

Andréa Moreira Monteiro

**Influência do tratamento periodontal sobre os
marcadores de risco para aterosclerose em
pacientes com periodontite crônica**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2010

Andréa Moreira Monteiro

**Influência do tratamento periodontal sobre os
marcadores de risco para aterosclerose em
pacientes com periodontite crônica**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Imunologia

Orientador: Prof. Dr. Magnus Ake Gidlund

São Paulo
2010

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Monteiro, Andréa Moreira.

Influência do tratamento periodontal sobre os marcadores de risco para aterosclerose em pacientes com periodontite crônica / Andréa Moreira Monteiro. -- São Paulo, 2010.

Orientador: Magnus Ake Gidlund.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Imunologia. Área de concentração: Imunologia. Linha de pesquisa: Imunofisiopatologia da Aterosclerose.

Versão do título para o inglês: Periodontal treatment influences risk markers for atherosclerosis in patients with chronic periodontitis.

Descritores: 1. Periodontite 2. Aterosclerose 3. Inflamação 4. Tratamento periodontal I. Gidlund, Magnus Ake II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Imunologia III. Título.

ICB/SBIB0101/2010

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Andréa Moreira Monteiro.

Título da Tese: Influência do tratamento periodontal sobre os marcadores de risco para aterosclerose em pacientes com periodontite crônica.

Orientador(a): Magnus Ake Gidlund.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

Aprovado(a)

Reprovado(a)

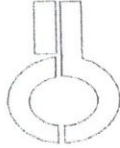
Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (11) 3091.7733 telefax : (55) (11) 3091-7438
e-mail: cep@icb.usp.br

São Paulo, 13 de junho de 2007.

PARECER 783/CEP

Prezada Senhora,

Atendendo sua solicitação, a *Comissão de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do ICB*, em sua 76ª reunião realizada em 13.06.07, analisou o projeto de sua responsabilidade intitulado: "*Doença Periodontal e LDL*".

Informo a V.Sa. que, após análise e discussão o referido projeto foi **aprovado** por esta Comissão.

Lembramos que cabe ao pesquisador elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais ou final), de acordo com a resolução 196/06 do Conselho Nacional da Saúde, item IX.2 letra c.

O primeiro relatório deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP em **13 de junho de 2008**.

Atenciosamente,

Prof. Dr. PAOLO A. M. ZANOTTO
Vice Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB /USP

Ilma. Sra.
ANDRÉA MOREIRA MONTEIRO
Departamento de Imunologia
Instituto de Ciências Biomédicas -USP

Este trabalho recebeu apoio financeiro da FAPESP

Processos: 05/57813-7

08/50006-7

Aos meus avôs (*in memoriam*) que embora pessoalmente já não os tenha na minha companhia, continuam para sempre no meu coração.

Aos meus pais e familiares por me apoiarem nessa caminhada. E ao meu querido Jorge pela paciência e companheirismo durante todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela força, luz e por estar sempre presente em meu coração.

Ao meu orientador Magnus Gidlund, pela atenção, amizade, confiança e disponibilidade. Obrigada por me receber de portas abertas e possibilitar meu crescimento científico e pessoal durante todos esses anos.

Ao professor Antonio Martins Figueiredo Neto. Por oportunas sugestões, incentivo e competência. Você sabe que sua colaboração nesse e outros trabalhos que fizemos juntos foi essencial.

A professora Maria Aparecida Jardim pela amizade, ajuda e colaboração durante a seleção, e tratamento dos participantes do trabalho. Sua presença foi e sempre será essencial;

As professoras do Instituto de Estatística e Matemática, Viviana Giampaoli e Elizete Aubin pelo trabalho brilhante de estatística;

A todos os amigos do laboratório, Eduardo, Francisco, Gabriela, Cristiane, Douglas, Ronald, Dr Elias, Henrique, Rafael e Mariana pela amizade que cultivamos durante todo esse período e aonde tive o prazer e alegria de trabalhar e conviver;

A Silvana pela amizade, carinho, ajuda, conversas e dedicação durante todos esses anos. Muito obrigada Sil!;

A Ana Paula pelo companheirismo e amizade desde o primeiro dia de aula na pós-graduação;

A todos os professores e alunos que participaram de todos os trabalhos que fizemos juntos durante minha pós-graduação;

Aos professores Dr. Niels Câmara, Dr. Francisco Fonseca, Dr. Giuseppe Romito, Dra. Nágila Damasceno e Dra. Márcia Dias pela grande ajuda e dicas na qualificação;

As secretárias da pós-graduação Jotelma, Amanda e Eni por todo apoio durante minha permanência no departamento de Imunologia;

Ao meu eterno amigo Moacyr Ligado Júnior pelas correções de língua portuguesa;

A direção e os funcionários da Associação Paulista de Cirurgiões Dentistas de São José dos Campos que sempre foram atenciosos, competentes e que com boa vontade colaboraram com toda a infra-estrutura para a realização deste trabalho;

A diretoria e enfermeiras do laboratório Quaglia de São José dos Campos, vocês foram essenciais para o trabalho;

Aos sujeitos que colaboraram com a pesquisa, disponibilizando seu tempo para as coletas, análise e dedicação a proposta do trabalho, essenciais para a execução deste estudo.

*A mente que se abre a uma nova idéia jamais
voltará ao seu tamanho original*

Albert Einstein

Não sabendo que era impossível foi lá e fez

Jean Cocteau

RESUMO

Monteiro AM. Influência do tratamento periodontal sobre os marcadores de risco para aterosclerose em pacientes com periodontite crônica [tese (Doutorado em Imunologia)]. São Paulo (Brasil): Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2010.

Recentemente, estudos têm reportado o impacto da saúde oral na aterosclerose e subsequente na doença cardiovascular. A proposta deste estudo foi fornecer uma introspecção desta associação determinando os níveis plasmáticos de alguns marcadores de risco para aterosclerose em pacientes com periodontite crônica. Além disso, nós investigamos o efeito do tratamento periodontal sobre esses marcadores de risco. Quarenta pacientes com periodontite crônica e quarenta pacientes sem doença periodontal foram incluídos no estudo. Colesterol Total, lipoproteína de alta densidade (LDL), lipoproteína de baixa densidade (HDL), triacilglicerol, nível de citocinas plasmática, anticorpos contra lipoproteína de baixa densidade oxidada, substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, proteína C Reativa (PCR), contagem total e diferencial de células brancas e índice de refração não linear foram investigados. Os níveis de triacilglicerol e de HDL em pacientes com periodontite foram significativamente maiores e menores, respectivamente quando comparados aos controles. Colesterol Total, LDL e nível de peróxidos lipídicos foram semelhantes entre os grupos. Interleucina (IL)-6, -8 e PCR anticorpos anti-oxLDL, e contagem de leucócitos e neutrófilos foram significativamente maiores em pacientes com periodontite. O valor o índice de refração não linear da solução de LDL foi maior no controle quando comparado a indivíduos com periodontite. Os quarenta pacientes com periodontite crônica passaram por tratamento periodontal. Amostras adicionais foram coletadas após 3, 6 e 12 meses após o tratamento periodontal. O tratamento periodontal foi bem sucedido, com diminuição significativa de bolsas gengivais patogênicas. Um ano após o término do tratamento, as concentrações de triacilglicerol foram significativamente diminuídas. Os níveis de IL-6 IL-8 e PCR foram significativamente menores depois do tratamento periodontal. O tratamento não teve efeito sobre os níveis plasmáticos de colesterol total, HDL e LDL. O valor do índice de refração não linear e os níveis de anticorpos anti-oxLDL foram significativamente maiores e menores, respectivamente 12 meses após o tratamento periodontal. A contagem de leucócitos e neutrófilos foi menor após 3 meses do

tratamento periodontal. Nossos resultados confirmam e reforçam a sugestão da associação entre o aumento de marcadores de risco para aterosclerose e periodontite. O tratamento periodontal induz várias mudanças nestes marcadores refletindo uma diminuição do risco cardiovascular nesses pacientes.

Palavras-chave: Periodontite. Aterosclerose. oxLDL. Inflamação. Tratamento periodontal.

ABSTRACT

Monteiro AM. Periodontal treatment influences risk markers for atherosclerosis in patients with chronic periodontitis [Ph. D. thesis (Immunology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2010.

Recently, studies have reported the impact of oral health on atherosclerosis and subsequent cardiovascular disease. The purpose of this study was to provide an insight into this association by determining the plasma levels of some risk markers for atherosclerosis in patient with chronic periodontitis. Moreover, we investigated the effect of periodontal treatment on these risk markers. Forty patients with chronic periodontitis and forty patients without periodontal disease were included in this study. Total cholesterol, high density lipoprotein (HDL), low density lipoprotein (LDL), triacylglycerol, plasma levels of cytokines, antibodies against oxidized low-density lipoprotein, thiobarbituric acid reactive substances, C-reactive protein (CRP), total and differential white blood cell count, and the non-linear index of refraction were investigated. The levels of triacylglycerol and HDL in periodontitis patients were significantly higher and lower, respectively, compared to controls. Total cholesterol, LDL, and lipid peroxide levels were the same in both groups. Interleukin (IL) -6, -8 and CRP, antibodies against oxidized low density lipoprotein, and leukocyte and neutrophils counts were significantly higher in periodontitis patients. The value of non-linear index of refraction of LDL solution was higher in the controls compared to individual with periodontitis. The forty patients with chronic periodontitis underwent periodontal treatment. Additional samples were collected after 3, 6 and 12 months after periodontal treatment. The periodontal treatment was successful, as pathogenic gingival pockets decreased significantly. One year after the ending of treatment, triacylglycerol concentrations were significantly decreased. Interleukin 6,-8 and CRP levels were significantly lower after periodontal treatment. Treatment had no effect on plasma levels total cholesterol, HDL and LDL. The value of non-linear index of refraction and the anti-oxLDL antibody levels were significantly higher and lower, respectively 12 months after periodontal treatment. Leukocyte and neutrophils counts were lower after 3 months of periodontal treatment. Our results confirmed and strengthened the suggested association between increased risk markers for coronary artery disease and

periodontitis. The periodontal treatment induces systemic changes in several markers reflecting a decrease of cardiovascular risk in these patients.

Key Words: Periodontitis. Atherosclerosis. oxLDL. Inflammation. Periodontal Treatment.

LISTA DE ABREVIATURAS

- ABS – Absorbância
- ApoB100 – Apolipoproteína B100
- CH – Colesterol Total
- CuSO₄ – Sulfato de cobre
- EDTA – Ácido etilenodiamino tetracético
- HDL – *High Density Lipoprotein* (Lipoproteína de alta densidade)
- H₂SO₄ – Ácido sulfúrico
- IgG – Imunoglobulina G
- IL – Interleucina
- IMC – Índice de massa corporal
- IS – Índice de Sangramento
- LDL – *Low density lipoprotein* (Lipoproteína de baixa densidade)
- LPL – Lípase Lipoprotéica
- LPS – Lipopolissacarídeo
- MDA – Malondialdeído
- MPM - Metaloproteínases
- NaCl – Cloreto de Sódio
- NaOH – Hidróxido de Sódio
- NCI – Nível clínico de inserção
- oxLDL – Lipoproteína de baixa densidade oxidada
- PBS – *Phosphate buffer saline* (solução salina de fosfato tamponada)
- PUFAS – Ácidos graxos poliinsaturados
- PCR – Proteína C reativa
- PG – Prostaglandina
- PS – Profundidade clínica de sondagem
- TBARS – *Thiobarbituric acid reactive substance assay*
- TG – Triacilglicerol
- TNF – *Tumor necrosis factor- α* (Fator de Necrose Tumoral – α)
- VLDL – *Very Low Density Lipoprotein* (Lipoproteína de muita baixa densidade).

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 DOENÇA PERIODONTAL.....	17
1.2 DOENÇA PERIODONTAL – BREVE PERSPECTIVA HISTÓRICA DA IMPORTÂNCIA SISTÊMICA.....	21
1.3 DOENÇA PERIODONTAL E ATEROSCLEROSE	23
1.4 DOENÇA PERIODONTAL E MARCADORES INFLAMATÓRIOS.....	24
1.5 DOENÇA PERIODONTAL E METABOLISMO LIPÍDICO.....	29
1.6 LIPOPROTEÍNA DE BAIXA DENSIDADE (LDL)	31
1.7 A IMPORTÂNCIA DA MODIFICAÇÃO DA LDL NA ATEROSCLEROSE.....	32
1.8 MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DA OXIDAÇÃO DA LDL.....	35
2 OBJETIVOS	40
2.1 OBJETIVOS GERAL.....	41
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
3 MATERIAL E MÉTODOS	42
3.1. METODOLOGIA.....	43
3.1.1 População	43
3.1.2 Aspéctos éticos	43
3.1.3 Determinação do fator de risco: periodontite crônica	44
3.1.4 Critérios de exclusão e inclusão	46
3.1.5. Avaliação periódica dos fatores de risco	47
3.2 ANÁLISES LABORATORIAIS.....	48
3.2.1 Preparação da LDL	48
3.2.2 Oxidação da LDL	48
3.2.3 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)	49
3.2.4 Dosagem de HDL, triacilglicerol e colesterol total	49
3.2.5 Detecção de anticorpos contra oxLDL	49
3.2.6 Concentrações séricas de IL-1β, IL-6, IL-8, IL-10 e TNF-α	50
3.2.7 Proteína C-Reativa de alta sensibilidade (PCR-us)	51
3.2.8 Leucograma	51
3.2.9 Variáveis clínicas	51
3.2.10 Análise física através de Z-scan	52
3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA	53
4 RESULTADOS	54
4.1 CASUÍSTICA.....	55
4.2 PERFIL LIPÍDICO.....	57
4.3 LEUCOGRAMA.....	65
4.4 ANÁLISE DE CITOCINAS.....	68
4.5 PROTEÍNA C REATIVA (PCR).....	71
4.6 AUTO-ANTICORPOS CONTRA oxLDL.....	73
4.7 SUBSTÂNCIAS REATIVAS AO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS).....	75
4.8 ANÁLISE POR VARREDURA Z.....	77
5 DISCUSSÃO	79
6 CONCLUSÕES	89
REFERÊNCIAS	91
ANEXOS	105
ANEXO A - CONSCENTIMENTO/AUTORIZAÇÃO	106

ANEXO B - ANAMNESE.....	108
ANEXO C - ARTIGO: Cardiovascular disease paramenters in periodontitis.....	110
ANEXO D - ARTIGO: Thermal-lens effect of native and oxidized lipoprotein solutions investigated by the z-scan technique.....	121
ANEXO E -ARTIGO: Cu e Fe metallic ions-mediated oxidation of low-density lipoproteins studies by NMR, TEM and Z-scan techique	127

1 INTRODUÇÃO

1.1 DOENÇA PERIODONTAL

Periodonto (*perio* = em torno de; *donto* = dente – conjunto de tecidos que circundam e sustentam o dente) é um complexo tecidual que forma uma unidade estrutural e funcional constituída pela gengiva, ligamento periodontal, cemento e osso alveolar (Figura 1). Sua função é proteger e manter o órgão dental. A gengiva constitui o periodonto de proteção e, as demais estruturas, o periodonto de sustentação. O quadro clínico dos tecidos gengivais saudáveis apresenta-se com coloração rósea pálido, superfície com aspecto granuloso, tom consistente e ausência de sangramento.

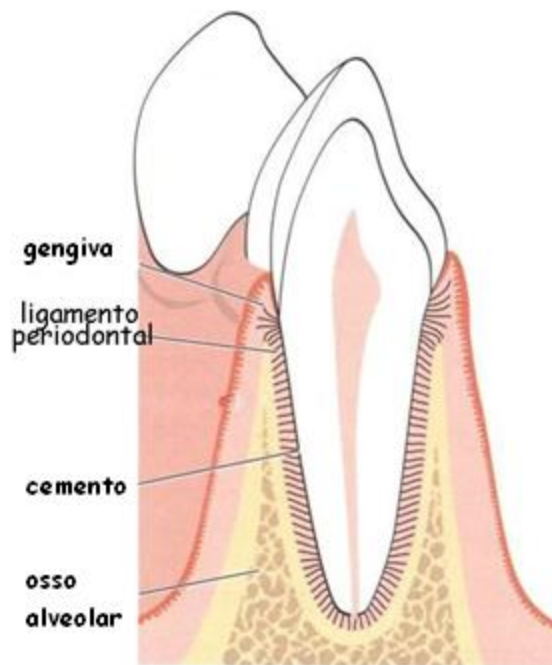


Figura 1 - Anatomia do Periodonto.
Fonte: Lindhe (1999).

A doença periodontal, dentre todas as patologias bucais, é uma das mais prevalentes (Petersen e Ogawa, 2005), mutilantes e complexas quanto à etiologia, à classificação das diferentes formas, ao tratamento e a sua manutenção. Estima-se que seja a infecção crônica mais prevalente em humanos. Trata-se de uma doença inflamatória e infecciosa produzida por bactérias gram-negativas anaeróbicas (Lindhe et al., 2003) presentes no biofilme dental que afetam o periodonto.

É caracterizada por intenso infiltrado inflamatório causando perda progressiva da inserção conjuntiva e podendo ocorrer em indivíduos saudáveis de qualquer idade. É

definida como uma doença sujeito e sito-específica, que evolui continuamente com períodos de destruição e de homeostase, resultando em resposta inflamatória e imune do hospedeiro à presença de bactérias e seus produtos (Almeida et al., 2006) que podem eventualmente levar a perda dos dentes.

Está bem estabelecido que as bactérias presentes no biofilme dental sejam a causa da inflamação. No entanto pesquisas têm evidenciado o fato de que muitos indivíduos podem abrigar os microorganismos sem manifestar destruição periodontal progressiva (Page et al., 1997). Assim o conhecimento relativo à etiologia, patogenicidade e tratamento das periodontopatogênias sofreu um forte incremento com estudos no âmbito dos fatores relacionados ao hospedeiro, incluindo as características genéticas e os mecanismos da resposta imune. De tal modo, os efeitos deletérios e, possivelmente os mais importantes, podem estar relacionados com a própria resposta imune do hospedeiro à presença de antígenos bacterianos.

A placa bacteriana é um biofilme complexo e pode ser definida como uma massa organizada constituída principalmente por microorganismos, que apresentam forte adesão à superfície dentária e próteses. Não é removida com bochechos, jato de ar ou mastigação de alimentos duros ou fibrosos.

O fato de que os microorganismos estão envolvidos na etiologia da doença periodontal tem sido alvo de inúmeros estudos, no entanto, a identificação completa de todos os agentes microbianos envolvidos não está totalmente definida. Estima-se que aproximadamente 300 espécies bacterianas habitem a cavidade oral sendo a maioria destas comensais e uma pequena parte patogênica oportunista. Segundo Slots (1986), das centenas de espécies de microorganismos isolados da microbiota oral, apenas vinte a trinta são consideradas periodontopatogênicas.

O reconhecimento da especificidade do biofilme dental e da existência de diversas formas de doenças periodontais associadas a diferentes patógenos, levou a um melhor entendimento do processo da doença. Offenbacher (1996) considera que *“a doença periodontal é uma mistura específica de bactérias que causam destruição periodontal em um indivíduo susceptível”*.

Segundo Moore e Moore (1994), de acordo com a teoria da *“placa específica”*, bactérias específicas (periodontopatógenos) com seus peculiares fatores de virulência provocarão um aumento da agressão que dificulta ainda mais o processo de defesa pelo organismo. Quando este não consegue suplantar a agressão, ocorre migração apical do

INTRODUÇÃO

epitélio juncional e perda de inserção conjuntiva. O processo saúde-doença periodontal é dinâmico e dependente da virulência das bactérias e da capacidade de defesa do organismo. O padrão de progressão está diretamente relacionado ao binômio: agressão e defesa.

O estabelecimento da saúde dos tecidos gengivais é resultado de um evento ativo e continuado que compreende os neutrófilos, presentes no sulco gengival, a primeira linha de defesa. Alterações na diapedese, quimiotaxia e migração de neutrófilos levam à ausência da barreira inflamatória protetora tornando o hospedeiro mais susceptível ao desenvolvimento da doença periodontal.

Baseado na ocorrência da perda de inserção dos tecidos, as doenças periodontais têm sido classificadas em duas categorias: gengivite e periodontite (Committee of the American Academy of Periodontology, 2003).

A gengivite (Foto 1) é caracterizada pela presença de inflamação crônica na margem gengival. Alterações na cor, forma e contorno da gengiva, hemorragia e edema são características clínicas desta fase, sendo reversível se a causa for eliminada.



Foto 1 – Gengivite

Na lesão inicial, ocorrem alterações na rede vascular com o aumento da permeabilidade vascular. Os fluídos e as proteínas exsudativas causam tumefação dos tecidos e influxo de células inflamatórias, principalmente de neutrófilos no tecido conjuntivo subjacente ao epitélio juncional. À medida que o infiltrado celular se desenvolve, as composições estruturais e celulares dos tecidos sofrem alterações.

Nos próximos estágios, linfócitos e neutrófilos predominam, e uma pequena quantidade de plasmócitos é observada. Os neutrófilos liberam as metaloproteínases

(MPM) que levam à destruição do colágeno empurrando assim, os tecidos e acomodando o infiltrado celular. Já na lesão estabelecida da gengivite, a lesão é dominada por plasmócitos. A perda de colágeno continua a ocorrer nas direções lateral e apical, mas sem atingir os tecidos de sustentação mais profundos. Com a progressão dessa situação há fragilização das estruturas, possibilitando assim um maior acesso dos agentes bacterianos agressores e/ou seus produtos às áreas subjacentes, podendo assim resultar na formação de bolsas periodontais, com perda óssea e contínua migração apical do epitélio juncional. A liberação de prostaglandinas (PG), especialmente PGE₂, que por sua vez induzem a produção de citocinas, entre as quais interleucina (IL) -1beta (β), IL-6 e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) conduzem decisivamente para a destruição progressiva que ocorre nos estágios avançados da doença (Almeida et al.,2006). Este processo culmina com a destruição dos componentes do periodonto, ou seja, cemento radicular, ligamento periodontal e osso alveolar, característicos da periodontite (Foto 2). Acredita-se que 15% da população adulta mundial apresentam forma severa de periodontite (Papapanou, 1996) enquanto 40% exibem sinais moderados ou leves da doença (Albandar, 2002).



Foto 2 – Periodontite

1.2 DOENÇA PERIODONTAL – BREVE PERSPECTIVA HISTÓRICA DA IMPORTÂNCIA SISTÊMICA

A Doença Periodontal tem sido estudada ao longo da história. Estudos em paleopatologia indicam que doenças gengivais e a perda de dentes são “*tão antigas quanto a própria humanidade*” e continuam a ser uma das doenças mais comuns que afetam a dentição humana (Loe, 1993). Há aproximadamente 4.000 anos atrás, as doenças periodontais foram descritas por egípcios e chineses como condições inflamatórias.

Papiros médicos que relacionam a dor de dente com doenças no sistema reprodutor feminino (2100 a.C.) (Gold, 1985) e tábuas cuneiformes, nas quais se lê “*As dores em sua cabeça, braços e pés são causados por seus dentes e devem ser removidos*” (Francke, 1973), demonstram que já havia uma preocupação da saúde oral no bem estar geral do indivíduo. Entre os gregos, Hipócrates (460-377 a.C.) o pai da medicina moderna, discutiu a etiologia da doença periodontal. Em seus relatos encontra-se descrita situação em que “*as gengivas estavam sangrando e dilacerando-se*” (Mitsis, 1991).

Já na Idade Média, em 1548, Walter Hermann Ryff escreveu uma monografia onde afirmava que os dentes e olhos tinham uma extraordinária afinidade, de forma que um não pode ser perfeitamente saudável sem o outro também o ser (O’Reilly e Claffey, 2000).

Nos tempos modernos, em 1882, foi publicado por Riggs um artigo intitulado “*Piorrêia alveolar*” (Riggs, 1882 apud O’Reilly e Claffey, 2003) no qual ele coloca como responsável pelas doenças da gengiva e do osso, os depósitos de cálculo e outros corpos estranhos que causassem aspereza na superfície dentária. Descreve ainda que a remoção de tais fatores poderia curar a piorrêia alveolar. Ele estava convencido de que a doença era local e que piorrêia alveolar iniciava com inflamação da gengiva, a qual por extensão apical atingia o osso alveolar, levando à formação de bolsa, ao aumento da mobilidade dental e à perda do suporte dental.

A primeira tentativa de relatar a relação de germes com doenças bucais foi feita por Miller em 1889, quando conduziu uma série de estudos de microrganismos salivares, suas habilidades em produzir ácidos orgânicos através de fermentação e sua

¹ Riggs JM. Pyorrhoea alveolaris. Dent Cosmos. 1882;24:523-38.

relação à dissolução do esmalte dentário (Loe, 1993). Este trabalho levou à elaboração da teoria bactéria-química para a formação de cáries. Miller foi também o primeiro a investigar a relação entre bactéria e doença periodontal. Em seu texto publicado, Miller claramente aponta a bactéria como tendo um importante papel em estágios avançados da patologia periodontal:

De acordo com a concepção, a piorrécia alveolar não é causada por uma específica bactéria, a qual ocorre em todos os casos (como ocorre na tuberculose), mas várias bactérias podem participar, (...). Além disso, até onde sabemos, não há bactéria que, inoculada sob a gengiva, seja capaz de provocar a doença em pessoas saudáveis.

A idéia de que as doenças periodontais eram doenças infecciosas e poderiam ser focos de contaminação sistêmica causaram mudanças nas medidas terapêuticas. Teorias foram desenvolvidas no intuito de prevenir que a infecção local pudesse ter efeito sistêmico.

Em 1911 Hunter, desenvolveu a teoria da “*infecção focal*”, na qual as infecções sépticas na gengiva e no periósteo constituíam uma grande fonte de contaminação ao organismo. Neste raciocínio, foram relacionadas várias doenças como problemas faríngeos e gástricos (incluindo dispepsia, úlcera, enterite e colite); incluíam-se também anemia, artrite, nefrite e doenças do sistema nervoso. Como consequência, durante as primeiras décadas do século passado, milhões e milhões de dentes foram removidos sem uma boa razão.

Atualmente é de consenso que as doenças sistêmicas, como a diabetes mellitus e a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) podem causar impacto sobre o periodonto, assim como a doença periodontal também possui o potencial de causar alterações sistêmicas (Segura et al., 2001).

A doença periodontal tem sido associada a diversas doenças de natureza sistêmica, entre elas a doença cardiovascular, infecções pulmonares, osteoporose, artrite reumatóide, partos de prematuros entre outras. Dessa forma, uma possível relação de duas vias pode ser estabelecida: a doença periodontal influencia e é influenciada pela doença sistêmica. No entanto mais pesquisas são necessárias para que se possa obter um melhor entendimento do real potencial das doenças periodontais e de seus mecanismos sobre alterações sistêmicas.

1.3 DOENÇA PERIODONTAL E ATEROSCLEROSE

A doença cardiovascular, especialmente a aterosclerose e eventos associados a ela (derrames e outros acidentes vasculares cerebrais e infarto agudo de miocárdio), constituem uma das principais causas de morte nos países desenvolvidos (Lotufo, 1998). No Brasil, a partir da década de 60, a doença cardiovascular aparece em primeiro lugar entre as causas de morte, representam quase um terço dos óbitos totais e atingem a população adulta em plena fase produtiva. No Sistema Único de Saúde (SUS), essas doenças foram responsáveis por mais de 1,2 milhão de internações, o que representa 10,3% do total de internações e 17% dos gastos financeiros (Araujo et al, 2005).

A aterosclerose é uma enfermidade inflamatória crônica e progressiva do sistema vascular, cuja causa principal é a formação de depósitos intra e extracelulares de colesterol nas paredes das artérias. Trata-se de um processo inicialmente silencioso cujas lesões se iniciam na primeira década de vida (Libby, 2002).

As lesões iniciais da aterosclerose, chamadas de estrias gordurosas, consistem de acúmulo subendotelial de células espumosas. As estrias gordurosas podem regredir ou progredir para placas fibrosas, as quais representam as lesões características da aterosclerose avançada. Estas placas são formadas por uma cobertura fibrosa composta de células muscular lisa, tecido conjuntivo, macrófagos e linfócitos T que envolvem um núcleo necrótico rico em lipídios. Estas placas podem sofrer calcificação, necrose, hemorragia, ulceração (ruptura) ou trombose, e desenvolver uma lesão complicada (ou complexa), a qual freqüentemente desencadeia eventos clínicos agudos decorrentes da oclusão arterial (Lusis, 2000; Mullenix et al., 2005).

Os principais fatores de risco para o desenvolvimento da aterosclerose são: aumento da concentração sanguínea de lipoproteína de baixa densidade (LDL) e triacilglicerol (TG), concentração sanguínea diminuída de lipoproteína de alta densidade (HDL), sexo, idade, tabagismo, pressão sanguínea sistólica, histórico familiar de desfecho cardiovascular e diabetes mellitus (Fruchart et al., 2004; Kris-Etherton et al., 2004). Esses fatores de risco tradicionais explicam apenas 50% de todos os casos de doenças cardiovasculares (Braunwald e Antman, 1997) o que abre espaço para a existência e a pesquisa de outros elementos, como o papel de agentes infecciosos (Matsuura et al., 2009). Por ser a aterosclerose um processo inflamatório acentuou-se o interesse no papel que alguns agentes infecciosos possam ter influência no início ou mesmo na

modulação da aterosclerose. Dentre os principais candidatos destacam-se a *Chlamydia pneumoniae*, o *Citomegalovírus* e *Helicobacter pylori* (Epstein et al, 2000). Nesta mesma perspectiva, colocou-se a hipótese das Doenças Periodontais que, como doenças infecciosas, poderiam ter um papel na formação de ateromas.

Esses estudos começaram a explorar os efeitos potenciais dos microorganismos periodontais na vasculatura e como essa exposição se relaciona à aterosclerose.

Loeshe et al. (1997) sugerem que bacteremias frequentes e de baixa intensidade seriam benéficas por estimular o sistema imunológico, mantendo-o sensibilizado e vigilante para a eventualidade de uma bacteremia de maior intensidade. Por outro lado, com a presença de infecções mais severas no periodonto, um número maior de microorganismos ganharia acesso à circulação com a mesma elevada frequência desta “bacteremia do cotidiano”, o que poderia levar ao aumento no número de leucócitos e na quantidade de fibrinogênio circulante (Lower, 1998), estímulo à síntese de citocinas inflamatórias por estes leucócitos (Kinane, 1998), elevação na quantidade plasmática de lipídios sanguíneos (Loeshe et al., 1997), e na indução de agregação plaquetária (Iacopino e Cutler, 2000), os quais são todos reconhecidos fatores de risco para a aterosclerose e eventos cardiovasculares.

Nos últimos vinte anos inúmeras pesquisas foram feitas relacionando a doença periodontal a doenças cardiovasculares. Entre elas destacaram-se os estudos de DeStefano et al. (1993) e Beck et al. (1996) que mostraram que a infecção e a inflamação causada pela doença periodontal aumentam o risco de doença cardiovascular.

1.4 DOENÇA PERIODONTAL E MARCADORES INFLAMATÓRIOS

A aterosclerose é um processo dinâmico, progressivo e essencialmente decorrente de inflamação, surgindo de uma combinação de disfunção endotelial e inflamatória (Ross, 1999). Conseqüentemente, os marcadores de inflamação têm sido utilizados na avaliação da doença cardiovascular por participarem diretamente na aterogênese e no desencadeamento dos fenômenos aterotrombóticos (Person et al., 2003).

O grau de inflamação periodontal é suficiente para desencadear resposta inflamatória sistêmica que é evidente com o aumento dos níveis de marcadores

inflamatórios, principalmente de proteína C reativa (PCR), citocinas proinflamatórias e aumento na contagem de leucócitos.

A PCR é considerada um importante marcador de inflamação sistêmica. Elevadas concentrações têm sido associados a risco futuro de eventos cardiovasculares em homens aparentemente saudáveis (Ridker et al., 1997; Ridker et al., 1998).

Dois importantes estudos de coorte prospectivos mensuraram os níveis de PCR em indivíduos clinicamente saudáveis inicialmente e determinaram ao longo do tempo associação dos níveis de PCR com eventos cardiovasculares futuros. Estes estudos mostraram que as concentrações iniciais de PCR foram significativamente maiores em pacientes que desenvolveram infarto de miocárdio quando comparados a pacientes que não desenvolveram problemas cardiovasculares (Danesh et al., 2004; Ridker, 2008).

Já na doença periodontal o estudo mais detalhado até hoje que demonstra associação entre a doença periodontal e concentrações elevadas de PCR no soro foi relatado por Slade et al. (2000). Nesse estudo, 14.766 indivíduos americanos foram entrevistados em suas casas e receberam exame periodontal em unidades móveis de saúde bucal. Segundo os autores, indivíduos com extensiva doença periodontal (>10% de sítios com bolsa periodontal maior que 4 mm) foram associados com aumento nos níveis de PCR. Além disso, em estudos de caso controle, Ebersole et al. (1997) e Noack et al. (2001) mostraram que os níveis de PCR estavam elevados em pacientes com doença periodontal quando comparados a pacientes sem doença periodontal.

Outro marcador inflamatório importante é a IL-6. A IL-6 é uma citocina proinflamatória e tem papel central na inflamação e no dano tecidual. Esta citocina tem papel considerável na patogenia da doença cardiovascular, na qual tem sido associada a episódios de angina instável e quadro clínico de doença cardiovascular (Biasucci et al., 1996; Mendall et al., 1997). Como um denominador comum, a IL-6 também tem papel importante nas doenças periodontais. O aumento na concentração sérica de IL-6 tem sido associado à periodontite e esse aumento parece estar relacionado com a severidade da doença. Yumoto et al. (1999) demonstraram que bactérias presentes na bolsa periodontal têm a propriedade de aumentar a concentração de mediadores inflamatórios como IL-6 que induz reabsorção óssea e conseqüentemente a perpetuação da resposta inflamatória durante a infecção crônica, como é o caso da doença periodontal.

Apesar da contagem de leucócitos ser considerada como marcador inflamatório, poucos estudos têm mensurado o número de leucócitos em pacientes com doença periodontal. Entre eles, destacam-se o estudo de Nibali et al. (2007) que observaram aumento na contagem de leucócitos em pacientes com periodontite, especialmente neutrófilos e linfócitos, sendo isso um possível reflexo do estímulo de inflamação sistêmica, que pode ser determinada pela doença periodontal persistente.

Como tem sido proposto que elevados níveis de PCR, IL-6 e leucócitos, em pacientes com doença cardiovascular podem ser resultantes de infecções crônicas e de processos inflamatórios presentes, no ano de 2000, Loss et al. avaliaram os níveis desses principais marcadores inflamatórios para doença cardiovascular em pacientes com e sem doença periodontal crônica. O estudo contou com 150 pacientes, destes, 43 não apresentavam doença periodontal. Segundo os autores, pacientes com doença periodontal apresentavam diferença estatisticamente significativa nos níveis de IL-6, PCR e leucócitos quando comparados ao grupo controle. Os autores concluem que a elevação dos níveis dos marcadores inflamatórios pode aumentar a atividade inflamatória nas lesões ateroscleróticas, com aumento do risco de eventos cardíacos e cerebrais.

No estudo de caso-controle de Buhlin et al. (2003), com casuística de 96 pacientes, sendo 50 pacientes com periodontite severa (grupo caso) e 46 pacientes sem doença periodontal (grupo controle) foi observado maior contagem de monócitos e maiores níveis de PCR no grupo caso quando comparados ao grupo controle. Ainda no estudo, os autores relatam que não observaram diferenças significativas nos níveis de IL-6 e na contagem de outras células inflamatórias.

Com o aumento da evidência de que a doença periodontal tem influência sobre marcadores inflamatórios surgiu o interesse em saber se o tratamento periodontal poderia ter influência sobre esses marcadores. Assim, D'Aiuto et al. (2004) realizaram um estudo clínico intervencional com seis meses de seguimento. Noventa e quatro pacientes receberam tratamento periodontal. A fase terapêutica foi completada dentro de 1 a 3 meses após a primeira visita. Após o término do tratamento os pacientes foram reavaliados 2 e 6 meses. Foi observado que o tratamento periodontal diminuiu significativamente os níveis de PCR e IL-6 quando comparado ao basal.

Em seu outro trabalho, D'Aiuto et al. (2006) observaram com o tratamento periodontal intensivo aumento no número de neutrófilos num intervalo de 24 horas e

que, após um mês do término da terapia periodontal, o número total de leucócitos estava significativamente reduzido quando comparado ao basal.

Em estudo recentemente publicado, Marcaccini et al. (2009) analisaram os níveis de IL-6 e PCR em 25 pacientes com doença periodontal. Os pacientes foram submetidos à terapia periodontal e avaliados 3 meses após o término do tratamento. Os autores observaram que a terapia periodontal diminuiu significativamente os níveis de IL-6 ($P=0.001$) e PCR ($P=0.006$) quando comparado ao basal.

Poucos estudos têm examinado o papel de outras citocinas pró-inflamatória e anti-inflamatória na doença periodontal e relacionado à aterosclerose.

A IL-1 β tem papel importante na patogênese da doença cardiovascular e da doença periodontal. Estudos têm demonstrado aumento na síntese de IL-1 β em placas arteriais humanas (Tipping e Hancock, 1993), e concentrações plasmáticas aumentada em pacientes com o mínimo de doença cardiovascular (Hasdai et al., 1996).

Já na doença periodontal, a IL-1 β tem sido descrita como indutor ou potencializador da expressão de fatores de diferenciação e ativação de osteoclastos, com consequente degradação de tecido conjuntivo e reabsorção óssea (Graves e Cochran, 2003). Chen et al. (1997) observaram aumento nos níveis de IL-1 β em tecidos periodontais de pacientes com periodontite quando comparados a tecidos saudáveis. A concentração de IL-1 β no soro de pacientes com doença periodontal também foi comparado ao soro de pacientes sem doença periodontal e não foi observada diferença estatística significativa. Com esses dados os autores concluíram que a concentração de IL-1 β nos tecidos gengivais pode relatar a severidade da doença periodontal, mas não reflete a concentração desse mediador no soro.

A IL-8 é expressa por macrófagos e liberada após estímulo inflamatório em resposta a citocinas IL-1 β e TNF- α . A IL-8 é uma quimiocina e importante quimio-atrativo para neutrófilos. A IL-8 tem sido encontrada em ateromas humanos (Koch et al., 1993) e implicada no desenvolvimento da aterosclerose (Braunersreuther et al., 2007). Boisvert et al. (1998) demonstraram que camundongos *knockouts* para receptores de IL-8 são menos susceptíveis a desenvolverem aterosclerose e possuem menos monócitos acumulados nas lesões vasculares. Na doença periodontal a IL-8 tem papel fundamental uma vez que os neutrófilos têm papel primordial na proteção da doença. Uma vez que o tecido gengival é agredido, as células epiteliais gengivais produzem altas quantidades de IL-8 na tentativa de aumentar o número de neutrófilos nos tecidos gengivais e assim

tentar conter a infecção. Entretanto, poucos estudos têm mensurado a concentração de IL-8 no soro de pacientes com doença periodontal.

Fokkema et al. (2003) em estudo de relato de caso, avaliaram a concentração de IL-8 em um paciente com 43 anos de idade que apresentava periodontite adulta generalizada. Após avaliação periodontal e coleta de sangue o paciente foi submetido à extração de todos os elementos dentais. O paciente foi reavaliado 3, 9, 20 e 32 meses após a extração e novas coletas de sangue foram realizadas. Foi observado que a concentração de IL-8 diminuiu com o tratamento quando comparado ao basal. Entretanto, resultados opostos também foram encontrados em estudo recentemente publicado por Buhlin et al. (2009) onde 68 pacientes com periodontite e 48 pacientes sem doença periodontal foram selecionados. Os autores observaram que pacientes sem doença periodontal apresentaram maiores concentrações de IL-8 quando comparados a pacientes com periodontite. No trabalho os autores não fazem comentários sobre esse resultado.

A IL-10 é secretada por monócitos/macrófagos e linfócitos ativados, e possui propriedade anti-inflamatória. Sua secreção conduz a uma supressão da produção de citocinas próinflamatórias bloqueando apoptose de macrófagos e monócitos após infecção. Esses mecanismos têm sido mostrados ter papel importante no desenvolvimento e na progressão de lesões ateroscleróticas, na qual sugere um papel benéfico regulatório da IL-10 (Heeschen et al., 2003). Reduzidas concentrações de IL-10 no soro também estão associados à instabilidade de placas ateroscleróticas e ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares (Mallat et al., 1999).

Na doença periodontal a IL-10 tem sido associada à inibição da secreção de citocinas próinflamatórias, supressão da fagocitose (Laichalk et al., 1996), ao metabolismo oxidativo, e a morte intracelular (Cenci et al., 1993), o que resulta numa anergia para uma grande variedade de bactérias (Groux et al., 1996), e levando a latência de infecções (Belkaid et al., 2002). Poucos estudos têm medido a concentração plasmática de IL-10 em pacientes com doença periodontal comparados a pacientes sem doença periodontal. Esses estudos têm observado concentrações semelhantes de IL-10 quando comparam pacientes com periodontite e pacientes sem doença periodontal (Gorska et al., 2003).

Embora existam evidências que apontem alterações nos marcadores inflamatórios de pacientes com periodontite crônica, investigações, ainda são

necessárias para fortalecer a idéia do tratamento periodontal como controlador da inflamação sistêmica na população em geral.

1.5 DOENÇA PERIODONTAL E METABOLISMO LIPÍDICO

A dislipidemia é considerada como um fator de risco fundamental para as doenças cardiovasculares, e importante indicador da doença isquêmica coronariana. Em especial, níveis elevados do colesterol total, TG e LDL e redução nos níveis de HDL (Goldbourt et al., 1997) estão associados ao risco de desenvolvimento de doenças coronarianas.

Estudos em humanos e animais têm demonstrado que um número de citocinas tais como a IL-1 β e TNF- α são produzidas em resposta a exposição ao lipopolissacarídeo (LPS) de bactérias gram-negativas. Acredita-se que essas citocinas exercem efeitos sobre o metabolismo por influenciar na produção de outras citocinas proinflamatórias, assim como de mediadores lipídicos, alterando assim a hemodinâmica e o metabolismo dos lipídeos (Van der Poll et al., 1991) resultando em elevados níveis de ácidos graxos livres, LDL e TG.

Nessa perspectiva, têm sido avaliados os níveis de colesterol total, HDL, LDL e TG em pacientes com doença periodontal.

O primeiro estudo a reportar associação significativa entre a doença periodontal e baixos níveis de HDL foi publicado por Buhlin et al. em 2003. O trabalho contou com 50 pacientes com periodontite severa e 46 pacientes sem doença periodontal. O estudo mostrou que 26% dos pacientes com doença periodontal e apenas 11% dos pacientes sem doença periodontal apresentavam níveis de HDL abaixo de 0,9 mmol/l. Como parâmetro para esses níveis de HDL, os autores citam um estudo no qual a taxa de mortalidade entre indivíduos com níveis de HDL abaixo de 0,9 mmol/l é maior do que em indivíduos com níveis maiores que 0,9 mmol/l (Goldbourt et al., 1997). Não foi verificada diferença estatística significativa para os níveis de TG, colesterol total e LDL entre pacientes com periodontite e pacientes sem doença periodontal.

Alguns estudos têm demonstrado que infecções agudas e crônicas promovem alteração na distribuição das lipoproteínas e na composição de subclasses, resultando na alteração dos níveis de HDL (Laurila et al., 1997; Sammalkorpi et al., 1988). Pussinen et al. (2004) demonstraram que a periodontite diminui os níveis totais de HDL e a razão

HDL₂/HDL₃. A HDL_{2a} tem sido proposto ser mais protetor que a HDL₃ (Salonen et al., 1991). Assim, os autores concluem que a periodontite diminui o potencial antiaterogênico da HDL podendo assim aumentar o risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares.

Estudos de caso controle têm demonstrado correlações positivas entre altos níveis de colesterol total, LDL, TG e doença periodontal. Lösche et al. (2000) analisaram o perfil lipídico de 39 indivíduos com periodontite moderada e compararam com os resultados obtidos de 40 indivíduos sem doença periodontal. Ambos os grupos eram constituídos de indivíduos sistemicamente saudáveis. Colesterol Total ($p < 0,03$), LDL ($p < 0,003$) e TG ($p < 0,001$) foram significativamente mais altos em indivíduos com periodontite quando comparados aos controles.

Katz et al. (2001) compararam 1.094 indivíduos com doenças periodontal e 943 indivíduos sem doença periodontal e encontraram associação entre doença periodontal e hipercolesterolemia. Além disso, em estudo mais recente de caso controle Nibali et al. (2007) analisaram o perfil lipídico de 302 indivíduos com periodontite severa e de 183 indivíduos sem doença periodontal. Após ajuste para diferenças na idade, gênero, etnia e hábito de fumar; foi observado que indivíduos com periodontite apresentavam menores níveis de HDL ($p < 0,0001$) e maiores níveis de LDL ($p < 0,0001$) quando comparados aos controles. Com esses dados, os autores sugerem um possível *link* entre periodontite severa e dislipidemia em indivíduos sistemicamente saudáveis.

Poucos estudos experimentais clínicos têm sido realizados para avaliação do perfil lipídico depois do tratamento periodontal.

D'Aiuto et al. (2006) investigaram os efeitos da terapia periodontal em 40 indivíduos sistemicamente saudáveis com periodontite. Os indivíduos foram tratados com terapia periodontal convencional e intensiva utilizando agente microbiano local e acompanhados por um período de 6 meses. O estudo demonstrou diminuição da pressão arterial sistólica (7 ± 3 mmHg ; $P=0,2$) em apenas 2 meses de acompanhamento, que foi correlacionada com o grau de redução no sangramento e inflamação gengival, bem como os sítios de supuração. A redução dos marcadores inflamatórios também foi associada com a diminuição no colesterol total, e LDL, sugerindo uma correlação entre a inflamação periodontal com o metabolismo lipídico alterado.

Pussinen et al. (2004) estudaram o efeito do tratamento periodontal na atividade antiaterogênica e nos níveis de HDL em 30 pacientes com periodontite. Após o

tratamento, a concentração total de HDL aumentou 10,7% ($p < 0,001$) e a média da razão HDL₂/HDL₃ aumentou de $2,16 \pm 0,87$ para $3,56 \pm 0,48$ ($p < 0,05$). Nessa mesma linha de raciocínio um estudo recentemente publicado Buhlin et al. (2009) verificaram que um ano após o início do tratamento periodontal as concentrações de HDL foram significativamente maiores do que o basal ($\Delta 0.08$ mmol/L) enquanto as concentrações de LDL foram significativamente menores quando comparado ao basal ($\Delta 0.23$ mmol/L).

Alguns estudos têm demonstrado que processos infecciosos promovem não só o aumento nos níveis de LDL total, mas sim oxidação das partículas de LDL (Iacopino et al., 2000). Nessa mesma perspectiva nenhum estudo tem analisado os níveis de LDL oxidada em pacientes com doença periodontal e qual o efeito do tratamento periodontal sobre esse marcador, deixando assim um espaço para novas pesquisas.

1.6 LIPOPROTEÍNA DE BAIXA DENSIDADE (LDL)

A LDL é a lipoproteína mais abundante no plasma e a principal transportadora de colesterol para as células, onde 80% do colesterol circulante é internalizado pelo fígado e cerca de 20% pelos tecidos periféricos (Brown e Goldstein, 1986). O colesterol transportado pela LDL contribui na síntese de membranas celulares, de hormônios, sais biliares e vitamina D.

Trata-se de uma partícula esférica de aproximadamente 22 nm de diâmetro (Foto 3), formada por fosfolipídios, colesterol livre, ésteres de colesterol, triglicérides e uma proteína carreadora, a apolipoproteína B100 (apoB100).

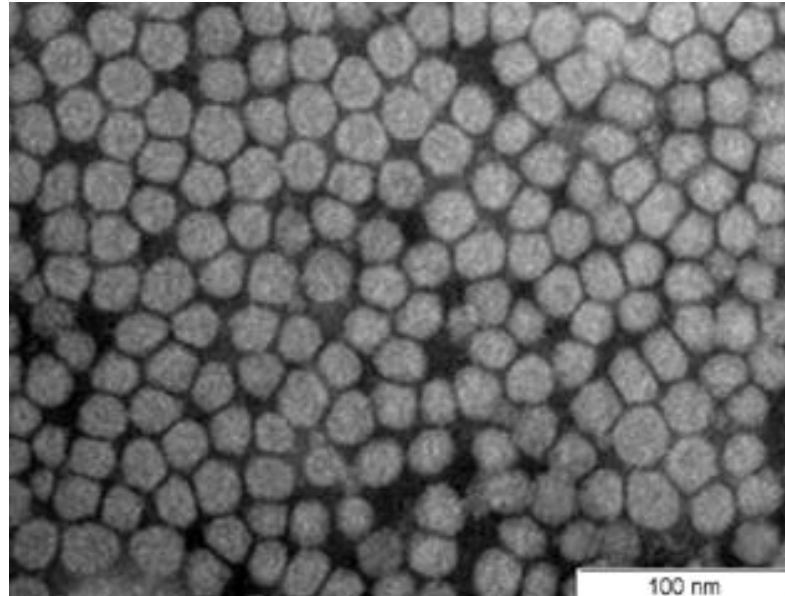


Foto 3 – Microscopia eletrônica de transmissão de LDL nativa.
Fonte: Gomez et al. (2010)

A apoB100 é uma cadeia de peptídeo simples (4.536 aminoácidos) sintetizada no fígado, da qual é a maior proteína monomérica conhecida em humanos (550kDa), altamente insolúvel em soluções aquosas, não transferível a outras partículas de lipoproteínas, além de funcionar como ligante do receptor de LDL (i.e. receptores do tipo B/E). Antioxidantes associados também estão presentes na partícula de LDL, entre eles temos α -tocoferol, γ -tocoferol, α -caroteno, β -caroteno, licopeno e criptoxantina (Hevonoja et al., 2000).

A LDL constitui um grupo heterogêneo de partículas, com tamanhos diferentes, densidade, carga e composição lipídica. Assim podemos nos dias de hoje distinguir ao menos quatro tipos de LDL circulantes de acordo com o seu tamanho e densidade.

1.7 A IMPORTÂNCIA DA MODIFICAÇÃO DA LDL NA ATEROSCLEROSE

Evidências clínicas, genéticas e epidemiológicas demonstram que a elevação da concentração plasmática de LDL constitui fator de risco para a doença aterosclerótica (Copper et al., 2005). A captação da LDL pelas células através do receptor clássico de LDL não pode provocar um acúmulo apreciável de colesterol, porque o receptor está sujeito à inibição pelo conteúdo intracelular de colesterol. No entanto, formas modificadas de LDL, como a LDL acetilada ou LDL oxidada (oxLDL), são captadas através do mecanismo de reconhecimento por receptores *scavengers* (presente em macrófagos,

células endoteliais e células de músculo liso), resultando em um substancial acúmulo de colesterol e subsequente formação de células espumosas, uma vez que o receptor *scavenger* não é regulado pelo conteúdo intracelular de colesterol (Goldstein e Brown, 1990; Gotto, 2003). Essas formas modificadas podem alterar as funções fisiológicas da lipoproteína, contribuindo para a instalação do processo aterosclerótico. Acredita-se que a modificação da LDL não ocorra na circulação devido a antioxidantes presentes nas partículas. Já no espaço subendotelial, local presumível da modificação da LDL *in vivo*, a geração exagerada de espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN) ultrapassa a capacidade antioxidante da LDL causando peroxidação lipídica e modificação protéica. O trânsito bidirecional da LDL através deste espaço pode conduzir a pequenas quantidades de LDL modificada na circulação (Stocker e Keaney, 2004). De tal modo, estudos têm demonstrado pelo uso de anticorpos monoclonais a presença de diferentes epítomos da LDL modificada no plasma (Holvoet et al., 2008; Hiki et al. 2009).

Os mecanismos que levam a modificação da LDL *in vivo* ainda não estão completamente esclarecidos, contudo, um dos eventos iniciais da modificação da LDL é a peroxidação lipídica, particularmente, de fosfolipídios e ésteres de colesterol, das quais contem ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs). O processo de peroxidação lipídica pode ser dividido resumidamente em três etapas: iniciação, propagação e terminação. Na fase de iniciação há a formação de dienos conjugados devido à abstração e ao rearranjo molecular do hidrogênio. Este dieno conjugado reage muito rapidamente com o oxigênio molecular iniciando uma reação autocatalítica que leva a formação de hidroperóxidos, a etapa de propagação. A terceira e última etapa, a fase de terminação, os hidroperóxidos lipídicos, por clivagem da ligação carbono-carbono, podem ainda dar origem a fragmentos menores, incluindo aldeídos (malondialdeído – MDA) e cetonas (Emerson et al., 2001). Adicionalmente a oxidação lipídica, a apoB100 fragmenta-se devido à cisão oxidativa produzindo peptídeos de tamanhos variados (14kDa-500kDa) (Svesjo et al., 2003). Os produtos formados resultam em alterações conformacionais, pela perda da estrutura terciária e por alterações de carga elétrica, resultando em uma proteína com carga negativa aumentada (Avogaro et al., 1988). Esta alteração de carga elétrica resultará na redução de ligações ao receptor B/E, altamente regulado, e no aumento de reconhecimento pelo receptor *scavenger* dos macrófagos, levando ao acúmulo descontrolado de LDL por estas células e à consequente formação de células espumosas, que caracteriza a lesão primária da aterosclerose (Teixeira Carvalho et al., 2010).

A reação de lipoperoxidação da LDL tem sido muito utilizada em métodos experimentais que visam avaliar a oxidação da LDL *in vitro*, deste modo inferindo seu estado oxidativo *in vivo*. Valendo-se desta reação facilmente induzida pela presença de íons metálicos, é possível quantificar e qualificar a cinética da modificação oxidativa. Os íons metálicos comumente utilizados *in vitro* são o cobre e o ferro. A LDL oxidada por ferro (FeLDL) representam partículas minimamente modificadas com insignificante modificação protéica (Chatterjee et al., 2004). Já a LDL oxidada por íons cobre (CuLDL) produzem partículas com extensiva modificação e perda da integridade (Pentikäinen et al., 1996).

Assim, vários resultados mostrados por nosso grupo de estudo e por outros pesquisadores confirmam o papel da LDL oxidada na aterogênese *in vivo* e *in vitro*, entre eles, destacam-se:

1. Nas lesões ateroscleróticas em animais de laboratório e em humanos, a LDL apresenta sinais de oxidação, e no soro humano são encontrados epítomos biologicamente ativos da oxLDL (Carvalho et al., 2000; Ketelhuth et al., 2008);
2. A oxLDL induz resposta celular com expressão de moléculas de adesão, quimiotaxia e recrutamento de monócitos, proliferação celular, vasoconstrição e citotoxicidade para células endoteliais estimulando a liberação de moléculas inflamatórias (Frostedgard et al., 1990; Frostedgard et al., 1991; Svesjö et al., 2003);
3. *In vitro*, macrófagos captam oxLDL com maior avidéz, quando comparada a captação de LDL não oxidada, o que leva a formação das células espumosas (Carvalho et al., 2002; Carvalho Teixeira et al., 2010);
4. A oxLDL contribui para a presença de células T e B na placa de ateroma (Stemme et al., 1995);
5. Estudos sugerem um possível envolvimento de infecções e reações imunológicas a patógenos na produção de anticorpos oxLDL (Liuba et al., 2003; Ronchini et al., 2004);
6. Formas modificadas da LDL interagem com monócitos e/ou macrófagos, dependendo do grau de oxidação. Modificações na partícula de LDL são capazes de aumentar a expressão de CD36 e FcγRII em linhagem humana de monócitos TH-1. O aumento da expressão de FcγRII é dependente de PPARγ enquanto que a expressão de CD36 não é dependente de PPARγ. (Rios et al., 2008);
7. Animais submetidos à poluição atmosférica apresentam maiores títulos de anticorpos oxLDL e de anticorpos anti-peptídeo D (Soares et al., 2009);

8. Mulheres menopausadas que receberam reposição hormonal apresentaram aumento nos títulos de anticorpos anti-oxLDL e diminuição na concentração de LDL oxidada (Uint et al., 2003);

9. Experimentos utilizando íons cobre para oxidação da LDL *in vitro* mostram claramente modificações topológicas da LDL, bem como a existência de agregados. (Gomez et al., 2010 – Foto 4).

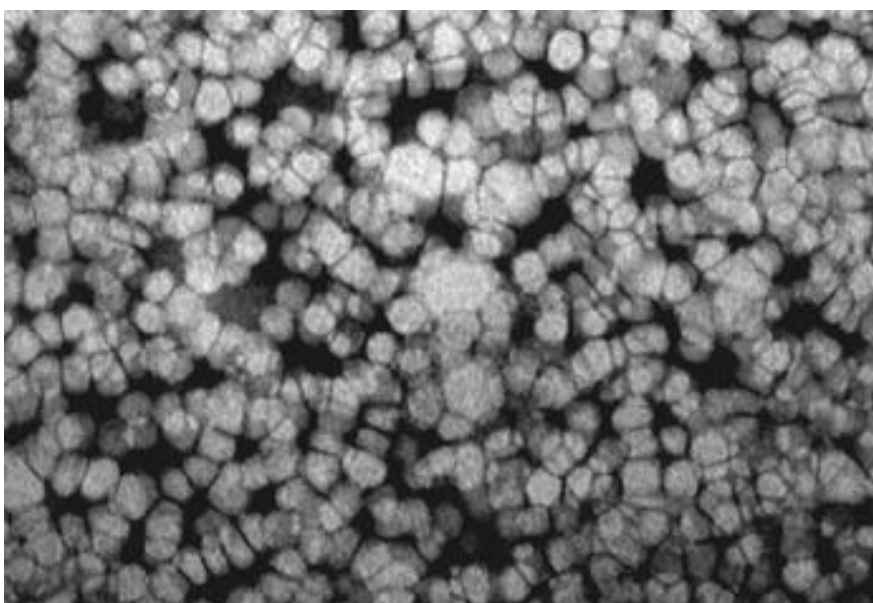


Foto 4 – Microscopia eletrônica de transmissão de LDL modificada por cobre.
Fonte: Gomez et al. (2010).

1.8 MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DA OXIDAÇÃO DA LDL

Até os dias de hoje para avaliação da oxidação da LDL, se faz necessário o isolamento desta lipoproteína. O isolamento é feito geralmente por ultracentrifugação utilizando gradiente de densidade das lipoproteínas para separá-las. Na maioria dos estudos experimentais e em humanos, a oxidação da LDL vem sendo avaliada por métodos indiretos (determinação de produtos da peroxidação lipídica, avaliação da susceptibilidade da LDL à oxidação, e por alteração na mobilidade eletroforética) e, o único meio para acessar a oxidação da LDL *in vivo* tem sido a quantificação de autoanticorpos contra oxLDL e a oxLDL por métodos imunológicos.

Uma das propriedades que diferenciam a LDL nativa (não modificada) da oxLDL é a sua capacidade imunogênica, sendo assim considerada um autoantígeno formado na lesão aterosclerótica. Estudos têm indicado que a resposta imune a formas modificadas de LDL estão presentes no plasma humano e tais anticorpos parecem contribuir no *clearance* desses antígenos. Existe uma extensa literatura de determinação de anticorpos contra epítomos da LDL modificada em modelos animais (Palinski et al., 1996) e em humanos (Santos et al., 2009).

Nos últimos dez anos, inúmeros estudos têm sido realizados com o intuito de avaliar a importância clínica dos anticorpos anti-oxLDL no desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Anticorpos anti-oxLDL são considerados importantes na regulação dos níveis de oxLDL. Desta maneira, anti-oxLDL são encontrados em crianças (Iughetti et al., 1999), adultos saudáveis e em indivíduos com doenças coronárias.

Soltest et al. (2007) analisaram, a concentração de PCR e os títulos de anticorpos anti-oxLDL em 50 indivíduos saudáveis e compararam com 33 indivíduos com síndrome coronária aguda e 62 indivíduos com doença coronariana. De acordo com os autores, indivíduos com síndrome coronária aguda e indivíduos com doença coronariana apresentaram significativamente maiores títulos de anticorpos oxLDL quando comparados ao controle. Correlação positiva foi encontrada entre concentração de PCR e anticorpos oxLDL. Com esses dados os autores concluem que a presença dos anticorpos anti-oxLDL é fator importante como preditor de manifestações cardiovasculares.

Em estudo recentemente publicado, Brandão et al. (2010), analisaram os títulos de anticorpos anti-oxLDL em pacientes hipertensos. Os pacientes foram tratados com anti-hipertensivos e acompanhados por 12 semanas. Os autores verificaram que o controle da hipertensão, os títulos de anticorpos anti-oxLDL aumentaram significativamente e concluíram que esse aumento pode ser protetor.

Já na doença periodontal apenas um estudo analisou os títulos de anticorpos anti-oxLDL no plasma de 50 indivíduos sistemicamente saudáveis e com periodontite e compararam com 46 indivíduos sistemicamente saudáveis e sem doença periodontal (Buhlin et al., 2003). Os resultados não mostraram diferença significativa na concentração de anti-oxLDL entre o grupo com periodontite e o grupo sem doença periodontal.

Apesar dos esforços dos pesquisadores, o papel da LDL modificada e dos anticorpos no desenvolvimento de doenças cardiovasculares permanece controverso.

Isso se deve ao fato de que a população de anticorpos é diversa; os epítomos formados durante a modificação da LDL a qual se ligam os anticorpos são heterogêneos; a população pode em princípio constituir de fragmentos diferentes da apoB100 (Ketelhuth et al., 2008), de epítomos de fosfolípidos e até mesmo de outras proteínas que funcionariam como co-fatores.

Por isso, a busca por métodos que possam determinar diretamente a quantidade de LDL modificada no plasma fez com que nosso laboratório em associação com o Grupo de Fluidos Complexos do Instituto de Física da Universidade de São Paulo desenvolvesse uma metodologia de avaliação da LDL e da LDL modificada através de varredura-Z. Esta técnica é muito utilizada por físicos da matéria condensada, na medida de propriedades ópticas não-lineares de materiais. Até então, ela não havia sido utilizada com essa finalidade. Esta avaliação tem como princípio geral a propriedade de que, quando um feixe de luz ilumina um meio parcialmente transparente, a absorção de radiação processada em tempos da ordem de milissegundos, é convertida em calor e imprime uma dada característica própria da amostra em estudo. Forma-se uma lente térmica que é caracterizada fisicamente pelo coeficiente termo-óptico da amostra. Assim, a medida consiste em colocar uma amostra do material em estudo no caminho do feixe de luz focalizado, com perfil Gausseano, e transladá-la ao longo da direção z, passando pelo foco. Um detector com uma íris é colocado no campo distante, longe do foco, para registrar a transmitância da amostra. Com esses sinais medidos nas diferentes posições z da amostra, constrói-se uma curva-resposta do material estudado e dela pode-se obter as propriedades ópticas não-lineares de interesse.

Os experimentos de varredura-Z realizados com LDL nativa e oxidada por íons cobre (CuSO_4), nas mesmas condições experimentais, forneceram resultados muito diferentes, mostrando que cada amostra possui uma “impressão digital” própria (Gomez et al., 2004 - Figura 2).

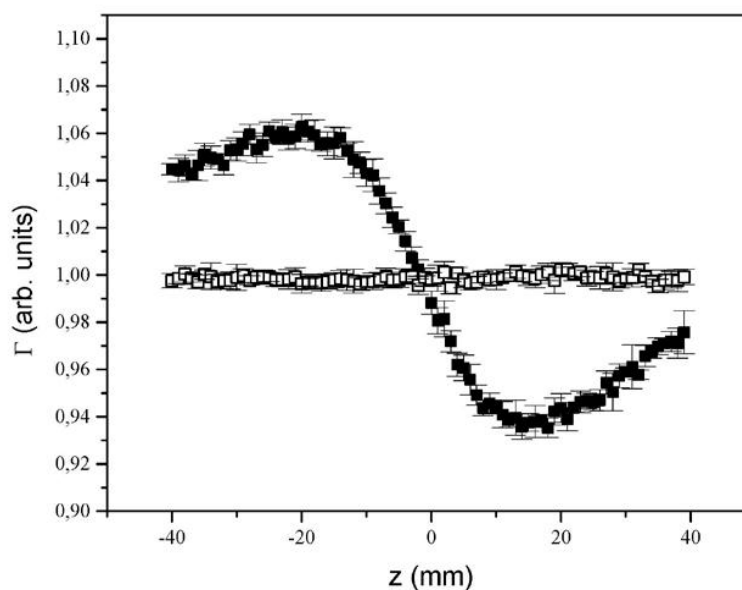


Figura 2 – Transmitância normalizada em função da posição da amostra. Varredura-Z da LDL nativa (■) e da oxidada com CuSO_4 (□)

A curva típica de Varredura possui um pico e um vale e a amplitude da diferença de transmitância pico-vale é proporcional ao coeficiente termo-óptico da amostra: quanto maior a amplitude pico-vale, maior o coeficiente termo-óptico. No caso da solução com a LDL nativa verifica-se a existência de uma curva típica de Varredura-Z, cuja amplitude pico-vale não é nula e depende da concentração de partículas na solução: quanto maior a concentração de LDL, maior a amplitude pico-vale. Por outro lado, a solução de LDL oxidada com íons cobre não apresenta a curva típica de Varredura-Z. Desta forma é possível construir uma curva que relaciona a concentração de LDL não modificada na solução com a amplitude pico-vale resultante do experimento de Varredura-Z.

Nós usamos LDL purificada de pacientes para determinação da oxLDL. Para isso a LDL foi isolada por ultracentrifugação. A varredura Z fornece importante informação da estrutura da partícula de LDL como mencionado anteriormente. Sabe-se que o evento inicial é crucial e uma vez iniciado progredirá até que a partícula esteja destruída completamente.



O coeficiente de transformação (K_{ox}) determinará a velocidade pela qual a LDL (LDL-V) será oxidada.

A quantidade de oxLDL irá depender da concentração da LDL-V, na qual nós sabemos que altos níveis são fatores de risco e vulnerabilidade de oxidação. Essa vulnerabilidade irá depender de uma série de fatores incluindo: composição da partícula, a densidade e o mais importante o conteúdo antioxidante. A análise por varredura-Z nos dá um valor numérico de propensão da LDL oxidar e consequentemente representa uma nova e inédita técnica com futuro promissor.

Assim, embora existam estudos que associam a condição periodontal à doença cardiovascular, há poucos trabalhos especificamente elaborados para elucidar os potenciais efeitos sistêmicos da disseminação de microorganismos orais e seus produtos em humanos. Muitos estudos que relatam uma associação entre a periodontite e doença cardiovascular são baseados em estudos epidemiológicos, os quais não foram inicialmente planejados para examinar as relações entre a doença periodontal e a doença cardiovascular. Além disso, muitos relatos de associação representam análises retrospectivas de conjuntos de dados existentes. A partir dessa realidade, e por considerar que, (i) tanto médicos quanto dentistas devem ter uma análise significativa do impacto da periodontite sobre marcadores de risco para aterosclerose e (ii) mais indivíduos possam ser monitorados e ter seus riscos diminuídos para doenças cardiovasculares, surgiu a ideia de desenvolver este trabalho.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar a influência do tratamento periodontal sobre os marcadores de risco para aterosclerose em pacientes com periodontite crônica.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar perfil lipídico;
- Avaliar padrão de citocina (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 e TNF- α ;) e PCR;
- Verificar a produção de auto-anticorpos oxLDL;
- Verificar sinais de oxidação da LDL por TBARS;
- Avaliar comportamento da LDL dos pacientes na Varredura Z;
- Avaliar todos esses marcadores 3, 6 e 12 meses após o término do tratamento periodontal.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 METODOLOGIA

3.1.1 População

Para melhor entendimento do desenho do projeto, o estudo foi dividido em duas etapas. Na primeira etapa foi realizado um estudo observacional do tipo caso-controle onde o grupo caso é formado por pessoas expostas ao fator de risco, ou seja, indivíduos com periodontite crônica e o grupo controle por pessoas não expostas ao fator de risco, isto é, que não apresentam doença periodontal.

Para isso foram selecionados 40 indivíduos sistemicamente saudáveis com periodontite crônica (22 mulheres e 18 homens; idade entre 31 a 60 anos; com média de idade: $45,2 \pm 9,9$ anos) e 40 indivíduos sistemicamente saudáveis sem doença periodontal (24 mulheres e 16 homens; idade entre 31 a 60 anos; com média de idade: $44,8 \pm 8,6$ anos) no Departamento de Periodontia da Associação Paulista de Cirurgiões Dentistas de São José dos Campos, São Paulo, Brasil.

Na segunda etapa do projeto foi realizado um estudo experimental clínico, onde os indivíduos com periodontite crônica passaram por tratamento periodontal adequado aos princípios técnicos científicos reconhecidos pela Odontologia. Após o término do tratamento esses indivíduos foram reavaliados três, seis e dozes meses.

3.1.2 Aspectos éticos

O projeto que fundamenta este estudo foi aprovado pelo Comitê Ético em Pesquisa para Humanos do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo sob o número 783/CEP, realizado no dia 13 de junho de 2007. Todos os participantes foram orientados quanto aos objetivos do estudo e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo A) do qual estão de acordo em participar do estudo.

3.1.3 Determinação do fator de risco: periodontite crônica

Os indivíduos foram examinados por um único operador previamente calibrado ($Kappa = 0,92$) através de uma sonda periodontal automática (Florida probe TM) e um espelho clínico plano (Foto 5).



Foto 5 - Exame clínico. Indivíduo com periodontite crônica. Presença de cálculos supra e subgingival.

Foram registrados a profundidade clínica de sondagem (PCS), o nível clínico de inserção (NCI) e o índice de sangramento (IS) em 6 sítios por dente (Figura 3).

A PCS correspondeu à distância da margem gengival ao ponto mais apical do fundo do sulco/bolsa. O número PCS foi expresso como a porcentagem do número de bolsa com profundidade maior que 4 mm em todos os sulcos/bolsas examinados. O NCI foi avaliado com a mesma sonda e traduzido como a distância em milímetros da junção cimento-esmalte até o fundo do sulco gengival ou da bolsa. A recessão gengival correspondeu à distância da margem gengival até a junção cimento-esmalte. O IS refere à presença ou ausência de sangramento após sondagem do sulco gengival com a sonda periodontal,

MATERIAL E MÉTODOS

mesmo sem características visíveis de alterações marginais. Quando ocorreu sangramento em até 10 segundos após a sondagem, considerou-se o IS positivo. O número de achados positivos foi expresso como a porcentagem do número de margens gengivais examinadas.

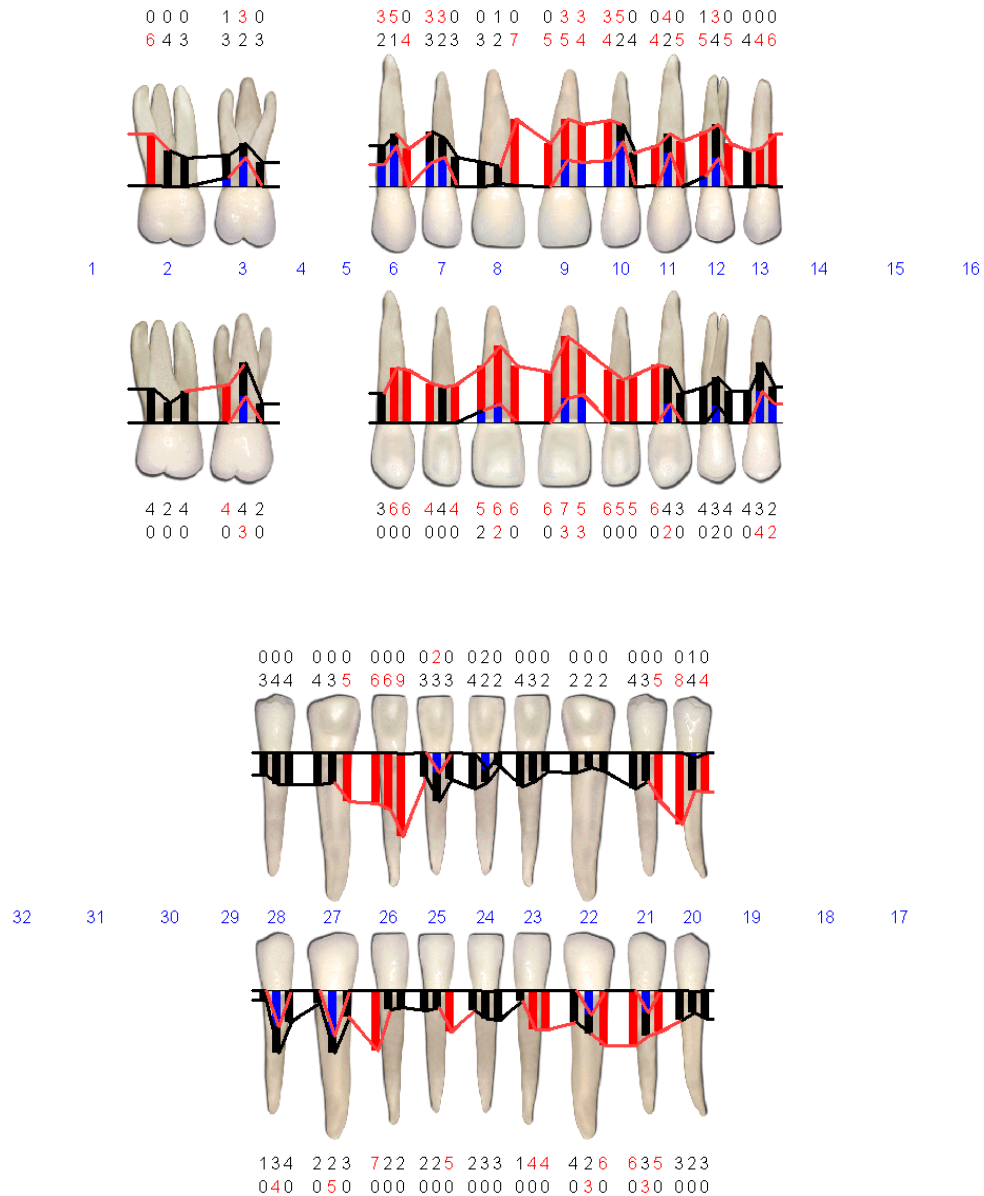


Figura 3 – Exame periodontal. Exame realizado em indivíduo com doença periodontal crônica realizado com sonda periodontal automática (Florida Probe). Barras pretas – Profundidade de Bolsa até 4 mm; Barras vermelhas – Profundidade de Bolsa > 4mm ; Barras azuis – Medida de recessão gengival

O critério para enquadrar o indivíduo como portador de periodontite crônica foi à presença de no mínimo dezesseis dentes (excluindo os terceiros molares) e mais de dez

sítios com PCS maior de 5 mm. O critério para enquadrar o indivíduo no grupo controle foi a ausência de manifestações clínicas e radiográficas de doença periodontal, ausência de sítios com PCS maior ou igual a 4 mm, e apresentar mais que dezesseis dentes (com exceção dos terceiros molares).

As medidas foram realizadas posicionando-se a sonda paralelamente ao longo eixo do dente em três locais: nas faces mesial, centro e distal tanto por vestibular como por lingual (Figura 4).

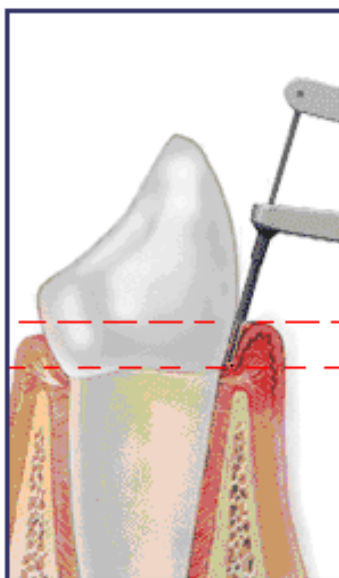


Figura 4 – Método correto de sondagem. Esta imagem mostra o método correto para coletar dados exatos da profundidade de bolsa. Uma vez que a sonda é calibrada, o computador calculará automaticamente a diferença de distância entre a ponta da sonda e a margem gengival (Florida Probe).

3.1.4 Critérios de exclusão e inclusão

Foram excluídos indivíduos que receberam tratamento periodontal nos últimos seis meses e fizeram uso de antibióticos e/ou anti-inflamatórios nos últimos três meses. Nenhum indivíduo fazia uso de medicação cardiovascular. Também foram excluídos indivíduos com disfunções sistêmicas diagnosticadas como diabetes, obesidade, hipertensos e indivíduos fumantes e ex-fumantes. Indivíduos com infecção pulpar ou periapical foram excluídos do estudo.

Os indivíduos dentro dos padrões de inclusão receberam e assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo A) do qual estão de acordo para participar do estudo.

3.1.5 Avaliação periódica dos fatores de risco

Na consulta inicial foi realizada anamnese (Anexo B) e exame periodontal. Em seguida os indivíduos foram encaminhados para a primeira coleta de sangue. Após a coleta de sangue, os indivíduos começaram o tratamento periodontal (Foto 6A). Todos os indivíduos foram reavaliados aos três, seis e doze meses após o término do tratamento periodontal, registrando as mudanças em relação à existência e grau de periodontite (Foto 6B) e exames laboratoriais sanguíneos para a determinação dos marcadores de risco para aterosclerose.

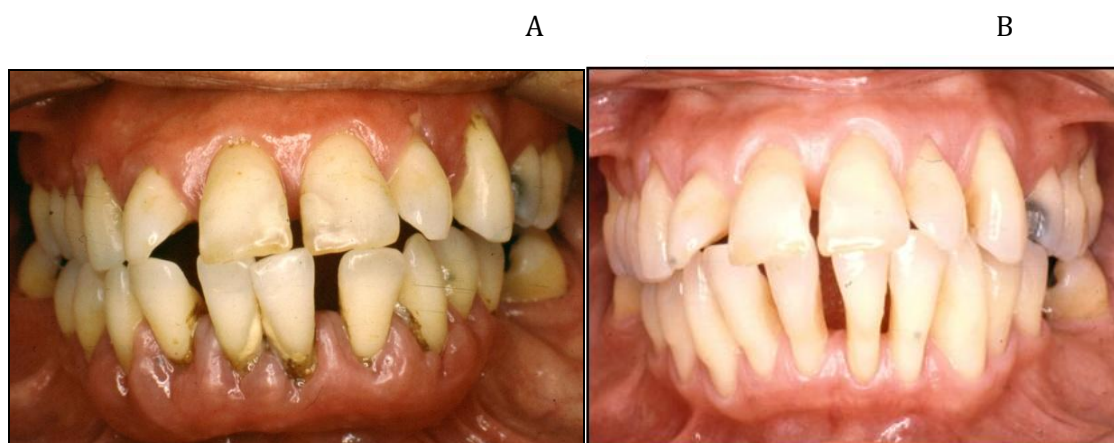


Foto 6 - Exame clínico

Foto 6A - Antes tratamento periodontal.

Foto 6B - Três meses após o término do tratamento periodontal.

3.2 ANÁLISES LABORATÓRIAS

3.2.1 Preparação da LDL

A LDL foi obtida de indivíduos em jejum de 12 horas com doença periodontal diagnosticada e de indivíduos sem doença periodontal diagnosticada e clinicamente saudáveis. Ao plasma dos voluntários foram adicionados os seguintes preservantes: 2 mM benzamida, 0,5% de gentamicina, 0,25% cloranfenicol, 0,5 mM fenilmetilsulfonilflúor (PMSF), e 0,1 unit/mL de aprotinina. A fração de LDL foi obtida por ultracentrifugação seqüencial (Havel et al., 1955) utilizando-se 75 Ti rotor (Hitachi Centrifuge), a 4 °C, 100.000 x g. Inicialmente o plasma foi centrifugado durante 20 horas para obtenção da lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL - densidade = 1,006 g/mL). Após esse período a densidade do infranadante foi acertada para 1,063 g/mL com adição de brometo de potássio (KBr) e, em seguida centrifugado durante 20 horas (100.000 x g, a 4 °C), para obtenção da LDL (densidade <1,063 g/mL). A LDL presente no sobrenadante foi retirada e dialisada por 24 horas em solução PBS – tampão fosfato (NaCl 0,9%, Na₂HPO₄ 0,2%, NaOH 0,38% e EDTA 0,001% pH =7,4) a 4 °C e ao abrigo da luz. Após este processo a LDL foi filtrada com filtro de 0,22 µm de diâmetro (Millipore). As proteínas foram quantificadas utilizando-se o Kit BCA (PIERCE) de acordo com as instruções do fabricante.

3.2.2 Oxidação da LDL

A LDL foi obtida de um pool de indivíduos normolipidêmicos e sem doença periodontal em jejum de 12 horas, para a sensibilização de placas de 96 poços para detecção de auto-anticorpos para oxLDL. Para obtenção da oxLDL, a LDL foi dialisada em PBS por 24 h a 4 °C, para retirada do EDTA. Em seguida a LDL foi incubada com CuSO₄ 20 µM, por 18h a 37 °C, como padronizado em nosso laboratório. Após este período, a oxidação foi bloqueada pela adição de EDTA 1mM ao meio contendo LDL com cobre.

3.2.3 Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)

Para avaliar o grau de oxidação da LDL foi realizada a dosagem de TBARS (Puhl et al., 1994), formados a partir da peroxidação lipídica da partícula. Foram incubados 50 µL de amostra com 200 µL de reagente de TBARS (ácido tiobarbitúrico 1%, ácido clorídrico 562,5 µmol e ácido tricloroacético 15%, para 100 mL de água bidestilada). A mistura foi colocada em sob fervura, a 100 °C por 15 min., centrifugada a 1000 x g por 10 min. O sobrenadante foi retirado e a leitura da absorbância foi medida utilizando-se filtro de 540 nm em um leitor de microplacas (Genios Tecan, Austria). Os resultados são expressos baseando-se em uma curva padrão de Malondialdeído (MDA) (TOP, Merck, Alemanha).

3.2.4 Dosagem de HDL, triacilglicerol e colesterol total

O conteúdo de colesterol total, HDL e de TG foi determinado por métodos enzimáticos colorimétricos (Liquiform, LabTest-Diagnóstica, Brasil) utilizando as informações do fabricante. As frações de LDL foram calculadas conforme a fórmula de Friedewald ($LDL = CHOL - HDL - TG/5$) (Friedewald et al., 1972). Para identificar indivíduos com concentrações anormais, os seguintes valores foram usados de acordo com a recomendação do fabricante: Colesterol Total ≥ 200 mg/dL, LDL ≥ 130 mg/dL, TG ≥ 150 mg/dL e HDL < 40 mg/dL.

3.2.5 Detecção de anticorpos contra oxLDL

Para dosagem de auto-anticorpos contra oxLDL, foi utilizado o método ELISA padronizado em nosso laboratório (Fernvik et al., 2004). Placas de 96 poços (Costar, EUA) foram sensibilizadas com 50 µL, na concentração de 7,5 µg/mL de oxLDL em tampão carbonato de sódio, 0,1 M, pH 9,4, durante 18h, a 4 °C. Após 4 ciclos de lavagens com 100

μL de PBS, as placas foram bloqueadas com solução de gelatina a 1,0% (Gibco, EUA), em temperatura ambiente, por 24h. Em seqüência, as placas foram lavadas 4 vezes com PBS e os poços receberam, em triplicata, 50 μL das amostras dos diferentes grupos, diluídas 1:400 em PBS. Após 2 horas de incubação, as placas foram lavadas 4 vezes com 100 μL de PBS-T e incubadas com 50 μL de conjugado com peroxidase, por 1h, em temperatura ambiente. Foi utilizado como conjugado imunoglobulina (Ig) G de cabra anti-IgG humana marcada com peroxidase (KLP, EUA) na diluição 1:1000. Posteriormente a mais 4 ciclos de lavagem, com PBS-T, o processo de revelação foi realizado com a adição, em cada poço, de 75 μL de solução de TMB (250 μL de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina 6,5% em DMSO, 12 mL de tampão citrato 0,1M, pH 5,5 e 10 μL de H₂O₂). A reação foi interrompida com a adição de 25 μL de ácido sulfúrico 2M (Merck, Alemanha). Os resultados foram obtidos por leitura espectrofotométrica a 450 nm em leitor de ELISA (Genios Tecan, Austria). Algumas imprecisões podem ocorrer no método de quantificação dos anticorpos por ELISA e para compensar a variação intra-placa nós utilizamos em todas as placas como controle IgG purificada humana (purified human IgG – 10 mg/ml – Pierce Protein Research Products, Thermo Scientific, Rockford). Os títulos de anticorpos foram expressos como Índice de Reatividade (IR) para cada amostra e calculado da seguinte maneira: (Abs da amostra – Abs do Branco)/(Abs do controle de IgG - ABS do Branco).

3.2.6 Concentrações séricas de IL-1β, IL-6, IL-8, IL-10 e TNF-α.

Os anticorpos monoclonais, específicos para as citocinas, foram diluídos em tampão Carbonato-bicarbonato 0,1 M, pH 9,6. Um volume de 30 μL foi adicionado em placas de ELISA de 96 poços (Costar, EUA), que foram incubadas por 18 h, a 4 °C. Após 4 ciclos de lavagens com 100 μL de PBS, as placas foram bloqueadas com solução PBS com 10% de soro fetal bovino (Gibco, EUA), em temperatura ambiente, por 2h. Em seqüência, as placas foram novamente lavadas 4 vezes com PBS e os poços receberam, em duplicata, 30 μl das amostras dos soros dos indivíduos, diluídas 1:10 em PBS a 10% de soro fetal bovino (Gibco, EUA) em PBS. Após duas horas de incubação, as placas foram lavadas com PBS-T e incubadas com 25 μL de conjugado biotilado, específicos para as citocinas, conforme as recomendações do Kit (B&D, EUA). Após 4 ciclo de lavagem, com volumes de 100 μL de PBS-T, os poços receberam 30 μl de esterptoavidina-peroxidase, diluída 1:250

em solução de PBS com 10% de soro fetal bovino (Gibco, EUA), por 2h, em temperatura ambiente. Após mais 4 ciclos de lavagem com volumes de 100 µL de PBS-T, o processo de revelação foi realizado com a adição, em cada poço, de 75 µL de solução de TMB (250 µL de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina 6,5% em DMSO, 12 mL de tampão citrato 0,1M, pH 5,5) e 10 µL de H₂O₂, substrato para enzima peroxidase. A reação foi interrompida 30 min. após seu início, com a adição de 25 µL de ácido sulfúrico 2M (Merck, Alemanha). Os resultados foram obtidos por leitura espectrofotométrica a 450 nm em leitor de placas de ELISA (Genios Tecan, Austria). O cálculo das concentrações foi obtido a partir de curva padrão das citocinas, segundo a orientação dos kits.

3.2.7 Proteína C-Reativa de alta sensibilidade (PCR-us)

A determinação da PCR foi realizada pelo método imunoturbidimétrico com detecção ultra-sensível automatizado (Advia, Alemanha).

3.2.8 Leucograma

O sangue dos pacientes foi coletado em tubos com EDTA para a realização do leucograma por meio de contador de células automático com diferencial de leucócitos (Pentra DX 120, Japão).

3.2.9 Variáveis clínicas

As variáveis clínicas foram obtidas conforme os seguintes parâmetros.

- IMC : O índice de massa corpórea foi calculado pela fórmula. Onde o peso é dado em kilogramas (kg) e a altura em metro (m).

$$\text{IMC} = \frac{\text{Peso (Kg)}}{\text{Altura x Altura (m)}}$$

- Pressão Arterial: Os pacientes permaneceram por aproximadamente 15 minutos em repouso e os registros da Pressão Arterial Sistêmica (PAS) e da Pressão Arterial Diastólica (PSD) braquial foram realizados na posição sentada pelo

método auscultatório de *Korotkoff* utilizando um esfigmomanômetro de coluna de mercúrio e um estetoscópio.

- A razão de triacilglicerol por HDL foi calculada pela fórmula (Razão TG/HDL).

3.2.10 Análise física através de Z-scan

Quando um feixe de luz ilumina um meio não transparente, um processo de absorção da radiação ocorre em milissegundos e que, converte a luz absorvida em calor. O índice de refração depende, entre outros fatores, da temperatura. Um aumento (ΔT) da temperatura induz uma mudança $\Delta n = (dn/dT) \Delta T$ no índice de refração (Gomez et al., 2004), em que o parâmetro dn/dT é o coeficiente termo-óptico. Nesta estrutura, um feixe com uma configuração Gaussiana induz a uma lente térmica no meio. As características desta lente dependem do meio, particularmente da condutividade térmica e do coeficiente térmico.

Nesta técnica, um feixe Gaussiano polarizado é focado em um centro estreito por uma lente e a amostra é movimentada através do ponto focal. A transmitância da íris, centralizada no eixo z (eixo que propaga o feixe de laser) neste campo, é medido como uma função da posição da amostra ao longo do eixo z. Na aproximação parabólica da lente térmica induzida, a amplitude do sinal de z-scan é dada pelo parâmetro descrito como:

$$\Theta = \frac{2.303 P}{\lambda} \left(- \frac{dn}{dT} \right) \frac{\alpha}{\kappa}$$

Onde, α é o coeficiente óptico de absorção linear (cm^{-1}), λ é o comprimento do laser (nm), κ é a condutividade térmica ($\text{cal s}^{-1} \text{cm}^{-1} \text{K}^{-1}$) e P a força de incidência do feixe de laser.

3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada utilizando software R2.6. O objetivo inicial foi analisar se fatores conhecidos associados às doenças arteriais coronarianas (CAD), tais como obesidade e maior incidência em homens, também eram fatores de risco para periodontite. Esses fatores são chamados de fatores de confusão porque alguns deles podem ser fatores de risco apenas para CAD e não para periodontite. Para esse objetivo, a associação entre a incidência de periodontite e fatores de confusão independentes foram analisados usando modelo de regressão logística ajustado para idade, sexo e índice de massa corporal (IMC). Essas variáveis foram escolhidas porque são relatadas serem fatores de risco para doenças cardiovasculares.

Métodos estatísticos não paramétricos (teste aproximado Kruskal-Wallis) foram utilizados para as variáveis contínuas no estudo de caso-controle. Finalmente nós analisamos se a periodontite é fator de risco para níveis patológicos de lipídios usando modelo de regressão logística também considerando idade, sexo e IMC.

Na segunda etapa do estudo, quando foi comparado o antes e o depois (três, seis e doze meses) do tratamento periodontal, os dados para as variáveis categorizadas foram aplicados o teste qui-quadrado. Nos modelos mistos, usados para analisar a evolução temporal no grupo caso o teste aplicado foi de Wald. E finalmente para análise de associação entre as variáveis sexo, IMC, idade e tempo, foi aplicado o teste da razão de verossimilhanças.

O tamanho amostral foi obtido através da expressão:

$$n = \frac{Z_{1-\alpha/2}^2 p(1-p)}{d^2}$$

n = tamanho da amostra,

$Z_{1-\alpha/2}$ = o quantil de uma distribuição normal com coeficiente de confiança $(1 - \alpha)$,

p = proporção ou prevalência esperada,

d = precisão ou erro esperado na estimativa.

Considerando a prevalência da periodontite para população em geral de 40% conforme relatado em estudos epidemiológicos (Albandar et al.,2002), com poder de teste de 90% chegamos a um número de 29 indivíduos para cada grupo.

4 RESULTADOS

4.1 CASUÍSTICA

As características dos indivíduos participantes do estudo estão sumarizadas na Tabela 1. O estudo incluiu no total 80 indivíduos, sendo 40 no grupo com periodontite crônica e 40 no grupo controle. No grupo caso, 22 indivíduos eram do sexo feminino e 18 do sexo masculino. No grupo controle 24 indivíduos eram do sexo feminino e 16 do sexo masculino, não havendo diferença entre os grupos quanto ao percentual de cada sexo ($P>0,6$). No grupo com caso, a média de idade foi de 45,1 ($\pm 9,9$) e no grupo controle foi de 44,7 ($\pm 8,6$), também não havendo diferença significativa quanto à idade ($P>0,3$). Não foi verificada diferença significativa quanto à etnia ($P>0,6$) e IMC ($P>0,6$), entre os dois grupos.

Tabela 1 – Característica clínica dos indivíduos dos grupos controle e periodontite.

Variáveis	Controle (n=40)	Periodontite (n=40)	Valor de <i>P</i>
Sexo (homem/mulher)	16/24	18/22	0,6 ¹
Idade (anos)	44,7 (8,6)	45,1 (9,9)	0,3 ¹
Raça (branco/negro)	36/4	37/3	0,6 ¹
IMC	26,2 (3,3)	26,9 (3,0)	0,6 ¹
Nº de dentes	23,7 (3,7)	23,2 (3,7)	0,5 ²
PCS > 4 mm (%)	0 (0,0)	39,3 (15,8)	-
IS (%)	15,3 (12,9)	73,5 (18,8)	<0,0001 ^{2*}

Dados são expressos em média (desvio padrão). IMC – Índice de massa corporal; PCS – Profundidade clínica de sondagem; IS – Índice de sangramento. 1- Foi aplicado o teste qui-quadrado; 2 – Foi aplicado o teste t-student. * Diferença significativa entre os grupos $p<0,05$.

A média do número de dentes nos indivíduos com periodontite foi de 23,2 ($\pm 3,7$) e no grupo controle foi de 23,7 ($\pm 3,7$), não havendo diferença significativa entre os grupos ($P=0,5$). Quando a profundidade de bolsa foi analisada, indivíduos do grupo periodontite apresentaram 39,3% ($\pm 15,8$ %) dos sítios sondados uma profundidade de bolsa maior que 4 mm enquanto que, nenhum indivíduo do grupo controle apresentou

RESULTADOS

profundidade de bolsa maior que 4 mm. Outro parâmetro periodontal analisado foi o índice de sangramento. Indivíduos com periodontite crônica apresentaram sangramento em 73,5 % (\pm 18,8 %) dos sítios sondados enquanto que os indivíduos do grupo controle apresentaram sangramento em 15,30 % (\pm 12,9 %) dos sítios, havendo assim diferença significativa ($P < 0,0001$). Não houve diferença significativa para os parâmetros periodontais quando os dados foram ajustados quanto ao sexo, idade, etnia e IMC.

As diferenças nos parâmetros periodontal entre o antes e depois do tratamento estão indicadas na Tabela 2.

Tabela 2 - Parâmetros periodontais antes e depois do tratamento

Variáveis	Antes		Após o tratamento	
	Basal	3 meses	6 meses	12 meses
Nº de dentes	23,2 (3,7)	20,6 (4,5)	20,6 (4,5)	20,6 (4,5)
PCS > 4 mm (%)	39,3 (15,8)	1,8 (3,1)	1,8 (3,1)	1,8 (3,1)
IS (%)	73,5 (18,8)	19,9 (11,3)	20,0 (9,7)	18,6 (7,5)

Dados são expressos em média (desvio padrão). PCS – Profundidade clínica de sondagem; IS – Índice de sangramento.

O tratamento periodontal com sucesso reduziu a intensidade da inflamação local. Os marcadores clínicos da doença diminuíram significativamente, como foi observado no IS e na quantidade de bolsa com profundidade maior que 4 mm. Assim, o valor da média do IS (73,5% versus 18,6%; $P < 0,0001$) e da PCS maior que 4mm (39,3% versus 1,8%; $P < 0,0001$) diminuiu significativamente quando comparamos o antes e doze meses após o término do tratamento periodontal. Vale ressaltar que durante o período do estudo, nenhum dos indivíduos relatou qualquer mudança na dieta, no uso de medicação ou na atividade física.

A média do número de dentes nos indivíduos com periodontite foi de 23,2 (\pm 3,7) e no grupo controle foi de 23,7 (\pm 3,7), não havendo diferença significativa entre os grupos ($P=0,5$). Quando a profundidade de bolsa foi analisada, indivíduos do grupo periodontite apresentaram 39,3% (\pm 15,8 %) dos sítios sondados uma profundidade de bolsa maior que 4 mm enquanto que, nenhum indivíduo do grupo controle apresentou profundidade

4.2 PERFIL LIPÍDICO.

Como mostra a Tabela 3, os níveis de colesterol total foram similares entre os indivíduos do grupo com periodontite e do grupo controle (204,0 mg/dL versus 193,5 mg/dL; $P=0,2$). Resultados similares também foram observados entre os dois grupos quando os níveis de LDL foram comparados (135,0 mg/dL versus 118,3 mg/dL; $P=0,1$). Entretanto, os níveis de TG foram significativamente mais altos em indivíduos com periodontite (118,0 mg/dL versus 93,5 mg/dL; $P=0,002$) e os níveis de HDL foram significativamente mais baixos (46,0 mg/dL versus 51,5 mg/dL; $P=0,013$) nos indivíduos com periodontite quando comparados ao grupo controle.

Tabela 3 – Mediana da concentração de lipídio plasmático dos dois grupos estudado

Lipídeo (mg/dL)	Controle		Periodontite		Valor P
	Mediana	D.P.	Mediana	D.P.	
CT	193,5	27,6	204,0	45,7	0,2
TG	93,5	41,2	118,0	104,7	0,002*
HDL	51,5	10,6	46,0	7,9	0,013*
LDL	118,3	22,8	135,0	40,8	0,1

CT=Colesterol Total; TG= Triacilglicerol; HDL – Lipoproteína de alta densidade; LDL Lipoproteína de baixa densidade; D.P. – Desvio Padrão. * Diferença estatística significativa ($P < 0,05$) entre os grupos.

A tabela 4 mostra que a frequência de hipercolesterolemia foi maior no grupo com periodontite ($n= 23$; 60,5%) quando comparado ao grupo controle ($n=15$; 39,5%). Num total de 80 indivíduos estudados, nós observamos que doze indivíduos apresentavam valores de LDL maiores que 130 mg/dL, dos quais 75,0% ($n=9$) dos indivíduos correspondiam ao grupo com periodontite. Em cinco indivíduos com periodontite (71,4%) e em dois indivíduos controle (28,6%), a concentração de HDL foi menor que 40 mg/dL. Dezesete indivíduos com periodontite (70,8%) e sete indivíduos controle (29,2%) apresentaram níveis de TG acima do recomendável (≥ 150 mg/dL).

Tabela 4 – Frequência de valores acima do recomendável de lipídios no plasma de indivíduos controle e indivíduos com doença periodontal crônica

Lipídeo	Controle			Periodontite		N° Total
	mg/dL	N°	%	N°	%	
Colesterol Total	(>200)	15	39,5	23	60,5	38
LDL	(>130)	3	25,0	9	75,0	12
HDL	(<40)	2	28,6	5	71,4	7
Triacilglicerol	(>150)	7	29,2	17	70,8	24

HDL – Lipoproteína de alta densidade; LDL Lipoproteína de baixa densidade.

Nós analisamos se a periodontite é fator de risco para níveis acima do recomendável de lipídios usando modelo de regressão logística ajustado para idade, sexo e IMC. Em todos os modelos, não foi verificada associação estatisticamente significativa entre essas variáveis e a presença de níveis de lipídios acima do recomendável. A exceção foi o resultado para TG, que sugere associação significativa entre os grupos (indivíduos com periodontite e indivíduos controle) e níveis elevados de TG ($P=0,001$; Odds Ratio =3,8; Intervalo de Confiança de 95% =1,17;3,27).

De acordo com nossos resultados, indivíduos com periodontite têm significativamente níveis plasmáticos mais altos de TG e menores níveis de HDL quando comparados ao grupo sem periodontite.

O perfil lipídico dos indivíduos foi então analisado de acordo com o sexo (Tabela 5). Os níveis de HDL foram menores em mulheres com periodontite quando comparado a mulheres sem periodontite (46,5 mg/dL versus 53,0 mg/dL; $P=0,02$). Também foi observado que mulheres do grupo controle apresentaram menores níveis de TG quando comparado a mulheres do grupo periodontite (74,5 mg/dL versus 110,5 mg/dL; $P=0,009$). Essa diferença também foi verificada entre mulheres e homens no grupo controle, ou seja, mulheres do grupo controle apresentaram menores níveis de TG quando comparadas a homens do grupo controle (74,5 mg/dL versus 114,5 mg/dL; $P=0,016$).

Tabela 5 – Perfil Lipídico ajustado de acordo com o sexo.

Lipídeo (mg/dL)	Controle		Periodontite	
	Mulheres (n=24)	Homens (n=16)	Mulheres (n=22)	Homens (n=18)
CT	192,0 (26,1)	199,0 (30,7)	194,0 (46,7)	225,0 (42,9)
TG	74,5 (32,9) ⁺	114,5 (45,4)	110,50 (118,3) ⁺	135,0 (87,3)
HDL	53,0 (10,2) [*]	48,0 (10,7)	46,5 (8,6) [*]	46,0 (7,2)
LDL	120,7 (18,4)	117,3 (28,2)	125,1 (45,8)	144,0 (34,3)

Dados são expressos em mediana (Desvio Padrão). CT=Colesterol Total; TG= Triacilglicerol; HDL= Lipoproteína de alta densidade; LDL= Lipoproteína de baixa densidade. A incidência da periodontite e variáveis independentes foi analisada utilizando modelo de regressão logística ajustada ao sexo.^{+*||} Diferença estatística significativa ($P < 0,05$) entre os grupos.

Os grupos foram então analisados considerando a idade dos indivíduos (Tabela 6). Os níveis de colesterol total foram mais baixos em indivíduos menores de 45 anos com periodontite quando comparados a indivíduos maiores de 45 anos com periodontite (183,0 mg/dL versus 221,0 mg/dL; $P=0,03$). Entre os indivíduos com idade acima de 45 anos, baixos níveis de LDL foram observados no grupo controle quando comparado ao grupo periodontite (120,4 mg/dl versus 145,0 mg/dL, $P= 0,006$). Os níveis de TG no grupo controle acima de 45 anos foram significativamente menores quando comparados a indivíduos acima de 45 anos e com periodontite (89,0 mg/dL versus 143,0 mg/dL; $P= 0,006$).

Tabela 6 – Perfil Lipídico ajustado de acordo com a idade.

Lípídeo (mg/dL)	Controle		Periodontite	
	Idade ≤ 45 anos (n=19)	Idade ≥ 45 anos (n=21)	Idade ≤ 45 anos (n=21)	Idade ≥ 45 anos (n=19)
CT	197,0 (25,7)	191,0 (29,4)	183,0 (45,0)	221,0 (41,5)
TG	98,0 (45,9)	89,0 (37,1)*	110,0 (139,7)	143,0 (38,5)*
HDL	48,0 (10,3)	53,0 (10,3)	46,0 (7,6)	47,0 (8,4)
LDL	117,5 (22,1)	120,4 (23,8) ⁺	118,8 (40,2)	145,0 (39,2) ⁺

Dados são expressos em mediana (Desvio Padrão). CT=Colesterol Total; TG= Triacilglicerol, HDL= Lipoproteína de alta densidade; LDL= Lipoproteína de baixa densidade. A incidência da periodontite e variáveis independentes foi analisada utilizando modelo de regressão logística ajustada a idade. ⁺^{||} Diferença estatística significativa ($P < 0,05$) entre os grupos.

Por fim os indivíduos foram analisados considerando o IMC (Tabela 7). Entre os indivíduos com IMC abaixo de 25 kg/m², indivíduos do grupo controle apresentaram menores níveis de TG quando comparados a indivíduos do grupo com periodontite (89,0 mg/dL versus 118,9 mg/dL; $P=0,06$).

Tabela 7 – Perfil Lipídico ajustado de acordo com o índice de massa corpórea

Lípídeo (mg/dL)	Controle		Periodontite	
	IMC < 25 kg/m ² (n=13)	IMC ≥ 25 kg/m ² (n=27)	IMC < 25 kg/m ² (n=11)	IMC ≥ 25 kg/m ² (n=29)
CT	192,0 (27,5)	205,0 (30,6)	204,0 (46,8)	210,5 (41,4)
TG	89,0 (43,3)*	98,0 (24,2)	118,0 (112,7)*	107,5 (26,9)
HDL	51,0 (11,0)	53,0 (8,5)	46,0 (8,0)	54,0 (7,6)
LDL	119,0 (23,1)	117,2 (21,3)	135,0 (41,0)	138,5 (42,1)

Dados são expressos em mediana (Desvio Padrão). CT=Colesterol Total; TG= Triacilglicerol; HDL= Lipoproteína de alta densidade; LDL= Lipoproteína de baixa densidade; IMC= Índice de massa corporal. A incidência da periodontite e variáveis independentes foi analisada utilizando modelo de regressão logística ajustada ao índice de massa corporal. *Diferença estatística significativa (P< 0,05) entre os grupos.

Quando analisamos a relação TG/HDL verificamos que os indivíduos que pertenciam ao grupo com periodontite apresentavam valores maiores da relação (TG/HDL) quando comparados aos indivíduos do grupo controle (3,3 versus 2,0; $P=0,005$ - Figura 5).

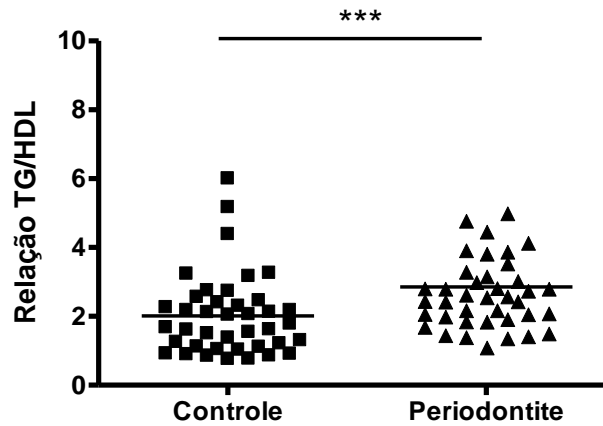


Figura 5- Relação TG/HDL nos grupos estudados. Os dados são dos (■) 40 indivíduos sem periodontite (controle) e dos (▲) 40 indivíduos com periodontite crônica. O gráfico apresentado mostra valores individuais. ***Diferença estatística significativa ($P < 0,005$) entre os grupos.

Os indivíduos com periodontite crônica foram submetidos ao tratamento periodontal e uma nova análise do perfil lipídico em três, seis e doze meses após o término do tratamento foi realizada. A Tabela 8 mostra o perfil lipídico dos indivíduos com doença periodontal antes e após (três, seis e doze meses) o tratamento. Quando os níveis de colesterol total e LDL foram comparados, não observamos diferença estatística entre antes e após o tratamento ($P=0,7$ e $P=0,9$ respectivamente). Um modesto aumento nos níveis de HDL foi observado após o tratamento, mas sem significância estatística ($P=0,9$). Em contraste, com o tratamento periodontal verificamos diminuição significativa nos níveis plasmáticos de TG ($P=0,005$). Verificamos que os níveis de TG não foram estatisticamente significantes entre o antes e três (144,4 mg/dL versus 127,2 mg/dL; $P=0,8$) e antes e seis (144,4 mg/dL versus 115,5 mg/dL; $P=0,2$) meses após o tratamento periodontal. Entretanto um ano após término do tratamento as concentrações de TG diminuíram significativamente quando comparado a antes do tratamento (104, mg/dL versus 144,4 mg/dL; $P=0,004$, respectivamente).

Tabela 8 – Média da concentração de lipídio plasmático nos indivíduos com periodontite crônica antes e depois do tratamento periodontal.

Lipídeo (mg/dL)	Antes		Após o tratamento			Valor de <i>P</i>
			3 meses	6 meses	12 meses	
CT	202,4 (45,7)	195,3 (38,6)	194,0 (37,8)	191,7 (33,9)	191,7 (33,9)	0,7
TG	144,4 (104,7)	128,2 (88,4)	114,0 (65,7)	105,0 (43,6)	105,0 (43,6)	0,005*
HDL	47,4 (7,9)	48,3 (7,9)	48,1 (7,6)	48,7 (7,5)	48,7 (7,5)	0,9
LDL	131,3 (40,8)	124,3(36,1)	125,6 (34,7)	124,8 (32,2)	124,8 (32,2)	0,9

Dados são expressos em média (Desvio Padrão). CT=Colesterol Total; TG= Triacilglicerol; HDL= Lipoproteína de alta densidade; LDL= Lipoproteína de baixa densidade. * Diferença estatística significativa ($P < 0,05$).

Ajustou-se um modelo linear misto normal para explicar a evolução dos níveis de colesterol, HDL, TG e LDL ao longo do tempo, considerando também o sexo, a idade e o IMC. Com o teste de razão de verossimilhanças concluiu-se que o sexo ($P = 0,1$), idade ($P = 0,5$) e IMC ($P = 0,9$) não foram estatisticamente significantes na qual o colesterol se relaciona de maneira quadrática com o tempo ($P = 0,002$), ou seja, a medida que o tempo passa e os níveis de colesterol diminuem. Para os níveis de HDL usando o mesmo modelo linear, concluiu-se que o sexo ($P > 0,7$), idade ($P > 0,2$) e IMC ($P > 0,7$) não foram estatisticamente significantes na qual os níveis de HDL se relacionam de maneira linear com o tempo ($P = 0,002$), ou seja, a medida que o tempo passa os níveis de HDL aumentam. Para os níveis de TG concluiu-se que o sexo ($P > 0,8$), idade ($P > 0,3$) e IMC ($P > 0,3$) também não foram estatisticamente significantes na qual os níveis de TG se relacionam de maneira linear com o tempo ($P < 0,0001$), ou seja, a medida que o tempo passa os níveis de triacilglicerol diminuem. Já para os níveis de LDL não foi observada diferença significativa para o tempo, sexo, idade e IMC.

Com o tratamento periodontal verificamos uma diminuição estatisticamente significativa da razão TG/HDL entre o antes do tratamento e doze meses após o término do tratamento periodontal ($P = 0,019$ – Figura 6).

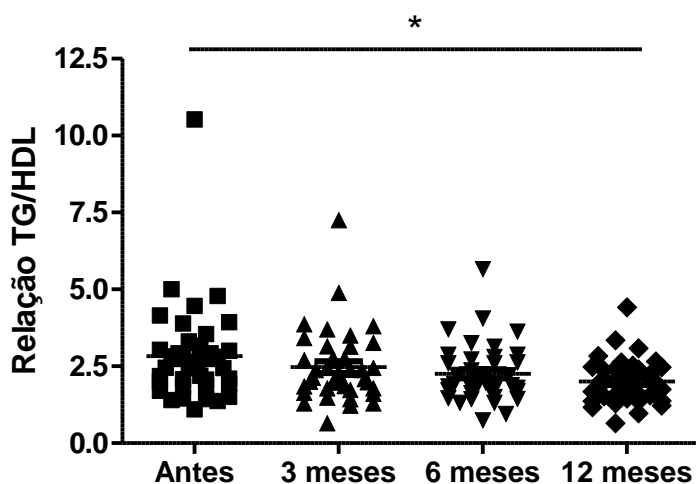


Figura 6 - Relação triacilglicerol/HDL antes e depois do tratamento periodontal. Os dados são dos 40 indivíduos (■) antes, (▲) 3 meses, (▼) 6 meses e (◆) 12 meses após o término do tratamento periodontal. O gráfico apresentado mostra valores individuais. *Diferença estatística significativa ($P < 0,05$) entre os grupos.

Ajustando o modelo linear para explicar a evolução da razão TG/HDL verificamos que não existe diferença estatística significativa para o sexo ($P > 0,8$), idade ($P > 0,4$) e IMC ($P > 0,3$) na qual a razão TG/HDL se relaciona de maneira linear com o tempo ($p < 0,0001$), ou seja, a medida que o tempo passa a relação TG/HDL diminui.

4.3 LEUCOGRAMA

O número de células brancas totais bem como diferenciais foi analisado entre os dois grupos (Tabela 9). O número de leucócitos foi significativamente maior no grupo com periodontite quando comparado ao grupo controle ($7,1 \times 10^3$ células/mm³ versus $5,6 \times 10^3$ células/mm³; $P= 0,0018$). Esse aumento foi acompanhado pelo aumento no número de neutrófilos ($4,27 \times 10^3$ células/mm³ versus $3,39 \times 10^3$ células/mm³; $P=0,0016$). Quando comparamos o número de monócitos, linfócitos, eosinófilos e basófilos entre os dois grupos, não observamos diferença estatística significativa. Nenhum indivíduo do grupo controle e apenas um indivíduo do grupo com periodontite, apresentou contagem de leucócitos fora do range de normalidade (4.000 a 10.000 células/mm³).

Tabela 9 – Leucograma dos dois grupos estudados

Células/mm ³	Controle		Periodontite	
	Mediana	D.P	Mediana	D.P
Leucócitos (x 10³)	5,6*	1,0	7,10*	1,3
Monócitos	447,5	105,0	477,5	147,7
Neutrófilos (10³)	3,3 ⁺	0,8	4,2 ⁺	1,2
Linfócitos (10³)	1,8	0,5	2,04	0,5
Eosinófilos	160,0	116,1	146,5	108,2
Basófilos	34,0	20,0	26,0	27,1

Dados são expressos em mediana. DP- Desvio padrão. *,⁺ Diferença estatística significativa ($P < 0,05$) entre os grupos.

Os grupos foram analisados de acordo com a idade (Tabela 10). Entre os indivíduos com idade menor que 45 anos, o número de neutrófilos foi maior em indivíduos com periodontite quando comparados a controle ($4,40 \times 10^3$ células/mm³ versus $3,22 \times 10^3$ células/mm³; $P=0,02$). Entre os indivíduos com idade acima de 45 anos, foi observado maior número de leucócitos em indivíduos com periodontite quando comparado ao controle ($7,20 \times 10^3$ células/mm³ versus $5,60 \times 10^3$ células/mm³; $P=0,006$).

Tabela 10 – Leucograma ajustado de acordo com a idade

Células/mm ³	Controle		Periodontite	
	Idade ≤ 45 anos (n=19)	Idade ≥ 45 anos (n=21)	Idade ≤ 45 anos (n=21)	Idade ≥ 45 anos (n=19)
Leucócito (x10³)	5,6 (0,9)	5,6 (1,2)*	6,50 (1,4)	7,2 (1,2)*
Monócito	439,0 (105,8)	462,0 (105,7)	480,0 (144,0)	475,0 (155,5)
Neutrófilo (x10³)	3,2 (0,6)+	3,6 (0,9)	4,4 (1,1)+	3,8 (1,2)
Linfócito (x10³)	1,8 (0,5)	1,8 (0,5)	1,8 (0,5)	2,2 (0,4)
Eosinófilo	155,0 (93,7)	166,0 (133,1)	128,0 (110,3)	213,0 (105,1)
Basófilo	34,0 (17,2)	35,0 (22,5)	35,0 (22,5)	25,0 (30,7)

Dados são expressos em mediana (Desvio padrão).*+ Diferença estatística significativa (P< 0,05) entre os grupos.

Os grupos também foram analisados de acordo com IMC (Tabela 11). Em indivíduos com IMC menor que 25 kg/m², indivíduos do grupo periodontite tiveram maiores contagens de leucócitos (7,10 x 10³ células/mm³ versus 5,60 x 10³ células/mm³; P= 0,007) e neutrófilos (4,27 x 10³ células/mm³ versus 3,39 x 10³ células/mm³; P= 0,01) quando comparado ao controle. Não observamos diferença significativa no leucograma quando analisamos os grupos de acordo com o sexo.

Tabela 11 – Leucograma ajustado de acordo com o índice de massa corporal

Células/mm ³	Controle		Periodontite	
	IMC < 25 kg/m ² (n=13)	IMC ≥ 25 kg/m ² (n=27)	IMC < 25 kg/m ² (n=11)	IMC ≥ 25 kg/m ² (n=29)
Leucócitos (x10³)	5,6 (1,1)*	5,6 (0,8)	7,1 (1,3)*	6,4 (1,5)
Monócitos	439,0 (105,8)	504,0 (111,2)	494,0 (148,0)	425,5 (128,3)
Neutrófilos (x10³)	3,3 (0,7)+	3,6 (1,0)	4,2 (1,1)+	3,9 (1,5)
Linfócitos (x10³)	1,8 (0,5)	1,5 (0,7)	2,0 (0,5)	1,9 (0,2)
Eosinófilos	165,0 (110,6)	140,0 (163,2)	146,5 (107,4)	176,0 (123,1)
Basófilos	34,0 (18,8)	29,0 (29,6)	29,5 (26,9)	12,5 (28,9)

Dados são expressos em mediana (Desvio padrão). IMC – Índice de massa corporal *+ Diferença estatística significativa (P< 0,05) entre os grupos.

RESULTADOS

Três, seis e doze meses após o término do tratamento periodontal, os indivíduos foram encaminhados para nova coleta de sangue. Novamente o número de leucócitos foi contado e comparado com os números obtidos antes do tratamento. Foi verificada diferença significativa na contagem de leucócitos entre antes, três, seis e doze meses após o tratamento periodontal ($P < 0,0001$ - Tabela 12).

Quando o número de neutrófilos foi comparado entre o antes e depois do tratamento verificamos diferença significativa ($P < 0,0001$ - Tabela 12). Não observamos diferença significativa entre o antes e depois do tratamento periodontal para o número de linfócitos ($P > 0,5$), monócitos ($P > 0,5$), basófilos ($P > 0,9$) e eosinófilos ($P > 0,6$).

Tabela 12 - Leucograma dos indivíduos com periodontite crônica antes e depois do tratamento periodontal.

Células (cell/mm ³)	Antes		Após o tratamento				
			Valor P	Valor P	Valor P	Valor P	Valor P
		3 meses	basal e 3 meses	6 meses	basal e 6 meses	12 meses	basal e 12 meses
Leucócitos (x10³)	6,94 (1,37)	6,04 (0,59)	0,002	6,04 (0,58)	0,0006	6,03 (0,59)	0,0006
Monócitos	488 (147,70)	488,3 (107,56)	ns	460,7 (95,91)	ns	494 (99,69)	ns
Neutrófilos (x 10³)	4,09 (1,20)	3,30 (0,56)	0,01	3,21 (0,56)	0,0006	3,16 (430,31)	<0,0001
Linfócitos (x10³)	2,07 (0,50)	2,04 (0,38)	ns	2,12 (0,34)	ns	2,13 (350,29)	ns
Eosinófilos	192,45 (108,24)	165,35 (76,97)	ns	181,3 (84,26)	ns	188,8 (82,66)	ns
Basófilos	29,55 (27,12)	29,75 (30,17)	ns	31,64 (34,78)	ns	33,02 (31,65)	ns

Dados são expressos em média (desvio padrão). Ns - Não significativo. Diferença estatística significativa ($P < 0,05$) entre os grupos

Ajustando o modelo linear para explicar a evolução do número de leucócitos ao longo do tempo considerando também o sexo, idade e IMC. Verificamos que não existe diferença estatística significativa para o sexo ($P > 0,7$), idade ($P > 0,2$) e IMC ($P > 0,7$) na qual o número de leucócitos se relaciona de maneira linear com o tempo ($P = 0,02$), ou seja, à medida que o tempo passa o número de leucócitos diminui. O mesmo modelo foi usado para o número de neutrófilos onde não observamos diferença estatisticamente significativa para o sexo ($P > 0,3$), idade ($P > 0,2$) e IMC ($P > 0,2$) na qual o número de neutrófilos se relaciona de maneira linear com o tempo ($P = 0,02$). Usando o modelo linear para o número de linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos não encontramos diferença significativa para o tempo, sexo, idade e IMC.

4.4 ANÁLISE DE CITOCINAS

A concentração de IL-8 no plasma foi maior em indivíduos com periodontite quando comparado ao grupo controle (4,4 pg/ml versus 4,2 pg/ml; $P=0,0119$). Resultado similar foi observado no plasma para a concentração de IL-6 (1,6 pg/ml versus 1,5 pg/ml; $P=0,001$). Não foi observada diferença significativa para as concentrações de IL-1 β , IL-10 e TNF- α entre o grupo periodontite e o grupo controle (Tabela 13).

Tabela 13 – Análise de citocinas nos dois grupos estudados

Citocina (pg/mL)	Controle		Periodontite	
	Mediana	D.P	Mediana	D.P
IL-1β	1,3	0,03	1,32	0,03
IL-6	1,5*	0,06	1,64*	0,1
IL-8	4,2+	0,2	4,45+	0,3
IL-10	3,5	0,001	3,58	0,001
TNF-α	1,6	0,1	1,7	0,1

Dados são expressos em mediana. DP- Desvio padrão. *+ Diferença estatística significativa ($P < 0,05$) entre os grupos.

A tendência para concentrações elevadas de IL-8 e IL-6 também foi observada quando os subgrupos foram analisados separadamente de acordo com a idade e o IMC, mas não para o sexo. Entre os indivíduos menores de 45 anos, a concentração de IL-8 plasmática foi maior em indivíduos com periodontite do que nos controle (4.5 pg/ml versus 4.1 pg/ml; $P=0.019$). Novamente, resultado similar foi observado para a concentração de IL-6 (1.6 pg/ml versus 1.5 pg/ml; $P=0.025$ – Tabela 14).

Tabela 14 – Análise de citocinas ajustado para a idade

Citocina (pg/mL)	Controle		Periodontite	
	Idade ≤ 45 anos (n=19)	Idade ≥ 45 anos (n=21)	Idade ≤ 45 anos (n=21)	Idade ≥ 45 anos (n=19)
IL-1β	1,3 (0,04)	1,3 (0,03)	1,3 (0,03)	1,3 (0,02)
IL-6	1,5 (0,07)*	1,5 (0,05)	1,6 (0,1)*	1,6 (0,1)
IL-8	4,1 (0,2)+	4,2 (0,2)	4,5 (0,3)+	4,4 (0,2)
IL-10	3,5 (0,001)	3,5 (0,001)	3,5 (0,001)	3,5 (0,001)
TNF-α	1,6 (0,1)	1,6 (0,09)	1,7 (0,1)	1,6 (0,1)

Dados são expressos em mediana. DP- Desvio padrão. *,+ Diferença estatística significativa ($P < 0,05$) entre os grupos.

Nós analisamos os grupos considerando o IMC (Tabela 15). Em indivíduos com IMC abaixo de 25 kg/m², a concentração de IL-6 plasmáticos foram mais baixos em indivíduos do grupo controle quando comparados a indivíduos do grupo periodontite (1.5 pg/ml versus 1.6 pg/ml; $P = 0.014$). Essa diferença também foi observada entre indivíduos do grupo controle com IMC abaixo de 25 kg/m² e acima de 25 kg/m² (1.5 pg/ml versus 1.5 pg/ml; $P = 0.036$).

Tabela 15 – Análise de citocinas ajustado para o índice de massa corporal

Citocinas (pg/mL)	Controle		Periodontite	
	IMC < 25 kg/m ² (n=13)	IMC ≥ 25 kg/m ² (n=27)	IMC < 25 kg/m ² (n=11)	IMC ≥ 25 kg/m ² (n=29)
IL-1β	1,31 (0,04)	1,35 (0,02)	1,31 (0,03)	1,33 (0,05)
IL-6	1,56 (0,06)*+	1,59 (0,05)+	1,64 (0,11)*	1,66 (0,10)
IL-8	4,22 (0,27)	4,37 (0,22)	4,41 (0,34)	4,49 (0,16)
IL-10	3,58 (0,001)	3,58 (0,001)	3,58 (0,001)	3,58 (0,001)
TNF-α	1,69 (0,12)	1,65 (0,08)	1,66 (0,17)	1,88 (0,09)

Dados são expressos em mediana (Desvio padrão). IMC – Índice de massa corporal. *,+ Diferença estatística significativa ($P < 0,05$) entre os grupos.

Quando foi comparada a concentração plasmática da IL-8 antes e depois do tratamento periodontal observamos diminuição significativa ($P=0,002$ – Tabela 16). As concentrações de IL-6 também foram dosadas e comparadas entre o antes e depois do tratamento, onde foi observada diminuição significativa na concentração plasmática ($P<0,0001$ - Tabela 16).

Tabela 16 – Análise de citocinas nos pacientes com periodontite crônica antes e depois do tratamento periodontal.

Citocina (pg/mL)	Antes		Após o tratamento				
		3 meses	Valor <i>P</i> basal e 3 meses	6 meses	Valor <i>P</i> basal e 6 meses	12 meses	Valor <i>P</i> basal e 12 meses
IL-1β	1,32 (0,03)	1,32 (0,03)	ns	1,31 (0,04)	ns	1,32 (0,04)	ns
IL-6	1,64 (0,11)	1,56 (0,05)	<0,001	1,53 (0,05)	<0,0001	1,51 (0,03)	<0,0001
IL-8	4,45 (0,32)	4,33 (0,24)	0,04	4,25 (0,22)	0,019	4,21 (0,18)	0,003
IL-10	3,58 (0,001)	3,58 (0,001)	ns	3,58 (0,001)	ns	3,58 (0,001)	ns
TNF-α	1,73 (0,17)	1,72 (0,14)	ns	1,75 (0,16)	ns	1,72 (0,16)	ns

Dados são expressos em média (desvio padrão). Ns – Não significativo. Diferença estatística significativa ($P<0,05$) entre os grupos

Usando o modelo linear para a concentração de IL-8 ao longo do tempo, não observamos diferença significativa para o sexo ($P>0,4$), idade ($P>0,1$) e IMC ($P>0,7$) na qual a concentração de IL-8 se relaciona de maneira linear com o tempo ($P<0,0001$). O mesmo modelo foi aplicado para a concentração de IL-6. Não observamos diferença significativa para o sexo ($P>0,8$), idade ($P>0,1$) e IMC ($P>0,2$) na qual a concentração de IL-6 se relaciona de maneira linear com o tempo ($P<0,0001$).

Através desse modelo observamos que a concentração de IL-10 se relaciona de maneira linear com o sexo ($P=0,003$), onde as concentrações de IL-10 são menores em indivíduos do sexo masculino. Para a concentração de IL-1 β e TNF- α não encontramos diferença significativa para o tempo, sexo, idade e IMC.

4.5 PROTEÍNA C REATIVA (PCR)

Quando a concentração sérica de proteína C reativa foi comparada entre o grupo controle e periodontite, foi verificada diferença significativa (Figura 7). Indivíduos com periodontite apresentaram concentrações de PCR maiores do que os indivíduos controle (1,3mg/mL versus 1,1 mg/mL; $P=0,008$).

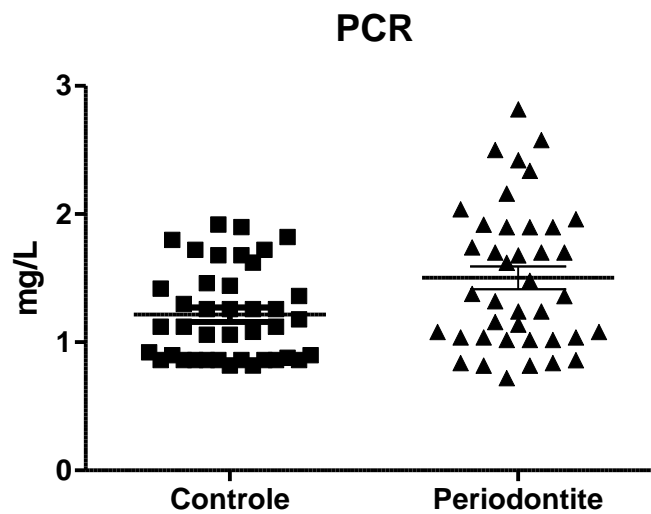


Figura 7- Concentração sérica de Proteína C reativa. Os dados são dos (■) 40 indivíduos sem periodontite (controle) e dos (▲) 40 indivíduos com periodontite crônica. O gráfico apresentado mostra valores individuais. A análise estatística foi realizada utilizando o teste de Wilcoxon.

Quando foi comparada a concentração sérica da PCR antes e após o tratamento periodontal observou-se diminuição significativa a partir do terceiro mês (Figura 8).

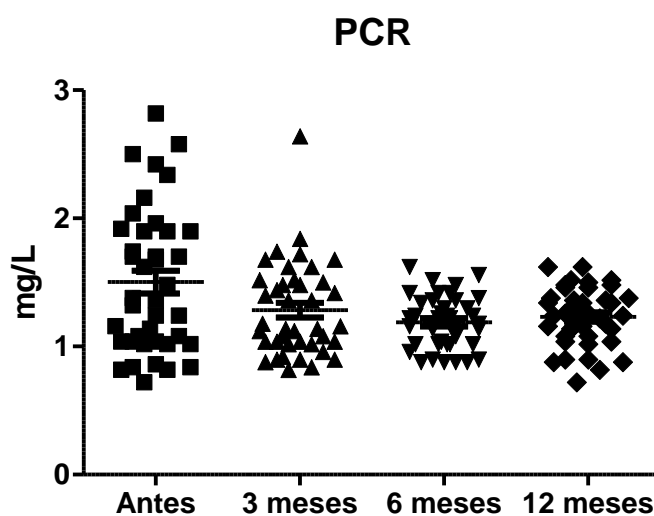


Figura 8 - Concentração sérica de Proteína C reativa antes e depois do tratamento periodontal. Os dados são dos 40 indivíduos (■) antes, (▲) 3 meses, (▼) 6 meses e (◆) 12 meses após o término do tratamento periodontal. O gráfico apresentado mostra valores individuais. A análise estatística foi realizada utilizando o teste qui-quadrado.

Usando o modelo linear para explicar a evolução da concentração de PCR ao longo do tempo, não observamos diferença significativa para o sexo ($P>0,4$), idade ($P>0,8$) e IMC ($P>0,3$) na qual os níveis de PCR se relacionam de maneira linear com o tempo ($P=0,0002$).

4.6 AUTO-ANTICORPOS CONTRA oxLDL

As concentrações de anticorpos anti-oxLDL foram significativamente maiores em indivíduos com periodontite comparados a indivíduos do grupo controle ($0.9 \pm 0,2$ unidades versus $0.8 \pm 0,2$ unidades; $P=0.021$; Figura 9). Não foram observadas diferenças entre os grupos de acordo com o sexo, idade e IMC.

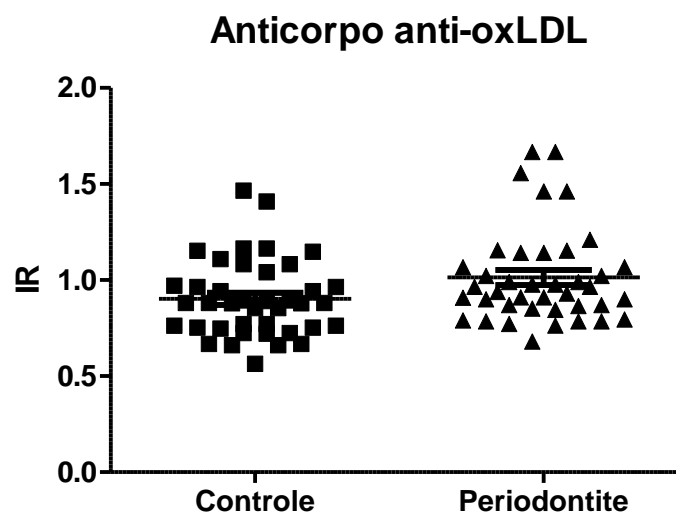


Figura 9 - Auto anticorpos IgG contra oxLDL nos grupos estudados. Os dados são dos (■) 40 indivíduos sem periodontite (controle) e dos (▲) 40 indivíduos com periodontite crônica. O gráfico apresentado mostra valores individuais. A análise estatística foi realizada utilizando o teste de Wilconxon.

Quando foram comparadas as concentrações de auto anticorpos oxLDL antes e depois do tratamento periodontal notamos diminuição significativa nos níveis entre o antes e 12 meses após o término do tratamento periodontal ($P=0,010$ – Figura 10).

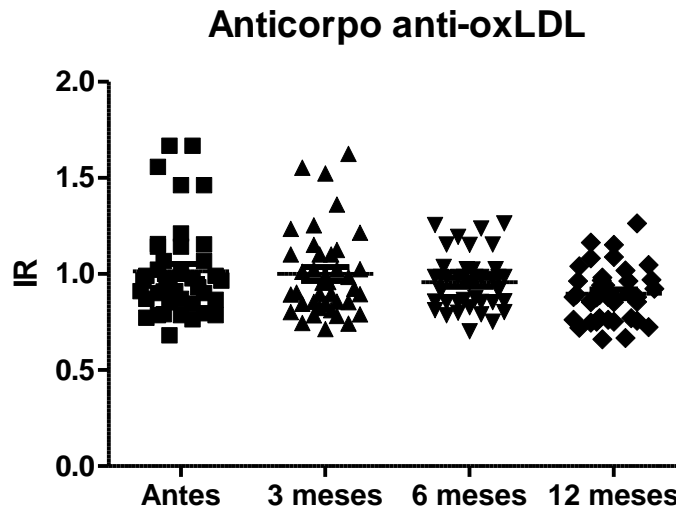


Figura 10 - Auto-anticorpos IgG contra oxLDL antes e depois do tratamento periodontal. Os dados são dos 40 indivíduos (■) antes, (▲) 3 meses, (▼) 6 meses e (◆) 12 meses após o término do tratamento periodontal. O gráfico apresentado mostra valores individuais. A análise estatística foi realizada utilizando o teste qui-quadrado.

Usando o modelo linear para as concentrações de auto anticorpos oxLDL ao longo do tempo, não observamos diferença significativa para o sexo ($P>0,6$), idade ($P>0,2$) e ($P>0,7$) na qual a concentração de auto anticorpos oxLDL se relaciona de maneira linear com o tempo ($P=0,01$)

4.7 SUBSTÂNCIAS REATIVAS AO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS)

Foram analisadas as amostras de LDL dos indivíduos com doença periodontal e controle. Não foi verificada diferença significativa na concentração de MDA entre os grupos periodontite e controle ($32.2 \pm 6,2$ mM versus $29.9 \pm 4,5$ mM; $P=0.067$; Figura 11). Também não observamos diferenças entre os grupos de acordo com o sexo, idade e IMC.

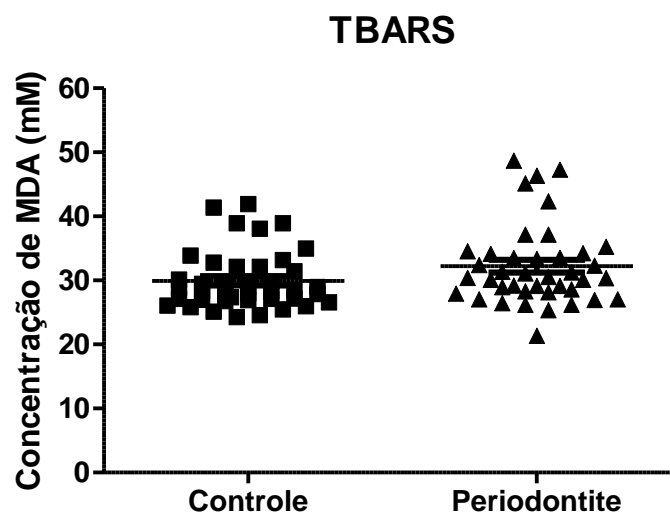


Figura 11- Concentração de malondialdeído nos grupos estudados. Os dados são dos (■) 40 indivíduos sem periodontite (controle) e dos (▲) 40 indivíduos com periodontite crônica. O gráfico apresentado mostra valores individuais. A análise estatística foi realizada utilizando o teste de Wilconxon.

Também não verificamos diferença significativa entre o antes e depois do tratamento periodontal na concentração de MDA ($P>0,9$ - Figura 12).

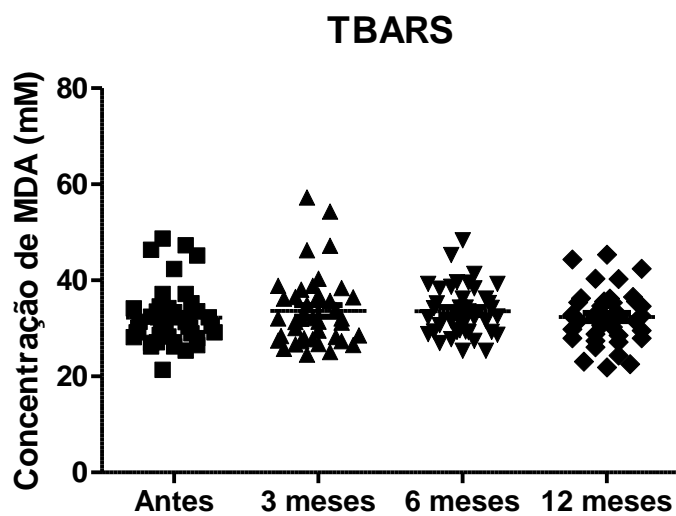


Figura 12. Concentração de malondialdeído antes e depois do tratamento periodontal. Os dados são dos 40 indivíduos (■) antes, (▲) 3 meses, (▼) 6 meses e (◆) 12 meses após o término do tratamento periodontal. O gráfico apresentado mostra valores individuais. A análise estatística foi realizada utilizando o teste qui-quadrado.

4.8 ANÁLISE POR VARREDURA Z

A curva pico-vale, característica de amostras com coeficiente negativo termo-óptico foi observado em todas as amostras investigada. A figura 13 mostra os parâmetros Θ de todos os indivíduos. A mediana e o desvio padrão foram 0.13 ± 0.017 e 0.081 ± 0.012 em indivíduos sem e com periodontite respectivamente. Os valores da mediana do Θ foram maiores no grupo controle quando comparados ao grupo periodontite ($P=0.015$). Não foi observada diferença entre os grupos de acordo com o sexo, idade e IMC.

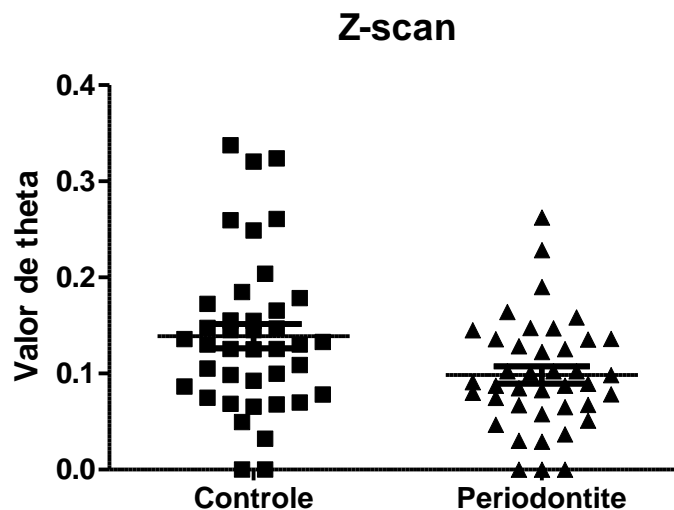


Figura 13- Valor de theta nos grupos estudados. Os dados são dos (■) 40 indivíduos sem periodontite (controle) e dos (▲) 40 indivíduos com periodontite crônica. O gráfico apresentado mostra valores individuais. A análise estatística foi realizada utilizando o teste de Wilconxon.

Quando foram comparados os valores de θ das LDLs entre o antes e 12 meses após o tratamento periodontal notamos um aumento no significativo no valor de θ ($0,081 \pm 0,012$ versus $0,12 \pm 0,01$; $P= 0,049$ – Figura 14)

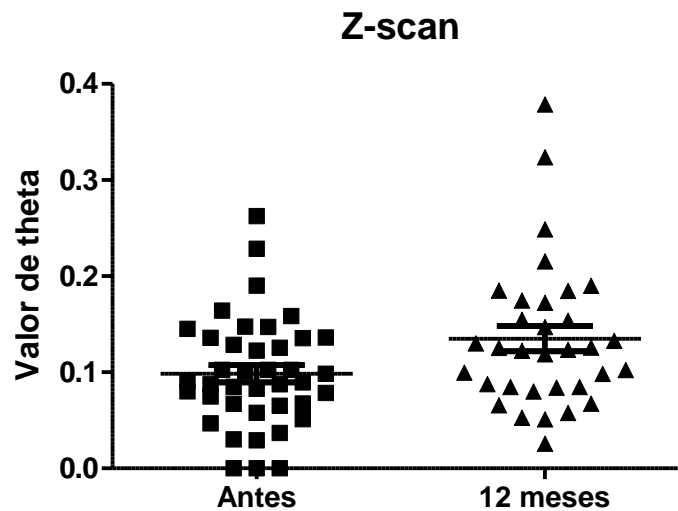


Figura 14- Valor de θ antes e 12 meses após o término do tratamento periodontal. Os dados são dos (■) 40 indivíduos antes do tratamento e dos (▲) 33 indivíduos 12 meses após o término do tratamento. O gráfico apresentado mostra valores individuais. A análise estatística foi realizada utilizando o teste de Wilcoxon.

Ajustamos o modelo linear misto normal para explicar a evolução do θ ao longo do tempo, considerando também o sexo, a idade e o IMC. Com o teste de razão de verossimilhanças não observamos diferença significativa para o tempo, sexo, idade, e IMC.

5 DISCUSSÃO

Nesta tese, nós estudamos os indivíduos antes e depois do tratamento periodontal. O tratamento foi adequado aos princípios técnicos científicos reconhecidos pela odontologia. Esse procedimento foi realizado por várias razões. A saúde oral, em particular a doença periodontal, é reconhecida por influenciar o aparecimento e a progressão da doença arterial coronariana. Com isto em mente, abordamos aqui um modelo atrativo para estudar como a intervenção terapêutica em uma patologia definida pode afetar os conhecidos fatores de risco para aterosclerose.

A elaboração deste estudo de uma maneira prospectiva (0-12 meses) permitiu-nos uma avaliação mais exata dos fatores de risco para aterosclerose comparada a um estudo de caso-controle. Como mencionado na introdução, o uso de métodos tradicionais (por exemplo: dislipidemia e índice de Framingham) somente explicam cerca de 50% dos eventos coronarianos. Isso abre espaço para novos e/ou adicionais marcadores. Neste modelo, nós podemos diretamente comparar marcadores tradicionais com dois novos marcadores desenvolvidos por nós (Z-scan e anticorpos anti-oxLDL).

Assim na primeira etapa do estudo, e com o intuito de analisarmos a relação entre a doença periodontal e marcadores de risco já conhecidos para a aterosclerose, foram selecionados 40 indivíduos sistemicamente saudáveis com periodontite crônica e 40 indivíduos sistemicamente saudáveis e sem sinais de doença periodontal. A faixa etária dos indivíduos da pesquisa foi definida com o objetivo de excluir os muito jovens ou muito idosos. Tal aspecto foi importante para a amostra por tentar minimizar aspectos relativos à idade avançada que poderiam ser importantes nos marcadores de risco para a doença cardiovascular. Por outro lado, indivíduos mais jovens também foram excluídos pela hipótese de que os efeitos da doença periodontal (tempo de ação) podem ser menos expressivos. Desta maneira, a média de idade entre os indivíduos dos dois grupos foi de 45 anos.

Os critérios de exclusão para os dois grupos (controle e periodontite) foram selecionados com o objetivo de obtermos uma amostra de indivíduos que não apresentasse os fatores de risco clássico para doença cardiovascular, como pressão arterial elevada, diabetes e tabagismo, afim de que fosse observada a possível associação entre a periodontite e marcadores de risco para aterosclerose sem necessidade de ajustar o modelo para outros fatores.

As variáveis periodontais reafirmaram as características dos grupos estudados. Deste modo, no grupo controle, observamos a ausência de profundidade de sondagem maior que 4 mm e no grupo periodontite observamos uma grande porcentagem de sítios sondados com profundidade de bolsa periodontal acima de 4 mm (média de 39%).

Na segunda etapa do estudo, e a fim de analisar a influência do tratamento periodontal sobre os marcadores de risco para aterosclerose, os indivíduos com periodontite crônica foram submetidos ao tratamento periodontal. O sucesso do tratamento foi avaliado pela redução da inflamação local medido pelo índice de sangramento e pela quantidade de bolsas com profundidade maior que 4 mm. Esses indivíduos foram então re-avaliados 3, 6 e 12 meses após o término do tratamento periodontal.

Embora a associação entre a periodontite e doença cardiovascular permaneça controversa, o mecanismo ou a relação causal não podem ser excluídos. O presente estudo fornece evidências para uma associação entre a periodontite crônica e a aterosclerose ao usar marcadores conhecidos, i.e, baixos níveis de HDL e elevados níveis de TG. Sete dos 80 indivíduos estudados tiveram níveis de HDL abaixo de 40 mg/dL; cinco (71,43%) deles pertenciam ao grupo com periodontite crônica e dois (28,57%) ao grupo controle. Uma possível explicação para isso é que a doença periodontal é uma infecção causada por bactérias gram-negativas. Estas bactérias possuem em sua membrana externa LPS, um potente ativador de resposta imunológica. Bacteremias causadas por periodontite resultam em bactérias gram-negativas e LPS livre no plasma, o que desencadeia a liberação de mediadores inflamatórios e a ativação de células de defesa e do endotélio tanto local quanto sistêmico.

Sabe-se que as lipoproteínas do plasma são importantes mecanismos defensores para o controle da resposta imune ao LPS (Feingold et al., 1995). Essas lipoproteínas ligam-se ao LPS e previnem a estimulação de monócitos, macrófagos e outras células responsivas ao LPS. Assim, complexos de LPS e lipoproteínas exercem menor efeito na resposta imune e diminuem a produção de citocinas inflamatórias (Levine et al., 1993; Pajkrt et al. 1996). A principal lipoproteína envolvida neste processo é a HDL (Kitchens et al., 1999), o que justifica os menores níveis plasmáticos em sujeitos com periodontite crônica quando comparados a sujeitos sem doença periodontal.

Hiperlipidemias frequentemente acompanham doenças infecciosas e inflamatórias (Gallin et al., 1969). Dezesete indivíduos com periodontite apresentaram hipertrigliceridemia, enquanto apenas sete indivíduos sem doença tiveram níveis acima do recomendável.

Uma explicação para estes resultados está no fato de que LPS pode exercer efeito nos níveis plasmáticos de TG. A administração de LPS em animais tem sido usada para mimetizar infecções e estudos têm demonstrado que a sua administração é suficiente para produzir hipertrigliceridemia pela diminuição da atividade da lipase lipoprotéica (LPL) (Hirsch et al., 1964). A LPL é a enzima que catalisa a hidrólise dos triacilglicerois dos quilomícrons e das VLDL. A diminuição na atividade da LPL pode influenciar as concentrações de lípidos plasmáticos e causar variados graus de hipertrigliceridemia (Assmann et al., 1991).

O papel dos TG na aterosclerose foi negligenciado por vários anos – sustentava-se que os níveis elevados não representavam fator de risco nessa doença (Grundy e Denke, 1990). Essa noção tem sido mudada graças a estudos clínicos importantes, que evidenciaram que a hipertrigliceridemia prolongada induz características de disfunção endotelial que contribuem para o desenvolvimento da aterosclerose (Davignon e Cohn, 1996; Gotto, 1998).

Portanto, embora ainda seja controverso que exista uma relação estatisticamente significativa entre os níveis plasmáticos de TG e doenças cardiovasculares, há evidências suficientes que demonstram que o excesso de TG amplifica o risco de cardiopatias quando em combinação com outros fatores de risco, tais como a diminuição dos níveis plasmáticos de HDL. Estudos recentes têm demonstrado uma relação direta entre a razão TG/HDL e a extensão da placa de gordura nas artérias do coração: quanto maior o valor dessa razão, mais grave o dano às coronárias, principalmente entre indivíduos com menos de 60 anos (da Luz et al., 2008).

Assim, quando analisamos a razão TG/HDL verificamos que os indivíduos que pertenciam ao grupo com periodontite apresentavam valores maiores da razão quando comparados a indivíduos do grupo controle.

Quando analisamos o perfil lipídico dos indivíduos submetidos ao tratamento periodontal, observamos que há influência sobre os níveis lipídicos de maneira consistente, o que representa diminuição dos riscos para doenças cardiovasculares.

As concentrações de TG diminuíram significativamente após 12 meses do término do tratamento periodontal. As mudanças nos níveis de TG após 12 meses foram grandes, o que resultou em uma redução de cerca de 20% destes. Em contraste, não observamos mudanças nos níveis de CT, LDL, e HDL entre antes e depois do tratamento periodontal. Já quando a razão TG/HDL foi analisada, observamos uma redução significativa após 12 meses do término do tratamento. Deste modo, nossos dados mostram que o tratamento periodontal reduz o risco para doenças cardiovasculares por diminuir os níveis de TG e a razão TG/HDL.

Estudos têm demonstrado que a concentração de citocinas proinflamatórias, tais como IL-6, parece ser preditiva de futuros eventos cardiovasculares (Ridker et al., 2000). Também tem sido demonstrado que a IL-6 está envolvida na indução de resposta de fase aguda hepática. Assim, a IL-6 pode afetar a produção de TG, além de produzir hipertrigliceridemia (Feingold e Grunfeld, 1992; Nonogaki et al., 1995). Esses estudos também mostram que a IL-6 tem efeito sobre a LPL, o que diminui o "clearance" de lipoproteínas ricas em TG.

A IL-6 também tem papel importante na doença periodontal. Estudo realizado por Mengel et al. (2002) mostrou que o aumento na concentração de IL-6 no sangue estava relacionado com a severidade da doença periodontal.

Quando comparamos a concentração plasmática de IL-6 entre indivíduos do grupo periodontite e controle, observamos concentrações significativamente maiores no grupo periodontite quando comparado ao grupo controle. Quando foi comparada a concentração de IL-6 entre o antes e depois do tratamento, verificamos significativa diminuição na concentração plasmática dessa citocina a partir do terceiro mês após o término do tratamento.

Como verificamos diferença significativa nas concentrações de IL-6, resolvemos então analisar as concentrações de IL-1 β e TNF- α no plasma dos indivíduos dos dois grupos e o efeito do tratamento periodontal sobre a concentração plasmática dessas citocinas. Não foi observada diferença significativa nas concentrações plasmáticas de IL-1 β e TNF- α entre o grupo periodontite e controle. Quando analisamos o efeito do tratamento periodontal, também não verificamos diferença significativa na concentração dessas citocinas entre antes e depois do tratamento. Uma explicação para esses dados pode ser dada pelo fato de que a cascata das interleucinas seja iniciada

quando determinado estímulo, como por exemplo, endotoxinas de bactérias gram-negativas, induzem a produção e secreção de citocinas proximais ou precoces, representadas pelo TNF- α e IL-1 β . Estas citocinas estimulam a produção de citocinas mais tardias ou distais, como a IL-6 e IL-8, que parecem intensificar e perpetuar a resposta inflamatória.

A PCR, um forte preditor de risco de infarto de miocárdio, tem sido o marcador mais frequentemente usado em pesquisas clínicas que relacionam inflamação e/ou infecção e doença cardiovascular. Isso se deve ao fato de que os métodos usados para outros marcadores, tais como concentração sérica de citocina, em geral, são inadequados para a rotina clínica. A PCR é uma proteína de fase aguda sintetizada por hepatócitos após estímulos como injúria tecidual, inflamação e/ou infecção. A produção de PCR também ocorre em lesões ateroscleróticas por células do músculo liso e macrófagos, nos rins, neurônios, alvéolos pulmonares e tecido adiposo (Gabay e Kushner, 1999; Ridker, 2005). Estudos epidemiológicos têm mostrado que os níveis de PCR estão aumentados em indivíduos saudáveis, mas com problemas periodontais (Loos et al., 2000; Slade et al., 2000). Dessa maneira, tem sido hipotetizado que qualquer associação entre periodontite e doenças cardiovasculares pode ser devida ao moderado aumento na concentração de PCR (D'Aiuto et al., 2004).

Assim, nosso estudo corrobora com os dados encontrados na literatura, nos quais: (i) os indivíduos com periodontite apresentaram maiores concentrações de PCR quando comparados aos indivíduos sem doença periodontal; (ii) o tratamento periodontal reduz significativamente as concentrações séricas de PCR.

Marcadores inflamatórios, como a concentração de citocinas e o comportamento das células do sangue periférico envolvidas na inflamação - leucócitos (Ernst et al., 1987; Kannel et al., 1992; Thomson et al., 1995; Oishi et al., 2000), linfócitos (Kannel et al., 1992; Thomson et al., 1995), neutrófilos e monócitos (Oishi et al., 2000) -, são intensamente estudados e relacionados a pacientes portadores de doenças cardiovasculares e a pacientes aparentemente saudáveis.

Os leucócitos podem ser ativados por lesão tecidual (necrose ou isquemia), pela presença de oxLDL ou pela presença de agente infeccioso na parede vascular ou em qualquer sítio orgânico (doença periodontal e infecções virais) (Ross, 1993; Berliner et

al., 1995). Uma vez ativados, iniciam a produção de diferentes citocinas, entre elas, TNF- α e interferon gama (IFN- γ) (Ernst et al., 1987; Thomson et al., 1995).

Com a concepção de que a aterosclerose é uma doença inflamatória crônica, a contagem de leucócitos ganhou importância em vários estudos epidemiológicos como indicador de futuras doenças coronárias. A maioria dos estudos tem demonstrado um efeito dose-resposta, no qual o aumento no número de leucócitos está associado a um aumento no risco de doença cardiovascular (Ensrud e Grimm, 1992). É sabido que infecções aumentam o número de leucócitos. Tal aumento na contagem de leucócitos devido à resposta inflamatória tem sido discutido como um fator “*link*” entre infecções e doença cardiovascular (Ross, 1999; Webber et al., 2008).

Poucos estudos têm mensurado o número de leucócitos em pacientes com doença periodontal. Por isso, surgiu o nosso interesse em mensurar o número de leucócitos em indivíduos com periodontite e analisar a influência do tratamento periodontal sobre sua contagem. Nossos dados mostram que indivíduos com periodontite apresentam significativamente maior contagem de leucócitos quando comparados a indivíduos sem doença periodontal, e que o tratamento periodontal diminui significativamente o número de leucócitos.

A contagem de leucócitos inclui vários subtipos de células que estão envolvidas no desenvolvimento e na progressão da placa aterosclerótica. O papel dos monócitos, macrófagos e linfócitos T e B na formação da lesão aterosclerótica tem sido bem descrito, mas o papel dos neutrófilos ainda não é claro. Neutrófilos estão entre as primeiras células a responder à invasão por microorganismos patogênicos. A liberação de ERO, mieloperoxidase e várias enzimas proteolíticas, tais como as elastases, pelos neutrófilos ajuda a eliminar os patógenos, mas também contribui para a destruição tecidual (Webber et al., 2008). Em adição, neutrófilos podem ser encontrados em lesões aórticas e em placas arteriais cerebrais (Naruko et al., 2002; Hansson, 2005).

Na doença periodontal, os neutrófilos são os leucócitos predominantes na bolsa gengival e no tecido conectivo (Okada et al., 2001). Essas células têm papel protetor no periodonto e indivíduos com defeitos quantitativos ou qualitativos na sua função podem ter predisposição para doenças periodontais (Restaino et al., 2007). Sítios inflamados são caracterizados pela infiltração de neutrófilos. O excessivo recrutamento e sua ativação no periodonto contribuem para a progressão da doença periodontal e a

destruição dos tecidos periodontais. Isso justifica um maior número de neutrófilos nos indivíduos com periodontite, quando comparado a indivíduos sem doença. Quando analisamos o efeito do tratamento periodontal, observamos uma diminuição significativa no número dessas células quando comparamos antes e após o término do tratamento periodontal. Esses dados demonstram que a periodontite tem influência sobre a quantidade de neutrófilos sistêmicos e o tratamento periodontal diminui significativamente o número dessas células sistemicamente.

Outro achado importante do nosso trabalho foi a concentração de IL-8 no plasma. Indivíduos com periodontite apresentaram diferença significativa na concentração de IL-8 quando comparado a indivíduos sem doença periodontal. Nossos dados estão de acordo com Zou et al. (2001) que encontraram diferença nas concentrações de IL-8 no soro de indivíduos com doença periodontal e indivíduos com periodonto saudável. A IL-8 é uma quimiocina e está envolvida na ativação de leucócitos e numa variedade de outras células (Saadeddin et al., 2002). Na doença periodontal, a IL-8 é liberada por células epiteliais gengivais e é quimio-atrativa para neutrófilos. Esses dados reforçam a diferença significativa no número de neutrófilos encontrados no plasma de indivíduos com periodontite quando comparado aos indivíduos controle. Quando foi analisada a concentração plasmática de IL-8 antes e após o tratamento periodontal, observou-se diminuição significativa a partir do terceiro mês. Pode-se, assim, associar a diminuição da concentração plasmática de IL-8 com a diminuição do número de neutrófilos sistêmicos.

A resposta imune humoral contra oxLDL tem sido alvo de vários estudos que tentam relacionar modificações oxidativas com o desenvolvimento de placas ateroscleróticas (Vaarala, 2000; Chen et al., 2007). Estudos clínicos e em modelo animal têm demonstrado que auto-anticorpos estão correlacionados com a modulação do processo aterosclerótico (Hansson, 1997; Witztum, 1997) e/ou com o risco de desenvolvimento de patologias por consequência da aterosclerose, além de estarem presentes em lesões ateroscleróticas (Yla-Herttuala et al., 1989).

Indivíduos que apresentam progressão em lesão de carótida têm altos títulos de anticorpos contra LDL oxidada. Estudos de casos-controle têm demonstrado que elevados títulos de anticorpos contra oxLDL são indicativos de infarto de miocárdio (Puurunen et al., 1994; Wu et al., 1997).

Estudos soroepidemiológicos em adultos têm demonstrado que várias infecções crônicas estão associadas com a aceleração da aterosclerose na carótida (Chiu et al., 1997; Mayr et al., 2000; Ishizaka et al., 2002). Infecções crônicas podem ser acompanhadas de danos às células endoteliais, hipercoagulabilidade, resposta sistêmica inflamatória, maior produção de citocinas inflamatórias, alteração no perfil lipídico e aumento da auto-imunidade, que podem servir como mecanismos de patogênese da aterosclerose e iniciar uma cascata de processos intravasculares humoral e celular (Libby et al., 1997).

A hipótese de que infecções crônicas e agudas podem aumentar a modificação da LDL tem sido alvo de vários estudos. Liuba e colaboradores (2003) associam infecções em crianças ao aumento na modificação da LDL (medida por maiores títulos de anticorpos) contra LDL modificada.

Nossos dados mostram que infecções periodontais podem aumentar a produção ou nível de auto-anticorpos contra modificações da LDL (mLDL). Indivíduos saudáveis com doença periodontal crônica possuem maiores títulos de auto-anticorpos quando comparados a indivíduos saudáveis e sem doença periodontal. Esses dados sugerem o papel das infecções periodontais e reações imunes contra esses patógenos periodontais na produção de anticorpos oxLDL. Neste caso a presença de uma infecção bacteriana localizada causa a inflamação. Esta inflamação gera mLDL e, conseqüentemente, auto-anticorpos são produzidos em um nível elevado. Quando foram comparados os títulos de auto-anticorpos oxLDL antes e depois do tratamento periodontal, observamos diminuição significativa nos títulos entre o antes e doze meses após o término do tratamento periodontal. Assim, quando a quantidade de antígeno é reduzida, os níveis dos anticorpos diminuem, como toda resposta humoral. Isso é importante, pois provavelmente a resposta destes indivíduos é diferente dos indivíduos com CAD, na qual a redução poderia ser devida à formação de imunocomplexos.

A utilização dos dados da varredura Z são interessantes mesmo que resultados não sejam conclusivos. A partícula de LDL é lábil e a geração de mLDL é dependente da estabilidade e do sistema de defesa anti-oxidante da partícula. A mudança no valor do θ indicou fortemente a presença de partículas mais estáveis e mais resistentes. A combinação dos dois dados (Z-scan e anticorpos anti-oxLDL) permite-nos considerá-los como complementares. A detecção do anticorpo pode indicar uma melhora

relativamente precoce enquanto que a varredura Z uma conseqüência mais tardia. Assim, em uma situação clínica, a varredura Z pode ser usada como controle interno já que o valor de θ é absoluto e universal, enquanto que a reatividade relativa do anticorpo pode ser usada como monitoramento de um marcador individual.

Em conclusão, nossos resultados confirmam e reforçam a sugestão da associação entre doença coronariana e periodontite e que o tratamento periodontal bem executado induz mudanças sistêmicas em vários marcadores que refletem no risco para aterosclerose.

6 CONCLUSÕES

Neste trabalho estudamos marcadores de risco para aterosclerose em pacientes com periodontite e qual a influência do tratamento periodontal bem sucedido sobre esses marcadores.

A partir dos resultados obtidos podemos concluir que:

1. Indivíduos com doença periodontal apresentam maiores níveis plasmáticos de triacilglicerol e menores níveis de HDL quando comparados a indivíduos sem doença periodontal. O tratamento periodontal diminui os níveis de triacilglicerol sem modificar os níveis plasmáticos de HDL;
2. Indivíduos com periodontite possuem maior contagem de leucócitos devido ao aumento de neutrófilos quando comparados a indivíduo sem doença e o tratamento periodontal diminui significativamente a contagem de leucócitos e especialmente neutrófilos;
3. Maiores concentrações de auto-anticorpos IgG anti-oxLDL foram encontradas em indivíduo com periodontite, e o tratamento periodontal diminui significativamente a concentração;
4. Concentrações plasmáticas elevadas de IL-6 e IL-8 foram encontradas em indivíduos com periodontite quando comparadas ao controle. O tratamento periodontal diminui significativamente a concentração plasmática de IL-6 e IL-8;
5. Indivíduos com periodontite apresentaram menores valores de theta da LDL e o tratamento periodontal aumentou significativamente o valor de theta.

REFERÊNCIAS

- Albandar JM. Periodontal disease in North America. *Periodontol 2000*. 2002;29:31-69.
- Almeida RF, Pinho MM, Lima C, Faria I, Santos P, Bordalo C. Associação entre doença periodontal e patologias sistêmicas. *Rev Por Clin Geral*. 2006;22:379-90.
- Araujo F, Yamada AT, Araújo MVM, Latorre MRDO, Mansur AJ. Perfil lipídico de indivíduos sem cardiopatia com sobrepeso e obesidade. *Arq Bras Card*. 2005;84(5):405-9.
- Assmann G, Betteridge DJ, Gotto AMJr, Steiner G. Management of hypertriglyceridemic patients. A. Treatment classifications and goals. *Am J Cardiol*. 1991;68(3):30A-34A.
- Avogaro P, Bittolo Bon G, Cazzolato G. Isolation and partial characterization of na oxidized LDL in humans. *Basic Life Sci*. 1988;49:391-6.
- Beck J, Garcia R, Heiss G, Vokonas PS, Offenbacher S. Periodontal disease and cardiovascular disease. *J Periodontol*. 1996;67(Suppl 10):1123-37.
- Belkaid Y, Piccirillo CA, Mendez S, Shevach EM, Sacks DL. CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. *Nature*. 2002;420(6915):502-7.
- Berliner AJ, Navab M, Fogelman AM, Frank JS, Demer LL, Edwards PA, et al., Atherosclerosis: Basic Mechanisms oxidation, inflammation, and genetics. *Circulation*. 1995;91:2488-96.
- Biasucci LM, Vitelli A, Liuzzo G, Altamura S, Caligiuri G, Monaco C, et al. Elevated levels of interleukin-6 in unstable angina. *Circulation*. 1996;94(5):874-7.
- Boisvert WA, Santiago R, Curtiss LK, Terkeltaub RA. A leukocyte homologue of the IL-8 receptor CXCR-2 mediates the accumulation of macrophages in atherosclerotic lesions of LDL receptor-deficient mice. *J Clin Invest*. 1998;101(2):353-63.
- Brandão SA, Izar MC, Fischer SM, Santos AO, Monteiro CM, Póvoa RM, et al. Early increase in autoantibodies against human oxidized low-density lipoprotein in hypertensive patients after blood pressure control. *Am J Hypertens*. 2010;23(2):208-14.
- Braunersreuther V, Mach F, Steffens S. The specific role of chemokines in atherosclerosis. *Thromb Haemost*. 2007;97(5):714-21.
- Braunwald E, Antman EM. Evidence-based coronary care. *Ann Inter Med*. 1997;126(7):551-53.
- Brown MS, Goldstein JL A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science*. 1986;232(4746):34-47.

*De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal:sample references. Available from: <http://www.icmje.org>[2007 May 22]

- Buhlin K, Gustafsson A, Pockley AG, Frostegard J, Klinge B. Risk factors for cardiovascular disease in patients with periodontitis. *Eur Heart J*. 2003;24(23):2099-107.
- Buhlin K, Hultin M, Norderyd O, Persson L, Pockley AG, Rabe P, et al. Risk factors for atherosclerosis in cases with severe periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2009;36(7):541-9.
- Carvalho MD, Tobias VE, Vendrame CM, Shimabukuro AF, Gidlund, Quintão EC. Lipoproteins modify the macrophages uptake of triacylglycerol emulsion and zymosan particles by similar mechanisms. *Lipids*. 2000;35(1):55-9.
- Carvalho MD, Harada LM, Gidlund M, Ketelhuth DF, Boschocov P, Quintão EC. Macrophages take up triacylglycerol-rich emulsions at a faster rate upon co-incubation with native and modified LDL: An investigation on the role of natural chylomicrons in atherosclerosis. *J Cell Biochem*. 2002;84(2):309-23.
- Cenci E, Romani L, Mencacci A, Spaccapelo R, Schiaffella E, Puccetti P, et al. Interleukin-4 and interleukin-10 inhibit nitric oxide-dependent macrophage killing of *Candida albicans*. *Eur J Immunol*. 1993;23(5):1034-8.
- Chatterjee S, Berliner JA, Subbanagounder GG, Bhunia AK. Identification of a biologically active component in minimally oxidized low density lipoprotein (MM-LDL) responsible for aortic smooth muscle cell proliferation. *Glycoconj J*. 2004;20(5):331-38.
- Chen CC, Chang KL, Huang JF, Tsai CC. Correlation of interleukin-1 beta, interleukin-6, and periodontitis. *Kaohsiung J Med Sci*. 1997;13(10):609-17.
- Chen YJ, Wang JS, Chow SE. Resveratrol protects vascular endothelial cell from ox-LDL-induced reduction in antithrombogenic activity. *Chin J Physiol*. 2007;50(1):22-8.
- Chiu B, Viira E, Tuckler W, Fong IW. Chlamydia pneumoniae, cytomegalovirus and herpes simplex virus in atherosclerosis of the carotid artery. *Circulation*. 1997;96(7):2144-8
- Committee of the American Academy of Periodontology. Diagnosis of periodontal diseases. *J Periodontol*. 2003;74:1237-1247.
- Cooper JA, Muller GJ, Humphries SE. A comparison of the PROCAM and Framingham point-scoring system for estimation of individual risk of coronary heart disease in the Second Northwick Park Heart study. *Atherosclerosis*. 2005;181(1):93-100.
- D'Aiuto F, Parkar M, Andreou G, Suvan J, Brett PM, Ready D, Tonetti MS. Periodontitis and systemic inflammation: control of the local infection is associated with a reduction in serum inflammatory markers. *J Dent Res*. 2004;83(2):156-60.

D'Aiuto F, Parkar M, Nibali L, Suvan J, Lessem J, Tonetti MS. Periodontal infections cause changes in traditional and novel cardiovascular risk factors: results from a randomized controlled clinical Trial. *Am Heart J*. 2006;151(5):977-84.

Danesh J, Wheeler JG, Hirschfield GM, Eda S, Eiriksdottir G, Rumley A, et al. C-reactive protein and other circulating markers of inflammation in the prediction of coronary heart disease. *N Engl Med*. 2004;350(14):1387-97.

Davignon J, Cohn JS. Triglycerides: a risk factor for coronary heart disease. *Atherosclerosis*. 1996;124 Suppl:S57-64.

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.

Ebersole JL, Machen RL, Steffen MJ, Willmann DE. Systemic acute-phase reactants, C-reactive protein and haptoglobin, in adult periodontitis. *Clin Exp Immunol*. 1997;107(2):347-52.

Emersom SL, Abdalla DSP. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. 2001;37(3):293-303.

Ensrud K, Grimm RH Jr. The white blood cell count and risk for coronary heart disease. *Am Heart J*. 1992;124(1):207-13.

Ernest E, Hammerschmidt DA, Bagge U, Matrai A, Dormandy JA. Leukocytes and the risk of ischemic disease. *JAMA*. 1987;257(17):2318-24.

Epstein SE, Zhu J, Burnett MS, Zhou YF, Vercellotti G, Hajjar D. Infection and atherosclerosis: potential roles of pathogen burden and molecular mimicry. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20(6):1417-20.

Feingold KR, Grunfeld C. Role of cytokines in inducing hyperlipidemia. *Diabetes*. 1992;41(Suppl 2):97-101.

Feingold KR, Funk JL, Moser AH, Shigenaga JK, Rapp JH, Grunfeld C. Role for circulating lipoproteins in protection from endotoxin toxicity. *Infect Immun*. 1995;63(5):2041-46.

Fernvik EC, Ketelhut DF, Russo M, Gidlund M. The autoantibodies repertoire against copper or macrophage modified LDL differ in normolipidemic and hypercholesterolemic patient. *J Clin Immunol*. 2004;24(2):170-6.

Fokkema SJ, Loos BG, Hart AA, van der Velden U. Long-term effect of full-mouth tooth extraction on the responsiveness of peripheral blood monocytes. *J Clin Periodontol*. 2003;30(8):756-60.

Francke OC. William Hunter's "oral sepsis" and American odontology. *Bull Hist Dent.* 1973;21(2):73-9.

Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem.* 1972;18(6):499-502.

Frostegard J, Nilsson J, Haegerstrand A, Hamsten A, Wigzell H, Gidlund M. Oxidized low density lipoprotein induces differentiation and adhesion of human monocytes and the monocytic cell line U937. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1990;87(3):904-8

Frostergasd J, Haegerstrand A, Gidlund M, Nilsson J. Biologically modified LDL increases the adhesive properties of endothelial cells. *Atherosclerosis.* 1991;90(2-3):119-26.

Fruchart JC, Nierman MC, Stroes ES, Kastelein JJ, Duriez P. New risk factors for atherosclerosis and patient risk assessment. *Circulation.* 2004;109(23 Suppl 1):15-19.

Gabay C, Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med.* 1999;340(6):448-54.

Gallin JI, Kade D, O'Leary WM. Serum lipids in infection. *N Engl J Med.* 1969;281(20):1081-6.

Gold SI. Periodontics. The past. Part (I). Early sources. *J Clin Periodontol.* 1985;12(2):79-97.

Goldbourt U, Yaari S, Medalie JH. Isolated low HDL cholesterol as a risk factor for coronary heart disease mortality. A 21-year follow-up of 8000 men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17(1):107-13.

Goldstein JL, Brown MS. Regulation of mevalonate pathway. *Nature.* 1990;343(1):425-30.

Gomez SL, Turchiello RF, Jurado MC, Boschcov P, Gidlund M, Neto AM. Characterization of native and oxidized human low-density lipoprotein by the Z-scan technique. *Chem Phys Lipids.* 2004;132(2):185-95.

Gomez SL, Monteiro AM, Rabbani SR, Bloise AC, Carneiro SM, Alves S. Cu and Fe metallic ions-mediated oxidation of low-density lipoproteins studies NMR, TEM and Z-scan tecnique. *Chem Phys Lipids.* 2010.[epud ahead of print].

Górska R, Gregorek H, Kowalski J, Laskus-Perendyk A, Syczewska M, Madalinski K. Relationship between clinical parameters and cytokine profile in inflamed gingival tissue and serum samples from patients with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2003;30(12):1046-5

REFERÊNCIAS

Goto AM Jr. Triglycerides as a risk factor for coronary artery disease. *Am J Cardiol.* 1998;82(9A):22Q-25Q.

Gotto AM. Antioxidantes, statins and atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol.* 2003;41(7):1205-10.

Graves DT, Cochran D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. *J Periodontol.* 2003;74(3):391-401.

Groux H, Bigler M, de Vries JE, Roncarolo MG. Interleukin-10 induces a long-term antigen-specific anergic state in human CD4+ T cells. *J Exp Med.* 1996;184(1):19-29.

Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med.* 2005;352(16):1685-95.

Hasdai D, Scheinowitz M, Leibovitz E, Sclarovsky S, Eldar M, Barak V. Increased serum concentrations of interleukin-1 beta in patients with coronary artery disease. *Heart.* 1996;76(1):24-8.

Havel RJ, Eder HA, Bragdon JH. The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J Clin Invest.* 1955;34(9):1345-53.

Heeschen C, Dimmeler S, Hamm CW, Fichtlscherer S, Boersma E, Simoons ML, et al. Serum level of the anti-inflammatory cytokine interleukin-10 is an important prognostic determinant in patients with acute coronary syndromes. *Circulation.* 2003;107(16):2109-14.

Hevonoja T, Pentikainen MO, Hyvonon MT, Kovanen PT, Ala-Korpela M. Structure of low density lipoprotein (LDL) particles: basis for understanding molecular changes in modified LDL. *Biochim Biophys Acta.* 2000;1488(3):189-210.

Hiki M, Shimada K, Ohmura H, Liyanagi T, Kume A, Sumiyoshi K. Serum levels of remnant lipoprotein cholesterol and oxidized low-density lipoprotein in patients with coronary artery disease. *J Cardiol.* 2009;53(1):108-16.

Hirsch RL. Hyperlipidemia, fatty liver, and bromsulphophthalein retention in rabbits injected intravenously with bacterial endotoxins. *J Lipid Res.* 1964;5:563-8.

Holvoet P, Lee DH, Steffes M, Gross M, Jacobs DR Jr. Association between circulating oxidized low-density lipoprotein and incidence of the metabolic syndrome. *JAMA.* 2008;299(19):2287-93.

Hunter W. An address on the role of sepsis and antisepsis in medicine. *Lancet.* 1911;177(4559):79-86.

Iacopino AM, Cutler CW. Pathophysiological relationships between periodontitis and systemic disease: recent concepts involving serum lipids. *J Periodontol.* 2000;71(8):1375-84.

Hunter W. An address on the role of sepsis and antiseptics in medicine. *Lancet.* 1911;177(4559):79-86.

Iacopino AM, Cutler CW. Pathophysiological relationships between periodontitis and systemic disease: recent concepts involving serum lipids. *J Periodontol.* 2000;71(8):1375-84.

Ishizaka N, Ishizaka Y, Takahashi E, Toda Ei E, Hashimoto H, Ohno M. Increased prevalence of carotid atherosclerosis in hepatitis B virus carriers. *Circulation.* 2002;105(9):1028-30.

Iughetti L, Volta C, Maggi E, Palladini G, Perugini C, Bellomo G et al. Circulating antibodies recognizing oxidatively modified low-density lipoprotein in children. *Pediatr Res.* 1999;45(1):94-9.

Kannel WB, Anderson K, Wilson PWF. White blood cell count and cardiovascular disease: insights from the Framingham Study. *JAMA.* 1992;267(9):1253-6

Katz J, Marc H, Porter S, Ruskin J. Inflammation, periodontitis, and coronary heart disease. *Lancet.* 2001;358(9297):1998.

Ketelhuth DF, Tonini GC, Carvalho MD, Ramos RF, Boschcov P, Gidlund M. Autoantibody response to chromatographic fractions from oxidized LDL in angina patients and healthy controls. *Scand J Immunol.* 2008;68(4):456-62.

Kinane DF. Periodontal diseases' contributions to cardiovascular disease: an overview of potential mechanisms. *Ann Periodontol.* 1998;3(1):142-150

Kris-Etherton PM, Lefevre M, Beecher GR, Gross MD, Keen CL, Etherton TD. Bioactive compounds in nutrition and health research methodologies for establishing biological function: the antioxidant and anti-inflammatory effects of flavonoids on atherosclerosis. *Annu Rev Nutr.* 2004;24:511-38.

Kitchens RL, Wolfbauer G, Albers JJ, Munford RS. Plasma lipoproteins promote the release of bacterial lipopolysaccharide from the monocyte cell surface. *J Biol Chem.* 1999;274(48):34116-22.

Koch AE, Kunkel SL, Pearce WH, Shah MR, Parikh D, Evanoff HL, et al. Enhanced production of the chemotactic cytokines interleukin-8 and monocytes chemoattractant protein-1 in human abdominal aortic aneurysms. *Am J Pathol.* 1993;142(5):1423-31.

Laichalk LL, Danforth JM, Standiford TJ. Interleukin-10 inhibits neutrophil phagocytic and bactericidal activity. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 1996;15(4):181-7.

Laurila A, Bloigu A, Nayha S, Hassi J, Leinonen M, Saikku P. Chronic Chlamydia pneumonia infection is associated with a serum lipid profile know to be a risk factor for atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17(11):2910-3.

Levine DM, Parker TS, Donnelly TM, Walsh A, Rubin AL. In vivo protection against endotoxin by plasma high density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci.* 1993;90(24):12040-4

Libby P, Egan D, Skarlatos S. Roles of infectious agents in atherosclerosis and restenosis. *Circulation.* 1997;96(11):4095-103.

Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature.* 2002;420(6917):868-74.

Lindhe J. Tratado de periodontia clínica e implantologia oral. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1999.

Lindhe J, Karring T, Lang NP. Clinical periodontology and implant dentistry. 4th ed. Copenhagen: Blakwell Munksgaard; 2003.

Liuba P, Persson J, Luama J, Yla-Herttuala S, Personen E. Acute infections in children are accompanied by oxidative modification of LDL and decrease of HDL cholesterol, and followed by thickening of carotid intima-media. *Eur heart J.* 2003;24(6):515-21.

Loe H. Periodontal diseases: a brief historical perspective. *Periodontol* 2000. 1993;2(1):7-12.

Loesche WJ. Association of the oral flora with important medical diseases. *Current Opin Periodontol.* 1997;4:21-28.

Loeshe W, Pohl A, Karapetous F. Plasma lipids and blood glucose in patients with marginal periodontais. *J Dent Res.* 1997;76:408-18

Loeshe 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):537-541.

Loos BG, Craandijk J, Hoek FJ, Wertheim-van Dillen PM, van der Velden U. Elevation of systemic markers related to cardiovascular diseases in the peripheral blood of periodontitis patients. *J Periodontol.* 2000;71(10):1528-34.

Lotufo PA. Premature mortality from heart disease in Brazil. A comparison with other countries. *Arq Bras Cardiol.* 1998; 70(5):321-5.

Lower GD. Etiopathogenesis of cardiovascular disease: hemostasis, thrombosis and vascular medicine. *Ann Periodontol.* 1998;3(1):121-6.

Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature*. 2000;407(6801):233-241.

Mallat Z, Heymes C, Ohan J, Faggini E, Lesèche G, Tedgui A. Expression of interleukin-10 in advanced human atherosclerotic plaques: relation to inducible nitric oxide synthase expression and cell death. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999;19(3):611-6.

Marcaccini AM, Meschiari CA, Sorgi CA, Saraiva MC, de Souza AM, Faccioli LH, et al. Circulating interleukin-6 and high-sensitivity C-reactive protein decrease after periodontal therapy in otherwise healthy subjects. *J Periodontol*. 2009;80(4):594-602.

Matsuura E, Kobayashi Y, Shen L, Quan N, Marakova M, et al. Autoimmunity, infectious, immunity and atherosclerosis. *J Clin Immunol*. 2009;29(6):714-21.

Mayr M, Heymes C, Ohan J, Faggini E, Leseche G, Tedgui A. Expression of interleukin-10 in advanced human atherosclerotic plaques: relation to inducible nitric oxide synthase expression and cell death. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999;19(3):611-6.

Mendall MA, Patel P, Asante M, Ballam L, Morris J, Strachan DP, et al. Relation of serum cytokine concentration to cardiovascular risk factors and coronary heart disease. *Heart*. 1997;78(3):273-7.

Mengel R, Bacher M, Flores de Jacoby L. Interactions between stress, interleukin-1beta, interleukin-6 and cortisol in periodontally diseased patients. *J Clin Periodontol*. 2002;29(11):1012-22.

Mitsis FJ. Hippocrates in the golden age: his life, his work and his contribution to dentistry. *J Am Coll Dent*. 1991;58(1):26-30.

Moore WE, Moore LV. The bacteria of periodontal diseases. *Periodontol* 2000. 1994;5:66-77.

Mullenix PS, Andersen CA, Starnes BW. Atherosclerosis as inflammation. *Annals Vasc Sur*. 2005;19(1):130-8.

Naruko T, Ueda M, Haze K, Van der Wal AC, Van der Loos CM, Itoh A, et al. Neutrophil infiltration of culprit lesions in acute coronary syndromes. *Circulation*. 2002;106(23):2894-2900.

Nibali L, D'Aiuto F, Griffiths G, Patel K, Suvan J, Tonetti MS. Severe periodontitis is associated with systemic inflammation and a dysmetabolic status: a case-control study. *J Clin Periodontol*. 2007;34(11):931-7.

Noack B, Genco RJ, Trevisan M, Grossi S, Zambon JJ, De Nardin E. Periodontal infections contribute to elevated systemic C-reactive protein level. *J Periodontol*. 2001;72(9):1221-7.

- Noack B, Genco RJ, Trevisan M, Grossi S, Zambon JJ, De Nardin E. Periodontal infections contribute to elevated systemic C-reactive protein level. *J Periodontol.* 2001;72(9):1221-7.
- Nonogaki K, Moser AH, Pan XM, Staprans I, Grunfeld C, Feingold KR. Lipoteichoic acid stimulates lipolysis and hepatic triglyceride secretion in rats in vivo. *J Lipid Res.* 1995;36(9):1987-95.
- Offenbacher S. Periodontal disease:pathogenesis. *Ann Periodontol.* 1996;1(1):821-78.
- Oishi Y, Oki T, Ito S. Leukocyte count and concentration of soluble adhesion molecules as predictors of coronary atherosclerosis. *Coron Artery Dis.* 2000.11(6):445-9.
- Okada M, Kobayashi M, Hino T, Kurihara H, Miura K. Clinical periodontal findings and microflora profiles in children with chronic neutropenia under supervised oral hygiene. *J Periodontol.* 2001;72(7):945-52.
- O'Reilly PG, Claffey NM. A history of oral sepsis as a cause of disease. *Periodontol* 2000.2000;23:13-8.
- Page RC, Offenbacher S, Schroeder HE, Seymour GJ, Kornman KS. Advances in the pathogenesis of periodontitis:summary of developments, clinical implications and future directions.*Periodontol* 2000. 1997;14:216-48.
- Palinski W, Horkko S, Miller E, Steinbrecher UP, Powell HC, Curtiss LK, et al. Cloning of monoclonal autoantibodies to epitopes of oxidized lipoproteins from apolipoprotein E-deficient mice. Demonstration of epitopes of oxidized low density lipoprotein in human plasma. *J Clin Invest.* 1996;98(3):800-14.
- Pajkrt PE., Doran JE, Koster F, Lerch PG, Arnet B, Van der Poll T, et al. Antiinflammatory effects of reconstituted high-density lipoprotein during human endotoxemia. *J Exp Med.* 1996;84(5):1601-8
- Papapanou PN. Periodontal diseases: epidemiology. *Ann Periodontol.*1996;1(1):1-36.
- Pearson TA, Mensah GA, Alexander RW, Anderson JL, Cannon RO 3rd, Criqui M et al. Markers of inflammation and cardiovascular disease: aplication to clinical and public health practice: A statement for healthcare professionals from the Centers for Disease Control and Prevention and American heart Association. *Circulation.* 2003; 107(3):499-511.
- Pentikäinen MO, Lehtonen EMP, Kovanen PT. Aggregation and fusion of modified low density lipoprotein. *J Lipid Res.* 1996;37(12):2638-49.

Petersen PE, Ogawa H. Strengthening the prevention of periodontal disease: the WHO approach. *J Periodontol*. 2005;76(12):2187-93.

Puhl H, Waeg, Esterbauer H. Methods to determinate oxidation of low-density lipoproteins. *Methods in enzymology*. 1994;233:425-41.

Pussinen PJ, Jauhiainen M, Vilkuna-Rautiainen T, Sundvall J, Vesanen M, Mattila K, et al. Periodontitis decreases the antiatherogenic potency of high density lipoprotein. *J Lipid Res*. 2004;45(1):139-47.

Puurunen M, Manttari M, Manninen V, Tenkanen L, Alfthan G, Ehnholm C, et al. Antibodies against oxidized low-density lipoprotein predicting myocardial infarction. *Arch Intern Med*. 1994;154(22):2605-2609.

Restaino CG, Chaparro A, Valenzuela MA, Kettlun AM, Vernal R, Silva A, et al. Stimulatory response of neutrophils from periodontitis patients with periodontal pathogens. *Oral Dis*. 2007;3(5):474-81.

Ridker PM, Cushman M, Stampfer MJ, Tracy RP, Hennekens CH. Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease in apparently men. *N Engl J Med*. 1997;336(14):973-9.

Ridker PM, Cushman M, Stampfer MJ, Tracy RP, Hennekens CH. Plasma concentration of C-reactive protein and risk of developing peripheral vascular disease. *Circulation*. 1998;97(5):425-8.

Ridker PM, Rifai N, Stampfer MJ, Hennekens CH. Plasma concentration of interleukin-6 and the risk of future myocardial infarction among apparently healthy men. *Circulation*. 2000; 101(15):1767-72.

Ridker PM. C-reactive protein, inflammation and cardiovascular diseases – clinical update. *Tex Heart Inst J*. 2005;32(3):384-6.

Ridker PM, Paynter NP, Rifai N, Gaziano JM, Cook NR. C-reactive protein and parental history improve global cardiovascular risk prediction: the Reynolds Score for men. *Circulation*. 2008;118(22):2243-51.

Riggs JM, Pyorrhea alveolaris. *Dent Cosmos*. 1882;24:523-38.

Rios FJ, Jancar S, Melo IB, Ketelhuth DF, Gidlund M. Role of PPAR-gamma in the modulation of CD36 and FcgammaRII induced by LDL with low and high degrees of oxidation during the differentiation of the monocytic THP-1 cell line. *Cell Physiol Biochem*. 2008;22(5-6):549-56.

- Ronchini KR, Duarte AJ, Casseb JS, Gidlund M. Cardiovascular complications and increased levels of circulating modified low density lipoprotein in HIV patients and patients with lipodystrophy. *Braz J Med Biol Res.* 2004;37(1):119-22.
- Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature.* 1993;362(6423):801-9.
- Roos R. Atherosclerosis: an inflammatory disease. *N Engl J Med.* 1999;340(2):115-126.
- Saadeddin SM, Habbab MA, Ferns GA. Markers of inflammation and coronary artery disease. *Med Sci Monit.* 2002;8(1):RA5-12.
- Sammalkorpi K, Valtonen V, Kerttula Y, Nikkila E, Taskinen MR. Changes in serum lipoprotein pattern induced by acute infections. *Metabolism.* 1998;37(9):859-865.
- Salonen JT, Salonen R, Seppanen K, Rauramaa R, Tuomilehto J. HDL, HDL2, and HDL3 subfractions, and the risk of acute myocardial infarction. A prospective population study in eastern Finnish men. *Circulation.* 1991;84(1):129-39.
- Sammalkorpi K, Valtonen V, Kerttula Y, Nikkila E, Taskinen MR. Changes in serum lipoprotein pattern induced by acute infections. *Metabolism.* 1988;37(9):859-65.
- Santos AO, Fonseca FA, Fisher SM, Monteiro CM, Brandão AS, Póvoa RM, et al. High circulating autoantibodies against human oxidized low-density lipoprotein are related to stable and lower titers to unstable clinical situation. *Clin Chim Acta.* 2009;406(1-2):113-8.
- Segura RCF, Tramontina VA, Farhat S, Kim SH. Doença periodontal e alterações sistêmicas – um novo paradigma. *J Bras Endo/Perio.* 2001;2(5):119-23.
- Slade GD, Offenbacher S, Beck JD, Heiss G, Pankow JS. Acute-phase inflammatory response to periodontal disease in the US population. *J Dent Res.* 2000;79(1):49-57.
- Slots J. Bacterial specificity in adult periodontitis. A summary of recent work. *J Clin Periodontol.* 1986;13(10):912-7.
- Soares SR, Carvalho-Oliveira R, Ramos-Sanchez E, Catanozi S, da Silva LF, Mauad T, et al. Air pollution and antibodies against modified lipoproteins are associated with atherosclerosis and vascular remodeling in hyperlipemic mice. *Atherosclerosis.* 2009;207(2):368-73.
- Soltész P, Veres K, Laczik R, Der H, Csipo I, Timar O, et al. Evaluation of antibodies to oxidized low-density lipoprotein and assessment of C-reactive protein in acute coronary syndrome and stable coronary artery disease. *Thromb Haemost.* 2007;98(2):413-9.

Stemme S, Faber B, Holm J, Wiklund O, Witztum JL, Hansson GK. T lymphocytes from human atherosclerotic plaques recognize oxidized low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995;92(9):3893-7.

Stocker R, Keaney JF Jr. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev*. 2004;84(4):1381-478.

Svensjo E, Boschov P, Ketelhuth DF, Jancar S, Gidlund M. Increased microvascular permeability in the hamster cheek pouch induced by oxidized low density lipoprotein (oxLDL) and some fragmented apolipoprotein B protein. *Inflamm Res*. 2003;52(5):215-20.

Teixeira Carvalho MD, Vieira Vendrame CM, Jacon Ketelhuth DF, Yamashiro-Kanashiro EH, Goto H, Gidlund M. High-Density Lipoprotein inhibits the uptake of modified Low-Density Lipoprotein and the expression of CD36 and FcγRI. *J Atheroscler Thromb*. 2010 (Epub ahead of print)

Thomson SP, Gibbon RJ, Smars PA, Suman VJ, Pierre RV, Santrach PJ, et al. Incremental value of the leukocyte differential and the rapid creatine-kinase-MB isoenzyme for the early diagnosis of myocardial infarction. *Ann Intern Med*. 1995;122(5):335-41.

Tipping PG, Hancock WW. Production of tumor necrosis factor and interleukin-1 by macrophages from human atheromatous plaques. *Am J Pathol*. 1993;142(6):1721-8.

Uint L, Gebara OC, Pinto LB, Wajngarten M, Boschov P, da Luz PL, et al. Hormone replacement therapy increased levels of antibodies against heat shock protein 65 and certain species of oxidized low density lipoprotein. *Braz J Med Biol Res*. 2003;36(4):491-4.

Van der Poll T, Van Deventer SJ, Buller HR, Sturk A, ten Cate JW. Comparison of the early dynamics of systemic prostacyclin release after administration of tumor necrosis factor and endotoxin to healthy humans *J Infect Dis*. 1991;164(3):599-601.

Vaarala O. Antibodies to oxidised LDL. *Lupus*. 2000;9(3):202-5.

Yumoto H, Nakae H, Fujinaka K, Ebisu S, Natsuo T. Interleukin-6 (IL-6) and IL-8 are induced human oral epithelial cells in response to periodontopathic *Eikenella corrodens*. *Infect Immun*. 1999;67(1):384-94.

Webber C, Zerneck A, Libby P. The multifaceted contributions of leukocyte subsets to atherosclerosis: lessons from mouse models. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(10):802-15.

Witztum JL. Immunological response to oxidized LDL. *Atherosclerosis*. 1997; 131 Suppl: 9-11.

Wu R, Nityanand S, Berglund L, Lithell H, Holm G, Lefvert AK. Antibodies against cardiolipin and oxidatively modified LDL in 50-year-old men predict myocardial infarction. *Atheroscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17(11):3159-3163.

Yla-Herttuala S, Palinski W, Rosenfeld ME, Parthasarathy S, Carew TE, Butler S, et al. Evidence for the presence of oxidatively modified low density lipoprotein in atherosclerotic lesions of rabbit and man. *J Clin Invest.* 1989;84(4):1086-95.

Zou DR, Lui YW, Chen Y, Dai QC. The levels of interleukin-8 in gingival crevicular fluids of chronic periodontitis. *Shanghai kou Qiang Yi Xue.* 2001;10(4):339-41.

ANEXOS

ANEXO A - Autorização para a execução de tratamento e pesquisa**CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO****(ao paciente)**

Prezado(a) Paciente,

**Eu,, portadora do documento de identidade RG....., juntamente
com vamos desenvolver uma pesquisa cujo título é: LDL e Z-scan.**

Os objetivos do trabalho serão:

- Verificar as concentrações de marcadores de risco para aterosclerose tais como: nível de citocina inflamatória, HDL, Triglicérides, LDL oxidada e marcadores de reações inflamatórias sistêmicas (números de leucócitos, neutrófilos, linfócitos e monócitos),
- Analisar o sinal de Z-scan sobre a partícula de LDL.
- Todos os dados serão utilizados com finalidade científica. Informo que o Sr (a) tem a garantia de confidencialidade, bem como de acesso, em qualquer etapa dos estudos, para qualquer esclarecimento de eventuais dúvidas e sobre o andamento do trabalho. Será necessária uma coleta de sangue para análise. Em nenhum momento da pesquisa será necessário fotografar ou fazer imagens do(a) senhor(a). Se tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Instituto de Ciências Biomédicas (CEP) da Universidade de São Paulo -USP, estabelecido a Avenida Lineu Prestes, 2415 – Cidade Universitária -pelo tel 3091-7733, na cidade São Paulo. Será mantido sigilo sobre sua identidade e informo que será garantida a liberdade de retirada do consentimento a qualquer momento e assim deixar de participar do estudo. Também não haverá custo nem pagamento pela colaboração.

AUTORIZAÇÃO

Autorizo de forma livre e voluntária a realização do trabalho apresentado. Declaro haver recebido explicações claras e simples, bem como os propósitos e riscos, além de saber que os tratamentos seguem os adequados princípios técnicos científicos reconhecidos pela odontologia. Declaro estar ciente da necessidade de quatro coletas de sangue, sendo elas; uma antes do início do tratamento periodontal, e as outras coletas 3, 6 e 12 meses após o término do tratamento periodontal.

Declaro que fui informado de que posso desistir da pesquisa e/ou tratamento em andamento, tendo de me manifestar por escrito, assumindo com isso os riscos e as conseqüências que possam prejudicar a minha saúde bucal.

Assinatura do paciente ou responsável legal

Data ---/----/-----

RG: _____

Nome: _____

Endereço: _____

Telefone: _____

Assinatura do pesquisador

ANEXO B - Anamnese

1. Clínica de origem: _____
2. Data do exame inicial: ___/___/___ Coleta de sangue inicial ___/___/___
 Término do Tratamento periodontal ___/___/___
 Data do exame final: ___/___/___
 Segunda coleta de sangue : ___/___/___ Terceira coleta de sangue ___/___/___
3. Dados Pessoais
 - 3.1) Prontuário número : _____ Nome : _____
 Endereço : _____ Tel : _____
 - 3.2) Idade : _____ Data de nascimento : ___/___/___.
 - 3.3) Sexo: _____ 1= masculino; 2 = feminino
 - 3.4) Procedência: Município: _____
 Estado : _____
 - 3.5) Ocupação: _____
 - 3.6) Cor da pele: _____ 1 = Branco; 2 = Negro; 3 = Pardo; 4 = Amarelo
 - 3.7) Escolaridade : _____ 1 = Não estudou; 2 = 1 grau incompleto; 3 = 1 grau completo
 ; 4= 2 grau incompleto 5 = 2 grau completo; 6= superior incompleto; 7= superior completo; 8= não sabe/ não lembra.
 - 3.8) Renda familiar: _____ 1= 1 salário mínimo; 2 = 2 a 3 salários mínimos, 3 = 4 a 6 salários mínimos; 4= 7 a 10 salários mínimos; 5 = 11 a 15 salários mínimos; 6= acima de 16 salários mínimos.
 - 3.9) Está sob tratamento médico atualmente? _____ Toma algum medicamento? _____
 Qual medicamento? _____
 - 3.10) Faz uso de suplemento alimentar? _____ Toma vitamina? _____
 - 3.11) Possui alguém da família com diabetes? _____ Quem? _____
 - 3.12) Possui alguém da família com problemas cardíacos? _____ Quem? _____
 - 3.13) Com que frequência pratica atividade física? _____ 1= diariamente; 2 = 5 a 6 dias por semana; 3= 3 a 4 dias da semana; 4= 1 a 2 dias da semana; 5= 3 a 4 dias no mês; 6= 1 a 2 dias no mês; 7= menos de um dia no mês; 8= não pratica; 9 = praticou no passado.

- 3.14) Se sim, que atividade física pratica? _____
- 3.15) Faz alguma dieta alimentar? _____ No caso de afirmativo, se priva de qual alimento? _____
- 3.16) Consume álcool? _____ 1= todos os dias; 2 = 5 a 6 dias por semana; 3 = 3 a 4 dias da semana; 4 = 1 a 2 dias da semana; 5 = 3 a 4 dias no mês; 6 = 1 a 2 dias no mês; 7 = menos de um dia no mês; 8= nunca consumiu; 9= consumiu no passado.
- 3.17) Hábitos de higiene bucal
- 3.17.1) Foi orientado sobre higiene bucal? _____
- 3.17.2) Se orientado por quem? _____ 1= dentista; 2= família; 3= na escola ou outra instituição; 4 = leu a respeito; 5 = outros.
- 3.17.3) Pratica a escovação dos dentes diariamente? _____. 1= Sim; 2= Não
- 3.17.4) Número de escovações por dia. _____ 1= 1 vez; 2= 2 vezes; 3=3 vezes; 4= 4 ou mais vezes.
- 3.17.5) Tipo de escova. _____ 1= dura; 2= média; 3= macia ou extra macia; 4= não sabe
- 3.17.6) Segundo o uso da escova, ela é _____ 1= individual; 2= familiar/coletiva
- 3.17.7) Fio/Fita dental _____ 1= não usa; 2 = usa às vezes; 3 = usa diariamente.
- 3.17.8) Enxaguatório bucal _____ 1= não usa; 2= usa às vezes; 3= usa diariamente.