G2**, porém não apresenta diferença significativa do **G1** em relação ao **G3** (mesmo a mediana sendo maior). Realizado **Teste T (Student)**, **G2** com **G3**, (**p=0,249**) , o grupo **G2** apresentou uma média maior em relação ao **G3**, porém sem significância estatística. Com estes dados em mãos, podemos notar que sempre ocorrera uma tendência de que existiria alterações na espessura do espaço periapical dos 1º molares superiores, porém após os teste paramétricos e não paramétricos, esta tendência não se confirmou. O que podemos dizer é que mais uma vez a região periapical do 1º molar superior destes animais, não sofrera alterações relevantes, possivelmente pelo tempo de exposição do animal ao colesterol e também por não induzirmos lesões nestes animais como descritas na revisão da literatura.

Com relação à variável da área de placa da aterosclerose, nos coelhos idosos com colesterol e nos sem colesterol. Fizemos as seguintes correlações: Área de placa versus a variável do comprimento dos dentes do arco superior, e também correlacionamos a área de placa com a espessura do osso alveolar da maxila e da mandíbula.

Foram feitas as correlações e fora verificada correlações positivas e significantes, porém fracas, quando associadas às variáveis de comprimento dos

dentes 1º e 2º pré-molares superiores, com a área da placa de aterosclerose, nos animais dos grupos **G2 e G3**. Com **p=0,025 e r=0,476**, sendo assim pudemos notar que a aterosclerose em associação com a dieta hipercolesterolêmica, pode ser fator predominante nas alterações da cavidade bucal, não separadamente, nos trabalhos revisados, notamos uma preocupação em induzir as lesões na cavidade bucal com os patógenos e amarras de sutura, e também por ingestão do colesterol (ASHIH et al., 2003; HASTURK et al., 2006; LI et al., 2002) ou então nos modelos para aterosclerose somente (SPAGNOLI et al., 1991; YANNI, 2004) nosso interesse foi de verificar realmente as correlações entre as duas vias, alterações de ordem sistêmicas e as da cavidade bucal.

Na região dos 1º molares superiores, obtivemos os seguintes resultados; ótima correlação negativa significativa para espessura do osso compacto, comprimento dos dentes e área de placa de aterosclerose, com **r= - 0,938**, e **p= 0,002**. Ou seja, o que ocorreu na região dos 1º e 2º pré-molares, não aconteceu na região dos 1º molares. O que leva-nos a crer que esta interação do colesterol com a aterosclerose seja fraca nesta região, e que talvez aumentando o tempo de exposição dos animais aos fatores aterosclerose e hipercolesterolemia, e também o numero de casos, possivelmente conseguiremos dados significativamente positivos.

7 CONCLUSÕES

- 1) A dieta hipercolesterolêmica induziu a formação de placas de aterosclerose.
- 2) Observamos alterações significativas no comprimento dos dentes do arco superior quando comparamos os grupos G1 X G2 e G2 X G3, diminuição no comprimento dos dentes do grupo com hipercolesterolemia (G2).
- 3) Observamos aumento significativo na espessura dos espaços periapicais dos dentes do arco superior no grupo G2, não sendo observado aumento do espaço periapical na região inferior.
- 4) Nas correlações entre a área de placa da aterosclerose com os comprimentos dos dentes dos grupos G1 X G2, encontramos correlações significativas, porém fracas. Não encontramos correlações entre a área de placa e a espessura do osso alveolar.

REFERÊNCIAS¹

Adams CW, Miller NE, Morgan RS, Rao SN. Lipoprotein levels and tissue lipids in fatty-fibrous atherosclerosis induced in rabbits by two years cholesterol feeding at low level. *Atherosclerosis*. 1982 Jul;44(1):1-8.

Ashih J, Batista EL Jr, Serhan C, Stahl GL, Van Dyke TE Role for periodontitis in the progression of lipid deposition in an animal model. *Infect Immun* 2003;71(10):6012-8.

Aukhil I, Greco G, Suggs C, Torney D. Root resorption potentials of granulation tissue from bone and flap connective tissue. *J Periodontal Res* 1986;21(5):531-42.

Baelum V, Lopez R. Periodontal epidemiology: towards social science or molecular biology? *Community Dent Oral Epidemiol* 2004;32(4):239-49.

Beck JD, Offenbacher S. Clinical measures of periodontal disease as an exposure for a systemic condition: extending a paradigm. *Annals Periodontol* 2003;7:79-89.

Beck JD, Eke P, Lin D, Madianos P, Couper D, Moss K, et al. Association between IgG antibody to oral organisms and carotid intima-medial thickness in community-dwelling adults. *Atherosclerosis* 2005;183:342-8.

Bocan TMA, Mazur MJ, Mueller SB, Brown EQ, Sliskovic DR, O'Brien PM, et al. Antiatherosclerotic activity of inhibitors of 3-hydroxy-3methylglutaryl coenzyme A reductase in cholesterol-fed rabbits: a biochemical and morphological evaluation. *Atherosclerosis* 1994;111:127-42.

Brasileiro Filho G. *Bogliolo patologia* , 7.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2006.

Brook I. Microbiology and management of periodontal infections. *Gen Dent* 2003; 51(5):424-8.

¹ De acordo com Estilo Vancouver. .Abreviaturas de periódicos segundo base de dados Medline.

Cavallero C, Turolla E, Ricevuti G. Cell proliferation in the atherosclerosis plaques of cholesterol-fed rabbits. *Atherosclerosis* 1971;13:9.

Constantinides P, Booth J, Carlson G. Production of advanced cholesterol atherosclerosis in the rabbit. *Arch Pathol* 1960;70:712.

Davé S, Van Dyke TE. The Link between periodontal disease and cardiovascular disease is probably inflammation. *Oral Dis* 2008;14:95-101.

De Rossi A, Rocha LB, Rossi MA. Interferon-gama, interleukin-10, intercellular adhesion molecule-1, and chemokine receptor 5, but not interleukin-4, attenuate the development of periapical lesions. *J Endod* 2007;2008:34-1:31-8..

Desvarieux M, Schwahn C, Völzke H, Demmer RT, Lüdemann J, et al. Gender differences in the relationship between periodontal disease, tooth loss, and atherosclerosis. *Stroke* 2004;35:2029-35.

Devlin H, Horner K. Mandibular radiomorphometric indices in the diagnosis of reduced skeletal bone mineral density. *Osteoporosis Int* 2002;13:373-8.

Devlin H, Horner K. Alveolar ridge resorption and mandibular atrophy. A review of the role of local and systemic factors. *Br Dent J* 1991;170:101-4.

Engelbrechtson SP, Lamster IB, Elkind MS, Rundek T, Serman NJ, Demmer RT, et al. Radiographic measures of chronic periodontitis and carotid artery plaque. *Stroke* 2005;36:561-66.

Finking G, Hanke H. Nikolaj Nikolajewitsch Anitschkow (1885-1964) established the cholesterol-fed rabbit as a model for atherosclerosis research. *Atherosclerosis* 1997;135(1):1-7.

Fong IW. Value of animal models for Chlamydia pneumoniae-related atherosclerosis. *Am Heart J* 1999;138:S512-3.

Ford PJ, Gemmell E, Hamlet SM, Hasan A, Walker PJ, West MJ, et al. Cross-reactivity of GroEL antibodies with human heat shock protein 60 and quantification of pathogens in atherosclerosis. *Oral Microbiol Immunol* 2005;20:296-302.

Fregni F, Castelo-Branco LÊ, Conforto AB, Yamamoto FI, Campos CR, Puglia P et al. Treatment of subclavian steal syndrome with percutaneous transluminal angioplasty and stenting: case report. *Arq Neuropsiquiatr* 2003;61:95-9.

Gibson III FC, Yumoto H, Takahashi Y, Chou HH, Genco CA. Innate Immune signaling and *Porphyromonas gingivalis*-accelerated atherosclerosis. *J Dent Res* 2006;85:106-21.

Gore I, Nakashima T, Imai T, White PD. Coronary atherosclerosis and myocardial infarction in Kyushu, Japan and Boston. *Am J Cardiol* 1962;10:400.

Gottlow J, Nyman S, Karring T, Lindhe J. New attachment formation as the result of controlled tissue regeneration. *J Clin Periodontol* 1984;11(8):494-503.

Gupta PP, Tandon HD, Ramalingaswami V. Experimental atherosclerosis in rabbits with special reference to reversal. *J Pathol* 1970;101:309-17.

Hasturk H, Kantarci A, Ebrahimi N, Andry C, Holick M, Jones VL, et al. Topical H2 antagonist prevents periodontitis in a rabbit model. *Infect Immun* 2006;74(4):2402-14

Haraszthy V, Zambon J, Trevisan M, Zeid M, Genco R. Identification of periodontal pathogens in atheromatous plaques. *Arch Intern Med* 2006.

Horiuchi N, Maeda T. Statins and bone metabolism. *Oral Dis* 2006;12(2):85-101.

Ignatowski AI. Influence of animal food on the organism of rabbits. *St Petersburg Invest Voyenno-Med Akad* 1908;16:154-76.

Iglhaut J, Aukhil I, Simpson DM, Johnston MC, Koch G. J. Progenitor cell kinetics during guided tissue regeneration in experimental periodontal wounds. *Periodontol Res* 1988;23(2):107-17.

Kilian M. Systemic disease: manifestations of oral bacteria. *Dent Microbiol* 1982; 832-838.

Kolodgie FD, Katocs AS Jr, Largis EE, Wrenn SM, Cornhill JF, Herderick EE, et al. Hypercholesterolemia in the rabbit induced by feeding graded amounts of low-level cholesterol. Methodological considerations regarding individual variability in response to dietary cholesterol and development of lesion type. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996;16(12):1454-64.

Lagunoff D, Phillips MT, Iseri OA, Benditt EP. Isolation and preliminary characterization of rat mast cell granules. *Lab Invest* 1964;13:1331-44.

Lakatta EG, Levy D. Arterial and cardiac aging: major shareholders in cardiovascular disease enterprises. Part I: aging arteries: a "set up" for vascular diseases. *Circulation* 2003;107:139-46.

Li L, Messas E, Batista EL Jr, Levine RA, Amar S. *Porphyromonas gingivalis* infection accelerates the progression of atherosclerosis in a heterozygous apolipoprotein E deficient murine model. *Circulation* 2002;106:861-7.

Mattila KJ, Pussinen PJ, Paju S. Dental infections and cardiovascular diseases: a review. *J Periodontol* 2005;75:2085-8.

Mercado FB, Marshall RI, Bartold PM. Inter-relationships between rheumatoid arthritis and periodontal disease. A review. *J Clin Periodontol* 2003;30:761-772.

Nair SP, Meghji S, Wilson M, Reddi K, White P, Henderson B. Bacterially induced bone destruction: mechanism and misconceptions. *Infect Immun* 1996;64:2371-80.

Persson RE, Hollender LG, Laurell L, Persson G. Horizontal alveolar bone loss and vertical bone defects in an adult patient population. *J Periodontol* 1998;69:348-56.

Persson RE, Hollender LG, Powell LV, MacEntee MI, Wyatt CC, Kiyak HA et al. Assessment of periodontal conditions and systemic disease in older subjects. *J Clin Periodontol* 2002;29:796-802.

Plasschaert AJ, Folmer T, van den Heuvel JL, Jansen J, van Opijnen L, Wouters SL. An epidemiologic survey of periodontal disease in Dutch adults. *Community Dent Oral Epidemiol* 1978;6(2):65-70.

Sabeti S, Exner M, Mlekusch W, Amighi J, Quehenberger P, Rumpold H, et al. Prognostic impact of fibrinogen in carotid atherosclerosis: nonspecific indicator of inflammation or independent predictor of disease progression? *Stroke* 2005;36(7):1400-4.

Schillinger T, Kluger W, Exner M, Mlekusch W, Sabeti S, Amighi J, et al. Dental and periodontal status and risk for progression of carotid atherosclerosis: the inflammation and carotid artery risk for atherosclerosis study dental substudy. *Stroke* 2006;37(9):2271-6.

Serhan CN, Jain A, Marleau S, Clish C, Kantarci A, Behbehani B, et al. Reduced inflammation and tissue damage in transgenic rabbits overexpressing 15-lipoxygenase and endogenous anti-inflammatory lipid mediators. *J Immunol* 2003; 15;171(12):6856-65.

Severson JA, Moffett BC, Kokich V, Selipsky H. A histologic study of age changes in the adult human periodontal joint (ligament). *J Periodontol* 1978;49(4):189-200.

Sheiham A, Hobdell MH. Decayed, missing and filled teeth in British adult populations. *Br Dent J* 1969; 6;126(9):401-4.

Ship JA. Oral health in the elderly. What's missing? *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Radiol Endod* 2004;98:625-6.

Spagnoli LG, Orlandi A, Mauriello A, Santeusano G, De Angelis C, Lucreziotti R, et al. Aging and atherosclerosis in the rabbit. Distribution, prevalence and morphology of atherosclerotic lesions. *Atherosclerosis* 1991;89:11-24.

Spahr A, Klein E, Khuseyinova N, Boeckh C, Muche R, Kunze M, et al. Periodontal infections and coronary heart disease. *Arch Intern Med* 2006;166:554-9.

Stahl SS, Fletcher PD, Wyman BS. Crevicular tissues as donor tissue for free gingival grafts. Limited human histologic observations. *J Periodontal Res* 1977;12(6):450-3.

Still WJS. An electron microscope study of cholesterol atherosclerosis in the rabbit. *Exp Mol Pathol* 1963;48:491.

Tyldesley WR. Oral medicine for the dental practitioner. 2. Infections of the oral mucosa. *Br Dent J* 1973;135(10):449-55.

Van der Velden U. Effect of age on the periodontium. J Clin Periodontol 1984; 11(5):281-94.

Weingand KW, Clarkson TB, Adans MR, Bostron AD. Effects of age and/or puberty on coronary artery atherosclerosis in cynomolgus monkeys. Atherosclerosis 1986;62:137.

Whitney C, Warburton DE, Frohlich J, Chan SY, McKay H, Khan K. Are cardiovascular disease and osteoporosis directly linked? Sports Med 2004;34:779-807.

Willians RC. A century of progress in understanding periodontal disease. Compend Contin Educ Dent 2002;23(5)Suppl:3-10.

Yanni AE. The laboratory rabbit: an animal model of atherosclerosis research. Lab Anim 2004;38:246-56.

Anexo A – Parecer da Comissão de Ética para análise de Projetos de Pesquisa - HC

À

Comissão Científica e de Ética do InCor

O Presidente da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em 27.04.06, tomou conhecimento que o Protocolo de Pesquisa nº 029/04, intitulado: "A participação de microorganismos no desenvolvimento de doenças crônicas inflamatórias, degenerativas e consumptivas em humanos e animais", será tese de doutorado do Dr. Endrigo Sperto Rodrigues.

Pesquisador(a) Responsável: Profa. Dra. Maria de Lourdes Higuchi

CAPPesq, 27 de Abril de 2006.

PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
Presidente da Comissão de Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa

Anexo B – Comitê de Ética em Pesquisa da FOU SP

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia
Comitê de Ética em Pesquisa

D E C L A R A Ç Ã O
PROTOCOLO DE PESQUISA Nº. 029/04

Informamos a Vossa Senhoria, que diante de Parecer da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, estamos cientes da aprovação do projeto de pesquisa intitulado "A participação de microorganismos no desenvolvimento de doenças crônicas inflamatórias, degenerativas e consumptivas em humanos e animais" de responsabilidade do(a) Pesquisador(a) Endrigo Sperto Rodrigues, sob orientação dos(a) Professores(a) Doutores(a) José Leonardo Simone e Maria de Lourdes Higuchi.

Sendo o que se nos apresentava, valemo-nos da oportunidade para reiterar-lhe os nossos protestos de elevada estima e distinta consideração.

São Paulo, 13 de dezembro de 2008.

Prof. Dr. João Gualberto de Cerqueira Luz
Coordenador CEP/FOUSP