

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

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.

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.

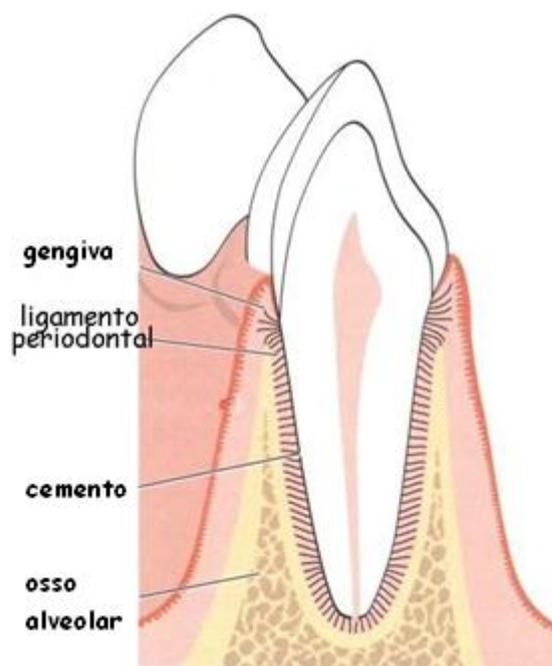


Figura 1 - Anatomia do Periodonto.

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

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. Pyorrhea 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 proinflamatórias 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 proinflamatórias, 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 pró-inflamatórias, 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).

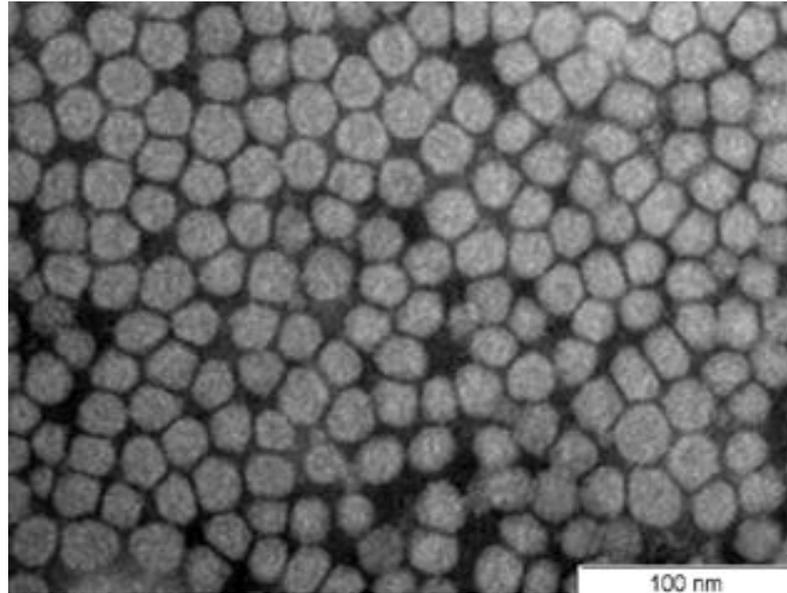


Foto 3 – Microscopia eletrônica de transmissão de LDL nativa.
Fonte: Gomez et al. (2010)

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).

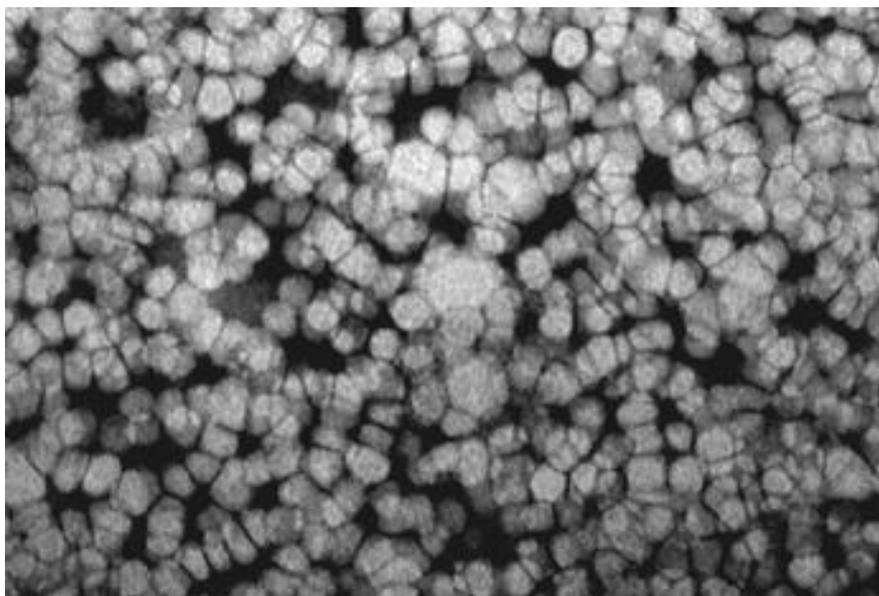


Foto 4 – Microscopia eletrônica de transmissão de LDL modificada por cobre.
Fonte: Gomez et al. (2010).

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).

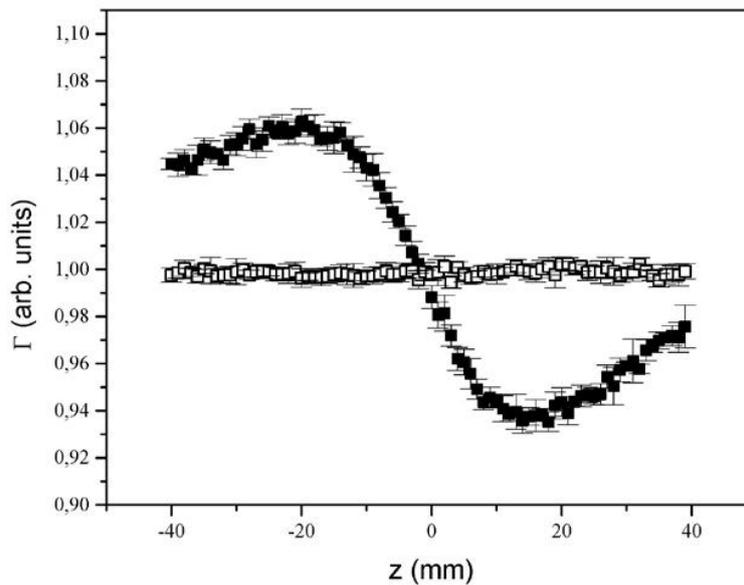


Figura 2 – Transmitância normalizada em função da posição da amostra. Varredura-Z da LDL nativa (■) e da oxidada com CuSO_4 (□)

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.

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 an 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 Intern 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

- 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 known 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: Blackwell Munksgaard; 2003.

Liuba P, Persson J, Luoma 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.

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

Loesche 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.