

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 28/03/2022.



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Rafael Nepomuceno Oliveira

**Investigação de polimorfismos genéticos e metabolismo lipídico com
doença periodontal crônica: metanálise e estudo caso-controle**

Araraquara

2018



UNESP - Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Rafael Nepomuceno Oliveira

Investigação de polimorfismos genéticos e metabolismo lipídico com doença periodontal crônica: metanálise e estudo caso-controle

Tese apresentada à Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia de Araraquara para obtenção do título de Doutor em Odontologia, na Área de Periodontia.

Orientadora: Profa. Dra. Raquel Mantuaneli Scarel Caminaga

Araraquara

2018

Oliveira, Rafael Nepomuceno

Investigação de polimorfismos genéticos e metabolismo lipídico com doença periodontal crônica: metanálise e estudo caso-controle / Rafael Nepomuceno Oliveira. -- Araraquara: [s.n.], 2018

167 f. ; 30 cm

Tese (Doutorado em Odontologia) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia

Orientadora: Profa. Dra. Raquel Mantuaneli Scarel Caminaga

1. Periodontite crônica 2. Dislipidemias 3. Metanálise
4. Polimorfismo genético 5. Genótipo I. Título

Rafael Nepomuceno Oliveira

Investigação de polimorfismos genéticos e metabolismo lipídico com doença periodontal crônica: metanálise e estudo caso-controle

Comissão julgadora

Tese para obtenção do grau de Doutor em Odontologia

Presidente e orientador: Prof^a. Dr^a. Raquel Mantuaneli Scarel Caminaga

2º Examinador: Prof. Dr. Renato Corrêa Viana Casarin

3º Examinador: Prof^a. Dr^a. Suzana Peres Pimentel

4º Examinador: Prof^a. Dr^a. Rosemary Adriana Chierici Marcantonio

5º Examinador: Prof^a. Dr^a. Daniela Leal Zandim-Barcelos

Araraquara, 28 de março de 2018.

DADOS CURRICULARES

Rafael Nepomuceno Oliveira

NASCIMENTO: 17 de novembro de 1988 – Fortaleza – CE

FILIAÇÃO: Jose Alberto de Oliveira Filho

Sueli Nepomuceno Oliveira

2007 - 2011 Curso de Graduação em Odontologia – Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem (FFOE) – Universidade Federal do Ceará (UFC).

2012 - 2014 Curso de Pós-Graduação em Odontologia, Área de concentração em Periodontia – Nível Mestrado - Faculdade de Odontologia de Araraquara (FOAr) - Universidade Estadual Paulista (UNESP).

2013 - 2014 Curso de Especialização em Periodontia – Faculdade de Odontologia de Araraquara (FOAr) - Universidade Estadual Paulista (UNESP).

2014 - 2018 Curso de Pós-Graduação em Odontologia, Área de concentração em Periodontia – Nível Doutorado - Faculdade de Odontologia de Araraquara (FOAr) - Universidade Estadual Paulista (UNESP).

Dedico esse trabalho...

Aos meus maiores incentivadores: **meus pais Beto e Sueli**. Obrigado pelo apoio e amor incondicional, por estarem ao meu lado em todas as decisões e por entenderem minha ausência nos últimos 6 anos. Obrigado por sempre terem investido em minha educação e em meus sonhos. Sem vocês, nada seria possível. AMO VOCÊS.

Ao meu **irmão Tiago**, que pelo seu exemplo de dedicação à Odontologia, sempre me incentivou a batalhar pelos meus objetivos. Irmão, esta conquista é nossa!

Aos meus **avós, Vovô Zé Alberto, Vovó Socorro, Vovô Zeca e Vovó Terezinha** que sempre estiveram próximos, me ajudaram, aconselharam e apoiaram. Agradeço especialmente aos meus padrinhos **Vovô Zé Alberto e Vovó Terezinha**.

Agradeço especialmente...

A **Deus**, presente em todos os momentos da minha vida. Luz que me iluminou nos momentos mais difíceis em que achei que poderia fraquejar, dando-me força e atendendo minhas preces.

Minha vida segue entregue a ti.

À minha **orientadora Prof^a. Dr^a. Raquel Scarel Caminaga** por ter me aceitado e acolhido em um momento tão decisivo da minha vida. Muito obrigado por entender minhas ansiedades, por acreditar em mim e por toda competência e paciência com que me orientou durante os últimos 6 anos. Mais do que isso, agradeço por criar uma verdadeira família dentro do laboratório de genética, um ambiente de trabalho movido a paz, companheirismo e amizade.

Meu exemplo de dedicação e entusiasmo ao ensino e à pesquisa.

À minha **orientadora da BEPE Prof^a. Dr^a. Silvana Pereira Barros** pelo apoio e confiança durante todo o meu estágio de pesquisa no exterior, tanto na realização deste trabalho como nas outras atividades que fui convidado. Obrigado pela sua dedicação a nossa pesquisa, por compartilhar seu conhecimento e por estar presente em todas as etapas desse trabalho no exterior. Agradeço também à **Prof^a. Dr^a. Silvana e ao Prof. Dr. Luiz Pimenta** pelas palavras sábias, conselhos e acolhimento nos Estados Unidos.

Obrigado a todo o grupo de professores, alunos e funcionários da UNC. Agradeço especialmente **Prof. Dr. Steven Offenbacher, Prof. Dr. James Beck, Dr. Steven Kim, Prof^a. Dr^a. Misa Graff e Prof^a. Dr^a. Kari North**. Foi uma honra ter convivido e aprendido muito com cada um. Vocês me inspiram como professor e pesquisador.

À **Profa. Dra. Ticiania Sidorenko de Oliveira Capote** meu agradecimento especial pelo carinho e acolhimento em todos os momentos, pela amizade e ensinamentos profissionais e de vida que compartilhamos durante estes anos, e principalmente, por sempre reforçar a fé em suas doces palavras. Me sinto privilegiada por conhecer e compartilhar meu dia-a-dia com uma pessoa tão pura.

Às minhas amigas fiéis e verdadeiras **Lívia Finoti, Suzane Pigossi e Thamiris Cirelli**. Por estarem comigo nos momentos mais difíceis. Quando o cansaço e a dúvida apareciam, sempre tínhamos uns aos outros para nos apoiar. Sei que sempre poderei contar com vocês!

Às minha amigas e companheiras de laboratório **Sâmia Corbi, Giovana Anovazzi e Sâmara Tfaile, Barbara Roque e Fernanda Coelho**. Sem vocês a realização deste trabalho não teria sido possível. Algumas palavras que definem nosso laboratório são: amizade, companheirismo e honestidade. Deus me colocou no caminho de pessoas que a cada dia me ensinam a ser uma pessoa melhor e um profissional mais dedicado.

À minha ex e eterna orientadora, amiga e “mãe-odontológica” **Profa. Dra. Maria Mônica Studart Mendes Moreira**. Agradeço a amizade e a confiança depositada em mim durante todos estes anos. Se hoje estou concluindo o doutorado, muito disso tem sua contribuição. Agradeço ainda o exemplo de competência profissional. Sempre lembrarei da promessa que fiz a você: “Espero um dia poder fazer por alguém tudo aquilo que fez e faz por mim”.

Aos meus grandes amigos de longas datas **André, Isadora, Isabela, Juan e Raquel** por todos estes anos de companheirismo. Já se foram, no mínimo, 17 anos de amizade. Passei metade da minha vida com vocês. Hoje, parte de cada um de nós tem um pouco de “sexteto”. Sorrimos juntos, sofremos juntos, dividimos muitos sonhos... obrigado por poder contar com vocês sempre! Nossa amizade transcende o tempo e a distancia.

À minha “irmã” **Suzanny** por sempre estar ao meu lado. Um dos meus maiores exemplos de ser humano em toda sua plenitude. Tenho certeza da sua importância na minha vida. À distância às vezes me obriga a estar ausente em momentos importantes... Mas não tenha dúvidas que sempre trago você em meus pensamentos.

Aos amigos de Fortaleza **Kênia, Erick, Mario, Sara, Yuri e Allan** pelos bons momentos de convivência e verdadeira amizade. Obrigado pelo carinho e palavras de incentivo.

Aos meus amigos Lucas, Diego, Fernando, Kleber e Gustavo o melhor e maior presente que São Paulo me deu. Obrigado pelos momentos felizes que passamos juntos. Vocês têm um lugar especial no meu coração.

Aos grandes amigos que a Carolina do Norte me deu de presente: **Daniel, Andy, Traci, Adam, Suzi, Nick, Ty, Stratton e todo time de Kickball** pela grande amizade. Foram vocês que nos momentos difíceis, quando a saudade do Brasil bateu, estiveram ao meu lado, me deram força, me ajudaram, foram confidentes e me colocaram dentro de suas casas e suas vidas. Tenho muitas saudades de tudo que vivenciei com vocês.

Ao meu maior presente piracicabano, **Flávia Cera**, por ser tão companheira, por tentar entender minha rotina, por me dar forças e por tornar tudo mais leve e prazeroso. Obrigado pela família “Nepomucera” e por todos amigos que você me deu (Lucas, Paula, Thiago e Guilherme). Você é o verdadeiro significado de amizade!

Aos meus **tios e primos** que sempre estiveram próximos e animaram minha vida.

À **Ia**, minha eterna babá, que até hoje acha que tenho 10 anos de idade e continua me “paparicando”. Obrigado por tudo que você tem feito por mim e por todo carinho.

Saudades...

Agradecimentos

À Faculdade de Odontologia de Araraquara (UNESP), na pessoa de sua Diretora, **Profa. Dra. Elaine Maria Sgavioli Massucato**, e da Vice-Diretor, **Prof. Dr. Edson Alves de Campos**, pelas condições oferecidas para a realização desta pesquisa.

Ao Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Odontologia, Área de Periodontia, **Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli** pela excelente formação dos alunos, dedicação, competência e empenho em suas atividades. Agradeço também pela sua dedicação no desenvolvimento desta tese, por compartilhar seu conhecimento e por estar presente em todas as etapas desse trabalho, especialmente na realização da metanálise.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio pesquisa (**Processo FAPESP 2016/03753-8**) e pelas bolsas de doutorado no Brasil e no exterior (**Processos FAPESP 2014/13295-1 e 2016/18313-3**).

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro à pesquisa.

Aos Docentes da Disciplina de Periodontia desta faculdade, **Prof. Dr. Élcio Marcantonio Junior**, **Profa. Dra. Rosemary Adriana Chiérici Marcantonio**, **Prof. Dr. Carlos Rossa Júnior**, **Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli**, **Profa. Dra. Silvana Regina Perez Orrico**, **Prof. Dr. José Eduardo César Sampaio** e **Profa. Dra. Daniela Leal Zandim Barcelos** que colaboraram com a minha formação.

Aos meus amigos de turma de Mestrado: **Adriana**, **Cassio**, **Elton**, **Fernanda**, **Jackeline**, **Lelis**, **Patrícia**, **Paula**, **Sâmara**, **Suzane** e **Vinícius P.** pelo companheirismo.

A todos os funcionários da Disciplina de Periodontia, **Suleima**, **Claudinha** e especialmente a **Isa**, cujo trabalho e dedicação possibilitou a realização dessa tese. Obrigado pela imensa colaboração com os pacientes na clínica de Periodontia, sua ajuda foi essencial.

A todos os funcionários do Departamento de Morfologia, especialmente **Margarete e Marcelo**, pela atenção e disponibilidade que sempre me atenderam.

Ao **Prof. Dr. Cleslei Fernando Zanelli**; aos alunos de pós-graduação e a Assistente de suporte acadêmico **Mariana**, por sempre me receberem tão bem e me ajudarem em tudo que precisei no Laboratório de Biologia Molecular e Celular da FCFar - UNESP.

Aos amigos conquistados no curso de **Odontologia, turma 2011.2 da UFC** pelos tempos de convívio agradáveis e enriquecedores.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação, **Cristiano e Alexandre**; e ao funcionário da Seção Técnica de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Extensão, **Renan**, pela gentileza com que sempre me receberam, pela enorme paciência e competência.

Aos **funcionários da Biblioteca**, pela disposição de sempre.

Aos **Pacientes**, que colaboraram com a pesquisa, contribuindo com a realização dos exames clínicos e coletas. Muito obrigado!

A todos que, direta ou indiretamente, colaboraram e tornaram possível a realização deste trabalho.

“Quando alcançamos nossos objetivos pelo esforço, dedicação e compromisso, sentimos uma alegria impar no coração e, a certeza de que Deus abençoa ao filho que trilha sua vida com humildade e fé”

(José Alberto de Oliveira Filho, **MEU PAI**)

Oliveira RN. Investigação de polimorfismos genéticos e metabolismo lipídico com doença periodontal crônica: metanálise e estudo caso-controle [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2018.

RESUMO

Diversos fatores relacionados ao hospedeiro, como fatores ambientais (tabagismo), doenças sistêmicas (diabetes e dislipidemia) e herança genética vêm sendo estudados quanto à influência no início e progressão da doença periodontal. Embora muitos estudos tenham investigado a relação entre dislipidemia e periodontite crônica (PC), examinando os níveis séricos de lipídeos, os resultados ainda são contraditórios, indicando a demanda da realização de uma metanálise. Alguns *Genome-Wide Association Studies* (GWAS), estudos de bioinformática e diversos estudos caso-controle evidenciaram variantes genéticas associadas à suscetibilidade à periodontite, mas os resultados para alguns desses polimorfismos são escassos ou contraditórios entre as diferentes populações. Assim, nota-se a importância de realizar metanálises e estudos caso-controle para buscar validar ou identificar a associação de polimorfismos com a PC na população brasileira. O objetivo deste estudo foi dividido em 3 capítulos: (1) investigar se os pacientes com PC apresentam diferentes níveis séricos de parâmetros lipídicos (HDL, LDL, colesterol total e triglicérides) em comparação com indivíduos saudáveis; (2) avaliar se polimorfismos de base única (SNPs, *single nucleotide polymorphisms*) nos genes *LDLR* (rs5925 e rs688) e *APOB* (rs676210 e rs693) contribuem para a suscetibilidade à PC, uma vez que PC está associada a níveis plasmáticos de LDL mais elevados, e os polimorfismos nestes genes podem aumentar as concentrações plasmáticas de LDL; (3) validar na população brasileira a associação de polimorfismos genéticos previamente associados à PC em outras populações, por meio de estudos que utilizaram técnicas sofisticadas de bioinformática e GWAS. No capítulo (1), foi realizada uma revisão sistemática com metanálise e meta-regressão. Nos capítulos (2) e (3) foram realizados estudos caso-controle com genotipagem de SNPs em pacientes com e sem PC para investigar a associação destes SNPs entre os diferentes genótipos em relação a PC e parâmetros periodontais, além de avaliar a associação genética sexo-específica, e a da interação destas variações genéticas com fatores ambientais (tabagismo). Na metanálise, foram incluídas 19 publicações, verificando-se como resultado que os participantes com PC apresentaram níveis séricos significativamente elevados de LDL e triglicérides ($p = 0,003$ e $p < 0,0001$, respectivamente) e níveis significativamente mais baixos de HDL ($p = 0,0005$), comparando-se a indivíduos sem PC. Como resultado do capítulo (2), não foi verificada associação significativa entre os parâmetros clínicos periodontais e as frequências de genótipos de qualquer

dos SNPs nos genes *APOB* e *LDLR* avaliados. Comparando-se pacientes com e sem PC, não houve diferenças significativas em nenhuma das análises multivariadas, interações multiplicativas e aditivas entre cada SNP e tabagismo e frequência de haplótipos nos dois genes. Referente ao capítulo (3), constatou-se que os SNPs rs2521634 (próximo ao gene *NPY*) e rs3811046 (no gene *IL37*) foram validados na população brasileira estudada como associado à PC. Em conclusão, observou-se que a PC foi associada a níveis mais altos de LDL e triglicérides, e níveis mais baixos de HDL; enquanto que não foi associada aos SNPs estudados nos genes *LDLR* e *APOB*; mas houve validação na população brasileira estudada dos SNPs próximo ao gene *NPY* e no gene *IL37*, previamente identificados por GWAS, com associação de maior risco à PC severa e moderada.

Palavras chave: Periodontite crônica. Dislipidemias. Metanálise. Polimorfismo genético. Genótipo.

Oliveira RN. Investigation of genetic polymorphisms and lipid metabolism with chronic periodontal disease: meta-analysis and case-control study [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2018.

ABSTRACT

Several factors related to the host, such as environmental factors (smoking), systemic diseases (diabetes and dyslipidemia) and genetic inheritance have been studied regarding the influence on the onset and progression of periodontal disease. Although several studies have investigated the relationship between dyslipidemia and chronic periodontitis (CP), focusing on serum lipid levels, the results are still contradictory, indicating the necessity of a meta-analysis. Some genome-wide association studies (GWAS), bioinformatics studies and several case-control studies have shown genetic variants associated with susceptibility to CP, but the results of some of these polymorphisms are sparse and contradictory among different populations. Thus, it is important to conduct meta-analysis and case-control studies in order to validate or identify an association of polymorphisms with CP in a Brazilian population. The objective of this study was divided into three chapters: (1) to investigate whether patients with CP present different serum levels of lipid parameters (HDL, LDL, total cholesterol and triglycerides) compared to healthy individuals; (2) to assess whether single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the *LDLR* (rs5925 and rs688) and *APOB* (rs676210 and rs693) genes contribute to CP susceptibility, since CP is associated with higher plasma LDL levels and the polymorphisms of these genes may increase plasma LDL concentration; (3) to validate, in the Brazilian population, the association of genetic polymorphisms previously associated with CP in other populations, through studies using sophisticated bioinformatics techniques and GWAS. A systematic review with meta-analysis and meta-regression was performed in chapter (1). Case-control studies with genotyping of SNPs in patients with and without CP were performed in chapters (2) and (3). These studies were conducted to investigate the association of different SNPs genotypes respecting to CP and periodontal parameters, as well as to evaluate sex-specific genetic association, and gene-environmental interaction. In the meta-analysis, 19 publications were included. It was found that participants with CP had significant higher LDL and triglycerides serum levels ($p = 0.003$ and $p < 0.0001$, respectively) and lower HDL levels ($p = 0.0005$) compared to healthy patients. As a result of chapter (2), no significant association was found between the periodontal clinical parameters and the frequencies of genotypes of any of the SNPs in the *APOB* and *LDLR* genes evaluated. Comparing patients with and without CP, there were no significant differences in any multivariate analysis, multiplicative and additive interactions between each SNP and smoking and haplotype frequency in the two genes. Regarding chapter

(3), the rs2521634 (near the NPY gene) and rs3811046 (in the IL37 gene) SNPs were validated in the Brazilian population studied in association with CP. In conclusion, CP was associated with higher levels of LDL and triglycerides and lower levels of HDL; while it was not associated with the SNPs studied in the LDLR and APOB genes; but there was validation in the studied Brazilian population of the SNPs near to the NPY gene and in the IL37 gene with a higher risk association to severe and moderate CP, previously identified by the GWAS.

Keywords: Chronic periodontitis. Dyslipidemias. Meta-analysis. Genetic polymorphism.

Genotype.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 PROPOSIÇÃO	26
3 CAPÍTULOS	27
3.1 Capítulo 1	27
3.2 Capítulo 2	65
3.3 Capítulo 3	95
4 DISCUSSÃO	121
5 CONCLUSÃO	128
REFERÊNCIAS	129
APÊNDICE A.....	142
ANEXO A.....	163
ANEXO B.....	167

1 INTRODUÇÃO

O workshop internacional para a classificação de doenças e condições periodontais da Academia Americana de Periodontologia em 1999 definiu a periodontite crônica (PC) como uma "doença infecciosa que resulta na inflamação das estruturas de sustentação do dente, com progressiva destruição do ligamento periodontal, cemento e osso alveolar. É caracterizada por formação de bolsa periodontal e / ou recessão gengival. É reconhecida como a forma mais frequente de periodontite" ^{1,2}. As características da periodontite crônica listadas no referido workshop são: maior prevalência em adultos, mas pode ocorrer em crianças e adolescentes; a quantidade de destruição é consistente com a presença de fatores locais; o cálculo subgengival é um achado frequente, associado a um padrão microbiano variável; taxa de progressão lenta a moderada, podendo ter períodos de rápida progressão; pode ser associado a fatores predisponentes locais (por exemplo, fatores iatrogênicos); podem ser modificados e / ou associados a doenças sistêmicas (por exemplo, diabetes mellitus); podem ser modificados por fatores ambientais (como tabagismo e estresse emocional) ²⁻⁴.

Doenças complexas são causadas por uma combinação de fatores genéticos, ambientais e de estilo de vida, sendo a grande maioria das doenças enquadrada nesta categoria, incluindo doenças como diabetes mellitus (DM), dislipidemia e doença periodontal ⁵. Embora herdemos genes associados a essas doenças, os fatores genéticos representam apenas parte do risco associado ao fenótipo das doenças complexas. Além disso, essas doenças são poligênicas, pois vários genes estão envolvidos na suscetibilidade e na severidade da doença, cada qual garantindo uma pequena contribuição. Uma predisposição genética significa que um indivíduo tem uma suscetibilidade genética ao desenvolvimento de uma determinada doença, mas isso não significa que tal pessoa desenvolverá obrigatoriamente a doença. Embora não possamos mudar nossos genes, podemos alterar nosso estilo de vida e alterar fatores ambientais para prevenir ou retardar o aparecimento de tal transtorno. De fato, a interação entre fatores genéticos e ambientais em doenças complexas continua a desafiar a compreensão dos pesquisadores ⁶.

Isso contrasta com as doenças mendelianas simples, nas quais a alteração de um só gene determina o fenótipo da doença ⁷⁻⁹. Para revelar as influências genéticas e ambientais em uma dada doença, são realizados estudos investigando gêmeos monozigóticos (MZ - gerados a partir da divisão de um único zigoto) e dizigóticos (DZ - gerados a partir de zigotos independentes). Gêmeos MZ, além dos genes completamente compartilhados, quando criados juntos, têm também influências ambientais muito similares. Nos estudos envolvendo pares de gêmeos, é

avaliado se uma característica (inclusive uma doença) ocorre em ambos os gêmeos (concordância) ou em somente um deles (discordância). Quanto maior a frequência da mesma característica em ambos os membros dos pares MZ, em comparação aos DZ, maior a probabilidade de que a característica tenha um componente genético. Os resultados de estudos em famílias e em gêmeos indicam que há herança genética para suscetibilidade à PC ^{10,11}. Comparando-se gêmeos MZ e DZ, foi observada maior concordância da ocorrência da PC entre os gêmeos MZ criados juntos do que a encontrada nos gêmeos DZ, significando que o fator genético tem forte contribuição para o acometimento da doença ¹². Os autores estimaram que a PC possui aproximadamente 50% de hereditariedade, mesmo após ajustes para variáveis comportamentais, como o tabagismo ¹².

Como mencionado anteriormente, não apenas fatores genéticos influenciam na doença periodontal. Diversos outros fatores relacionados ao hospedeiro, como fatores ambientais (tabagismo), estresse emocional e doenças sistêmicas (diabetes mellitus e dislipidemia) passaram a serem estudados para compreender como contribuem para o início e progressão da PC ^{13,14}. O termo Medicina Periodontal, como sugerido pela primeira vez por Offenbacher ¹⁵ (1996), pode ser visto como um termo amplo que define uma relação entre saúde/doença periodontal e saúde/doença sistêmica. Acredita-se em uma relação bidirecional, ou seja, a doença periodontal pode influenciar na saúde sistêmica de um indivíduo, bem como doenças sistêmicas podem influenciar a saúde ou doença periodontal de um indivíduo ¹⁵. Dentre estas doenças, vem crescendo o número de estudos investigando a relação entre a doença periodontal e o diabetes mellitus e também a dislipidemia ¹⁶⁻²⁰.

FATORES GENÉTICOS E DOENÇA PERIODONTAL

A PC pode se manifestar de diferentes formas clínicas na população e a influência genética pode explicar isso em parte²¹. Polimorfismos genéticos são formas variantes (alelos) de um locus específico do cromossomo, que coexistem naturalmente na população humana. Polimorfismos genéticos são também entendidos como variações normais do genoma humano, no qual o alelo mais raro ocorre com uma frequência maior que 1% na população. Os polimorfismos surgem como resultado de mutações, como inserções, deleções ou substituições de bases nucleotídicas, podendo gerar uma proteína não funcional ou alterar a expressão da referida proteína. O tipo de polimorfismo mais comumente relatado na literatura é o de base

única, conhecido como Polimorfismo de Nucleotídeo Único (*Single Nucleotide Polimorphism - SNP*), que consiste em uma variação da identidade de um nucleotídeo singular num sítio particular do genoma ²².

Os polimorfismos genéticos são muito úteis em estudos da área de Genética de Populações. As frequências dos genótipos e alelos podem variar entre grupos de pacientes doentes e saudáveis. Subsequentemente, quando um determinado alelo está associado com a doença, estudos enfocando a genética funcional podem ser realizados para investigar a possível influência do referido polimorfismo na expressão do gene e seu papel na etiologia e patogênese da doença ^{23,24}. É muito importante essa investigação da funcionalidade de um polimorfismo, pois tais variações alélicas podem estar situadas em regiões promotoras do gene e isso pode influenciar a transcrição do mesmo; ou seja, um SNP pode influenciar na produção de maior ou menor quantidade de proteína, provocando variações nas respostas imunológica e inflamatória individuais frente a uma agressão bacteriana ²⁵. Além disso, um SNP também pode estar localizado em exons, de forma que, dependendo do nucleotídeo variante e de sua posição, um determinado aminoácido pode ser alterado para outro, levando à mudança da sequência original da proteína, o que pode comprometer sua função ²⁶.

Nota-se uma tendência mundial em identificar marcadores genéticos de suscetibilidade à PC, principalmente focando-se em genes relacionados ao sistema imunoinflamatório, particularmente das citocinas. Citocinas são proteínas secretadas por células do sistema imune, importantes na regulação imune e comprovadamente relacionadas ao processo de inflamação periodontal e sistêmica ^{27,28}. Estudos relatam que variações alélicas, como os polimorfismos em genes que codificam citocinas, podem afetar a suscetibilidade e a progressão da PC ^{8,28-31}. O primeiro estudo demonstrando a associação entre PC e um polimorfismo genético, no caso no gene *IL1*, foi de Kornman e colaboradores ³² em 1997. A partir de então, muitos estudos vêm sendo realizados com o objetivo de associar diversos polimorfismos em vários genes com a PC ³³⁻³⁷.

Existem milhões de SNPs distribuídos no genoma que têm sido investigados em associação a doenças, mas apenas uma pequena parcela destes foi estudado em relação à PC ³⁸. Os primeiros estudos investigando a suscetibilidade genética à PC na população brasileira são de 2002, utilizando a técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) aliada à de Polimorfismo de Comprimento de Fragmento de Restrição (RFLP), ou seja, a PCR-RFLP ³⁹. A partir de então, várias outras pesquisas têm sido realizadas na população brasileira a fim de

identificar marcadores genéticos que possam estar associados com a suscetibilidade ou predisposição à PC ⁴⁰⁻⁴³.

Para otimizar a análise de vários SNPs, atualmente tem sido empregadas tecnologias de alto desempenho, como *microarrays*. A partir de 2009, surgiram as primeiras publicações utilizando-se um protocolo baseando em uma tecnologia de alto desempenho e rendimento de genotipagem através de PCR em tempo real, conhecido como Plataforma de Genotipagem TaqMan™ OpenArray® da empresa Life Technologies ⁴⁴.

A tecnologia OpenArray™ utiliza um chip do tamanho de uma lâmina para microscopia com 3.072 orifícios. Cada placa contém 48 subarranjos (*subarray*), cada uma com 64 poços de 300 µm de diâmetro e 300 µm de profundidade. A superfície da placa tem propriedades hidrofóbicas, enquanto o interior dos poços (onde as sondas e primers já estão inseridos) são de natureza hidrofílica. Os reagentes são retidos nos orifícios através da tensão superficial. Estas propriedades físicas permitiram que um pequeno volume (33 nL) da amostra possa ser inserido com grande acurácia e precisão ⁴⁵.

Uma placa OpenArray pode conter tantas amostras como oito placas tradicionais de 384 poços. Tal tecnologia atua por meio de um chip contendo sondas para detecção de alelos de diferentes SNPs, assim esse chip de genotipagem permite a análise simultânea de no mínimo 16 e máximo 256 SNPs. Uma das principais vantagens desse método é que o pesquisador escolhe os SNPs que deseja investigar, comunicando-se com a empresa que desenvolverá o chip de modo “customizado”. O chip contém os ensaios em nano-cavidades, requerendo apenas a adição da amostra quantificada de DNA dos pacientes. A manipulação e distribuição das amostras no chip de OpenArray® é realizada por um pipetador automático, o que aumenta a precisão e diminui erros de pipetagem ⁴⁵.

Apesar de aparentemente mais caro, na verdade, em comparação a técnicas de genotipagem convencionais (onde cada SNP é investigado de cada vez), o uso da plataforma OpenArray® é mais econômica quando pretende-se analisar diversos polimorfismos ⁴⁶. Em um estudo recente realizado em uma população brasileira, a plataforma de genotipagem OpenArray® provou ser altamente eficaz (taxa de precisão – *call rate* de 96,99%) para a genotipagem de SNPs suspeitos de estarem relacionados à perda auditiva ⁴⁶. O resultado de genotipagem com o OpenArray foi validado por meio de outras técnicas como sequenciamento direto, PCR multiplex e PCR-RFLP.

A limitação da abordagem de genes candidatos é que centenas de genes não são

estudados porque suas funções são desconhecidas. Portanto, estudos com estratégia livres de hipótese e abordando todo o genoma são novas estratégias que estão sendo utilizadas para diversas doenças ⁴⁷. Dentre estas estratégias, destacam-se *Genome-Wide Association Study* (GWAS) e análises envolvendo técnicas sofisticadas de bioinformática.

O número de publicações usando bases de dados genéticos e métodos de bioinformática para identificar genes candidatos a doenças vem se expandindo. Uma combinação de ferramentas computacionais vem sendo utilizada para a identificação de genes candidatos para a periodontite. Esses resultados teóricos fornecem novas pistas para os pesquisadores planejarem experimentos específicos para cada gene identificado. Há poucos estudos publicados na literatura utilizando as técnicas de bioinformática para identificar os genes candidatos mais promissores para PC. Apenas um estudo usou as múltiplas fontes de dados associado a diferentes métodos computacionais para identificar genes em todo o genoma humano que fossem candidatos ao desenvolvimento da periodontite ⁴⁸. Por meio desse método integrativo de ranqueamento de genes, alguns destacam-se: (i) a *interleucina 18 (IL18)* que apresenta um papel importante na regulação da resposta imunoinflamatória, modulando atividade de macrófagos e neutrófilos ⁴⁹, cuja proteína encontra-se em concentração aumentada na saliva de pacientes com PC ⁵⁰; e (ii) membro 9 da família de *Receptores Toll-like (TLR)*, ou seja o *TLR9*, cuja expressão mostrou-se aumentada em pacientes com periodontite comparado a pacientes com gengivites e pacientes saudáveis ⁵¹.

GWAS são estudos de associação do tipo caso-controle envolvendo uma grande amostra populacional que, ao invés da abordagem de gene candidato, investigam simultaneamente milhares de polimorfismos genéticos para identificar variantes genéticas associadas à uma doença ⁵². Assim, GWAS permitem uma análise em larga escala e imparcial do genoma, utilizando grande número de indivíduos ⁵³. Os GWAS são capazes de analisar aproximadamente 650.000 SNPs e são capazes de mostrar aproximadamente 22% da variância fenotípica observada na PC ⁵⁴. Uma série de GWAS relataram novos achados para doenças complexas e, curiosamente, a maioria desses genes identificados não foram previamente estudados como genes candidatos. Isso também foi observado em relação à PC, uma vez que diversos GWAS evidenciaram variantes genéticas associadas à susceptibilidade à PC. Pode-se destacar polimorfismos no gene *IL37* e próximo ao gene *NPY* ⁵⁴⁻⁵⁶.

O neuropeptídeo Y (NPY) é um potente vasoconstritor que é co-localizado com noradrenalina no sistema nervoso simpático ⁵⁷. O NPY mostrou ter vários papéis, incluindo a

modulação da resposta imune e angiogênese, sugerindo um papel no metabolismo e reparo tecidual ⁵⁸⁻⁶¹. O NPY é o neuropeptídeo mais abundante no osso e recentemente demonstrou ter um papel na manutenção do equilíbrio entre a formação e reabsorção óssea, processos que são relevantes na periodontite ^{62,63}. Além disso, o NPY está presente no fluido crevicular gengival (FCG), apresentando níveis significativamente maiores em sítios periodontalmente saudáveis em comparação aos sítios com periodontite ⁶⁴. Isso indica um possível papel do *NPY* no processo de saúde / doença periodontal.

A interleucina-37 (IL-37), também conhecida como IL-1F7, é o membro mais recentemente descrito da família de citocinas IL-1 ⁶⁵. É uma potente citocina anti-inflamatória, produzida por monócitos, células dendríticas, células plasmáticas e células epiteliais ^{66,67}. Em condições normais, a IL-37 atenua a resposta imune inata pela supressão de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-17 e IFN- γ) ⁶⁷. Nas infecções bacterianas, a IL-37 é capaz de inibir o processo inflamatório ⁶⁶. Existe apenas um estudo que investigou o FCG, níveis salivares e plasmáticos de IL-37 em indivíduos com PC e em indivíduos sistemicamente e periodontalmente saudáveis ⁶⁸. A IL-37 foi detectada em FCG, saliva e plasma de todos os grupos, porém as quantidades totais de IL-37 foram semelhantes nos sítios de pacientes controle e com doença periodontal.

DISLIPIDEMIA E DOENÇA PERIODONTAL

Evidências crescentes mostram a relação da PC com doenças sistêmicas ⁶⁹. Estudos epidemiológicos comprovam que a PC confere maior risco à doença cardiovascular (DCV) ⁷⁰. A base patológica da DCV é a aterosclerose ⁷¹, que geralmente se desenvolve como resultado de um desequilíbrio no perfil lipídico, uma vez que a placa ateromatosa pode ser iniciada pela acúmulo localizado de lipídeos ⁷².

Anormalidades nos níveis de lipídeos séricos caracterizam a dislipidemia, que é uma disfunção metabólica caracterizada por mudanças qualitativas e quantitativas das lipoproteínas no sangue, além de transtornos no metabolismo de lipídeos ⁷³. Os lipídeos não são solúveis no plasma, em vez disso são transportados em partículas conhecidas como lipoproteínas ⁷⁴. Esta doença pode surgir e ser agravada devido a descompensação metabólica gerada pelo quadro de diabetes mellitus (DM) e / ou devido a uma dieta rica em gorduras ⁷⁵.

Uma das principais características da dislipidemia é o aumento na concentração de colesterol total, lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e triglicérides, além da redução de lipoproteínas de alta densidade (HDL) no sangue ⁷⁵⁻⁷⁷. De acordo com *National Cholesterol Educational Program (NCEP) Adult Treatment III (ATP III)* ⁷³, os seguintes pontos de corte foram usados para definir dislipidemia: (i) Hipercolesterolemia: nível de colesterol total ≥ 200 mg/dL; (ii) Hipertrigliceridemia: níveis de triglicérides ≥ 150 mg/dL; (iii) Baixos níveis de HDL: níveis de HDL < 40 mg/dL e (iv) Altos níveis de LDL: níveis de LDL ≥ 130 mg/dL.

As causas da dislipidemia podem ser genética, ambiental, ou ambos. Dentre as causas genéticas, há a hipercolesterolemia familiar (HF), apolipoproteína B100 defeituosa, hiperlipidemia combinada (familiar), entre outras. Dentre as causas secundárias (ambientais), incluem a dieta, uso de alguns medicamentos, além de doenças e desordens metabólicas, como obesidade e DM tipo 2 (DM2) ⁷⁴.

A hipercolesterolemia, como já comentado, pode ser ocasionada por fatores genéticos. Entre as mutações e polimorfismos envolvidos no aumento sérico de colesterol, é possível destacar os que ocorrem no gene *Apolipoproteína B (APOB)* ^{78,79} e, principalmente, no gene do Receptor de LDL (*LDLR*) ^{80,81}. ApoB é uma Apolipoproteína primária da LDL, sendo a principal transportadora natural de colesterol e fosfolípidos, atuando como um suprimento constante de colesterol para tecidos periféricos e células ⁸². ApoB contém múltiplas regiões associadas a lípidos em sua estrutura que são necessários para ligar-se ao LDL-R ^{83,84}. O LDL-R desempenha um papel fundamental na regulação do metabolismo do colesterol, removendo o excesso de LDL do sangue ⁸⁵. Além disso, estudos sugerem que *LDLR* é expresso em células epiteliais do tecido gengival ⁸⁶, e que a proteína ApoB pode ser encontrada no FCG, estando em concentração aumentada em sítios com PC ⁸⁷. Estes estudos mostram uma possível participação desses dois genes na patogênese da PC. Apesar de existirem estudos comprovando a relação de polimorfismos nos genes *LDLR* e *APOB* com dislipidemia, não existem estudos publicados sobre a associação destes polimorfismos com a PC.

A dislipidemia em associação com DM2 são as principais causas da morbidade e mortalidade devido ao elevado índice de doenças cardiovasculares severas decorrentes ^{88,89}. Quando a PC está também associada a estas duas patologias, o quadro pode ser ainda mais grave, pois a PC também tem sido indicada como um fator de risco independente para doenças cardiovasculares ^{90,91}.

Desde 1999, a relação entre PC e níveis lipídicos plasmáticos tem sido investigada, considerando a hipótese de que a periodontite pode alterar os níveis séricos de lípidos ^{16-20,92}.

Atualmente, vários trabalhos investigaram a relação entre periodontite e parâmetros lipídicos ⁹³. Já foi observado que indivíduos com PC têm maiores níveis séricos de colesterol total, LDL e de triglicérides quando comparados com indivíduos periodontalmente saudáveis ⁹⁴. Estes resultados levaram pesquisadores a considerar a inter-relação entre PC e dislipidemia como um exemplo de uma doença sistêmica predispondo à infecção por via oral, e uma vez estabelecida a infecção oral, ela agrava a doença sistêmica (assim como ocorre com a DM). Assim, acredita-se que a dislipidemia e a PC estão envolvidas em um relacionamento bidirecional ⁹⁵.

Estudos *in vitro* fornecem as bases biológicas para tal associação. Existem evidências científicas de que a PC, como uma doença infecciosa crônica, produz altos níveis de citocinas pró-inflamatórias; que, por sua vez, levam à alteração dos parâmetros lipídicos séricos, promovendo assim a hiperlipidemia ^{96,97}. Níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias ocorrem como consequência da infecção por microrganismos periodontopatogênicos, cujos componentes de superfície (muitas vezes descritos como endotoxinas), particularmente lipopolisacarídeos (LPS), provocam uma reação do sistema imune ^{98,99}. Por outro lado, quando os níveis séricos de lipídeos são elevados além do limite do intervalo fisiológico aceitável, como consequência, as funções das células imunes são alteradas. Os lipídeos podem promover hiperatividade de leucócitos, além de alterar o perfil de expressão gênica dos macrófagos, aumentando a produção de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa) e a interleucina 1 beta (IL-1 β), aumentando-se a produção de espécies reativas de oxigênio em pacientes hiperlipidêmicos ^{98,100-104}. A liberação de citocinas pró-inflamatórias comprometem a resposta do tecido periodontal e afeta a cicatrização de feridas, aumentando assim a suscetibilidade e severidade da PC ^{102,105-107}.

No entanto, existem relatos contraditórios na literatura quanto à existência de associação entre a PC e os níveis séricos de lipídeos. Em um estudo que investigou 8.028 indivíduos, verificou-se que os níveis séricos de lipídeos não estavam associados à infecção periodontal (definida como a presença de dentes com bolsas periodontais profundas) ¹⁰⁸. Alternativamente, foi indicado que a dislipidemia não está associada com a perda de nível clínico de inserção periodontal, mas que DM2 seja um fator mais importante para determinar a porcentagem de sítios com destruição periodontal ¹⁰⁹. Acredita-se que a DM seja um preditor mais forte para a PC do que a dislipidemia ⁷⁶. Contrapondo-se a isso, foi demonstrado que a maior produção de citocinas pró-inflamatórias por macrófagos ocorra em decorrência da hiperlipidemia, e não da hiperglicemia ^{100,110}.

Tem sido cada vez mais comum encontrar pacientes com DM2 que também são afetados por dislipidemia e periodontite crônica, mas contraditoriamente, existem limitados estudos sobre a associação conjunta dessas doenças. Em vista disso, nosso grupo de pesquisa tem estudado nos últimos anos a expressão genética em pacientes com DM2 compensados e descompensados e em indivíduos normoglicêmicos, associadas a dislipidemia e periodontite crônica ^{111,112}. Foi possível obter evidências que a dislipidemia foi a principal doença associada ao aumento de *IL10* e *IFNA* e à diminuição da expressão dos genes *IFNG*, *IP10*, *IRF1*, *JAK1*, *STAT3*; porém sem ignorar a participação da periodontite crônica nessa expressão gênica, uma vez que os parâmetros periodontais se correlacionaram significativamente com os níveis de mRNA dos citados genes ¹¹¹.

Além disso, resultados de Oliveira (2014) ¹¹³ ainda não publicados, mostraram que os parâmetros lipídicos se correlacionaram com os parâmetros periodontais (Tabela 1). Aumento nos níveis de colesterol total, triglicérides e LDL correlacionaram-se com aumento na porcentagem dos parâmetros clínicos periodontais (placa visível, sangramento marginal, sangramento à sondagem, profundidade de sondagem ≥ 6 mm, perda de inserção ≥ 5 mm e supuração). Estes resultados indicam que a maior gravidade da PC se correlaciona com pior controle lipídico, caracterizado pelo aumento nos níveis lipídicos (colesterol total, triglicérides e LDL).

Esses achados fornecem evidências de que o estado inflamatório se associe principalmente à dislipidemia, porém a regulação da resposta imune sistêmica é complexa, sendo correlacionada também à PC. Além disso, observamos que pacientes dislipidêmicos apresentaram maior gravidade da periodontite, afetando negativamente a saúde e a qualidade de vida.

Tabela 1 - Correlação ajustada entre parâmetros periodontais e lipídicos

	Colesterol total	HDL	LDL	Triglicérides
IPV (% sítios)	0.38	-0.02	0.26	0.32
ISM (% sítios)	0.32	-0.05	0.23	0.28
SS (% sítios)	0.31	0.00	0.24	0.19
PS ≤ 3mm (% sítios)	-0.21	0.10	-0.16	-0.23
PS 4-5mm (% sítios)	0.06	-0.11	0.02	0.14
PS ≥ 6mm (% sítios)	0.28	-0.06	0.22	0.25
NI ≤ 2mm (% sítios)	-0.18	0.04	-0.14	-0.15
NI 3-4mm (% sítios)	-0.09	0.04	-0.09	-0.09
NI ≥ 5mm (% sítios)	0.30	-0.07	0.25	0.24
Supuração (nº sítios)	0.20	-0.11	0.20	0.13

Os coeficientes de correlação de Spearman são apresentados (r ; $\alpha = 5\%$) ajustados para idade e sexo. Correlações significativas ($p < 0,05$) foram destacadas: cinza escuro significa correlação significativa negativa e cinza claro significa correlação significativa positiva. IPV: índice de placa visível; ISM: índice de sangramento marginal; SS: sangramento à sondagem; PS: profundidade de sondagem; NI: nível de inserção.

Fonte: Elaboração próprio com dados extraídos de Oliveira ¹¹³.

Embora muitos estudos tenham investigado a relação entre dislipidemia e PC, examinando os níveis séricos de lipídeos, os resultados ainda são contraditórios, indicando a demanda da realização de uma metanálise. Metanálise é “a análise estatística de uma grande coleção de resultados oriundos de diferentes estudos com a finalidade de integrar os achados” ¹¹⁴. Os resultados de uma metanálise são mais precisos em determinar o efeito de um tratamento ou o risco de um fator para uma doença, ou outros resultados, do que qualquer estudo individual que contribua para a análise conjunta ¹¹⁵. Portanto, a metanálise desempenha um papel central na medicina baseada em evidências, sendo considerada a melhor forma de evidência científica e, portanto, colocada no topo da hierarquia da evidência ^{115,116}.

Considerando que alguns GWAS e diversos estudos caso-controle evidenciaram variantes genéticas associadas à suscetibilidade à periodontite, mas os resultados para alguns desses polimorfismos são escassos ou são contraditórios entre as diferentes populações, nota-se a importância de realizar metanálises e estudos caso-controle para buscar validar ou identificar a associação de polimorfismos com a PC na população brasileira.

5 CONCLUSÃO

- Capítulo 1: Pode-se concluir que, apesar das limitações deste estudo, após meta-regressão, uma metanálise homogênea indicou que a periodontite crônica foi significativamente associada a uma redução da HDL e elevação da concentração de LDL e triglicerídeos. Portanto, a periodontite crônica pode ter associação com o controle metabólico lipídico.
- Capítulo 2: Não foi verificada associação significativa entre os parâmetros clínicos periodontais e as frequências de genótipos de qualquer dos SNPs avaliados (rs5925, rs688, rs676210, rs693) nos genes *LDLR* e *APOB*. No modelo multivariável, não houve diferenças significativas nas frequências de genótipos para todos os SNPs que compararam o controle e os grupos de pacientes com periodontite crônica. As interações multiplicativas e aditivas entre cada SNP e tabagismo não foram estatisticamente significantes. Além disso, nenhum dos haplótipos nos genes *APOB* e *LDLR* estava significativamente relacionado ao risco de doença periodontal.
- Capítulo 3: Foi possível validar em uma população brasileira, a associação do SNP rs2521634 próximo do gene *NPY*, e do SNP rs3811046 na região intrônica do gene *IL37*, com risco aumentado para periodontite crônica moderada e severa, sendo esse risco sexo-específico. Esses resultados reforçam a evidência de que os polimorfismos nos genes *NPY* e *IL37*, previamente encontrados por *GWAS*, podem desempenhar um papel no perfil genético que predispõe a periodontite crônica.

REFERÊNCIAS*

- 1 Kannel WB. Coronary heart disease risk factors in the elderly. *Am J Geriatr Cardiol.* 2002; 11(2):101-7.
- 2 Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol.* 1999; 4(1):1-6.
- 3 Nath SG, Raveendran R. "What is there in a name?": A literature review on chronic and aggressive periodontitis. *J Indian Soc Periodontol .* 2011; 15(4):318-22.
- 4 Highfield J. Diagnosis and classification of periodontal disease. *Aust Dent J.* 2009; 54 Suppl:S11-26.
- 5 Hunter DJ. Gene-environment interactions in human diseases. *Nat Rev Genet.* 2005; 6(4):287-98.
- 6 Dempfle A, Scherag A, Hein R, Beckmann L, Chang-Claude J, Schafer H. Gene-environment interactions for complex traits: definitions, methodological requirements and challenges. *Eur J Hum Genet.* 2008; 16(10):1164-72.
- 7 Covani U, Marconcini S, Giacomelli L, Sivozhelevov V, Barone A, Nicolini C. Bioinformatic prediction of leader genes in human periodontitis. *J Periodontol.* 2008; 79(10):1974-83.
- 8 Grigoriadou ME, Koutayas SO, Madianos PN, Strub JR. Interleukin-1 as a genetic marker for periodontitis: review of the literature. *Quintessence Int.* 2010; 41(6):517-25.
- 9 Greenstein G, Hart TC. A critical assessment of interleukin-1 (IL-1) genotyping when used in a genetic susceptibility test for severe chronic periodontitis. *J Periodontol.* 2002; 73(2):231-47.
- 10 Corey LA, Nance WE, Hofstede P, Schenkein HA. Self-reported periodontal disease in a Virginia twin population. *J Periodontol.* 1993; 64(12):1205-8.
- 11 Michalowicz BS, Aeppli D, Virag JG, Klump DG, Hinrichs JE, Segal NL, et al. Periodontal findings in adult twins. *J Periodontol.* 1991; 62(5):293-9.
- 12 Michalowicz BS, Diehl SR, Gunsolley JC, Sparks BS, Brooks CN, Koertge TE, et al. Evidence of a substantial genetic basis for risk of adult periodontitis. *J Periodontol.* 2000; 71(11):1699-707.
- 13 Mealey BL, Oates TW. Diabetes mellitus and periodontal diseases. *J Periodontol.* 2006; 77(8):1289-303.
- 14 Page RC, Kornman KS. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontol 2000.* 1997; 14:9-11.

* De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/Home/Biblioteca/guia-de-normalizacao-atualizado.pdf>

- 15 Williams RC, Offenbacher S. Periodontal medicine: the emergence of a new branch of periodontology. *Periodontol 2000*. 2000; 23:9-12.
- 16 Andrukhov O, Haririan H, Bertl K, Rausch WD, Bantleon HP, Moritz A, et al. Nitric oxide production, systemic inflammation and lipid metabolism in periodontitis patients: possible gender aspect. *J Clin Periodontol*. 2013; 40(10):916-23.
- 17 Duzagac E, Cifcibasi E, Erdem MG, Karabey V, Kasali K, Badur S, et al. Is obesity associated with healing after non-surgical periodontal therapy? A local vs. systemic evaluation. *Journal of periodontal research*. 2016; 51(5):604-12.
- 18 Fentoglu O, Kirzioglu FY, Bulut MT, Kumbul Doguc D, Kulac E, Onder C, et al. Evaluation of lipid peroxidation and oxidative DNA damage in patients with periodontitis and hyperlipidemia. *Journal of periodontology*. 2015; 86(5):682-8.
- 19 Golpasand Hagh L, Zakavi F, Hajizadeh F, Saleki M. The association between hyperlipidemia and periodontal infection. *Iran Red Crescent Med J*. 2014; 16(12):e6577.
- 20 Penumarthy S, Penmetsa GS, Mannem S. Assessment of serum levels of triglycerides, total cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol, and low-density lipoprotein cholesterol in periodontitis patients. *J Indian Soc Periodontol*. 2013; 17(1):30-5.
- 21 Susin C, Dalla Vecchia CF, Oppermann RV, Haugejorden O, Albandar JM. Periodontal attachment loss in an urban population of Brazilian adults: Effect of demographic, behavioral, and environmental risk indicators. *J Periodontol*. 2004; 75(7):1033-41.
- 22 Taylor JJ, Preshaw PM, Donaldson PT. Cytokine gene polymorphism and immunoregulation in periodontal disease. *Periodontology 2000*. 2004; 35:158-82.
- 23 Schafer AS, Jepsen S, Loos BG. Periodontal genetics: a decade of genetic association studies mandates better study designs. *J Clin Periodontol*. 2011; 38(2):103-7.
- 24 Vijayalakshmi R, Geetha A, Ramakrishnan T, Emmadi P. Genetic polymorphisms in periodontal diseases: an overview. *Indian J Dent Res*. 2010; 21(4):568-74.
- 25 Kornman KS, di Giovine FS. Genetic variations in cytokine expression: a risk factor for severity of adult periodontitis. *Ann Periodontol*. 1998; 3(1):327-38.
- 26 Stern DL. Evolutionary biology. The problem of variation. *Nature*. 2000; 408(6812):529, 31.
- 27 Hodge PJ, Riggio MP, Kinane DF. Failure to detect an association with IL1 genotypes in European Caucasians with generalised early onset periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2001; 28(5):430-6.
- 28 Lopez NJ, Jara L, Valenzuela CY. Association of interleukin-1 polymorphisms with periodontal disease. *J Periodontol*. 2005; 76(2):234-43.
- 29 Franch-Chillida F, Nibali L, Madden I, Donos N, Brett P. Association between interleukin-6 polymorphisms and periodontitis in Indian non-smokers. *J Clin Periodontol*. 2010; 37(2):137-44.

- 30 Kim YJ, Viana AC, Curtis KM, Orrico SR, Cirelli JA, Scarel-Caminaga RM. Lack of association of a functional polymorphism in the interleukin 8 gene with susceptibility to periodontitis. *DNA Cell Biol.* 2009; 28(4):185-90.
- 31 Tervonen T, Raunio T, Knuuttila M, Karttunen R. Polymorphisms in the CD14 and IL-6 genes associated with periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 2007; 34(5):377-83.
- 32 Kornman KS, Crane A, Wang HY, diGiovine FS, Newman MG, Pirk FW, et al. The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 1997; 24(1):72-7.
- 33 Kornman KS, Crane A, Wang HY, di Giovine FS, Newman MG, Pirk FW, et al. The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 1997; 24(1):72-7.
- 34 Laine ML, Crielaard W, Loos BG. Genetic susceptibility to periodontitis. *Periodontol* 2000. 2012; 58(1):37-68.
- 35 Zhang J, Sun X, Xiao L, Xie C, Xuan D, Luo G. Gene polymorphisms and periodontitis. *Periodontol* 2000. 2011; 56(1):102-24.
- 36 Scarel-Caminaga RM, Kim YJ, Viana AC, Curtis KM, Corbi SC, Sogumo PM, et al. Haplotypes in the interleukin 8 gene and their association with chronic periodontitis susceptibility. *Biochem Genet.* 2011; 49(5-6):292-302.
- 37 Ding C, Ji X, Chen X, Xu Y, Zhong L. TNF-alpha gene promoter polymorphisms contribute to periodontitis susceptibility: evidence from 46 studies. *J Clin Periodontol.* 2014; 41(8):748-59.
- 38 Sachidanandam R, Weissman D, Schmidt SC, Kakol JM, Stein LD, Marth G, et al. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature.* 2001; 409(6822):928-33.
- 39 Scarel-Caminaga RM, Trevilatto PC, Souza AP, Brito RB, Line SR. Frequencies of the -330 (T --> G) IL-2 and -590 (T --> C) IL-4 gene polymorphisms in a population from south-eastern Brazil. *Eur J Immunogenet.* 2002; 29(4):293-6.
- 40 Astolfi CM, Shinohara AL, da Silva RA, Santos MCLG, Line SRP, de Souza AP. Genetic polymorphisms in the MMP-1 and MMP-3 gene may contribute to chronic periodontitis in a Brazilian population. *J Clin Periodontol.* 2006; 33(10):699-703.
- 41 Moreira PR, Costa JE, Gomez RS, Gollob KJ, Dutra WO. The IL1A (-889) gene polymorphism is associated with chronic periodontal disease in a sample of Brazilian individuals. *J Periodontal Res.* 2007; 42(1):23-30.
- 42 Oliveira RN, Corbi SCT, Bastos AS, Orrico SRP, Scarel-Caminaga RM. Doença periodontal em pacientes com Diabetes Mellitus: influência de polimorfismos genéticos? *Rev Odontol UNESP.* 2011; 40(4):187-94.
- 43 Pontes CC, Gonzales JR, Novaes AB, Jr., Taba Junior M, Grisi MF, Michel J, et al. Interleukin-4 gene polymorphism and its relation to periodontal disease in a Brazilian population of African heritage. *J Dent.* 2004; 32(3):241-6.

- 44 Reid ME. Transfusion in the age of molecular diagnostics. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2009; 171-7.
- 45 Martins FT, Ramos PZ, Svidnicki MC, Castilho AM, Sartorato EL. Optimization of simultaneous screening of the main mutations involved in non-syndromic deafness using the TaqMan(R) OpenArray Genotyping platform. *BMC Med Genet*. 2013; 14:112.
- 46 Martins FTA, Ramos PZ, Svidnicki MCCM, Castilho AM, Sartorato EL. Optimization of simultaneous screening of the main mutations involved in non-syndromic deafness using the TaqMan (R) OpenArray (TM) Genotyping Platform. *BMC Med Genet*. 2013; 14:112.
- 47 Vaithilingam RD, Safii SH, Baharuddin NA, Ng CC, Cheong SC, Bartold PM, et al. Moving into a new era of periodontal genetic studies: relevance of large case-control samples using severe phenotypes for genome-wide association studies. *J Periodontal Res*. 2014; 49(6):683-95.
- 48 Zhan Y, Zhang R, Lv H, Song X, Xu X, Chai L, et al. Prioritization of candidate genes for periodontitis using multiple computational tools. *J Periodontol*. 2014; 85(8):1059-69.
- 49 Okamura H, Tsutsui H, Kashiwamura S, Yoshimoto T, Nakanishi K. Interleukin-18: a novel cytokine that augments both innate and acquired immunity. *Adv Immunol*. 1998; 70:281-312.
- 50 Ozcaka O, Nalbantsoy A, Buduneli N. Interleukin-17 and interleukin-18 levels in saliva and plasma of patients with chronic periodontitis. *J Periodontal Res*. 2011; 46(5):592-8.
- 51 Kajita K, Honda T, Amanuma R, Domon H, Okui T, Ito H, et al. Quantitative messenger RNA expression of Toll-like receptors and interferon-alpha1 in gingivitis and periodontitis. *Oral Microbiol Immunol*. 2007; 22(6):398-402.
- 52 Teumer A, Holtfreter B, Volker U, Petersmann A, Nauck M, Biffar R, et al. Genome-wide association study of chronic periodontitis in a general German population. *J Clin Periodontol*. 2013; 40(11):977-85.
- 53 Vaithilingam RD, Safii SH, Baharuddin NA, Ng CC, Cheong SC, Bartold PM et al. Moving into a new era of periodontal genetic studies: relevance of large case-control samples using severe phenotypes for genome-wide association studies. *J Periodontal Res*. 2014; 49(6):683-95.
- 54 Divaris K, Monda KL, North KE, Olshan AF, Reynolds LM, Hsueh WC, et al. Exploring the genetic basis of chronic periodontitis: a genome-wide association study. *Hum Mol Genet*. 2013; 22(11):2312-24.
- 55 Freitag-Wolf S, Dommisch H, Graetz C, Jockel-Schneider Y, Harks I, Staufienbiel I, et al. Genome-wide exploration identifies sex-specific genetic effects of alleles upstream NPY to increase the risk of severe periodontitis in men. *J Clin Periodontol*. 2014; 41(12):1115-21.

- 56 Shaffer JR, Polk DE, Wang X, Feingold E, Weeks DE, Lee MK, et al. Genome-wide association study of periodontal health measured by probing depth in adults ages 18-49 years. *G3 (Bethesda)*. 2014; 4(2):307-14.
- 57 Lundberg JM, Pernow J, Tatemoto K, Dahlof C. Pre- and postjunctional effects of NPY on sympathetic control of rat femoral artery. *Acta Physiol Scand*. 1985; 123(4):511-3.
- 58 Bedoui S, Miyake S, Lin Y, Miyamoto K, Oki S, Kawamura N, et al. Neuropeptide Y (NPY) suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis: NPY1 receptor-specific inhibition of autoreactive Th1 responses in vivo. *J Immunol*. 2003; 171(7):3451-8.
- 59 Zukowska Z, Grant DS, Lee EW. Neuropeptide Y: a novel mechanism for ischemic angiogenesis. *Trends Cardiovasc Med*. 2003; 13(2):86-92.
- 60 Pedrazzini T, Pralong F, Grouzmann E. Neuropeptide Y: the universal soldier. *Cell Mol Life Sci*. 2003; 60(2):350-77.
- 61 Lundy FT, Linden GJ. Neuropeptides and neurogenic mechanisms in oral and periodontal inflammation. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2004; 15(2):82-98.
- 62 Ahmed M, Srinivasan GR, Theodorsson E, Bjurholm A, Kreicbergs A. Extraction and quantitation of neuropeptides in bone by radioimmunoassay. *Regul Pept*. 1994; 51(3):179-88.
- 63 Haug SR, Heyeraas KJ. Modulation of dental inflammation by the sympathetic nervous system. *J Dent Res*. 2006; 85(6):488-95.
- 64 Lundy FT, El Karim IA, Linden GJ. Neuropeptide Y (NPY) and NPY Y1 receptor in periodontal health and disease. *Arch Oral Biol*. 2009; 54(3):258-62.
- 65 Kumar S, McDonnell PC, Lehr R, Tierney L, Tzimas MN, Griswold DE, et al. Identification and initial characterization of four novel members of the interleukin-1 family. *J Biol Chem*. 2000; 275(14):10308-14.
- 66 Nold MF, Nold-Petry CA, Zepp JA, Palmer BE, Bufler P, Dinarello CA. IL-37 is a fundamental inhibitor of innate immunity. *Nat Immunol*. 2010; 11(11):1014-22.
- 67 Boraschi D, Lucchesi D, Hainzl S, Leitner M, Maier E, Mangelberger D, et al. IL-37: a new anti-inflammatory cytokine of the IL-1 family. *Eur Cytokine Netw*. 2011; 22(3):127-47.
- 68 Saglam M, Koseoglu S, Savran L, Pekbagriyanik T, Saglam G, Sutcu R. Levels of interleukin-37 in gingival crevicular fluid, saliva, or plasma in periodontal disease. *J Periodontal Res*. 2015; 50(5):614-21.
- 69 Kuo LC, Poison AM, Kang T. Associations between periodontal diseases and systemic diseases: A review of the inter-relationships and interactions with diabetes, respiratory diseases, cardiovascular diseases and osteoporosis. *Public Health*. 2008; 122(4):417-33.

- 70 Tonetti MS, Van Dyke TE, Working group 1 of the joint EFP/AAP workshop. Periodontitis and atherosclerotic cardiovascular disease: consensus report of the Joint EFP/AAP Workshop on Periodontitis and Systemic Diseases. *J Clin Periodontol*. 2013; 40 Suppl 14:S24-9.
- 71 Kinane DF, Lowe GD. How periodontal disease may contribute to cardiovascular disease. *Periodontol 2000*. 2000; 23:121-6.
- 72 Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 1999; 340(2):115-26.
- 73 National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation*. 2002; 106(25):3143-421.
- 74 Nelson RH. Hyperlipidemia as a risk factor for cardiovascular disease. *Prim Care*. 2013; 40(1):195-211.
- 75 Chahil TJ, Ginsberg HN. Diabetic dyslipidemia. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2006; 35(3):491-510.
- 76 Almeida Abdo J, Cirano FR, Casati MZ, Ribeiro FV, Giampaoli V, Viana Casarin RC, et al. Influence of dyslipidemia and diabetes mellitus on chronic periodontal disease. *J Periodontol*. 2013; 84(10):1401-8.
- 77 Howard BV. Lipoprotein metabolism in diabetes mellitus. *J Lipid Res*. 1987; 28(6):613-28.
- 78 Rajput-Williams J, Knott TJ, Wallis SC, Sweetnam P, Yarnell J, Cox N, et al. Variation of apolipoprotein-B gene is associated with obesity, high blood cholesterol levels, and increased risk of coronary heart disease. *Lancet*. 1988; 2(8626-8627):1442-6.
- 79 Xiao R, Sun S, Zhang J, Ouyang Y, Zhang N, Yang M, et al. Association analysis of APO gene polymorphisms with ischemic stroke risk: a case-control study in a Chinese Han population. *Oncotarget*. 2017; 8(36):60496-503.
- 80 Brown MS, Goldstein JL. Expression of the familial hypercholesterolemia gene in heterozygotes: mechanism for a dominant disorder in man. *Science*. 1974; 185(4145):61-3.
- 81 Alonso R, Mata N, Castillo S, Fuentes F, Saenz P, Muniz O, et al. Cardiovascular disease in familial hypercholesterolaemia: influence of low-density lipoprotein receptor mutation type and classic risk factors. *Atherosclerosis*. 2008; 200(2):315-21.
- 82 Oram JF, Heinecke JW. ATP-binding cassette transporter A1: a cell cholesterol exporter that protects against cardiovascular disease. *Physiol Rev*. 2005; 85(4):1343-72.
- 83 Chen PF, Marcel YL, Yang CY, Gotto AM, Jr., Milne RW, Sparrow JT, et al. Primary sequence mapping of human apolipoprotein B-100 epitopes. Comparisons of trypsin accessibility and immunoreactivity and implication for apoB conformation. *Eur J Biochem*. 1988; 175(1):111-8.

- 84 Fernandez-Higuero JA, Etxebarria A, Benito-Vicente A, Alves AC, Arrondo JL, Ostolaza H, et al. Structural analysis of APOB variants, p.(Arg3527Gln), p.(Arg1164Thr) and p.(Gln4494del), causing Familial Hypercholesterolaemia provides novel insights into variant pathogenicity. *Sci Rep*. 2015; 5:18184.
- 85 Dammerman M, Breslow JL. Genetic basis of lipoprotein disorders. *Circulation*. 1995; 91(2):505-12.
- 86 Ito S, Gojoubori T, Tsunoda K, Yamaguchi Y, Asano M, Goke E, et al. Nicotine-induced expression of low-density lipoprotein receptor in oral epithelial cells. *PLoS One*. 2013; 8(12):e82563.
- 87 Ishizuka M, Kato R, Moriya Y, Noguchi E, Koide Y, Inoue S, et al. Changes in apolipoprotein B and oxidized low-density lipoprotein levels in gingival crevicular fluids as a result of periodontal tissue conditions. *J Periodontal Res*. 2017; 52(3):594-602.
- 88 American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes--2013. *Diabetes Care*. 2013; 36 (1):11-66.
- 89 Mehra R. Global public health problem of sudden cardiac death. *J Electrocardiol*. 2007; 40(6 Suppl):S118-22.
- 90 DeStefano F, Anda RF, Kahn HS, Williamson DF, Russell CM. Dental disease and risk of coronary heart disease and mortality. *BMJ*. 1993; 306(6879):688-91.
- 91 Morrison HI, Ellison LF, Taylor GW. Periodontal disease and risk of fatal coronary heart and cerebrovascular diseases. *J Cardiovasc Risk*. 1999; 6(1):7-11.
- 92 Ebersole JL, Cappelli D, Mott G, Kesavalu L, Holt SC, Singer RE. Systemic manifestations of periodontitis in the non-human primate. *J Periodontal Res*. 1999; 34(7):358-62.
- 93 Bullon P, Morillo JM, Ramirez-Tortosa MC, Quiles JL, Newman HN, Battino M. Metabolic syndrome and periodontitis: is oxidative stress a common link? *J Dent Res*. 2009; 88(6):503-18.
- 94 Losche W, Karapetow F, Pohl A, Pohl C, Kocher T. Plasma lipid and blood glucose levels in patients with destructive periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 2000; 27(8):537-41.
- 95 Awartani F, Atassi F. Evaluation of periodontal status in subjects with hyperlipidemia. *J Contemp Dent Pract*. 2010; 11(2):33-40.
- 96 Heasman PA, Collins JG, Offenbacher S. Changes in crevicular fluid levels of Interleukin-1-Beta, Leukotriene-B4, Prostaglandin-E2, Thromboxane-B2 and Tumor-Necrosis-Factor-Alpha in experimental gingivitis in humans. *J Periodontal Res*. 1993; 28(4):241-7.
- 97 Page RC. The role of inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontal-disease. *J Periodontal Res*. 1991; 26(3):230-42.

- 98 Cutler CW, Shinedling EA, Nunn M, Jotwani R, Kim BO, Nares S, et al. Association between periodontitis and hyperlipidemia: cause or effect? *J Periodontol.* 1999; 70(12):1429-34.
- 99 Lakio L, Lehto M, Tuomainen AM, Jauhiainen M, Malle E, Asikainen S, et al. Pro-atherogenic properties of lipopolysaccharide from the periodontal pathogen *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Endotoxin Res.* 2006; 12(1):57-64.
- 100 Chu X, Newman J, Park B, Nares S, Ordonez G, Iacopino AM. In vitro alteration of macrophage phenotype and function by serum lipids. *Cell Tissue Res.* 1999; 296(2):331-7.
- 101 Doxey DL, Cutler CW, Iacopino AM. Diabetes prevents periodontitis-induced increases in gingival platelet derived growth factor-B and interleukin 1-beta in a rat model. *J Periodontol.* 1998; 69(2):113-9.
- 102 Fentoglu O, Koroglu BK, Hicyilmaz H, Sert T, Ozdem M, Sutcu R, et al. Pro-inflammatory cytokine levels in association between periodontal disease and hyperlipidaemia. *J Clin Periodontol.* 2011; 38(1):8-16.
- 103 Krause S, Pohl A, Pohl C, Liebreuz A, Ruhling K, Losche W. Increased generation of reactive oxygen species in mononuclear blood cells from hypercholesterolemic patients. *Thromb Res.* 1993; 71(3):237-40.
- 104 Iacopino AM. Diabetic periodontitis: possible lipid-induced defect in tissue repair through alteration of macrophage phenotype and function. *Oral Dis.* 1995; 1(4):214-29.
- 105 Stashenko P, Fujiyoshi P, Obernesser MS, Prostack L, Haffajee AD, Socransky SS. Levels of interleukin 1 beta in tissue from sites of active periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 1991; 18(7):548-54.
- 106 Fentoglu O, Oz G, Tasdelen P, Uskun E, Aykac Y, Bozkurt FY. Periodontal status in subjects with hyperlipidemia. *J Periodontol.* 2009; 80(2):267-73.
- 107 Valentaviciene G, Paipaliene P, Nedzelskiene I, Zilinskas J, Anuseviciene OV. The relationship between blood serum lipids and periodontal condition. *Stomatologija.* 2006; 8(3):96-100.
- 108 Saxlin T, Suominen-Taipale L, Kattainen A, Marniemi J, Knuuttila M, Ylostalo P. Association between serum lipid levels and periodontal infection. *J Clin Periodontol.* 2008; 35(12):1040-7.
- 109 Yoon AJ, Cheng B, Philipone E, Turner R, Lamster IB. Inflammatory biomarkers in saliva: assessing the strength of association of diabetes mellitus and periodontal status with the oral inflammatory burden. *J Clinical Periodontol.* 2012; 39(5):434-40.
- 110 Cutler CW, Machen RL, Jotwani R, Iacopino AM. Heightened gingival inflammation and attachment loss in type 2 diabetics with hyperlipidemia. *J Periodontol.* 1999; 70(11):1313-21.

- 111 Nepomuceno R, Villela BS, Corbi SC, Bastos AS, Dos Santos RA, Takahashi CS, et al. Dyslipidemia rather than Type 2 Diabetes Mellitus or Chronic Periodontitis affects the systemic expression of pro- and anti-inflammatory genes. *Mediators Inflamm.* 2017; 2017:1491405.
- 112 Corbi SCT, Bastos AS, Nepomuceno R, Cirelli T, Dos Santos RA, Takahashi CS, et al. Expression profile of genes potentially associated with adequate glycemic control in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Diabetes Res.* 2017; 2017:2180819.
- 113 Nepomuceno R. Parâmetros clínicos periodontais e expressão genética em indivíduos com diabetes mellitus, dislipidemia e doença periodontal [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da Unesp; 2014.
- 114 Glass GV. Primary, secondary, and meta-analysis of research. *Educ Res.* 1976; 5(10):3-8.
- 115 Haidich AB. Meta-analysis in medical research. *Hippokratia.* 2010; 14(Suppl 1):29-37.
- 116 Gopalakrishnan S, Ganeshkumar P. Systematic reviews and meta-analysis: understanding the best evidence in primary healthcare. *J Family Med Prim Care.* 2013; 2(1):9-14.
- 117 Guyatt GH, Sackett DL, Sinclair JC, Hayward R, Cook DJ, Cook RJ. Users' guides to the medical literature. IX. A method for grading health care recommendations. Evidence-Based Medicine Working Group. *JAMA.* 1995; 274(22):1800-4.
- 118 Sackett DL, Rosenberg WM, Gray JA, Haynes RB, Richardson WS. Evidence based medicine: what it is and what it isn't. *BMJ.* 1996; 312(7023):71-2.
- 119 Nibali L, Tatarakis N, Needleman I, Tu YK, D'Aiuto F, Rizzo M, et al. Clinical review: Association between metabolic syndrome and periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013; 98(3):913-20.
- 120 Page RC, Eke PI. Case definitions for use in population-based surveillance of periodontitis. *J Periodontol.* 2007; 78(7 Suppl):1387-99.
- 121 Russell AL. A system of classification and scoring for prevalence surveys of periodontal disease. *J Dent Res.* 1956; 35(3):350-9.
- 122 Preshaw PM. Definitions of periodontal disease in research. *J Clin Periodontol.* 2009; 36(1):1-2.
- 123 Savage A, Eaton KA, Moles DR, Needleman I. A systematic review of definitions of periodontitis and methods that have been used to identify this disease. *J Clin Periodontol.* 2009; 36(6):458-67.
- 124 Beck JD, Koch GG, Offenbacher S. Attachment loss trends over 3 years in community-dwelling older adults. *J Periodontol.* 1994; 65(8):737-43.

- 125 Offenbacher S, Divaris K, Barros SP, Moss KL, Marchesan JT, Morelli T, et al. Genome-wide association study of biologically informed periodontal complex traits offers novel insights into the genetic basis of periodontal disease. *Hum Mol Genet.* 2016; 25(10):2113-29.
- 126 Marchesan JT, Jiao Y, Moss K, Divaris K, Seaman W, Webster-Cyriaque J, et al. Common Polymorphisms in IFI16 and AIM2 Genes Are Associated With Periodontal Disease. *J Periodontol.* 2017; 88(7):663-72.
- 127 Willey JZ, Rodriguez CJ, Carlino RF, Moon YP, Paik MC, Boden-Albala B, et al. Race-ethnic differences in the association between lipid profile components and risk of myocardial infarction: The Northern Manhattan Study. *Am Heart J.* 2011; 161(5):886-92.
- 128 Sliwa K, Lyons JG, Carrington MJ, Lecour S, Marais AD, Raal FJ, et al. Different lipid profiles according to ethnicity in the Heart of Soweto study cohort of de novo presentations of heart disease. *Cardiovasc J Africa.* 2012; 23(7):389-95.
- 129 Zhang L, Qiao Q, Tuomilehto J, Janus ED, Lam TH, Ramachandran A, et al. Distinct ethnic differences in lipid profiles across glucose categories. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010; 95(4):1793-801.
- 130 Davis TM, Cull CA, Holman RR, Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Relationship between ethnicity and glycemic control, lipid profiles, and blood pressure during the first 9 years of type 2 diabetes: U.K. Prospective Diabetes Study (UKPDS 55). *Diabetes Care.* 2001; 24(7):1167-74.
- 131 Zaninotto P, Mindell J, Hirani V. Prevalence of cardiovascular risk factors among ethnic groups: results from the Health Surveys for England. *Atherosclerosis.* 2007; 195(1):e48-57.
- 132 Cooper RS, Kaufman JS, Ward R. Race and genomics. *N Engl J Med.* 2003; 348(12):1166-70.
- 133 Risch N, Burchard E, Ziv E, Tang H. Categorization of humans in biomedical research: genes, race and disease. *Genome Biol.* 2002; 3(7):comment2007.
- 134 Correa JD, Madeira MF, Resende RG, Correia-Silva Jde F, Gomez RS, de Souza Dda G, et al. Association between polymorphisms in interleukin-17A and -17F genes and chronic periodontal disease. *Mediators Inflamm.* 2012; 2012:846052.
- 135 Anovazzi G, Kim YJ, Viana AC, Curtis KM, Orrico SR, Cirelli JA, et al. Polymorphisms and haplotypes in the interleukin-4 gene are associated with chronic periodontitis in a Brazilian population. *J Periodontol.* 2010; 81(3):392-402.
- 136 Moreira PR, Lima PM, Sathler KO, Imanishi SA, Costa JE, Gomes RS, et al. Interleukin-6 expression and gene polymorphism are associated with severity of periodontal disease in a sample of Brazilian individuals. *Clin Exp Immunol.* 2007; 148(1):119-26.

- 137 Plothow A, Benvenuti R, Contieri FL, Bicalho MG. Frequencies at three polymorphic sites of interleukin-10 gene promoter in Brazilian renal recipients. *Transplant Proc.* 2003; 35(8):2908-10.
- 138 Alves-Silva J, da Silva Santos M, Guimaraes PE, Ferreira AC, Bandelt HJ, Pena SD, et al. The ancestry of Brazilian mtDNA lineages. *Am J Hum Genet.* 2000; 67(2):444-61.
- 139 Pimenta JR, Zuccherato LW, Debes AA, Maselli L, Soares RP, Moura-Neto RS, et al. Color and genomic ancestry in Brazilians: a study with forensic microsatellites. *Hum Hered.* 2006; 62(4):190-5.
- 140 Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, Rocha J, Antunes CM, Pena SD. Color and genomic ancestry in Brazilians. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003; 100(1):177-82.
- 141 de Aguiar PK, Coletta RD, de Oliveira AM, Machado RA, Furtado PG, de Oliveira LA, et al. rs1801133C>T polymorphism in MTHFR is a risk factor for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in the Brazilian population. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2015; 103(4):292-8.
- 142 Messetti AC, Machado RA, de Oliveira CE, Martelli-Junior H, de Almeida Reis SR, Moreira HS, et al. Brazilian multicenter study of association between polymorphisms in CRISPLD2 and JARID2 and non-syndromic oral clefts. *J Oral Pathol Med.* 2017; 46(3):232-9.
- 143 Paranaíba LM, Bufalino A, Martelli-Junior H, de Barros LM, Graner E, Coletta RD. Lack of association between IRF6 polymorphisms (rs2235371 and rs642961) and non-syndromic cleft lip and/or palate in a Brazilian population. *Oral Dis.* 2010; 16(2):193-7.
- 144 Pena SD, Di Pietro G, Fuchshuber-Moraes M, Genro JP, Hutz MH, Kehdy Fde S, et al. The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected. *PLoS One.* 2011; 6(2):e17063.
- 145 Fentoglu O, Bozkurt FY. The bi-directional relationship between periodontal disease and hyperlipidemia. *Eur J Dent.* 2008; 2(2):142-6.
- 146 Griffiths R, Barbour S. Lipoproteins and lipoprotein metabolism in periodontal disease. *Clin Lipidol.* 2010; 5(3):397-411.
- 147 Sun HL, Wu YR, Song FF, Gan J, Huang LY, Zhang L, et al. Role of PCSK9 in the development of mouse periodontitis before and after treatment: a double-edged sword. *J Infect Dis.* 2018; 217(4):667-80.
- 148 Bengtsson T, Karlsson H, Gunnarsson P, Skoglund C, Elison C, Leanderson P, et al. The periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis* cleaves apoB-100 and increases the expression of apoM in LDL in whole blood leading to cell proliferation. *J Intern Med.* 2008; 263(5):558-71.
- 149 Lonn J, Ljunggren S, Klarstrom-Engstrom K, Demirel I, Bengtsson T, Karlsson H. Lipoprotein modifications by gingipains of *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontal Res.* 2018 Jan 17. [Epub ahead of print]

- 150 Miyakawa H, Honma K, Qi M, Kuramitsu HK. Interaction of *Porphyromonas gingivalis* with low-density lipoproteins: implications for a role for periodontitis in atherosclerosis. *J Periodontal Res.* 2004; 39(1):1-9.
- 151 Hashimoto M, Kadowaki T, Tsukuba T, Yamamoto K. Selective proteolysis of apolipoprotein B-100 by Arg-gingipain mediates atherosclerosis progression accelerated by bacterial exposure. *J Biochem.* 2006; 140(5):713-23.
- 152 Sakiyama Y, Kato R, Inoue S, Suzuki K, Itabe H, Yamamoto M. Detection of oxidized low-density lipoproteins in gingival crevicular fluid from dental patients. *J Periodontal Res.* 2010; 45(2):216-22.
- 153 Nepomuceno R, Pigossi SC, Finoti LS, Orrico SRP, Cirelli JA, Barros SP, et al. Serum lipid levels in patients with periodontal disease: A meta-analysis and meta-regression. *J Clin Periodontol.* 2017; 44(12):1192-207.
- 154 Ottman R. Gene-environment interaction: definitions and study designs. *Prev Med.* 1996; 25(6):764-70.
- 155 Chantarangsu S, Sura T, Mongkornkarn S, Donsakul K, Torrungruang K. Vitamin D receptor gene polymorphism and smoking in the risk of chronic periodontitis. *J Periodontol.* 2016; 87(11):1343-51.
- 156 Lanktree MB, Hegele RA. Gene-gene and gene-environment interactions: new insights into the prevention, detection and management of coronary artery disease. *Genome Med.* 2009; 1(2):28.
- 157 Tanaka K, Miyake Y, Hanioka T, Furukawa S, Miyatake N, Arakawa M. The IL18 promoter polymorphism, rs1946518, is associated with the risk of periodontitis in Japanese women: the Kyushu Okinawa Maternal and Child Health Study. *Tohoku J Exp Med.* 2017; 243(3):159-64.
- 158 Tanaka K, Miyake Y, Hanioka T, Arakawa M. Relationship between IL1 gene polymorphisms and periodontal disease in Japanese women. *DNA Cell Biol.* 2014; 33(4):227-33.
- 159 Ribeiro MS, Pacheco RB, Fischer RG, Macedo JM. Interaction of IL1B and IL1RN polymorphisms, smoking habit, gender, and ethnicity with aggressive and chronic periodontitis susceptibility. *Contemp Clin Dent.* 2016; 7(3):349-56.
- 160 Andreotti G, Chen J, Gao YT, Rashid A, Chen BE, Rosenberg P, et al. Polymorphisms of genes in the lipid metabolism pathway and risk of biliary tract cancers and stones: a population-based case-control study in Shanghai, China. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2008; 17(3):525-34.
- 161 Rhodin K, Divaris K, North KE, Barros SP, Moss K, Beck JD, et al. Chronic periodontitis genome-wide association studies: gene-centric and gene set enrichment analyses. *J Dent Res.* 2014; 93(9):882-90.
- 162 Haririan H, Andrukhov O, Bottcher M, Pablik E, Wimmer G, Moritz A, et al. Salivary neuropeptides, stress and periodontitis. *J Periodontol.* 2017 Sep 15:1-15. [Epub ahead of print].

- 163 Kim SJD. Functional analysis of rs3811046 and rs3811047 variants in caucasians [Doctor of Philosophy thesis]. Chapel Hill: University of North Carolina; 2017.
- 164 Chen D, Zhang TL, Wang LM. The association of CSF-1 gene polymorphism with chronic periodontitis in the Han Chinese population. *J Periodontol*. 2014; 85(8):e304-12.
- 165 Meisel P, Krause T, Cascorbi I, Schroeder W, Herrmann F, John U, et al. Gender and smoking-related risk reduction of periodontal disease with variant myeloperoxidase alleles. *Genes Immun*. 2002; 3(2):102-6.
- 166 Ericson U, Rukh G, Stojkovic I, Sonestedt E, Gullberg B, Wirfalt E, et al. Sex-specific interactions between the IRS1 polymorphism and intakes of carbohydrates and fat on incident type 2 diabetes. *Am J Clin Nutr*. 2013; 97(1):208-16.
- 167 Gbadoe KM, Berdouzi N, Aguinano AA, Ndiaye NC, Visvikis-Siest S. Cardiovascular diseases-related GNB3 C825T polymorphism has a significant sex-specific effect on serum soluble E-selectin levels. *J Inflamm (Lond)*. 2016; 13:39.
- 168 Rinn JL, Snyder M. Sexual dimorphism in mammalian gene expression. *Trends Genet*. 2005; 21(5):298-305.
- 169 Yan N, Meng S, Song RH, Qin Q, Wang X, Yao Q, et al. Polymorphism of IL37 gene as a protective factor for autoimmune thyroid disease. *J Mol Endocrinol*. 2015; 55(3):209-18.
- 170 Igl BW, Konig IR, Ziegler A. What do we mean by 'replication' and 'validation' in genome-wide association studies? *Hum Hered*. 2009; 67(1):66-8.