



ESCOLA BAHIANA DE MEDICINA E SAÚDE PÚBLICA  
CURSO DE ODONTOLOGIA  
ESPECIALIZAÇÃO EM PERIODONTIA COM INICIAÇÃO EM  
IMPLANTODONTIA

IZADORA DA SILVA CAMPODONIO ELOY BALINHA

**PERIODONTITE MATERNA E NASCIMENTO DE BEBÊS  
PREMATUROS E/OU COM BAIXO PESO: AVALIAÇÃO  
MICROBIOLÓGICA DA PLACENTA E RESPOSTA  
IMUNE CELULAR NO LEITE MATERNO.**

MATERNAL PERIODONTITIS AND PREMATURE BIRTH OF  
BABIES AND / OR LOW WEIGHT: MICROBIOLOGICAL  
EVALUATION OF PLACENTA AND CELLULAR IMMUNE  
RESPONSE IN BREAST MILK.

SALVADOR, 2012

IZADORA DA SILVA CAMPODONIO ELOY BALINHA

**PERIODONTITE MATERNA E NASCIMENTO DE BEBÊS  
PREMATUROS E/OU COM BAIXO PESO: AVALIAÇÃO  
MICROBIOLÓGICA DA PLACENTA E RESPOSTA  
IMUNE CELULAR NO LEITE MATERNO.**

Projeto de pesquisa apresentado a Pós  
Graduação da Escola Bahiana de  
Medicina e Saúde Pública para obtenção  
do título de especialista em Periodontia  
com Iniciação em Implantodontia.

Orientador: Prof. Dr. Urbino Tunes

Co-orientador: Prof. Dra. Roberta Tunes

SALVADOR, 2012

## RESUMO

A doença periodontal, de origem infecciosa, apesar de estar localizada na cavidade oral, é capaz de causar alterações à distância, devido à possibilidade das bactérias envolvidas no processo inflamatório atingirem a via hematogênica. A plausibilidade biológica entre periodontite e prematuridade baseia-se no fato da presença dessas bactérias em úteros grávidos poderem causar a elevação de prostaglandinas e outras citocinas inflamatórias, induzindo o trabalho de parto ou até mesmo diminuindo a nutrição fetal. Especulando-se que a resposta inflamatória pode provocar um aumento plasmático de leucócitos, atraindo mais células para a glândula mamária, resultando em aumento de células e citocinas secretadas no leite materno, após o parto, a doença periodontal poderia influenciar também a qualidade do leite materno oferecido ao recém-nato. Já na presença de diabetes gestacional, o risco do parto prematuro e complicações neonatais também é bastante aumentado. Apesar da doença periodontal poder ser influenciada pelo diabetes mellitus e estado grávidico, sugere-se que esta também possa interferir no controle glicêmico e curso da gestação. O objetivo deste trabalho é avaliar a relação entre parto prematuro e nascimento de bebês de baixo peso com doença periodontal crônica, por meio da análise da presença de periodontopatógenos em amostras de placenta, correlacionando com a microbiota subgengival e da secreção cervicovaginal em parturientes com parto a termo ou prematuro, com ou sem diabetes gestacional. Buscar-se-á, também, identificar se a periodontite pode interferir na qualidade do leite materno destas mulheres.

**PALAVRAS-CHAVE:** Periodontite, trabalho de parto prematuro, recém-nascido de baixo peso, diabetes gestacional, leite materno.

## **ABSTRACT**

Periodontal disease, of infectious origin, despite being located in the oral cavity, can cause changes in the distance due to the possibility of bacteria involved in the inflammatory process reach hematogenous. The biological plausibility between periodontitis and preterm birth based on the fact that the presence of these bacteria in the uterus can cause gravidic elevation of prostaglandins and other inflammatory cytokines, inducing labor or even decreasing fetal nutrition. Speculating that the inflammatory response may result in increased plasma levels of leukocytes, attracting more cells to the mammary gland, resulting in an increase of cells and cytokines secreted in breast milk after delivery, periodontal disease could also influence the quality of breast milk offered to the newborn. In the presence of gestational diabetes, the risk of premature birth and neonatal complications is also greatly increased. Although periodontal disease may be influenced by diabetes mellitus and pregnancy status, it is suggested that this may also interfere in glycemic control and course of pregnancy. The objective of this study is to evaluate the relationship between preterm birth and low birth weight babies with chronic periodontal disease, by analyzing the presence of periodontal pathogens in samples of placenta, correlating with the subgingival microbiota and cervicovaginal secretions in pregnant women with childbirth term or preterm, with or without gestational diabetes. Search It will also identify whether periodontitis may interfere with the quality of breast milk of the women.

**KEY WORDS:** Periodontitis, Obstetric labor, premature, low birth weight, breast milk.

## SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	03
ABSTRACT.....	05
1.0 INTRODUÇÃO.....	07
2.0 REVISÃO DE LITERATURA.....	10
3.0 DISCUSSÃO.....	36
4.0 SUBPROJETO I: Periodontite materna e nascimento de bebês prematuros e/ou com baixo peso: avaliação microbiológica da placenta.....	42
4.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	42
4.2. METODOLOGIA.....	43
5.0 SUBPROJETO II: Periodontite materna e a presença de diabetes gestacional: avaliação microbiológica da placenta.....	54
5.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	54
5.2. METODOLOGIA.....	55
6.0 SUBPROJETO III: Relação entre condição periodontal e composição do leite materno .....	59
6.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	59
6.2. METODOLOGIA.....	60
7.0 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	63
8.0 ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA.....	64
9.0 RESULTADOS ESPERADOS.....	66
10.0 REFERÊNCIAS.....	68
ANEXO 1.....	75
ANEXO 2.....	76

## 1.0 INTRODUÇÃO

A doença periodontal é uma patologia de origem infecciosa causada pelo acúmulo de microorganismos sobre a superfície dentária supra ou subgingivalmente. Estima-se que 700 espécies diferentes de patógenos podem colonizar a cavidade bucal, e que todas as pessoas são capazes de abrigar pelo menos 150 tipos diferentes de bactérias<sup>1</sup>.

A doença se instala quando ocorre um desequilíbrio entre as defesas do organismo, e a agressão microbiana<sup>2</sup>. Assim, a depender da resposta do hospedeiro e do acúmulo bacteriano, a doença começa, inicialmente como uma inflamação na gengiva, gengivite, podendo ou não evoluir para uma periodontite, onde já ocorre destruição progressiva do periodonto de sustentação (ligamento periodontal, cemento e osso alveolar).

As principais bactérias envolvidas neste processo são as localizadas subgingivalmente, ditas periodontopatogênicas, por serem capazes de desencadear uma resposta inflamatória intensa na região dos tecidos periodontais. São normalmente bactérias Gram negativas, anaeróbios, facultativos ou estritos, assacarolíticos. Socransky et al., em 1998<sup>2</sup>, buscaram avaliar os espécimes bacterianos envolvidos com a periodontite. De acordo com a existência de bactérias e sua prevalência em bolsas periodontais com diferentes graus de gravidade, agruparam-nas em cinco grupos. As denominadas complexo vermelho, *Tannerella forsythia*, *Porphyromonas gingivalis* e *Treponema denticola*, foram consideradas as mais patogênicas, encontradas em bolsas periodontais mais profundas.

Essas bactérias são capazes de desencadear processo inflamatório devido à liberação de vários produtos tóxicos (vesículas extracelulares e lipopolissacarídeos, LPS), que irão atrair infiltrado de neutrófilos, macrófagos e linfócitos, promovendo a liberação de inúmeras citocinas inflamatórias, como Fator de Necrose Tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), interleucina 1(IL-1) e interleucina 6(IL-6) <sup>3</sup>.

A literatura já demonstrou que indivíduos portadores de periodontite crônica apresentam níveis plasmáticos de mediadores inflamatórios elevados, além das próprias bactérias e seus subprodutos que são capazes de atingir a corrente sanguínea, de modo a configurar a plausibilidade biológica para a associação da presença de inflamação no periodonto com diversas alterações sistêmicas, como hiperlipidemia<sup>4</sup>, diabetes<sup>5</sup>, parto prematuro<sup>6</sup>, pré-eclampsia<sup>7</sup>, doenças cardiovasculares e hipertensão arterial<sup>8</sup>.

Em gestantes, a bacteremia, endotoxemia e elevação plasmática de mediadores inflamatórios causadas pela presença de uma infecção periodontal, aumentam a oportunidade da ocorrência de infecção placentária por via hematogênica, podendo ter como consequência o parto prematuro e nascimento de bebês de baixo peso<sup>9</sup>.

Assim, é oportuna a investigação de periodontopatógenos na placenta, pois a presença destas bactérias, seus subprodutos e citocinas inflamatórias poderiam favorecer o desenvolvimento precoce de trabalho de parto e levar ao nascimento de bebês prematuros e/ou com baixo peso.

A presença de diabetes gestacional nas mulheres já é um importante fator de risco conhecido na ocorrência de partos prematuros e nascimento de bebês com baixo peso, com plausibilidade biológica bem estabelecida<sup>10</sup>.



Quando associada à periodontite, pode ser um fator potencializador das intercorrências gestacionais.

Além das alterações durante a gestação e na sua conclusão, após o nascimento do bebê, pode-se pensar na possibilidade da interferência dos mediadores inflamatórios também no leite materno, influenciando a qualidade do alimento ofertado a estes bebês, podendo prejudicar o seu desenvolvimento.

Assim, este projeto de pesquisa tem como objetivo avaliar a relação entre parto prematuro e nascimento de bebês de baixo peso com periodontite crônica, por meio de análise da presença de periodontopatógenos (*Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia* e a *Fusobacterium nucleatum*) em amostras de placenta e citocinas do leite materno, fazendo-se sua correlação com o status periodontal em parturientes a termo ou pré-termo, com ou sem diabetes gestacional.

## 2.0 REVISÃO DE LITERATURA

Mesmo com todo o desenvolvimento médico ao longo dos anos, os índices de nascimento prematuro não se alteraram e continuam causando grandes despesas à saúde pública, não só pelas internações neonatais, mas pelo fato de gerarem indivíduos com mais chances de terem diversas doenças quando adultos (doenças cardiovasculares, diabetes) <sup>11</sup>. Nascimento prematuro configura a maior conta médica, social e econômica em grande parte das maternidades, causando, principalmente mortalidade neonatal, morbidade aguda e sequelas a longo prazo<sup>12</sup>.

Crianças nascidas prematuras, principalmente aqueles antes de 32 semanas, têm um risco maior de, em curto prazo, terem problemas respiratórios, cardíacos, gastrointestinais e septicemia. A longo prazo, podem ter como seqüela paralisia cerebral, déficit de atenção, retinopatia, retardo mental e malformações cardíacas<sup>13</sup>.

Crianças nascidas com menos de 28 semanas de gestação na Inglaterra chegam a custar cinco vezes mais que crianças nascidas a termo, considerando apenas os dez primeiros dias de vida. Além dos custos diretos ocasionados em hospitais, crianças prematuras podem requerer educação especial<sup>13</sup>.

A Organização Mundial de Saúde (OMS) define como parto prematuro nascimentos com menos de 37 semanas de gestação; muito prematuro, antes de 32 semanas; extremamente prematuros, menos de 28 semanas. Quanto ao

peso: baixo, inferior a 2500 g, muito baixo, menor que 1500 g; e extremamente baixo, menor que 1000 g.

O peso ao nascer é o fator determinante mais importante no que diz respeito à chance da criança sobreviver, crescer e se desenvolver com normalidade, sendo este parâmetro utilizado em diversas investigações epidemiológicas e objetivo de intervenção da saúde pública<sup>11</sup>.

Em uma revisão de literatura de base populacional, no Brasil, Silveira et al., em 2008<sup>14</sup>, avaliaram o aumento no nascimento de prematuros por meio de pesquisa utilizando as bases de dados Pubmed/Medline e Lilacs desde 1950. A taxa de parto prematuro variou de 3,4 a 15% nas regiões sul e sudeste, entre 1978 e 2004. Na região nordeste, estudos realizados entre 1984 e 1998 mostraram taxas de 3,8 a 10,2%, também com tendência de aumento. Não foram encontrados estudos avaliando as regiões norte e centro-oeste. Os autores concluíram que há uma clara evidência de aumento das taxas de nascimento pré-termo no país.

Spalicci et al., em 2000<sup>15</sup>, estudaram algumas variáveis maternas em 307 partos prematuros de recém-nascidos vivos em um hospital na cidade de São Paulo. As variáveis maternas estudadas foram: idade, raça, estado civil, escolaridade, profissão, peso, altura, paridade, partos prematuros e abortos anteriores, histórico de natimortos e neomortos anteriores, patologias clínicas maternas, intervalo entre partos, assistência pré-natal, curva de peso materno, patologias maternas, alcoolismo, tabagismo e uso de drogas ilícitas. De todos os itens avaliados, mostraram-se significativos a idade materna maior que 35 anos, peso materno inferior a 49 quilos, curva de peso inicial baixo,

intercorrências materno-fetais (rotura prematura de membranas, infecção ovular, sofrimento fetal, hipertensão arterial, eclampsia, descolamento prematuro de placenta, placenta prévia, gestação múltipla, crescimento intrauterino retardado e infecção do trato urinário), partos prematuros anteriores e ausência adequada de assistência pré-natal.

Nascimento prematuro normalmente ocorre devido ao trabalho de parto prematuro, ruptura de membranas e complicações maternas ou fetais. Vários são os fatores de risco para o desenvolvimento desta intercorrência gestacional de acordo com Williams et al., em 2000<sup>11</sup>:

- Genético: são muito difíceis de serem avaliados devido a grande influência dos fatores ambientais (pré-natal, demográficos e nutricionais). Um dos fatores genéticos que parece mais influenciar é o tamanho do corpo da mãe;
- Demográficos e sociais: mães muito jovens (menores de 18 anos) ou muito velhas (maiores de 36 anos) podem afetar o desenvolvimento intrauterino e o tempo de gestação. Condições socioeconômicas baixas, estresse, ansiedade, esforços físicos muito grandes e baixo nível educacional materno podem causar partos prematuros. O mais importante talvez seja o nível de escolaridade materno;
- Riscos obstétricos: história pregressa de nascimentos prematuros, aborto espontâneo, incompetência cervical, muitos partos ou gravidez gemelar;

- Risco nutricional: para alimentar o feto o que influencia é o peso materno, que determina a capacidade de nutrir o bebê. A dieta materna durante a gestação pouco influencia no peso ao nascer;
- Exposição a produtos tóxicos: fumar e/ou beber são fatores de risco ao parto prematuro;
- Cuidados anteriores a gestação: é muito difícil se fazer conclusões sobre este fator, mas provavelmente será influenciado pelo grau de escolaridade, modificando comportamento por conhecer fatores de risco;
- Infecções: doenças infecciosas passageiras, como malária, diarreia, infecção respiratória ou infecções localizadas, como as genitais, podem afetar o período gestacional.

Na literatura médica já é comumente aceito a infecção vaginal, vaginose bacteriana, como fator de risco para o parto prematuro, principalmente por considerarem a via de acesso direta das bactérias da vagina para o útero (via ascendente) e grandes concentrações plasmáticas de citocinas inflamatórias presentes nestas pacientes<sup>16</sup>. A vaginose bacteriana consiste em uma alteração da microbiota da vagina, que em condições normais, tem predominantemente lactobacilos facultativos. Em condições patológicas, ocorre uma diminuição destas bactérias e um aumento de bactérias anaeróbias e facultativas<sup>12</sup>.

Trabalho de parto é caracterizado pelas contrações uterinas, dilatação cervical e finalmente expulsão do feto. No tempo de gestação normal, a ruptura das membranas ocorre depois do início das contrações. O mecanismo que

inicia o processo não é bem conhecido, mas parece que as prostaglandinas são essenciais no processo e que prostaglandina E2 (PGE2) pode induzir o trabalho de parto<sup>11</sup>.

Porém, em estudos microbiológicos de líquido amniótico intacto em pessoas com trabalho de parto prematuro, não foram encontradas apenas bactérias comuns da vaginose bacteriana. Foi isolado, por exemplo, em várias mulheres, a bactéria *Fusobacterium nucleatum*, que não é comumente encontrada nesta condição clínica. Sendo assim, a infecção do líquido amniótico pode ter como origem outra via de infecção. De fato, muitas mulheres em trabalho de parto prematuro não tem vaginose bacteriana como fator de risco<sup>12</sup>.

*Fusobacterium nucleatum* é uma bactéria comum na cavidade oral, principalmente na presença de doença periodontal. Sugere-se que a origem da *Fusobacterium nucleatum* no líquido amniótico possa ser devido a uma bacteremia transitória oriunda da cavidade oral e uma disseminação pela corrente sanguínea atingindo o fluido amniótico. Pode também ocorrer por bacteremia em procedimentos odontológicos, na presença de úlceras ou imunossupressão<sup>12</sup>.

Han et al., em 2004<sup>17</sup>, aplicaram *Fusobacterium nucleatum* diretamente na corrente sanguínea de camundongos grávidas, buscando mostrar a capacidade desta bactéria em induzir parto prematuro por invadir e se multiplicar no útero gravídico. Foi observada presença destas bactérias na placenta, líquido amniótico e no próprio feto. Os camundongos tiveram gestações com anormalidade, onde se observou o nascimento prematuro e

natimortos. O estudo também avaliou a presença desta bactéria em outros órgãos do camundongo para se verificar a hipótese de uma infecção sistêmica estar favorecendo a prematuridade. Porém observou-se que infecção se deu restritamente dentro do útero.

Lin et al., em 2003<sup>18</sup>, mostraram que 40% dos camundongos que foram submetidos a um modelo de infecção por *Porphyromonas gingivalis* para investigar a associação entre um patógeno periodontal com gravidez anormal tiveram filhotes com baixo peso. Este resultado está associado com a disseminação bacteriana (detecção de DNA destas bactérias no fígado e no útero por exame de PCR) e respostas imunes maternas (elevado número de imunoglobulina G – IgG – específico para *Porphyromonas gingivalis* no soro e no líquido amniótico) e na resposta inflamatória (elevação sérica de TNF  $\alpha$ ).

Arce et al., em 2009<sup>19</sup>, analisaram as consequências de uma infecção oral por *Campylobacter rectus* e *Porphyromonas gingivalis*, em ratos, no crescimento fetal, fecundidade e expressão de TLR4 (*toll-like receptors*) na placenta. TLR4 faz parte do sistema inflamatório inato reconhecendo LPS bacteriano, lipoproteínas e proteoglicanas. Os resultados mostraram um grande aumento de TLR4 na placenta após infecção oral por estes patógenos. Atualmente são conhecidos dez TLR que participam na resposta inflamatória inata.

Fardini et al., em 2010<sup>9</sup>, em estudo com ratos, observou a possibilidade de uma grande diversidade de bactérias poderem causar infecção placentária por via hematogênica, inclusive bactérias consideradas comensais na cavidade oral. Foram injetados em ratas gestantes, bactérias presentes na saliva e

biofilme oriundo de bolsas periodontais maiores que 7 mm, de voluntários, buscando simular bacteremia. Através do exame de reação em cadeia da polimerase (PCR), os autores buscaram comparar as bactérias presentes nas amostras de biofilme e saliva com as presentes na placenta destas ratas. O resultado mostrou que diversas bactérias orais, inclusive as comensais, foram capazes de causar infecção intrauterina.

O PCR é uma tecnologia molecular para identificação de bactérias muito mais sensível e rápida que a cultura. Baseia-se na identificação de genes bacterianos específicos utilizando *primers* para amplificação do DNA em um grande número de cópias<sup>20</sup>.

Bearfield et al., em 2002<sup>21</sup>, compararam as bactérias presentes no biofilme bacteriano oral, secreção vaginal e líquido amniótico de 48 mulheres sem rompimento de membranas. As amostras foram investigadas por meio de cultura e microscopia. O líquido amniótico foi analisado por meio de PCR direcionada para as bactérias mais comuns presentes na cavidade oral (*Streptococcus sp.* e *Fusobacterium nucleatum*). Também mediram os níveis das citocinas inflamatórias e PGE2 presentes no líquido. Como resultado, apesar de ter sido observada uma relação positiva entre a presença de *Fusobacterium nucleatum* em líquido amniótico com experiências anteriores de ruptura prematura das membranas, aborto espontâneo e morte neonatal, não se pode verificar correlações significativas entre as bactérias do biofilme oral e vagina com aqueles do líquido amniótico. Quanto à presença de PGE2 e citocinas, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos com ou sem infecção do líquido amniótico.



Léon et al., em 2007<sup>22</sup>, realizaram pesquisa avaliando microbiologicamente o líquido amniótico de 26 gestantes em trabalho de parto prematuro, entre 24 e 34 semanas de gestação, e amostras subgengivais. Destas, 8 apresentaram ruptura prematura de membranas e 18, membranas intactas. Das 26 participantes, 30.8% apresentaram *Porphyromonas gingivalis* no líquido amniótico.

DiGiulio et al., em 2008<sup>23</sup>, avaliou o líquido amniótico de 166 gestantes em trabalho de parto prematuro e membranas intactas, através amniocentese quanto a presença de bactérias e fungos tanto qualitativamente quanto quantitativamente, através da PCR em tempo real. Uma das bactérias encontradas foi a *Fusobacterium nucleatum*. O PCR positivo foi associado a corioamnionite histológica com um risco 20 vezes maior (OR 20; IC 95%, 2,4-172). Em todas as amostras de líquido amniótico de mulheres que tiveram parto prematuro havia presença de bactérias, ou seja, o valor preditivo positivo de PCR positiva para parto prematuro foi de 100%. Quanto maior a quantidade de bactérias encontradas, mais prematuro era o nascimento.

Ovalle et al., em 2009<sup>24</sup>, avaliaram 59 gestantes em trabalho de parto prematuro identificando a presença de doença periodontal, presença de vaginose e infecção do líquido amniótico através de amniocentese. Para diagnóstico de vaginose bacteriana, o critério utilizado foi o de Nugent et al., em 1991<sup>25</sup>. Considerou-se doença periodontal, presença de pelo menos 5 dentes com PS  $\geq 5$ mm e PIC  $\geq 3$ mm, e a gengivite, mais de 25% dos sítios com sangramento a sondagem. O estudo mostrou que a presença conjunta de

doença periodontal e infecção bacteriana ascendente, vaginose, associam-se com nascimento prematuro, potencializando este ( $p=0.03$ ).

Katz et al., 2009<sup>26</sup>, avaliaram imunohistoquimicamente a presença de *Porphyromonas gingivalis* em porções de placenta de mães que apresentaram partos a termo, cinco mães, comparando com mães que tiveram parto prematuro devido a presença de corioamnionite (gestantes com febre superior a 38°C, taquicardia maternal e fetal sem outra causa aparente de infecção), nove mães. Os dois grupos mostraram presença de *Porphyromonas gingivalis*, porém 30% mais intensamente no grupo com corioamnionite, sendo esta diferença estatisticamente significativa ( $p<0.019$ ).

Jones et al., em 2009<sup>20</sup>, buscaram identificar bactérias em amostra de placenta de um grupo de 74 mulheres com períodos de parto diferentes através de PCR. Das 74, 21 tiveram parto prematuro e 53 parto muito prematuro, anterior há 32 semanas. A maioria das bactérias pesquisadas eram comumente encontradas na flora vaginal. As outras incluídas faziam parte de outros sistemas, como o respiratório, dentre elas, a *Fusobacterium sp.*, por poderem acessar a placenta provavelmente pela via hematogênica. As amostras de placenta de 90% das parturientes com trabalho de parto prematuro com membranas intactas e de 65% daquelas com trabalhos de parto com ruptura de membranas e menos que 32 semanas de gestação apresentaram presença de diversas bactérias (*U. parvum*, *U. urealyticum*, *M. hominis*, *Fusobacterium spp* e *S. agalactiae*). Desta forma, sugere-se que não só infecções vaginais são capazes de induzir o trabalho de parto prematuro, como também infecções a distância.

Offenbacher et al., em 1996<sup>27</sup>, realizaram um estudo caso-controle com 132 mulheres no pós-parto, excluindo 8 pela presença de infecção geniturinária, risco de endocardite, ou por alguma necessidade de profilaxia antibiótica para exame periodontal. Aquelas com recém-nascidos prematuros de baixo peso apresentaram condições periodontais significativamente piores do que as que tiveram filhos no período a termo. Modelos de regressão logística multivariada, controlado para outros fatores de risco e variáveis, indicaram que doença periodontal é um fator de risco significativo, com impressionante risco de 7,9 vezes para mães de prematuros (OR: 7,9; IC: 6.27-9.58), bebês de baixo peso ao nascer e 7,5 vezes para as mães primigestas.

Desanayake, em 1998<sup>28</sup>, realizou um estudo caso-controle pareado, com um grupo de 55 crianças que nasceram com baixo peso e outro grupo composto por 55 crianças que nasceram com peso normal, acima de 2500 gramas, ambos acima de 37 semanas de gestação, ou seja, não prematuros. A conclusão mostrou que mães de crianças com baixo peso eram menores, tinham menor escolaridade, menos áreas saudáveis de gengiva, áreas com mais cálculos e sangramento e ganharam menos peso na gravidez. Ou seja, quanto mais saudável estivesse a condição periodontal, menor seria a chance de uma gestante ter um filho com baixo peso, mesmo em período gestacional considerado normal (OR:0,3, IC: 0.12-0.72).

Cota, em 2005<sup>29</sup>, buscou avaliar, através de um estudo caso-controle, a associação entre doença periodontal e intercorrências gestacionais, tais como parto prematuro, nascimento com baixo peso e pré-eclampsia, em 733

mulheres. Para o diagnóstico de doença periodontal, considerou-se periodontite a presença de pelo menos um sítio com profundidade de sondagem (PS)  $\geq 4$  mm e com nível de inserção clínica (NIC)  $\geq 4$ mm. Após ajustes nas variáveis, o autor concluiu que a doença periodontal materna apresentou uma associação positiva com as intercorrências gestacionais, sendo um fator de risco independente para parto prematuro e pré-eclampsia.

Lopes et al., em 2005<sup>30</sup>, avaliaram periodontalmente 40 puérperas, sendo o grupo teste composto por mães de recém-nascidos com peso inferior a 2500 g e o grupo controle, com recém-nascido de peso superior a 2500 g. Para diagnóstico de doença periodontal foi utilizado o PSR (*Periodontal Screening and Recording*) com a sonda WHO-621. O código aplicado foi o maior escore em cada sextante. Os autores concluíram que o grupo teste apresentava condição periodontal pior, com presença de bolsas, em relação ao grupo controle (p=0,049).

Marakoglu et al., 2008<sup>31</sup>, avaliaram 48 gestantes, sendo que destas, 20 tiveram parto prematuro. Além da avaliação periodontal, todas as participantes responderam questionário buscando identificar outros fatores de risco para o nascimento de bebês prematuros ou com baixo peso, como idade materna, número de gestações, infecções, eclampsia e presença de vaginose bacteriana. Para diagnóstico de periodontite, adotou-se o critério da presença de 3 ou mais sítios com PS $\geq 4$ mm, com sangramento a sondagem, e perda óssea, considerada existente na presença de uma distância maior que 3mm entre a junção cimento esmalte (JCE) e crista óssea alveolar, verificada em radiografia panorâmica. Os resultados indicaram que periodontite (OR: 3.6, IC:

1.06-12.18) e a presença de vaginose (OR: 11.57, IC: 1.26-105.7) são fatores de risco para o parto prematuro.

Já Vettore et al., 2008<sup>32</sup>, encontraram resultados divergentes ao avaliarem periodontalmente 542 gestantes em relação ao tempo de conclusão da gestação. Os parâmetros clínicos periodontais, incluindo média de PS e média do NIC para cada indivíduo foi realizado e, em seguida, foi feita a média entre os participantes de cada grupo. Para diagnóstico de periodontite, foram utilizados treze parâmetros diferentes de diagnóstico para doença, utilizados em trabalhos anteriores sobre o assunto. Os resultados mostraram que a condição periodontal do grupo controle, parto a termo, era pior do que no grupo de mães que tiveram parto prematuro, além de não ter sido verificada associação entre este e doença periodontal utilizando-se nenhum dos treze critérios adotados. Os resultados mostraram ainda que o índice de massa corporal foi menor nas mães que tiveram parto prematuro, assim como o número de fumantes foi maior neste grupo.

Nabet et al., 2010<sup>33</sup>, em estudo multicêntrico na França, avaliaram periodontalmente 2202 gestantes, sendo que 1108 tiveram parto prematuro, e 1094 tiveram parto a termo. Para diagnóstico de periodontite, os autores consideraram doença periodontal a presença de sítios com PS $\geq$ 4mm e perda de inserção  $\geq$ 3mm, sendo localizada, quando tinham 2 ou 3 dentes nesta situação, ou generalizada, quando acometiam 4 ou mais dentes. Os resultados mostraram associação entre periodontite generalizada e o parto prematuro (OR: 2.46, IC: 1.58-3.83).

Mannen & Chava, em 2011<sup>34</sup>, realizaram estudo caso-controle para avaliar a influência da periodontite entre 104 gestantes, sem doenças sistêmicas ou infecções crônicas, no peso do bebê ao nascer e o tempo de resolução da gestação. O critério de diagnóstico da periodontite foi a presença de pelo menos 4 sítios em 4 dentes com PS  $\geq 4$ mm e perda de inserção  $\geq 3$ mm no mesmo sítio. No grupo teste, 84.6% das parturientes tinham periodontite, enquanto no grupo controle, apenas 3.8%, sugerindo uma forte associação entre presença de periodontite e parto prematuro e nascimento de bebê com baixo peso.

Jeffcoat et al., em 2001<sup>35</sup>, em um estudo observacional longitudinal em 1313 mulheres grávidas, mostraram que a periodontite grave estava associada a um risco 5,28 (IC: 2.05-13.60) vezes maior de um nascimento prematuro anterior a 35 semanas de gestação e um risco 7,07(IC: 1.7-27.4) vezes maior para um parto prematuro anterior a 32 semanas de gestação, mesmo após a realização de ajustes para outras variáveis como idade, raça, tabagismo e paridade. Neste estudo, foi realizado exame periodontal apenas entre a 21<sup>a</sup> e a 24<sup>a</sup> semana de gestação, e observou-se, posteriormente, em que semana foi realizado o parto. Para o diagnóstico de doença periodontal e gravidade de doença, os critérios utilizados foram perda de inserção  $\geq 3$ mm, sendo que mulheres com 3 ou mais sítios com perda foram consideradas com periodontite e esta generalizada, caso o número de sítios fossem superiores a 90.

Offenbacher et al., em 2006<sup>36</sup>, pesquisaram 1020 mulheres grávidas, comparando a condição periodontal anterior a 26 semanas de gestação e após o parto, buscando mostrar a progressão de doença periodontal associada a um

maior risco de parto prematuro. As mulheres consideradas periodontalmente saudáveis não apresentavam sítios com PS maiores que 4mm, sendo que estes não possuíam sangramento a sondagem. Para diagnóstico de periodontite moderada ou grave, foram consideradas aqueles que tinham mais de 15 sítios com PS maior que 4mm. As demais foram classificadas como gengivite ou periodontite leve. A incidência de parto prematuro foi de 11,2% entre mulheres periodontalmente saudáveis, em comparação com 28,6% em mulheres com doença periodontal moderada ou grave.

Offenbacher et al., 2006<sup>37</sup>, em estudo piloto com 67 gestantes buscaram avaliar se o tratamento periodontal realizado antes da 22ª semana de gestação poderia interferir no tempo de resolução da gestação, na mudança do status periodontal, quantidade de oito periodontopatógenos, e quantidade de citocinas inflamatórias no fluido crevicular gengival (FCG) e no plasma. Para diagnóstico de periodontite, o critério adotado foi a presença de pelo menos dois sítios com PS  $\geq 5$ mm e perda de inserção  $\geq 1$ mm. Os resultados mostraram uma redução significativa do número de partos prematuros entre as que receberam tratamento (OR: 0.26, IC: 0.08 – 0.85). Estas ainda mostraram melhora significativa nos parâmetros clínicos periodontais, nos níveis de *Prevotella nigrescens* e *Prevotella intermedia* e de citocinas inflamatórias quando comparadas com as gestantes que não receberam tratamento, reduzindo neste grupo em 3,8 vezes a taxa de ocorrência de pré-termo ( $p=0.026$ ).

Buscando avaliar ainda se o tratamento da doença periodontal durante a gestação poderia provocar alteração no tempo da mesma em 1760 gestantes com periodontite, Offenbacher et al., em 2009<sup>38</sup>, realizaram tratamento

periodontal não cirúrgico, antes da 23<sup>o</sup> semana de gestação, em aproximadamente metade do grupo. O critério para diagnóstico de periodontite utilizado foi a existência de pelo menos três sítios com perda de inserção  $\geq$  3mm. Os resultados mostraram uma taxa de 13,1% de partos prematuros no grupo que foi tratado e 11,5%, no grupo que foi apenas acompanhado clinicamente, não havendo diferenças estatisticamente significativas entre os mesmos ( $p=0.316$ ).

Em 2011<sup>39</sup>, Jeffcoat et al., também avaliaram a possibilidade do tratamento periodontal interferir no tempo de resolução da gestação. Foi realizado tratamento periodontal em 160 mulheres entre a 6<sup>a</sup> e a 20<sup>a</sup> semana de gestação, comparando-as com o grupo controle, 162 gestantes, ambos com diagnóstico de doença periodontal pela perda de inserção  $\geq$  4mm. A incidência de parto prematuro foi de 52.4% no grupo controle, sem tratamento, versus 45.6% no grupo que recebeu tratamento, sem diferença estatisticamente significativa ( $p<0.13$ ). Porém se observou que o tratamento periodontal foi capaz de reduzir a incidência de parto prematuro, com OR de 6.02 (IC: 2.57-14.03) na população de alto risco (mulheres que nunca haviam ido ao dentista). Não foram excluídas do estudo gestantes com outras alterações sistêmicas, como diabetes gestacional, pré-eclampsia, fumantes.

Em uma meta-análise, Polyzos et al., em 2010<sup>40</sup>, buscaram avaliar se o tratamento da doença periodontal com raspagem e alisamento radicular durante a gestação poderia interferir no tempo de resolução da mesma. Após análise criteriosa das metodologias, 11 estudos foram incluídos, totalizando 6.558 mulheres, sendo que apenas 5 apresentavam alta qualidade



metodológica de acordo com a ferramenta de avaliação de risco do Instituto Cochrane. Considerando os melhores estudos, os resultados mostraram que a realização do tratamento periodontal não interferiu no tempo da gestação (OR: 1.5; IC: 0.95-1.4), nem no peso ao nascer (OR: 1.07; IC: 0.85 – 1.36).

Rosa et al., em 2012<sup>41</sup>, em outra meta análise, avaliaram também se a realização de tratamento periodontal durante a gestação, anterior a 20<sup>a</sup> semana, poderia interferir na prematuridade ou não dos bebês. Para diagnóstico de periodontite foram consideradas as gestantes com sangramento gengival a sondagem  $\geq 25\%$  e com pelo menos dois dentes com perda de inserção  $\geq 2\text{mm}$ . Treze estudos preenchem os critérios de inclusão, totalizando 3,412 gestantes. Os resultados mostraram que o tratamento da doença periodontal não interfere no tempo de resolução da gestação de partos prematuros (RR=0.90; IC: 0.68-1.19), nem de muito prematuros (RR=0.92; IC: 0.71-1.20).

A literatura ainda demonstra mais evidências de como tais infecções podem gerar repercussões sistêmicas, levando a respostas imunoinflamatórias com altas concentrações de mediadores inflamatórios em placenta, líquido amniótico e plasma. Offenbacher et al., em 1998<sup>42</sup>, realizaram estudo caso-controle com 48 mulheres avaliando a inter-relação entre mediadores inflamatórios, PGE e IL-1, e presença de periodontopatógenos no fluido gengival e o tempo de resolução da gestação. Encontraram-se níveis significativamente maiores de PGE no fluido gengival crevicular (FGC) de mães de recém-nascidos prematuros e com baixo peso ao nascer ( $p=0.02$ ). Além disso, puderam observar que quanto maior o nível de PGE, menor o peso ao

nascer, provavelmente pelo trabalho de parto anterior há 37 semana ( $p=0.02$ ). No que diz respeito as bactérias, o número de periodontopatógenos avaliados, *Porphyromonas gingivalis*, *Agregatibacter actinomycetemcomitans*, *Treponema denticola* e *Tanarella forshythia*, era mais elevados nas mães com parto prematuro do que nas que tiveram parto a termo, sem, entretanto, mostrar diferenças estatisticamente significantes.

Alguns tipos de prostaglandinas são capazes de, injetadas por via oral, endovenosa ou diretamente no colo uterino, causar maturação cervical, contrações uterinas e aborto em qualquer estágio da gestação, indicando que estas substâncias devem ter um papel importante no desencadeamento do parto fisiológico<sup>43</sup>. As prostaglandinas têm forte efeito na dilatação cervical<sup>44</sup>.

As próprias citocinas inflamatórias,  $TNF\alpha$  e a IL-1, presentes em processos infecciosos, são capazes de induzir células macrofágicas a produzirem ácido araquidônico, precursor comum das prostaglandinas<sup>43</sup>.

Além de serem capazes de induzir a produção de prostaglandinas, as citocinas inflamatórias, principalmente IL-1,  $TNF\alpha$  e interferon- $\gamma$ , aumentam a produção de metaloproteinases da matriz (MMP) e catepsina. IL-1 também é capaz de diminuir a expressão de um inibidor de MMP endógeno. Essas proteinases podem digerir a elastina e fibras colágenas na matriz extracelular do colo uterino, aumentando ainda mais a dilatação<sup>3,44</sup>.

Sabe-se que a resposta inflamatória é caracterizada por dois tipos principais, a do tipo Th1 e a do tipo Th2. A primeira é composta por citocinas do tipo interferon  $\gamma$ ,  $TNF\alpha$ , interleucina 2 (IL-2), conhecidamente prejudiciais ao feto, modulando a integridade das membranas placentárias e o tônus uterino.

As do tipo Th2 são predominantemente interleucina 4 (IL-4) e interleucina 10 (IL-10), predominantes em uma gravidez saudável<sup>3</sup>.

Lin, et al, em 2003<sup>3</sup>, mostraram que a presença de infecção por *Porphyromonas gingivalis* pode acarretar um desequilíbrio entre as citocinas do tipo Th2 e Th1, pois, além de aumentar o nível de interferon  $\gamma$  (Th1) são capazes de reduzir o número de IL-10 (Th2). Essas alterações sistêmicas estão associadas com o nascimento de crianças com baixo peso. Os resultados suportaram a hipótese que as citocinas pró-inflamatórias Th1 são dominantes em gravidezes com resultados adversos. Os dados sugerem que, quando há um equilíbrio das citocinas Th2 inflamatórias com as citocinas do tipo Th1 na placenta, o feto tem peso normal.

Li et al., em 2011<sup>45</sup>, realizaram uma análise *in vitro* de uma cultura de trofoblastos (células da placenta humana) em contato com o *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* através de *microarray*. Os resultados mostraram que o LPS do *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* é capaz de induzir apoptose destas células. O desenvolvimento e multiplicação rápida destas células é fundamental para a manutenção de uma gravidez saudável, a ponto que, a ação de apoptose destas células pode diminuir a produção hormonal e transferência de nutrientes para o feto.

Na presença de infecção, a cascata de citocinas inflamatórias pode ser ativada, causando, assim, essas alterações que podem desencadear o parto prematuro<sup>43,44</sup>. Mulheres com maior concentração destas citocinas em líquido amniótico, placenta ou fluido vaginal, têm mais chances de ter um trabalho de parto prematuro<sup>44</sup>.

Da mesma forma em que a doença periodontal pode, então, estar relacionada a partos prematuros e nascimento de bebês de baixo peso, o estado gravídico também influencia o periodonto, de modo que a variação hormonal pode aumentar a permeabilidade vascular, alterar a produção de colágeno e estimular uma maior produção de PGE, intensificando a resposta inflamatória<sup>46</sup>. Outras doenças, por sua vez, também podem acarretar consequências no periodonto, tais como o diabetes mellitus (DM), que torna a resposta inflamatória deficiente, provoca alterações nos vasos sanguíneos, composição salivar e no próprio tecido conjuntivo<sup>5</sup>. Da mesma forma, de maneira bidirecional, sugere-se que a doença periodontal (DP) também possa influenciar no controle glicêmico dos indivíduos diabéticos, sobretudo tipo 2, por meio das citocinas inflamatórias e LPS oriundas do periodonto doente, contribuindo para a inflamação de baixo grau, aumentando a resistência insulínica<sup>47</sup>.

A pesquisa para presença de diabetes gestacional (DG), em mulheres sem diabetes prévia a gestação, é realizada entre 24<sup>a</sup> e 28<sup>a</sup> semana de gestação, utilizando-se 75 g de glicose via oral. Para o diagnóstico, os parâmetros utilizados são: glicemia em jejum  $\geq 92$  e/ou após uma hora  $\geq 180$ , e/ou após duas horas,  $\geq 153$ . De seis a doze semanas após o parto, a glicemia das mulheres com diabetes gestacional deve ser acompanhada para regularização dos seus valores utilizando-se o exame de hemoglobina glicada - HbA1C<sup>48</sup>.

Os fatores de risco associados ao diabetes gestacional são semelhantes aos do diabetes tipo 2, incluindo idade superior a 25 anos, ganho excessivo de

peso, deposição excessiva de gordura corporal, baixa estatura, crescimento fetal excessivo, polidrâmnio, hipertensão ou pré-eclâmpsia, antecedentes obstétricos de morte fetal ou neonatal<sup>49</sup>. Sendo assim, como a doença periodontal esta associada ao DM, bem como aos vários fatores descritos anteriormente associados ao parto pré-termo, nascimento de bebês de baixo peso e antecedentes obstétricos de morte fetal ou neonatal, é plausível verificar uma associação entre DG e DP e como ela poderia atuar como um fator sinérgico tanto para o difícil controle do DG bem como ao parto pré-termo ao qual este está associado.

Nogueira et al., em 2011<sup>50</sup>, acompanharam 66 gestantes buscando avaliar as complicações maternas e fetais em pacientes com diabetes gestacional. Observaram-se complicações em 42% das gestantes, principalmente pré-eclâmpsia e infecção do trato urinário. As complicações fetais ocorreram em 45% dos casos, sendo representados principalmente por macrossomia e polidrâmnio. A morbidade perinatal foi elevada e acometeu 62% dos recém-nascidos, sendo hipoglicemia a complicação mais frequente.

Desanayake et al., em 2008<sup>51</sup>, tentando correlacionar a presença de doença periodontal com o risco de desenvolver diabetes gestacional, avaliaram 265 gestantes, 7 semanas anteriores aquela em que é realizada pesquisa para DG, submetendo-as ao exame periodontal e a pesquisa de biofilme e subgengival e cérvico-vaginal. A partir da amostra, 22 mulheres vieram a apresentar diabetes gestacional posteriormente. A periodontite foi diagnosticada pela presença de pelo menos uma bolsa maior que 3mm. Quando comparadas às gestantes saudáveis, as com diabetes gestacional

apresentavam maior peso corporal, maiores níveis de *Tannerella forsythia* na secreção vaginal, e maiores níveis de proteína C reativa. A pesquisa não conseguiu correlacionar a presença de diabetes gestacional com periodontite.

Xiong et al., em 2009<sup>52</sup>, em um estudo caso controle com 53 gestantes com diabetes gestacional e 106 mulheres grávidas saudáveis, realizaram avaliação periodontal buscando correlacionar a diabetes gestacional com a presença de periodontite. O diagnóstico de periodontite foi dado pela presença de pelo menos um sítio com PS  $\geq 4$ mm ou perda de inserção  $\geq 4$ mm. A porcentagem de periodontite no grupo teste foi de 77,4% e no grupo controle, 57,5% (OR: 2.5; IC 1.2-5.3;  $p < 0.05$ ). Após ajuste das variáveis maternas, como idade, raça, estado civil, nível de escolaridade, consumo de álcool ou tabaco, histórico familiar de diabetes, peso corporal, periodontite foi associada com um significativo aumento de risco para DG, com risco de 2.6 (IC:1.1-6.1,  $p < 0.05$ ).

Para avaliação do controle glicêmico destas pacientes, podem ser realizados exame de frutossamina, que avalia o controle glicêmico em um período mais curto, ou HbA1C, que avalia o controle trimestralmente<sup>53</sup>.

A hemoglobina glicada é o parâmetro de escolha para o controle glicêmico a longo prazo, refletindo o controle dos últimos 60 a 120 dias. Este é produto da reação não-enzimática entre glicose e o grupo amino terminal de um resíduo de valina na cadeia  $\beta$  da hemoglobina. Quanto maior a média glicêmica do indivíduo, maior é a porcentagem de proteínas glicadas, e assim, de hemoglobina glicada. Existem muitos métodos laboratoriais para a realização deste exame, dentre eles o HPLC (*High-Performance Liquid Chromatography*), sendo este o padrão-ouro<sup>49</sup>.

A frutamina é uma proteína glicada, constituída principalmente de albumina, que reflete o controle glicêmico das últimas duas semanas, já que a meia vida da albumina é de 14 a 20 dias<sup>49</sup>.

As evidências científicas, então, já demonstram que a plausibilidade biológica entre doença periodontal e parto prematuro são consistentes, já que a bacteremia, endotoxemia e elevação plasmática de mediadores inflamatórios podem contribuir com a perpetuação de um estado inflamatório sistêmico que acarretam em disfunções placentárias e indução de trabalho de parto prematuro. Diante disso, também é plausível suspeitar que este estado inflamatório sistêmico induzido ou perpetuado pela DP possa provocar alterações no leite materno. Este se configura em importantíssima fonte de desenvolvimento na vida extrauterina pela transferência de anticorpos e outros fatores para o desenvolvimento e fortalecimento da resposta imunológica do recém nascido.

Após o nascimento, pode-se imaginar se a presença de patógenos periodontais sistemicamente, induzindo e perpetuando a elevação de mediadores inflamatórios plasmáticos, pode ser capaz de alterar a composição do leite materno que será fonte de alimento para estes bebês. A amamentação é considerada importantíssima porque é capaz de determinar o crescimento e o desenvolvimento do recém nascido, tanto pelo seu caráter nutritivo quanto pelo fortalecimento ou amadurecimento da resposta imunológica inata durante o período de adaptação na vida extra uterina<sup>54</sup>.

A qualidade deste leite materno é avaliada pela qualidade nutricional e os fatores imunológicos existentes. Ao longo de toda a amamentação, o leite

materno de todas as mulheres que amamentam, possui ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa (AGP), que são essenciais para a nutrição infantil. Estes ácidos graxos também são fundamentais para o desenvolvimento visual e cognitivo das crianças<sup>55</sup>. Ácido linoleico, ácido  $\alpha$ -linoléico, ácido aracdônico e ácido docosahexaenóico são as formas mais representativas de AGP e são as que mais contribuem para o crescimento e desenvolvimento infantil<sup>56</sup>.

Os recém nascidos são mais susceptíveis a infecções devido a imaturidade do seu sistema imunológico<sup>57</sup>. Além da transferência da IgG para o feto através da placenta, o aleitamento materno constitui um importante suporte imunológico que a mãe de mamíferos pode fornecer para seu filho, ainda imuno-incompetente, contra infecções durante os primeiros meses de vida<sup>58,59,60</sup>.

Citocinas e imunoglobulinas são importantes fatores imunes que ajudam a reduzir essa susceptibilidade do recém nato a infecções<sup>61</sup>. Uma grande variedade de citocinas têm sido identificadas no leite materno e este número vem crescendo rapidamente em estudos mais recentes. Citocinas são secretadas por macrófagos no leite e também pelo epitélio mamário, e muitas continuam a ser secretadas por células do leite já no trato gastrointestinal do lactente<sup>62,63</sup>.

Fazem parte do sistema imunológico presente no leite materno humano as imunoglobulinas IgA, IgG, ácidos graxos livres, monoglicerídeos, proteínas, tais como lactoferrina, lactalbumina, glicanos, oligossacádeos,



imunomoduladores, tais como citocinas, ácidos nucléicos, antioxidantes e células imunes, tais como macrófagos, neutrófilos e linfócitos<sup>64,65,66,67,68</sup>.

Vários são os benefícios do aleitamento materno incluindo um menor número de otites, diminuição da incidência de problemas gastrointestinais, bem como uma proteção prolongada contra infecções através da estimulação ativa do sistema imunológico do recém-nascido<sup>69</sup>.

Todos estes constituintes imunológicos do leite interagem entre si e com o intestino do recém nascido, direta ou indiretamente (por exemplo, alterando a microbiota intestinal) para aumentar a imunidade contra a infecção, e, provavelmente, também contribuem para a maturação e a eficiência do sistema imune neonatal. Muitos estudos, tanto nos países industrializados e em desenvolvimento, têm mostrado que crianças amamentadas são menos vulneráveis a infecções durante os seus primeiros meses de vida, incluindo gastroenterite, infecções respiratórias, otite média, infecções do trato urinário e enterocolite necrosante em recém-nascidos prematuros<sup>70,71</sup>.

No entanto, os mecanismos envolvidos na imunidade fornecido pelo leite humano para o lactente não estão totalmente compreendidos. Até recentemente, acreditava-se que as mudanças nos componentes imunológicos do leite materno foram principalmente relacionadas com o tempo que decorreu desde a entrega ou, em alguns casos, também foram relacionados com o estado nutricional da mãe. Era desconhecido se a defesa imunológica passiva e relativamente constante poderia ser modulada de acordo com as necessidades ativas do lactente, em resposta a situações como infecções maternas. Curiosamente, publicações recentes têm indicado que as infecções

urinárias e mastite podem alterar a qualidade do leite materno<sup>72,73</sup>. Hunt et al., em 2012<sup>73</sup>, relataram que os níveis de TNF $\alpha$  diminuíram significativamente no leite das mães doentes entre os tempos de infecção aguda e de remissão. Além disso, os níveis de lactoferrina e IL-10 também mostraram uma tendência a diminuir, mas esta era apenas de significância estatística limítrofe.

Existe uma grande variabilidade na composição do leite materno entre mulheres em lactação, em relação a quantidade de nutrientes, bem como nos componentes celulares, oligossacarídeos e níveis de citocinas. Esta variabilidade é também controlada geneticamente e pode depender da capacidade imunológica da mãe em responder a infecções. Riskin et al., em 2012<sup>74</sup>, relataram que uma resposta inflamatória no corpo materno pode causar aumento da secreção de células brancas e citocinas plasmáticas para o leite materno produzido. Pode-se especular que a resposta inflamatória sistêmica possa aumentar leucócitos no sangue, atrair mais células para a glândula mamária ou alternar o tráfego intra-célula mamária, resultando em aumento de células secretadas no leite materno. Para sustentar essa hipótese, aproximadamente 35% das mães apresentam febre recorrente. Este mecanismo fala mais a favor da influência de um estado inflamatório sistêmico do que de infecções localizadas, como do trato urinário ou meningite, nestas lactantes.

Por uma questão lógica parece plausível sugerir que a periodontite crônica presente em algumas mulheres durante a lactação possa também ser capaz de alterar fatores nutricionais e imunológicos do leite materno. Ou seja, além de interferir negativamente durante a gestação e no seu desfecho, como

já abordado anteriormente, os patógenos periodontais, bem como a resposta inflamatória induzida por estes, podem ser capazes de prejudicar também a qualidade do leite materno que será fornecido aos recém nascidos.

### 3.0 DISCUSSÃO

A prematuridade e o baixo peso ao nascer são considerados as principais causas de mortalidade ao nascer em todo o mundo<sup>12</sup>. Várias são as intercorrências gestacionais que podem favorecer a prematuridade, sendo as infecções maternas um fator de risco já conhecido<sup>11</sup>. Dentre estas, já é um consenso na medicina a importância do controle de infecções geniturinárias para minimizar o risco de infecção placentária e aceleração do trabalho de parto pela ascensão das bactérias e seus subprodutos para o espaço coriodecidual, aumentando o número de citocinas inflamatórias, o que favorece a ruptura prematura das membranas<sup>16</sup>. Estudos a partir da década de 90 mostram que é possível que infecções a distância possam acelerar o trabalho de parto por mecanismos semelhantes<sup>9,12,17,20,21</sup>.

A partir do estudo de Offenbacher et al., 1996<sup>27</sup>, onde foi sugerida a possibilidade da doença periodontal intervir negativamente no curso da gestação, várias pesquisas ao longo destes 16 anos vêm buscando comprovar a existência da relação entre periodontite e parto prematuro e como a primeira poderia intervir na ocorrência da segunda. Baseado no fato de que não só bactérias oriundas da região genital poderiam interferir no curso da gestação, tem-se aventado hipóteses de que bactérias oriundas da cavidade oral também poderiam estar relacionadas à prematuridade, tentando-se elucidar os mecanismos biológicos para tal associação.

A plausibilidade biológica em muitas pesquisas para esta associação consiste no fato da infecção periodontal ser uma fonte de microrganismos que, por via hematogênica, podem atingir o espaço intrauterino e provocar

corioamnionite<sup>23,24,26</sup>. Além da contaminação pelos periodontopatógenos, seus subprodutos, principalmente LPS, também podem favorecer a produção de citocinas inflamatórias pela gestante, como PGE e TNF- $\alpha$ , as quais são responsáveis pela ruptura das membranas<sup>42,43,44</sup>. Estes mecanismos biológicos foram demonstrados em estudos em animais, que buscaram identificar as prováveis alterações imunológicas provocadas em gestantes após inoculação de periodontopatógenos<sup>3,9,16,19</sup>. Nos trofoblastos humanos, a presença de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ainda foi capaz de causar a apoptose destas células, sendo, portanto, capaz de reduzir o crescimento fetal e pré-eclampsia<sup>45</sup>.

Os estudos ainda não conseguem correlacionar consistentemente à presença de patógenos orais, em FCG e biofilme, com a sua presença à distância (líquido amniótico e placenta). Além das pesquisas serem piloto, as metodologias utilizadas por elas podem levar a resultados falsos positivos, visto às diferenças de sensibilidade e especificidade entre as mesmas, tais como PCR e cultura<sup>21,22,42</sup>.

Diversos estudos observacionais, do tipo caso-controle, mostraram razão de chance (OR) elevadas para a ocorrência de parto prematuro em gestantes com periodontite<sup>27,29,30,31,51</sup>. Porém, devido às grandes diferenças metodológicas entre estes, sobretudo nos critérios adotados para o diagnóstico da doença periodontal, esta ainda não pode ser considerada um fator de risco para a existência do parto prematuro e nascimento de bebês com baixo peso. Alguns estudos utilizam critérios que podem subestimar a condição periodontal da gestante, como o método de PSR utilizado por Lopes et al., 2005<sup>30</sup>,

enquanto outros usam critérios que podem superestimar uma condição de doença talvez inexistente, como Cota, 2005<sup>29</sup>, que considerou periodontite a existência de pelo menos um dente com PS $\geq$ 4mm e perda de inserção também  $\geq$ 4mm.

Marakoglu et al., 2008<sup>31</sup>, por sua vez utilizou como critério de diagnóstico da perda óssea, a presença de mais de 3mm de distância entre junção cimento esmalte e crista óssea alveolar, avaliado na radiografia panorâmica, exame este com pouca acurácia para realizar tal medida. Para tanto, os autores poderiam lançar mão de radiografias interproximais, caso quisessem mais fidedignidade, constituindo um exame complementar para o diagnóstico de doença periodontal.

Assim como os parâmetros de diagnóstico de periodontite são bem diversos dentre os estudos, os critérios de inclusão e exclusão das amostras são bastante divergentes, dificultando comparações entre os mesmos. Alguns destes trabalhos<sup>35</sup> excluíram da amostra apenas as gestantes que necessitavam de antibiótico profilaxia para avaliação odontológica, não levando em consideração outras variáveis, tais como presença de fumantes e idade materna aumentando a heterogeneidade das amostras.

Desanayake et al., 1998<sup>51</sup>, Nabet et al., 2010<sup>33</sup>, e Offenbacher et al., 1996<sup>27</sup>, apesar de excluírem das amostras gestantes com alterações sistêmicas, como diabetes, asma, glomerulonefrite e hipertireoidismo, mantiveram aquelas fumantes, apesar de no período já se saber da forte influência exercida pelo cigarro na condição periodontal e sistêmica dos indivíduos.

Já Vettore et al., 2008<sup>32</sup>, não conseguiram associar a presença de doença periodontal com o nascimento de bebês de baixo peso ou prematuros. Porém, o estudo não excluiu das amostras diversas intercorrências gestacionais, como infecções no trato geniturinário, pré-eclampsia e uso de tabaco. Além disso, as maternidades utilizadas no estudo para seleção das amostras foram centros de referência para partos de risco, podendo gerar uma amostra de conveniência para o grupo teste, e uma amostra com diversos vieses, para o grupo controle. Talvez estas considerações possam ser responsáveis pelos resultados tão discrepantes em comparação a outros estudos, ao se ter como resultado uma porcentagem de doença periodontal bem superior no grupo controle em relação ao teste.

Jeffcoat et al., 2001<sup>35</sup> e Offenbacher et al., em 2006<sup>36</sup>, em estudos longitudinais observando a progressão da doença periodontal durante a gestação e sua correlação com o desfecho desta, obtiveram resultados semelhantes, mostrando que a progressão da doença periodontal é mais acentuada no grupo de gestantes com parto muito prematuro, anterior há 32 semanas.

Além dos estudos longitudinais, estudos intervencionistas são importantes para a caracterização de um fator de risco, avaliando se a intervenção no fator pode alterar a ocorrência do desfecho, no caso parto prematuro. Duas meta-análises recentes, Rosa et al., 2012<sup>41</sup> e Polyzos et al., 2010<sup>40</sup>, foram realizadas buscando verificar se o tratamento periodontal durante a gestação poderia minimizar o risco de nascimento de bebês prematuros ou com baixo peso. Os resultados mostraram que apesar da melhora alcançada

nos parâmetros clínicos, o tratamento periodontal durante a gestação não foi capaz de alterar por si só o tempo de resolução da gestação.

O critério para diagnóstico de doença periodontal no estudo de Rosa et al., 2012<sup>41</sup>, pode ter superestimado a condição periodontal das gestantes que foram submetidas a tratamento periodontal. Pelo critério adotado, sangramento gengival a sondagem  $\geq 25\%$  e com pelo menos dois dentes com perda de inserção  $\geq 2\text{mm}$ , muitas gestantes incluídas no grupo teste poderiam ter apenas gengivite com presença de algumas recessões gengivais, não caracterizando de maneira fidedigna o desfecho, bem como representando indivíduos que não teriam uma infecção local de intensidade suficiente para acarretar alterações sistêmicas imuno-inflamatórias.

Os resultados dos estudos epidemiológicos de caso-controle, longitudinais e intervencionistas, ainda não são capazes de afirmar consistentemente que a doença periodontal é um fator de risco para o nascimento de bebês prematuros ou com baixo peso. Para ser considerado um fator de risco, seria necessário que esta associação fosse confirmada em mais estudos longitudinais e que as pesquisas ainda comprovassem que quanto mais grave a periodontite, maior a chance de prematuridade, independente da existência de outras intercorrências gestacionais. Desta forma, pode-se considerar que a periodontite ainda é apenas um indicador de risco, demonstrado em estudos transversais e de caso-controle, fazendo-se necessárias mais pesquisas que possam associá-lo a estas intercorrências gestacionais como um fator de risco<sup>75</sup>.



Ao se considerar os estudos em diabetes gestacional, os mesmos vieses são encontrados. Desanayake et al., 2008<sup>51</sup>, não conseguiram com seus resultados associar a DG com periodontite. Metodologicamente este estudo superestimou a condição de doença periodontal dos voluntários ao caracterizá-la pela existência de pelo menos uma bolsa com PS > 3 mm. Ou seja, a existência de uma restauração com invasão de espaço biológico provocando uma profundidade de sondagem aumentada em apenas um sítio já teria inserido o indivíduo no grupo com periodontite. Já Xiong et al., 2009<sup>52</sup>, ao superestimar o diagnóstico de periodontite, considerando doença a presença de pelo menos um sítio com PS ≥ 4mm ou perda de inserção ≥ 4 mm, encontrou porcentagens altas de doença periodontal no grupo com DG, 77,4%, e no grupo de gestantes saudáveis, 57,5%, mesmo sendo a idade média das participantes de 29 anos grupo teste e 27 anos no grupo controle.

Embora as metodologias adotadas tenham sido muito divergentes, os resultados apresentados por estas pesquisas têm sido encorajadores em tornar a associação entre periodontite e nascimento prematuro e de bebês de baixo peso mais consistente, evidenciando-a não como um indicador de risco, mas como um fator de risco. Ainda não há evidência suficiente de como a infecção de origem periodontal possa interferir no desfecho gestacional, e por isso, mais estudos imuno e microbiológicos, intervencionistas e longitudinais são necessárias.

## **4.0 SUBPROJETO I: PERIODONTITE MATERNA E NASCIMENTO DE BEBÊS PREMATUROS E/OU COM BAIXO PESO: AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DA PLACENTA**

### **4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

- Identificar bactérias periodontopatogênicas em placenta, biofilme e secreção cérvico-vaginal de parturientes com parto a termo e bebês com peso superior a 2500 g ou parto pré-termo e bebês com peso inferior a 2500 g;
- Avaliar a correlação entre bactérias identificadas nas amostras de biofilme subgengival, placentária e cérvico-vaginal com condição periodontal e com desfecho gestacional a termo e bebês com peso superior a 2500 g ou pré-termo e bebês com peso inferior a 2500 g;
- Avaliar a correlação entre a condição periodontal e o desfecho da gestação;

## **4.2 METODOLOGIA**

### **4.2.1 SELEÇÃO DA AMOSTRA**

Será realizado estudo transversal, fazendo parte do estudo parturientes do Hospital Geral Clériston de Andrade (HGCA) e do Hospital da Mulher (HM), em Feira de Santana - Bahia, no período de junho de 2013 a julho de 2014, considerando as que estiverem internadas para resolução da gestação, nos dias da semana previstos para as avaliações odontológicas, bem como para a coleta das amostras do biofilme subgengival, cérvico-vaginal e placentárias.

#### **Critérios de inclusão:**

Serão incluídas no estudo mulheres com idade entre 18 e 35 anos, com parto vaginal ou cesariana, a termo ou pré-termo, que tiverem o parto realizado nos dias da semana previstos para a coleta da amostra da placenta na unidade hospitalar, bem como avaliação odontológica e coleta de secreção cérvico-vaginal.

#### **Critérios de exclusão:**

Serão excluídas do estudo mulheres com menos de 18 anos e mais de 35 anos, fumantes, com gestação múltipla, que tiverem feito tratamento de fertilização *in vitro*, tenham qualquer condição médica em que tenha sido necessário uso de terapia antibiótica nos três meses anteriores ao parto, ou tenha alguma condição sistêmica que justifique profilaxia antibiótica antes da sondagem periodontal, possuam diagnóstico de vírus da imunodeficiência humana (HIV), sífilis, HTLV, hepatite B, citomegalovírus, toxoplasmose ou rubéola durante a gestação, apresentarem hipertensão, pré-eclâmpsia, diabetes ou infecção urinária. Estes dados serão verificados e confirmados no

prontuário médico e/ou caderneta do pré-natal da parturiente. Mulheres em condição de risco iminente de parto ou trabalho de parto avançado serão também excluídas. Esta avaliação é realizada pelo obstetra responsável pela gestante. Ainda será necessária a presença de pelo menos 10 dentes na boca, além dos restos radiculares e terceiros molares.

#### 4.2.2 DELINEAMENTO DO ESTUDO

As gestantes que chegarem à maternidade no dia do parto com ausência de sinais e sintomas de trabalho de parto iminente serão informadas da pesquisa, e caso aceitem participar, assinarão o termo de livre consentimento, sendo, então, submetidas à entrevista por meio de questionário para obtenção de dados referentes à identificação, condições sócio demográficas, história médica e odontológica e dados físicos e antropométricos. Logo após o parto, serão coletas as amostras de placenta e preenchidas os dados referentes ao tipo de parto, semana de conclusão da gestação, condição placentária, sexo e peso do neonato.

A amostra obtida será dividida em dois grupos: grupo 1, composto de mães de crianças com peso superior a 2500 g e com 37 ou mais semanas de gestação; grupo 2, composto por mães de crianças com peso inferior a 2500 g e menos de 37 semanas de gestação. Para tornar as duas amostras com números equivalentes de participantes, para cada parturiente do grupo 2, será incluída a parturiente com parto a termo seguinte. A idade gestacional será considerada baseada na data da última menstruação ou baseada em exame de

ultrassonografia, quando o dado anterior for desconhecido (dados verificados no prontuário médico).

Os questionamentos presentes na ficha (anexo 1) buscam identificar fatores que possam excluir a parturiente do estudo, como a presença de alterações sistêmicas, ou determinar em que grupo da pesquisa a parturiente será incluída devido ao peso do bebê ou tempo de resolução da gestação. Além disso, serão avaliados outros fatores de risco para o parto prematuro, como presença de abortos espontâneos anteriores, natimortos, pré-eclâmpsia, aumento excessivo de peso durante a gestação, uso de drogas ou álcool.

Após o parto, a parturiente será submetida às avaliações periodontais e cérvico-vaginais, assim que se sentirem aptas para a realização dos mesmos, não ultrapassando 72h após o parto.

#### 4.2.3 PROCEDIMENTO PARA COLETA DE DADOS

##### 4.2.3.1 COLETA DE POLIMORFONUCLEARES, AMOSTRA SUBGENGIVAL E EXAME PERIODONTAL

O exame periodontal e coleta das amostras subgengivais serão realizados por um mesmo cirurgião-dentista, previamente calibrado e cego para os dados adquiridos nos questionários e fichas clínicas, anteriormente citadas.

- **Coleta de polimorfonucleares (PMN) orais:**

Antes do exame intraoral, todas as parturientes realizarão um bochecho não vigoroso com 10ml de uma solução salina a 0.9% por 15 segundos a fim de recolher PMNs orais para posterior quantificação da carga inflamatória oral.

As participantes serão orientadas a não comer ou beber por pelo menos 30 minutos antes de fornecer esta amostra para evitar a eliminação prévia de PMNs, garantindo uma boa quantidade dos mesmos durante a coleta.

Cada amostra do enxague oral irá ser recolhido num tubo Falcon estéril e armazenados a 4°C para preservar as células antes do transporte para o laboratório para processamento. As amostras serão transportadas, em um recipiente com gelo para o laboratório, e armazenadas novamente a 4°C. Todas as amostras serão processadas no prazo máximo de 24 horas após a coleta. Uma série de soluções padrão será preparada no laboratório utilizando concentrações de neutrófilos plasmáticos já conhecidos. A densidade óptica será medida a 420 nm durante 10 ciclos de 180 segundos por ciclo, utilizando o software FLUOstar. A equação da curva padrão será obtida traçando a densidade óptica das soluções-padrão versus as concentrações conhecidas, permitindo assim a dedução da contagem de PMN das amostra usando a densidade ótica ou valor de absorvância.

- **Exame periodontal:**

No exame periodontal serão avaliados os seguintes parâmetros clínicos em seis faces (mesio-vestibular, vestibular, disto-vestibular, disto-lingual/palatina, lingual/palatina, mesio-lingual/palatina) de cada dente:

- Profundidade de sondagem: distância da margem gengival livre a base da bolsa;
- Posição da margem gengival: localização da margem gengival livre em relação à posição da junção cemento-esmalte. Em casos de recessão

gengival, o valor em milímetros será considerado positivo. No caso de hiperplasia gengival, o valor será considerado negativo;

- Nível de inserção clínica: determinada através da profundidade de sondagem e a localização da margem gengival livre em relação à posição da junção cimento-esmalte;
- Sangramento a sondagem: será avaliado durante o procedimento de sondagem descrito acima, observando-se a presença de sangramento nos 10 segundos após a remoção da sonda periodontal do sulco ou bolsa;
- Índice de placa visível: a condição de higiene bucal será avaliada pela presença ou ausência de placa bacteriana visível em cada face dentária, exceto a oclusal. A presença de placa será considerada se ao correr a sonda periodontal na cervical de cada dente, uma faixa contínua de placa for encontrada em contato com o tecido gengival<sup>76</sup>.

Todas as medições da sondagem serão arredondadas para o milímetro mais próximo. Serão excluídos dentes com coroa destruídas (restos radiculares), dentes decíduos, dentes com erupção incompleta, terceiros molares, dentes com cárie extensa, dentes com superfícies com invasão de espaço biológico por fratura ou restauração iatrogênica.

Os exames periodontais serão realizados sob condições de iluminação e assepsia adequadas, estando as pacientes em posição de decúbito dorsal nos leitos da enfermaria obstétrica. Serão utilizadas para o exame equipamento de proteção individual (EPI) completo, um espelho bucal de superfície plana sem

aumento, uma pinça de algodão, uma sonda periodontal milimetrada modelo Carolina do Norte PCPUNC (Hufriedy, Jacarepaguá, Rio de Janeiro, Brasil) e gaze. Os instrumentais serão esterilizados e acondicionados em embalagens individuais seguindo rigorosamente as normas de biossegurança, evitando qualquer risco de contaminação para a participante ou examinador. Os dentes serão previamente limpos com uma gaze antes da execução da sondagem, para melhor visualização dos detalhes a serem avaliados. A iluminação do campo será feita por uma fonte de luz artificial posicionada em um dispositivo na cabeça do examinador. Todos os critérios avaliados serão anotados na ficha de exame periodontal conforme anexo 2.

O diagnóstico da doença periodontal será realizado baseando-se no critério de Page & Eke, 2007<sup>77</sup>, onde será considerado presença periodontite crônica, as parturientes que apresentarem NIC proximal (mesial ou distal)  $\geq$  4mm em dois ou mais dentes diferentes ou PS proximal (mesial ou distal)  $\geq$  5mm em dois ou mais dentes diferentes.

- **Coleta da amostra subgengival:**

Após o periograma completo, será realizada coleta da amostra subgengival. Esta será coletada em seis sítios diferentes (o sítio com maior profundidade de sondagem de cada sextante); serão coletadas com cureta periodontal (Hufriedy, Jacarepaguá, Rio de Janeiro, Brasil) após remoção da placa supragengival com gaze estéril, e acondicionadas em tubos do tipo Eppendorf também estéreis com 0.1mL de tampão TRIS-EDTA (50mM de Tris, 1mM EDTA, pH7.6), mantidos em freezer a -20°C (DESANAYAKE, et al, 2008).



#### 4.2.3.2 COLETA DE SECREÇÃO VAGINAL

Para coleta das amostras de secreção gengival, será solicitado auxílio do pessoal de enfermagem responsável por cada parturiente. No próprio leito a mulher ficará em posição ginecológica (pernas dobradas e afastadas) cobertas por lençol. Será, então, colocado um espéculo vaginal (descartável) a seco, sem lubrificante, onde serão expostos a cérvix e o fundo de saco vaginal. Com uma espátula de Ayre será colhido material do fundo de saco vaginal e depositado no centro de uma lâmina de vidro, que será fixado a seco para posterior coloração pelo método de Gram<sup>78</sup>. No mesmo momento, também será coletado material para avaliação das bactérias periodontopatógenas na secreção cérvico-vaginal pelo método PCR. Para isto, será utilizado dois swabs esterilizados, que serão introduzidos na parte posterior do fórnix vaginal por 30 segundos, girando-os pelo menos 6 vezes. Os swabs serão colocados em 0.1mL de tampão TRIS-EDTA (50mM Tris, 1Mm EDTA, ph 7.6) e mantidos em freezer a -20°C (DESANAYAKE, et al, 2008).

Os esfregaços serão avaliados em microscópio óptico em aumento de 1000 vezes, com a finalidade de se observar a microbiota vaginal. Os achados serão submetidos ao método de escore de Nugent et al., 1991<sup>25</sup>. Esta avaliação consiste em se identificarem bacilos Gram (+) (sugestivo de lactobacilos), bacilos curtos Gram variáveis (sugestivo de *Gardnerella vaginalis*) e bacilos curtos Gram (-) ou variáveis (sugestivos de *Mobiluncus sp.*). Conforme a ausência ou presença de cada um, distribui-se uma pontuação que ao final é somada (Tabela 1). Serão considerados vaginose situações em que o escore seja sete ou mais<sup>16</sup>.

---

A. *Lactobacillus acidophilus* (bacilos Gram-positivos)  
B. *Gardnerella vaginalis* e espécies bacteróides (bacilos curtos Gram-variáveis)  
C. *Mobiluncus* sp (bacilos curvos Gram-negativos ou variáveis)

O escore total é a soma do peso da quantidade dos três morfotipos bacterianos.

*Escore para cada um dos morfotipos*

Zero = sem morfotipos no campo de imersão (1000X)  
1+ = menos que um morfotipo por campo de imersão (1000X)  
2+ = um a quatro morfotipos por campo de imersão (1000X)  
3+ = cinco a trinta morfotipos por campo de imersão (1000X)  
4+ = mais que trinta morfotipos por campo de imersão (1000X)

---

A soma dos pontos dá o escore final, ou seja, A + B + C:  
0 a 3 = normal.  
4 a 6 = intermediário.  
7 a 10 = vaginose bacteriana.

Tabela 1: Critérios de diagnóstico para vaginose bacteriana.

#### 4.2.3.3 COLETA DAS AMOSTRAS DE PLACENTA

As coletas das amostras de placenta serão realizadas por um mesmo examinador da equipe de pós-graduação da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública.

Imediatamente após o parto serão coletadas 5 amostras de locais diferentes de cada placenta e colocadas em recipiente esterilizado (tubos Falcon) com 5ml de RNAlater. As cinco amostras terão aproximadamente 1cm x 1cm e serão removidas das seguintes regiões: membrana placentária (âmnio e córion), do centro (próximo a inserção do cordão umbilical) e da periferia; região central do parênquima (sem as membranas) do centro e da periferia; e a região de inserção do cordão umbilical (JONES, et al, 2009). As amostras serão colocadas imediatamente em freezer a -20°C.

#### 4.2.4 ANÁLISE MOLECULAR DAS AMOSTRAS DO ESTUDO

##### 4.2.4.1 EXTRAÇÃO DE DNA DAS AMOSTRAS SUBGENGIVAS E CÉRVICO-VAGINAL

Para a extração de DNA de cada amostra coletada, serão utilizados 500µL, diluídos em 500µL de água Mili-Q e lavados duas vezes a 12.000 x g por 10 minutos. Os *pellets* serão ressuspensos em 500µL de água Mili-Q e aquecidos até ferver por 10 minutos em banho-maria. Nova centrifugação será realizada, (14.000 x g por 10 minutos) e o sobrenadante será transferido para novo tubo tipo Eppendorf. Em seguida as amostras serão analisadas por PCR.

##### 4.2.4.2. EXTRAÇÃO DE DNA DAS AMOSTRAS PLACENTÁRIA

Para extração do DNA das amostras de placenta, serão utilizados 20mg de tecido, obtidos por meio do Kit de extração para Tecido ChargeSwitch gDNA Mine Tissue Kit (Invitrogen do Brasil, LTDA, São Paulo, São Paulo, Brasil) de acordo com as instruções do fabricante.

O protocolo para esta extração será foi baseado no método descrito por Isola et al., em 1994.

Serão adicionados aos tubos, 400µl de tampão de lise (NaCl 1M; Tris-HCL pH 8,0 1M; EDTA 0,5M pH 8,0; SDS 10%) estéril e proteinase K na concentração final de 500µg/ml. Os tubos serão mantidos a 55°C em banho Maria por 3 dias até a completa dissolução do tecido. Serão adicionados 30µl de proteinase K a 250µg/ml em intervalos de 24h, e os tubos serão invertidos uma vez ao dia. A enzima será inativada por aquecimento a 95°C durante 10 minutos. O DNA será purificado utilizando-se 1ml de solução de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1) repetindo-se, então, o mesmo processo

de homogeneização e centrifugação, sendo, por fim, acrescentado 1ml de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1). O sobrenadante final será transferido para outro tubo onde será feita a precipitação do DNA adicionando-se etanol absoluto gelado (2 a 3x do volume do sobrenadante) e acetato de amônia 7M (1/10 do volume do sobrenadante) que permanecerá a -20°C por 18 horas. Será realizada centrifugação a 18.300 xg por 20 minutos, a 4°C, e o precipitado obtido será lavado com etanol a 70%. Após evaporação do etanol a temperatura ambiente, o precipitado será dissolvido em 50µ de tampão TRIS-EDTA (50mM Tris, 1Mm EDTA, ph 7.6) e mantido a 4°C até a quantificação.

#### 4.2.4.3. DETECÇÃO BACTERIANA POR PCR

A avaliação microbiológica por PCR do biofilme subgengival, secreção cérvico-vaginal e placenta serão realizadas na Universidade Federal da Bahia, que possui um termo ciclador, equipamento para realização do exame de PCR. Todas as amostras serão transportadas em caixa térmica com gelo.

A amplificação por PCR para a detecção de DNA bacteriano será realizada em volumes de 50µL contendo tampão 1X PCR/Mg<sup>++</sup> (Boehringer Mannheim, Indianápolis, IN, USA), 0.2mM de dNTP (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA), 0.5 U Taq DNA polimerase (Boehringer Mannheim), 0.4mM de cada par de primer e 10ng de base. A amplificação será realizada em termociclador (Perkin Elmer, GeneAmp PCR System 2400, Norwalk, CT, USA), programado para 94°C (5 minutos), acompanhado por 30 ciclos com a temperatura de anelamento adequada para cada par de primer descrita no

Quadro 1. Depois dos 30 ciclos, será utilizada uma temperatura de 72°C por 5 minutos, para a completa extensão do DNA.

Os produtos da amplificação serão comparados por eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão 1XTBE (Tris 1M, ácido bórico 0.9M, EDTA 0.01M, pH8.4) (Gibco BRL, Life Technologies Ltda, Bethesda, MD, USA), corados com brometo de etídio (0.5mg/mL) e fotografados sob um transiluminador com luz UV (Kodak Digital Science System 120). Será incluído o padrão de massa molecular 1-Kb (Gibco BRL).

<b>Primes</b>	<b>Sequência de oligonucleotídeos 5´ e 3´</b>	<b>Temperatura de anelamento (°C)</b>
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	AGG CAG CTT GCC ATA CTG CG ACT GTT AGC AAC TAC CGA TGT	60
<i>Agregatibacter actinomycetemcomitans</i>	AAA CCC ATC TCT GAG TTC TTC TTC ATC CCA ACT TGA CGT TAA ATT	50
<i>Treponema denticola</i>	TAA TAC CGA ATG TGC TCA TTT ACA T TCA AAG AAG CAT TCC CTC TTC TTC TTA	60
<i>Tannerella forshytensis</i>	GCG TAT GTA ACC TGC CCG CA TGC TTC AGT GTC AGT TAT ACC T	60
<i>Prevotella intermedia</i>	TTT GTT GGG GAG TAA AGC GGG TCA ACA TCT CTG TAT CCT GCG T	67
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	ATT GTG GCT AAA AAT TAT AGT T ACC CTC ACT TTG AGG ATT ATA G	40

Quadro 1: Sequência de oligonucleotídeos

## **5.0 SUBPROJETO II: PERIODONTITE MATERNA E PRESENÇA DE DIABETES GESTACIONAL: AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DA PLACENTA.**

### **5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

- Identificar bactérias periodontopatogênicas em placenta, biofilme subgengival e secreção cérvico-vaginal de parturientes com e sem diabetes gestacional;
- Avaliar a relação entre bactérias identificadas nas amostras de biofilme subgengival, placenta e cérvico-vaginal com a condição periodontal das parturientes com e sem diabetes gestacional;
- Correlacionar a condição periodontal das parturientes e o diabetes gestacional.

## **5.2 METODOLOGIA**

### **5.2.1 SELEÇÃO DA AMOSTRA**

Será realizado estudo transversal, fazendo parte do estudo parturientes do Hospital Geral Clériston de Andrade (HGCA) e do Hospital da Mulher (HM), em Feira de Santana - Bahia, no período de junho de 2013 a julho de 2014, considerando as que estiverem internadas para resolução da gestação, nos dias da semana previstos para as avaliações odontológicas, bem como para a coleta das amostras do biofilme subgengival, cérvico-vaginal e placentárias.

#### **Critérios de inclusão:**

Serão incluídas no estudo mulheres com idade entre 18 e 35 anos, que tiverem o parto realizado nos dias da semana previstos para a coleta da amostra da placenta na unidade hospitalar, bem como avaliação odontológica e coleta de secreção cérvico-vaginal.

#### **Critérios de exclusão:**

Serão excluídas do estudo mulheres com menos de 18 anos e mais de 35 anos, fumantes, gestação múltipla, tiverem feito tratamento de fertilização in vitro, tenham qualquer condição médica em que tenha sido necessário uso de terapia antibiótica nos três meses anteriores ao parto, ou tenha alguma condição sistêmica que justifique profilaxia antibiótica antes da sondagem periodontal, possuam diagnóstico de vírus da imunodeficiência humana (HIV), sífilis, HTLV, hepatite B, citomegalovírus, toxoplasmose ou rubéola durante a gestação, apresentarem hipertensão, pré-eclâmpsia, diabetes prévia a gestação ou infecção urinária. Estes dados serão verificados e confirmados no prontuário médico e/ou caderneta do pré-natal da parturiente. Mulheres em

risco iminente de parto ou trabalho de parto avançado serão também excluídas. Esta avaliação é realizada pelo obstetra responsável pela gestante. Ainda será necessária a presença de pelo menos 10 dentes na boca, além dos restos radiculares e terceiros molares.

### 5.2.2 DELINEAMENTO DO ESTUDO

As gestantes que chegarem à maternidade no dia do parto com ausência de sinais e sintomas de trabalho de parto iminente serão informadas da pesquisa, e caso aceitem participar, assinarão o termo de livre consentimento, sendo, então, submetidas à entrevista por meio de questionário para obtenção de dados referentes à identificação, condições sócio demográficas, história médica e odontológica e dados físicos e antropométricos. Logo após o parto, serão coletadas as amostras de placenta e preenchidos os dados referentes ao tipo de parto, semana de conclusão da gestação, condição placentária, sexo e peso do neonato. O questionário e a coleta das placentas serão feitas por um mesmo examinador.

A amostra obtida será dividida em dois grupos: grupo 1, composto de parturientes com diagnóstico de doença periodontal mas sem diabetes gestacional; grupo 2, composto por parturientes com doença periodontal e diabetes gestacional. O diagnóstico de diabetes gestacional será observado no prontuário médico ou cartão do pré-natal. O diagnóstico de doença periodontal será baseado no critério de Page & Eke, 2007, descritos no subprojeto I.

Os questionamentos presentes na ficha, anexo 1, buscam identificar fatores que possam excluir a parturiente do estudo, como a presença de



alterações sistêmicas. Além disso, serão avaliados outros fatores de risco para o parto prematuro, como presença de abortos espontâneos anteriores, natimortos, pré-eclâmpsia, aumento excessivo de peso durante a gestação, uso de drogas ou álcool.

Após o parto, a parturiente será submetida às avaliações periodontais e cérvico-vaginais, além de terem coletadas amostras de sangue para avaliação da hemoglobina glicada A1C e frutossamina, assim que se sentirem aptas para a realização dos mesmos, não ultrapassando 72h após o parto.

### 5.2.3 PROCEDIMENTO PARA COLETA DE DADOS

Para a coleta das amostras subgengivais, de secreção cérvico-vaginal e placenta, além do exame periodontal, serão adotados os mesmos critérios do subprojeto I.

#### 5.2.3.1. COLETA DAS AMOSTRAS DE SANGUE

Para avaliação dos níveis de hemoglobina glicada A1C (HbA1C) e frutossamina, serão coletados 5 ml de sangue venoso na fossa antecubital das participantes com o objetivo de avaliar os níveis glicêmicos das parturientes. As amostras serão colocadas em tubo estéril com ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA).

#### 5.2.4 ANÁLISE MOLECULAR DAS AMOSTRAS DO ESTUDO

Para extração de DNA e detecção bacteriana das amostras subgengivais, cérvico-vaginal e placentária serão adotados os mesmos critérios do subprojeto I.

### 5.2.5 AVALIAÇÃO LABORATORIAL DAS PARTURIENTES COM DIABETES GESTACIONAL

A avaliação da HbA1C será realizada por cromatografia líquida de alto desempenho (CLAD, certificada pela NGSP) e a frutossamina será avaliada pelo método colorimétrico cinético, ambas em laboratório de análises clínicas. Os valores de referência para frutossamina tido como normais são de 205 a 285umol/mL e os de referência para hemoglobina glicada são de 4 a 6%.

## **6.0 SUBPROJETO III: RELAÇÃO ENTRE CONDIÇÃO PERIODONTAL E COMPOSIÇÃO DO LEITE MATERNO**

### **6.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

- Investigar o impacto da periodontite crônica na qualidade do leite materno (nutricional e fatores imunológicos);
- Correlacionar os níveis de AGP, IgA e citocinas (IL-10 e TNF- $\alpha$ ) no leite materno com a presença de periodontite crônica.

## **6.2 METODOLOGIA**

### **6.2.1 SELEÇÃO DA AMOSTRA**

Farão parte deste estudo todas as parturientes inclusas no subprojeto I que residirem no município de Feira de Santana – Bahia, independente do desfecho gestacional e peso do bebê ao nascer.

### **6.2.2 DELINEAMENTO DO ESTUDO**

As participantes do subprojeto I serão contatadas por telefone para a identificação de parturientes que estejam amamentando exclusivamente com leite materno seus bebês no período de 30 a 90 dias após o nascimento. Todas que se adequarem a este pré-requisito serão visitadas para coleta das amostras de leite materno.

### **6.2.3 COLETA DAS AMOSTRAS DE LEITE MATERNO**

Amostras de leite serão coletadas das mães declararem que seus filhos estão recebendo exclusivamente leite materno, independentemente do grupo a qual pertençam no subprojeto I. Os encontros para a coleta das amostras serão realizados nos postos de saúde em que as mães estejam fazendo o pré-natal dos seus filhos.

Serão coletados pelo menos 3 ml de leite materno, por expressão manual ou por bomba para retirar leite materno. Serão excluídas mães com sintomas de mastite no dia da coleta. As amostras de leite serão colocadas em tubos contendo solução de tolueno butilado hidroxilo (500 mg / ml) para evitar a oxidação, sendo mantidas em gelo e levadas imediatamente para o laboratório.

Alíquotas de leite serão levadas para a determinação imediata do teor de gordura total pelo método de cromatografia gasosa (CG). Cada amostra de leite será dividida em dois tubos Eppendorf codificados. Alíquotas designadas serão centrifugadas a 13.000 rpm durante 5 min para remover a gordura (leite desnatado) e serem utilizadas para a análise das citocinas e imunoglobulinas; sobrenadantes do leite desnatado e o restante das alíquotas contendo o leite preservado integralmente servirão para análise de AGP serão armazenados a -80°C.

Imunoensaios multiplex biométricos e testes ELISA serão utilizados para determinar os níveis de citocinas selecionadas e imunoglobulinas. Cromatografia gasosa será utilizada para quantificar os níveis de ácidos graxos polinsaturados (AGP).

#### 6.2.4 DETECÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS, CITOCINAS E ANTICORPOS IgA NO LEITE MATERNO

A composição de ácidos graxos do leite humano será determinada por CG. Para as análises de ácidos graxos no leite, as amostras serão descongeladas em banho-maria e homogeneizadas por inversão e, por agitação em banho ultrassônico para dispersar a gordura coalescida. AGP serão convertidos em ésteres metílicos de ácidos graxos com ácido tridecanóico como padrão interno. Para todas as amostras, os ésteres metílicos dos ácidos graxos serão analisados por CG com detecção por ionização de chama. Os dados serão expressos como percentagem do peso dos ácidos graxos totais. Os ácidos graxos mensurados serão agrupados em ácidos

graxos saturados ( $\Sigma$ SFA): (14:0, 16:0, 18:0, 22:0 e 24:0), ácidos graxos monoinsaturados ( $\Sigma$ MUFA): (14:0<sup>1</sup> n-5 , 16:1 n-7, 18:1 n-9, 24:1 n-9), o total de AGPI n-6 ( $\Sigma$ n-6): [18:2 n-6 (LA: ácido linoleico), 18:3 n-6, 20:3 n-6, 20:4 n-6 (AA), 22:0<sup>4</sup> n-6, 22:5 n-6], e total de AGPI n-3 ( $\Sigma$ n-3): [(18:3 n-3 (ALA: .  $\alpha$ -linolénico), 20:5 n-3, 22:5 n-3, 22:6 n-3 (DHA)]. Será mensurado 20:3 n-9 (MA: ácido de *Mead*) como um parâmetro da eficiência da bioquímica essencial de ácidos graxos.

Para detecção de citocinas e IgA, será realizado um imunoenensaio multiplex biométrico, contendo microesferas fluorescentes conjugados com um anticorpo monoclonal específico para a proteína alvo, será utilizado para a mensuração das citocinas de acordo com as instruções do fabricante (Bio-Plex <sup>®</sup> Assay Cytokine Humano). Citocinas selecionadas (IL-10 e TNF- $\alpha$ ) e IgA serão mensurados em cada amostra de leite. Os níveis de citocinas serão determinados utilizando-se um sistema multiplex de análise (*Luminex <sup>®</sup> Instrumentation System multiplex array reader - Bio-Plex Workstation - Austin, TX*) . Concentração de citocinas será calculado utilizando-se um software.

## 7.0 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise dos dados será feita através de estatística descritiva utilizando gráficos e tabelas contendo frequências absolutas e relativas e parâmetros de média e desvio padrão. A comparação entre os sujeitos no que diz respeito a condição periodontal e presença ou não de bactérias na placenta será feita utilizando o teste do quiquadrado e o teste de t *Student*. Em todos os testes será adotado nível de significância de 5%.

## 8.0 ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA

A participação em cada etapa do estudo é voluntária, podendo a parturiente desistir em qualquer uma das fases de coleta de dados. Estão assegurados a confidencialidade no uso das informações, excluindo-se o nome da participante das bases de dados, bem como de todas as publicações que venham a ser realizadas.

Esta pesquisa não realizará nenhum tipo de intervenção clínica ou cirúrgica nas parturientes nem nos recém-natos. Não será realizado nenhum tipo de tratamento, apenas serão feitos exames clínicos periodontais, coleta de amostra da placenta, avaliação de secreção vaginal para diagnóstico de vaginose bacteriana e coleta de amostra do leite materno, além de um questionário que será feito a parturiente após prévio esclarecimento e assinatura no termo de consentimento.

A placenta humana após o parto normalmente é descartada, pois ela é expulsa do útero logo após o parto normal ou completamente removida após um parto cesário. Desta forma, a remoção de pequenas porções deste tecido para análise laboratorial não causará nenhum prejuízo aos participantes desta pesquisa. Após avaliação laboratorial, as amostras de tecido serão descartadas em local apropriado para resíduos biológicos.

Todas as participantes serão esclarecidas sobre sua condição da saúde oral e em casos de diagnóstico de doença periodontal, todas terão o seu tratamento assegurado pelo Sistema Único de Saúde (SUS) no Centro de Especialidades Odontológicas por um periodontista. As participantes que receberem o diagnóstico de vaginose serão contactadas por telefone ou carta,



mesmo após alta hospitalar, para esclarecimento sobre a condição encontrada e encaminhamento para tratamento em posto de saúde pelo SUS.

Conhecer outros fatores de risco para o parto prematuro é de fundamental importância no desenvolvimento de políticas de saúde que ampliem o acesso a avaliação odontológica de gestantes, tentando minimizar os riscos destas mulheres terem filhos com peso inferior a 2500gr, fato este, que pode acarretar uma série de doenças a curto, como dificuldade respiratória ao nascer, ou a longo prazo, como sequelas de uma paralisia cerebral ao nascer.

## 9.0 RESULTADOS ESPERADOS

É bastante aceito na comunidade científica a questão de processos infecciosos, como vaginose, desencadeando o processo de indução de parto pré-termo. Da mesma forma que uma infecção vaginal pode provocar uma resposta imunológica que leve ao parto prematuro, supõe-se que outras infecções, mesmo a distância, possam desencadear o mesmo processo. Sendo assim, neste estudo buscar-se-á mostrar se gestantes com doença periodontal têm uma maior chance de ter partos anteriores a 37 semanas.

Espera-se com este estudo demonstrar como a doença periodontal pode estar envolvida neste processo. Será avaliado se as bactérias envolvidas na doença periodontal são capazes de infectar as membranas intrauterinas durante a gestação por via hematogênica. Esta contaminação pode propiciar a ocorrência de parto prematuro, favorecendo o nascimento de bebês de baixo peso. Acredita-se que gestantes com doença periodontal apresentarão bactérias comuns a esta doença também na placenta e quanto maior a quantidade periodontopatógenos infectando este tecido, maior será a chance da resolução da gestação ocorrer antes do período adequado.

Além disso, este projeto busca avaliar a condição periodontal em um grupo específico de gestantes com diabetes gestacional. Sabe-se que a presença de diabetes é um fator de risco importante para a ocorrência de parto prematuro, e portanto, é importante que se busque avaliar se a condição periodontal destas parturientes pode ou não agravar este risco.

Após a resolução da gestação, independente do tempo, tipo de parto e do peso que esses bebês venham a apresentar no nascimento, é importante se

pensar ainda na possibilidade da interferência destes mesmos mediadores inflamatórios presentes no plasma na qualidade do leite materno ofertado. Sendo assim, espera-se neste estudo demonstrar se essa relação pode ou não existir, esclarecendo se a presença de doença periodontal pode ou não modificar a composição do leite ou transmitir através deste, citocinas inflamatórias.

## 10.0 REFERÊNCIAS

1. Socransky S, Haffajee A. Infecções periodontais. "In": Lindhe J, Lang N, Karring T. Tratado de periodontia clínica e implantologia oral. 5ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2010; p.197-254.
2. Socransky S, Haffajee A, Cugini M, Smith C, Kent Jr R. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol.* 1998; (25): 134-44.
3. Lin D, Smith M, Champagne C, Elter J, Beck J, Offenbacher S. Porphyromonas gingivalis infection in pregnant mice is associated with placental dissemination, an increase in the placental Th1/Th2 cytokine ration, and fetal growth restriction. *Infection and immunity.* 2003; 71(9): 5163-8.
4. Fentoglu O, Koroglu BK, Sert T, et al. Pro-inflammatory cytokine levels in association between periodontal disease and hyperlipidaemia. *J Clin Periodontol.* 2011; 38(1): 08-16.
5. Alves C, Andion J, Brandão M, Menezes R. Mecanismos patogênicos da doença periodontal associada ao diabetes melito. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2007 Oct; 51(7): 1050-7.
6. Zanatta F, Machado E, Zanatta G, Fiorini T. Doença periodontal materna e nascimento prematuro e de baixo peso: uma revisão crítica das evidências atuais. *Arq Catar Med.* 2007; 36(1): 96-101.
7. Politamo G. Doença periodontal, alterações inflamatórias e pré-eclampsia: avaliação clínica e imunológica (tese). São Paulo: Universidade Estadual de Campinas, Tocogineologia, Ciências Biomédicas; 2009.
8. Paizan M, Martin F. Associação entre doença periodontal, doença cardiovascular e hipertensão arterial. *Rev Bras Hipertens.* 2009; 16(3): 183-5.
9. Fardini Y, Chung P, Dumm R, Joshi N, Han Y. Transmission of diverse oral bactéria to murine placenta: evidence for the oral microbiome as a potencial source of intratuterine intection. *Infection and Immnuty.* 2010 Apr; 78(4): 1789-96.
10. Detsch J, Almeida A, Bortolini L, Nascimento D, Oliveira Junior F, Rea R. Marcadores para o diagnóstico e tratamento de 924 gestações com diabetes melito gestacional. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2011; 55(6): 389-98.
11. Williams C, Davenport E, Sterne J, Sivapathasundaram V, Fearne J, Curtis M. Mechanisms of a risk in preterm low-birthweight infants. *Periodontology* 2000. 2000; 23: 142-50.

12. Hill G. Preterm Birth: associations with genital and possibly oral microflora. *Journal of Periodontology*. 1998 Jul; 3: 222-32.
13. Milchalowicz B, Durand R. Maternal periodontal disease AND spontaneous preterm birth. *Periodontology* 2000. 2007; 44: 103-12.
14. Silveira MF, Santos IS, Barros AJD, Matijasevich A, Barros F, Victovia CG. Aumento da prematuridade no Brasil: revisão de estudos de base populacional. *Rev Saúde Pública*. 2008; 42(5): 957-64.
15. Spallicci M, Chiea M, Albuquerque P, Bittar R, Zugaib M. Estudo de algumas variáveis maternas relacionadas com a prematuridade no hospital universitário da universidade de São Paulo. *Rev Med. HU-USP*. 2000; 10(1): 19-25.
16. Hillier S, Nugent R, Eschenbach D, et al. Association between bacterial vaginosis and preterm delivery of a low-birth-weight infant. *The New England Journal of Medicine*. 1995; 333(26): 1737-42.
17. Han Y, Redline R, Li M, Yin L, Hill G, McCormick T. *Fusobacterium nucleatum* induces premature and preterm stillbirths in pregnant mice: implication of oral bacteria in preterm birth. *Infect Immun*. 2004; 72(4): 2272-79.
18. Lin D, Smith M, Champagne C, Elter J, Beck J, Offenbacher S. *Porphyromonas gingivalis* infection during pregnancy increases maternal tumor necrosis factor alpha, suppresses maternal interleukin-10, and enhances fetal growth restriction and resorption in Mice. *Infection and Immunity*. 2003 Sept; 71(9): 5156-62.
19. Arce RM, Barros SP, Wacker B, Peters B, Moss K, Offenbacher S. Increased TLR4 expression in murine placentas after oral infection with periodontal pathogens. *Placenta*. 2009; 30: 156-62.
20. Jones H, Harris KA, Azizia M, et al. Differing prevalence and diversity of bacterial species in fetal membranes from very preterm and term labor. *Plos One*. 2009; 4 (12): e8205.
21. Bearfield C, Davenport E, Sivapathasundaran V, Allaker R. Possible association between amniotic fluid micro-organism infection and microflora in the mouth. *An Intern J Obst and Gyn*. 2000 May; 109: 527-33.
22. Léon R, Silva N, Ovalle A, et al. Detection of *Porphyromonas gingivalis* in the amniotic fluid in pregnant women with a diagnosis of threatened premature labor. *J Periodontal*. 2007; 78(7): 1249-55.

23. DiGiulio DB, Romero R, Amogan HP, et al. Microbial Prevalence, Diversity and Abundance in Amniotic Fluid During Preterm Labor: A Molecular and Culture-Based Investigation. *Plos One*. 2008 Aug; 3(8): 1-10.
24. Ovalle A, Gamonal J, Martinez A, et al. Relacion entre enfermedad periodontal, infección bacteriana ascendente y patologia placentária com parto prematuro. *Rev Med Chile*. 2009; 137: 504-14.
25. Nugent R, Krohn MA, Hillier SL. Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of gram stain interpretation. *J Clin Microbiol* 1991; 29(2): 297-301.
26. Katz J, Chegini N, Shiverick K, Lamont R. Localization of *P. gingivalis* in preterm delivery placenta. *J Den Res* 2009; 88(6): 575-8.
27. Offenbacher S, Katz V, Fertik G, et al. Periodontal infection as a possible risk factor for preterm low birth weight. *Journal of Periodontology*. 1996; 67: 1103-13.
28. Desanayake AP. Poor periodontal health of the pregnant woman as a risk factor for low birth weight. *Ann Periodontol*. 1998; 3: 206-12.
29. Cota LOM. Associação entre doença periodontal materna e intercorrências gestacionais: parto pré-termo, baixo peso ao nascimento, pré-eclampsia (dissertação). Minas gerais: Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Odontologia; 2005.
30. Lopes F, Lima L, Rodrigues MC, Cruz MC, Oliveira AE, Alves C. A condição periodontal materna e o nascimento prematuro de baixo peso: estudo caso controle. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2005; 27(7): 382-6.
31. Marakoglu I, Gursoy U, Marakoglu K, Cakmak H, Ataolgu T. Periodontitis as a risk factor for preterm low birth weight. *Yonsei Med J* 2008; 49(2):200-3.
32. Vettore M, Leal M, Leão A, Silva A, Lamarca G, Sheihan A. The relationship between periodontitis and preterm low birthweight. *J Dent Res* 2008; 87(1): 73-8.
33. Nabet C, Lelong N, Colombier M, et al. Maternal periodontitis and the causes of preterm birth: the case-control EpiPap study. *J Clin Periodontol* 2010; 37: 37-45.
34. Mannen S, Chava V. The relationship between maternal periodontitis and preterm low birth weight: a case control study. *Contemp Clin Dent* 2011; 2(2): 88-93.

35. Jeffcoat MK, Geurs NC, Reddy MS, Cliver SP, Goldenberg RL, Hauth JC. Periodontal infection and preterm birth: results of a prospective study. *J Am Dent Assoc.* 2001 Jul; 132: 875-80.
36. Offenbacher S, Boggess K, Murtha A, et al. Progressive periodontal disease and risk of very preterm delivery. *Obstetrics & Gynecology.* 2006; 107(1): 29-36.
37. Offenbacher S, Lin D, Strauss R, et al. Effects of periodontal therapy during pregnancy on periodontal status, biologic parameters, and pregnancy outcomes: a pilot study. *J Periontol* 2006; 77(12): 2011-24.
38. Offenbacher S, Beck J, Jared H, et al. Effects of periodontal therapy rate of preterm delivery a randomized controlled trial. *Obstet Ginecol* 2009; 114(3): 551-59.
39. Jeffcoat MK, Parry S, Sammel M, Clothier B, Catlin A, Macones G. Periodontal infection and preterm birth: successful periodontal therapy reduces the risk of preterm birth. *BJOG* 2011; 118(2): 250-6.
40. Polyzos N, Polyzos P, Zavos A, et al. Obstetric outcomes after treatment of periodontal disease during pregnancy: systematic review and meta-analysis. *BMJ* 2010; 29; 341-51.
41. Rosa M, Pires P, Medeiros L, Edelweiss M, Mastinés-Mesa J. Periodontal disease treatment and risk of preterm birth: a systematic review and meta-analysis. *Cad Sal Pública* 2012; 28(10): 1823-33.
42. Offenbacher S, Jared HL, O'Reilly PG, et al. Potential pathogenic mechanism of periodontitis associated pregnancy complications. *Ann Periodontol*, 1998; 3(1): 230-50.
43. Souza S, Voltarelli J, Ferriani R. *Imunologia da reprodução humana.* Medicina. 1997; 30: 277-88.
44. Peltier M. Immunology of term and preterm labor. *Reproductive Biology and Endocrinology.* 2003; 1: 122.
45. Li Y, Shibata Y, Zhang L, Kuboyama N, Abiko Y. Periodontal pathogen *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* LPS induces mitochondria-dependent apoptosis in human placental trophoblasts. *Placenta.* 2011; 32: 11-19.
46. Passanezi E, Brunetti M, Santana A. Interação entre a doença periodontal e a gravidez. *R Periodontia* 2007; 17(2): 32-8.
47. Tunes RS, Foss-Freitas MC, Nogueira-Filho GR. Impact of periodontitis on the diabetes – related inflammatory status. *J Can Dent Assoc.* 2010; 76(35): 1-7.

48. Standards of Medical Care in Diabetes – 2012. *Diabetes Care* 2012; 35: S11-62.
49. Gross J, Silveiro S, Camargo J, Reichelt A, Azevedo M. Diabetes melito: diagnóstico, classificação e avaliação do controle glicêmico. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2002; 46(1): 16-26.
50. Nogueira A, Santos J, Santos L, Salomon I, Abrantes M, Aguiar R. Diabetes gestacional: perfil e evolução de um grupo de pacientes do Hospital das Clínicas da UFMG. *Rev Med Minas Gerais* 2011; 21(1): 32-41.
51. Desanayake AP, Chhun N, Tanner A, et al. Periodontal pathogens and gestacional diabetes mellitus. *J Dent Res.* 2008; 87(4): 328-33.
52. Xiong X, Elkind-Hirsch K, Vastardis S, Delarosa R, Pridjian G, Buekens P. Periodontal disease is associated with gestacional diabetes mellitus: a case-control study. *J Periodontol.* 2009; 80(11): 1742-79.
53. Silva J, Soccol Junior H, Laçava B, Ribeiro T, Bertini A. Fatores relacionados à insulino-terapia no diabetes melito gestacional. *Arq Catarinen Med.* 2008; 37(1): 49-53.
54. Cummins A, Thompsom FM. Post natal changes in mucosal immune response: a physiological perspective of breast feeding and weaning. *Immunol Cell Biol,* 1997; 75(5): 419-29.
55. Meneses F, Torres AG, Trugo NM. Essencial and long-chain polyunsaturated fatty acids status and fatty acid composition of breast milk of lactating adolescents. *Br J Nutr* 2008; 100(5): 1029-37.
56. Bokor S, Koletzko B, Decsi T. Systematic review of fatty acids composition of human milk from mothers of preterm compared to full-term infants. *Ann Nutr Metab* 2007; 51(6): 550-56.
57. Chirico G, Marzollo R, Cortinovia S, Fonte C, Gasparoni A. Antiinfective properties of human milk. *J Nutr.* 2008;138:1801S–6.
58. Goldman AS, Chheda S, Garofalo R. Evolution of immunologic functions of the mammary gland and the postnatal development of immunity. *Pediatr Res* 1998;43:155–62.
59. Newburg DS. Innate immunity and human milk. *J Nutr* 2005;135:1308–12.
60. Newburg DS, Walker WA. Protection of the neonate by the innate immune system of developing gut and of human milk. *Pediatr Res* 2007;6(1):2–8.
61. Garofalo R. Cytokines in human milk. *J Periatr.* 2010; 156(2): S36-40.



62. Bollinger RR, Everett ML, Palestrant D, Love S, Lin S, Parker W. Human secretory immunoglobulin A may contribute to biofilm formation in the gut. *Immunology* 2003; 109: 580-7.
63. Goldman AS. The immune system in human milk and the developing infant. *Breastfeed Med* 2007;2:195–204.
64. Goldman AS, Chheda S, Garofalo R, Schmalstieg FC. Cytokines in human milk: properties and potential effects upon the mammary gland and the neonate. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 1996;1:251–8.
65. Hawkes JS, Bryan DL, James MJ, Gibson RA. Cytokines (IL-1beta, IL-6, TNF-alpha, TGF-beta1, and TGF-beta2) and prostaglandin E2 in human milk during the first three months postpartum. *Pediatr Res* 1999;46:194–9.
66. Gustafsson L, Hallgren O, Mossberg AK, et al. HAMLET kills tumor cells by apoptosis: structure, cellular mechanisms, and therapy. *J Nutr* 2005;135:1299-303.
67. Field CJ. The immunological components of human milk and their effect on immune development in infants. *J Nutr* 2005; 135:1–4.
68. de la Rosa G, Yang D, Tewary P, Varadhachary A, Oppenheim JJ. Lactoferrin acts as an alarmin to promote the recruitment and activation of APCs and antigen-specific immune responses. *J Immunol* 2008 May; 180(10): 6868–76.
69. Oddy WH, Halonen M, Martinez FD, et al. TGF-beta in human milk is associated with wheeze in infancy. *J Allergy Clin Immunol* 2003;112:723–8.
70. Levy I, Comarsca J, Davidovits M, et al. Urinary tract infection in preterm infants: the protective role of breastfeeding. *Pediatr Nephrol* 2009;24:527–31.
71. Sullivan S, Schanler RJ, Kim JH, et al. An exclusively human milk-based diet is associated with a lower rate of necrotizing enterocolitis than a diet of human milk and bovine milk-based products. *J Pediatr* 2010;156: 562–7.e1.
72. Groer M, Davis M, Steele K. Associations between human milk SIgA and maternal immune, infectious, endocrine, and stress variables. *J Hum Lact.* 2004; 20(2): 153-8.
73. Hunt KM, Williams JE, Shafii B, et al. Mastitis is associated with increased free fatty acids, somatic cell count, and interleukin-8 concentrations in human milk. *Breastfeed Med* 2012, 0(0): 1-6.. Epub ahead of print.

74. Riskin A, Almog M, Peri R, Halasz K, Srugo I, Kessel A. Changes in immunomodulatory constituents of human milk in response to active infection in the nursing infant. *Pediatr Res*. 2012, 71(2): 220-5.
75. Tagliaferro E, Pardi V, Pereira A. Avaliação de risco em odontologia. "In": Pereira A, et al. *Tratado de saúde coletiva em odontologia*. 1ª edição. São Paulo: Editora Napoleão; 2009; p. 529-45.
76. Ainamo J, Bay I. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. *Int Dent J* 1975; 25: 229-35.
77. Page RC, Eke PI. Case definitions for use in population-based surveillance of periodontitis. *J Perio* 2007; 78: 1387-99.
78. Campos A, Leite A, Lisboa C et al. Estudo comparativo entre o teste do pH e do KOH versus score de Nugent para diagnóstico de vaginose bacteriana em gestantes. *Rev Bras Ginecol Obstet* 2012; 34(5):209-14.
79. Isola J, DeVries S, Chu L, Ghazvini S, Waldman F. Analysis of changes in DNA sequence copy number by comparative genomic hybridization in archival paraffin-embedded tumor samples. *Americ Journ Patology*. 1994; 145(6): 1301-08.

## ANEXO 1 - Questionário

<b>Identificação e Dados Sócio Demográficos</b>	
Nome:	
Data de nascimento:	Estado civil:
Cor:	Renda familiar:
Escolaridade:	Profissão:
<b>Dados físicos e antropométricos</b>	
Peso no início da gestação:	Peso atual:
Estatura:	Frequência respiratória:
Frequência cardíaca:	Média de PA:
Índice de massa corporal (peso antes da gestação):	
Doenças sistêmicas anteriores a gestação:	
<b>História da gestação</b>	
Número de gestações:	Data do parto anterior:
Nº de filhos nascidos vivos:	Aborto espontâneo?
Data da última menstruação*:	
Método de concepção (espontâneo ou induzido):	
Quantos kilos ganhou na gestação:	Já teve algum parto prematuro:
Quantas consultas fez no pré-natal:	
Alguma infecção durante gestação?	Qual?
Usou antibióticos?	Quando?
Diabetes gestacional?*	Pré-eclâmpsia?*
Uso de drogas/tabaco?	Uso de álcool?
Foi feito o diagnóstico de alguma infecção durante a gestação (rubéola, toxoplasmose, citomegalovírus, HIV, HTLV, sífilis)?	
<b>Dados do pós-parto</b>	
Tipo de parto:	Membrana intacta?
<b>Dado do recém-nascido</b>	
Sexo:	Peso:
<b>História odontológica</b>	
Consulta com o dentista durante gestação:	
Fez algum tratamento?	Qual?

\* Confirmar dados em prontuário.

## ANEXO 2: Ficha Periodontal

### Exame periodontal

#### Controle de biofilme dentário (índice de placa corada)

18	17	16	15	14	13	12	11	21	22	23	24	25	26	27	28	
																V
																P
																L
																V
48	47	46	45	44	43	42	41	31	32	33	34	35	36	37	38	

Total de sítios: \_\_\_\_\_ (100%); sítios corados: \_\_\_\_ ( \_\_\_\_%) Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

#### Sangramento gengival (sangramento à sondagem)

18	17	16	15	14	13	12	11	21	22	23	24	25	26	27	28	
																V
																P
																L
																V
48	47	46	45	44	43	42	41	31	32	33	34	35	36	37	38	

Total de sítios: \_\_\_\_ (100%); sítios c/ sangramento: \_\_\_\_ ( \_\_\_\_%) Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

#### Profundidade de sondagem (PS), recessão (R), lesão de furca (F), mobilidade (M)

18	17	16	15	14	13	12	11	21	22	23	24	25	26	27	28	
																PS
																R
																F/M
																V
																PS
																R
																F/M
																V
																PS
																R
																F/M
																L
48	47	46	45	44	43	42	41	31	32	33	34	35	36	37	38	

Diagnóstico: \_\_\_\_\_