

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
NÍVEL DOUTORADO
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO CLÍNICA ODONTOLÓGICA/PERIODONTIA

Tese

**Bactérias subgengivais em gestantes: resposta ao
tratamento periodontal e associação com
prematuridade e baixo peso ao nascer**

Linha de pesquisa

Biomateriais e técnicas terapêuticas em odontologia

José Mariano da Rocha

Porto Alegre, julho de 2014.

JOSÉ MARIANO DA ROCHA

**Bactérias subgengivais em gestantes: resposta ao
tratamento periodontal e associação com
prematuridade e baixo peso ao nascer**

Linha de pesquisa

Biomateriais e técnicas terapêuticas em odontologia

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia, Nível Doutorado, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como pré-requisito final para a obtenção do título de Doutor em Odontologia, área de concentração Clínica Odontológica/Periodontia

Orientador: Prof. Dr. Cassiano Kuchenbecker Rösing

Porto Alegre, julho de 2014.

CIP - Catalogação na Publicação

Mariano da Rocha, José

Bactérias subgengivais em gestantes: resposta ao tratamento periodontal e associação com prematuridade e baixo peso ao nascer / José Mariano da Rocha. -- 2014.

86 f.

Orientador: Cassiano Kuchenbecker Rösing.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Odontologia, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Porto Alegre, BR-RS, 2014.

1. Prematuridade. 2. Tratamento periodontal . 3. Periodontite. 4. Bactérias. I. Kuchenbecker Rösing, Cassiano, orient. II. Título.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho é resultado do esforço, carinho e dedicação de muitas pessoas que contribuíram de forma direta ou indireta para a conclusão desta tese. Eu gostaria de deixar aqui registrado o meu agradecimento a todos que estiveram comigo ao longo desses anos. Saibam que ao escrever esse texto lembrei-me de cada pessoa que esteve comigo, independente do tempo ou do momento em que estiveram ao meu lado. Vou sempre guardar com carinho na minha memória tudo que aconteceu durante esse período e vou ser eternamente grato a todos vocês. A junção das experiências que tive nesse período contribuiu para construir quem eu sou hoje. Não vou conseguir agradecer a cada um de vocês em específico nesse texto. Talvez eu nunca consiga demonstrar o quanto sou agradecido a todos por tudo que fizeram por mim, mas gosto de acreditar que as pessoas que participaram dessa caminhada sabem o quanto foram e são importantes para mim e mais que isso, o quanto eu valorizo cada pequeno gesto. Gostaria, mesmo que de forma não específica, destacar meu agradecimento a alguns grupos de pessoas:

À minha família. Meu pai e a minha mãe. Vocês são o meu exemplo e o meu suporte. Obrigado por me amparar nos momentos difíceis, me dar força para superar as dificuldades e apoiar as minhas decisões. Tenho um enorme orgulho de ter vocês como meus pais. Só tenho a agradecer pela confiança, amor, carinho e dedicação que vocês depositam em mim. Também ao meu irmão, pela certeza de ter sempre alguém com quem eu posso contar.

Aos mentores, Cassiano Rösing, o meu profundo agradecimento por me orientar em mais essa etapa da minha vida. Obrigado por me estimular a ir atrás dos meus objetivos. Fernando Hugo, obrigado por surgir abrindo novos caminhos. Dizem que as melhores coisas acontecem por acaso. Se for assim, posso dizer que você foi responsável por um grande acaso deste doutorado. Chris, orientador, amigo e conselheiro. Vou guardar para sempre comigo teus ensinamentos de vida. Também a todos os professores da UFRGS que tive o prazer de conhecer e conviver.

Aos amigos e colegas de projeto. Tiago, Carlos Heitor e Marta, pelo incentivo constante e apoio sempre que precisei. Patrícia, pela contribuição fundamental para a realização desta tese.

A todos com os quais convivi em Chicago. Em especial a Leah, minha amiga e colega e a todos do grupo de estudo sobre cicatrização na UIC.

Aos que me acompanharam no campus do Vale. Tiago Dalberto, Zeca e a todos do laboratório de imunogenética.

Aos colegas de pós-graduação e amigos da graduação da odontologia UFRGS.

Às gestantes que participaram deste projeto e a todos do HMIPV.

Ao Capes pelo auxílio financeiro através da bolsa.

Muito Obrigado.

RESUMO

Tem sido proposto na literatura que infecções distantes à unidade feto-placentária como as doenças periodontais, poderiam estar associadas a desfechos gestacionais adversos. Para tanto, duas possíveis vias têm sido propostas: uma por via direta, na qual bactérias periodontopatógenas presentes na cavidade oral poderiam se disseminar sistemicamente através da corrente sanguínea até a região feto-placentar estimulando uma resposta inflamatória local e com isso desencadear o parto prematuro; outra por via indireta, através do desafio inflamatório causado pelas doenças periodontais que causaria um estado pró-inflamatório no qual o aumento de mediadores inflamatórios locais e sistêmicos desencadearia desfechos gestacionais adversos. Dentro desses possíveis mecanismos propostos, algumas questões ainda não estão completamente esclarecidas, como, por exemplo, o perfil microbiológico de gestantes e o efeito do tratamento periodontal durante a gestação sobre a microbiota subgengival. Baseado nisso, esta tese busca responder essas questões. A presente tese é composta de uma revisão das evidências recentes e de dois estudos apresentados na forma de artigos científicos. O primeiro artigo, com um desenho de caso-controle, procura elucidar as correlações entre parâmetros clínicos, microbiológicos e imunológicos (locais e sistêmicos) em gestantes com parto prematuro e/ou baixo peso e gestantes com parto a termo e bebês com peso normal. O segundo artigo visa avaliar parâmetros microbiológicos durante a gestação e qual o efeito do tratamento periodontal sobre os microorganismos avaliados. Entre as principais conclusões destes estudos estão: 1 - Mulheres que gestantes com parto prematuro e/ou baixo peso não apresentaram diferenças nos parâmetros clínicos, microbiológicos e imunológicos avaliados em relação a gestantes com parto a termo e bebês com peso normal 2 - A inflamação local não parece se traduzir em um aumento de marcadores inflamatórios sistêmicos 3 - O tratamento periodontal não cirurgico reduz parâmetros clínicos inflamatórios e a contagem de *P. gingivalis* durante a gestação.

Palavras chave: Prematuridade, Bactérias, Periodontite, Tratamento periodontal

SUMÁRIO

1	APRESENTAÇÃO	6
2	JUSTIFICATIVA	8
2.1	MICROBIOTA SUBGENGIVAL EM GESTANTES.....	11
2.2	EFEITO DO TRATAMENTO PERIODONTAL DURANTE A GESTAÇÃO.....	12
3	OBJETIVOS	16
4	METODOLOGIA	17
4.1	AMOSTRA DO ESTUDO.....	17
4.2	AMOSTRA DE BIOFILME SUBGENGIVAL.....	18
4.3	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	19
4.4	ANÁLISE MICROBIOLÓGICA.....	19
4.4.1	Extração de DNA.....	19
4.4.2	Avaliação da quantidade e qualidade do DNA (Nanodrop)	19
4.4.3	Primers.....	20
4.4.4	Reação de Polimerase em Cadeia (PCR convencional)	21
4.4.5	PCR em tempo real.....	25
4.4.6	Curva Padrão.....	26
4.5	ANÁLISE DOS RESULTADOS.....	26
5	MANUSCRITO 1	27
6	MANUSCRITO 2	51
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	69
	REFERÊNCIAS	73
	ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA	78
	ANEXO B – FICHA DE COLETA DE DADOS	79
	ANEXO C – CALIBRAGEM DOS EXAMINADORES	82
	ANEXO D – FLUXOGRAMA	83
	ANEXO E – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO MANUSCRITO 2	85

1 APRESENTAÇÃO

O presente estudo é parte integrante do Projeto “Desfechos bucais e sistêmicos do tratamento periodontal durante a gestação”, um macro projeto desenvolvido pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UFRGS em conjunto com o Hospital Materno Infantil Presidente Vargas (HMIPV), que teve como um de seus objetivos avaliar desfechos gestacionais adversos em mulheres que receberam tratamento periodontal durante a gestação. Dando seqüência ao objetivo inicial, a presente tese “Perfil de bactérias subgengivais em gestantes: resposta ao tratamento periodontal e associação com prematuridade e baixo peso ao nascer” utilizou os dados provenientes deste estudo maior (Weidlich *et al.*, 2013).

Esta tese apresenta cinco seções distintas:

- A) Justificativa: Uma revisão da literatura apresentando as evidências atuais sobre a relação entre as doenças periodontais e desfechos gestacionais adversos, a microbiota subgengival em gestantes e o efeito do tratamento periodontal sobre esta microbiota.
- B) Metodologia: Apresentação mais detalhada da metodologia utilizada para as análises microbiológicas utilizadas nos manuscritos desta tese.
- C) Manuscrito 1: **“Clinical, microbiological and immunological periodontal parameters in women who experienced preterm/low birthweight and normal weight deliveries – a case-control approach”** , um estudo de caso controle que será submetido ao periódico: *Brazilian Oral Research*.
- D) Manuscrito 2: **“Influence of periodontal treatment on subgingival microbiota in pregnant women”** é uma análise secundária de um ensaio clínico randomizado que foi submetido ao periódico: *Molecular Oral Microbiology*.

E) Considerações Finais: Síntese dos resultados e perspectivas futuras são apresentadas.

2 JUSTIFICATIVA

Tem sido proposto na literatura que infecções em locais distantes ao feto como, por exemplo, as doenças periodontais, possam estar associadas com desfechos adversos na gestação. Estudos de caso controle têm consistentemente mostrado associações significativas entre desfechos gestacionais adversos e doenças periodontais (Corbella *et al.*, 2012). No entanto, a força desta associação é modesta e parece variar de acordo com a população estudada e com os critérios utilizados para avaliar inflamação periodontal (Sanz & Kornman, 2013).

Estudos que avaliaram o efeito do tratamento periodontal sobre eventos gestacionais adversos mostraram resultados contraditórios. Meta análises recentes sugerem tanto um efeito benéfico do tratamento periodontal sobre as taxas de prematuridade e baixo peso ao nascer (Polyzos *et al.*, 2009), quanto a ausência de redução nas taxas de prematuridade e baixo peso ao nascer com o tratamento periodontal materno (Fogacci *et al.*, 2011; Chambrone *et al.*, 2011). Tais inconsistências entre os achados dos estudos podem ser explicadas tanto pelas disparidades encontradas nos estudos, que incluem critérios de diagnóstico, extensão e gravidade de doença periodontal, bem como por critérios de definição de sucesso do tratamento periodontal.

Embora os mecanismos fisiopatológicos que expliquem essa relação ainda não tenham sido esclarecidos, duas principais vias têm sido propostas para explicar essa associação. Uma via direta, na qual microrganismos orais e/ou seus subprodutos atingem a unidade feto-placentária, e uma via indireta, na qual esse efeito sobre a unidade feto-placentária se daria através de mediadores inflamatórios presentes na corrente sanguínea. (Sanz & Kornman, 2013).

A via direta é baseada nas evidências que mostram que bactérias periodontais subgengivais como *Porphyromonas gingivalis* (Leon *et al.*, 2007; Katz *et al.*, 2009; Hasegawa-nakamura *et al.*, 2011) e *Fusobacterium nucleatum* (Cahill *et al.*, 2005; Gauthier *et al.*, 2011; Tateishi *et al.*, 2012) podem ser encontradas no fluido amniótico, placenta e membranas fetais de gestantes com desfechos gestacionais adversos. Essas bactérias poderiam causar uma inflamação aguda na placenta e levar ao parto prematuro (Han *et al.*, 2010; Hasegawa-nakamura *et al.*, 2011; Tateishi *et al.*, 2012). A via indireta é baseada na premissa de que o desafio inflamatório local nas doenças periodontais entre microrganismos e a resposta do

hospedeiro poderia aumentar a quantidade de mediadores inflamatórios circulantes e desencadear efeitos gestacionais adversos (Conde-Agudelo *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2006).

Uma série de estudos tem buscado avaliar essa possível via de relação entre microrganismos periodontais e a gestação. Estudos clínicos avaliaram o papel da quantidade e da qualidade da microbiota subgengival na ocorrência de desfechos gestacionais adversos. Barak *et al.* (2007) mostraram proporções significativamente altas de periodontopatógenos em placentas de mulheres com pré-eclâmpsia quando comparadas com mulheres sem pré-eclâmpsia. Bactérias periodontais como *P. gingivalis* foram detectadas por reação de polimerase em cadeia (PCR) no fluido amniótico de gestantes com risco de parto prematuro (León *et al.*, 2007).

Em um estudo de caso-controle realizado no Brasil, Vettore *et al.* (2008) avaliaram os níveis e proporções de 39 espécies bacterianas (incluindo *F. nucleatum* e *P. gingivalis*) presentes no biofilme subgengival de puérperas que tiveram parto pré-termo e/ou baixo peso (casos) e gestantes com parto a termo e bebês com peso normal (controles). A técnica utilizada para a avaliação microbiológica neste estudo foi a de Checkerboard DNA-DNA hybridization. A média de profundidade de sondagem foi significativamente maior no grupo controle quando comparado aos grupos parto pré-termo, baixo peso e pré-termo e baixo peso. Apesar disso, as proporções de bolsas com profundidade de sondagem $\geq 4\text{mm}$, $\geq 5\text{mm}$ e $\geq 6\text{mm}$ não apresentaram diferenças estatísticas entre os grupos, bem como não houve diferença para o percentual de sangramento subgengival que variou de 14.3% no grupo pré-termo até 18% no grupo controle. Além disso,, os grupos não diferiram em termos de proporções médias das bactérias avaliadas e não foram encontradas associações entre características clínicas e microbiológicas com a experiência de ter nascidos pré-termo e/ou com baixo peso.

Urbán *et al.* (2006), em um estudo de caso-controle, encontraram diferenças na prevalência de bactérias anaeróbias gram-negativas em relação a bactérias gram-positivas em amostras de biofilme subgengival analisadas por meio de cultura bacteriana. Aproximadamente metade (50.6% das gestantes que tiveram parto prematuro (n=77) apresentaram pelo menos um sitio com profundidade de sondagem $\geq 4\text{mm}$ e mais de 50% dos sítios com sangramento subgengival, enquanto que no grupo controle o percentual de gestantes que apresentou esses parâmetros clínicos foi significativamente menor (21.4%, p=0.001). Em relação aos

parâmetros microbiológicos, o grupo de gestantes que tiveram parto prematuro apresentou uma prevalência significativamente maior ($p < 0.001$) de bactérias periodontopatógenas como *Tannerella forsythensis*, *Fusobacterium nucleatum* e *Porphyromonas gingivalis* que gestantes que tiveram parto a termo ($n=84$), enquanto que microrganismos identificados com a saúde periodontal, como *Streptococcus mitis* e *S. oralis* estavam presentes em menores proporções nos casos do que nos controles (18.9% Vs. 84.2%, $p < 0.001$).

Jarjoura *et al.* (2005) avaliaram 83 gestantes que tiveram parto pré-termo (casos) com 120 gestantes que tiveram parto a termo. Apesar de uma diferença significativa na média de perda de inserção entre o grupo caso e controle (1.7mm VS 1.5mm, $p=0.003$), não houve diferença na média de profundidade de sondagem (2.5mm vs 2.4mm, $p=0.135$) e no percentual de sítios com sangramento à sondagem (35.1% vs 33.3%, $p=0.548$). Não houve diferença entre casos e controles na quantidade de todas 12 espécies (incluindo *P. gingivalis* e *F. nucleatum*) microbianas avaliadas (Checkerboard DNA-DNA hybridization).

Um estudo piloto realizado por Lin *et al.* (2007) avaliou a quantidade de oito bactérias (incluindo *P. gingivalis* e *F. nucleatum*) presentes no biofilme subgingival de gestantes que tiveram parto prematuro ($n=14$) e parto a termo ($n=17$) através de Checkerboard DNA-DNA hybridization. As gestantes foram incluídas antes da 22ª semana de gestação e apresentavam pelo menos 2 sítios com profundidade de sondagem ≥ 5 mm, sendo que pelo menos um destes com perda de inserção ≥ 1 mm. Não houve diferença entre os grupos para profundidade de sondagem e níveis clínicos de inserção. Os grupos não apresentaram diferenças significativas durante a gestação para nenhuma das oito bactérias avaliadas. O grupo de gestantes com parto prematuro apresentou uma maior quantidade de *P. gingivalis*, *T. forsythensis*, *P. intermedia* e *P. nigrescens* quando comparado ao grupo de gestantes com parto a termo.

Baseado nessa possível associação, Hasegawa-Nakamura *et al.* (2011) avaliaram o possível mecanismo pelo qual bactérias orais poderiam desencadear desfechos gestacionais adversos. Neste estudo, os autores mostraram que *P. gingivalis* estava presente nos tecidos coriônicos de 6 de 23 gestantes hospitalizadas por alto risco. Além disso, lipopolissacárides produzidos por essa bactéria induzem a produção de interleucina(IL)-6 e IL-8 via receptores do tipo Toll 2(TLR-2) em células derivadas de tecido coriônico.

2.1 MICROBIOTA SUBGENGIVAL EM GESTANTES

Bactérias anaeróbias específicas vêm sendo associadas com inflamação gengival durante a gestação. O mecanismo pelo qual a presença de bactérias no ambiente subgengival pode influenciar a inflamação gengival durante a gestação apresenta duas possíveis explicações. Na primeira, o aumento dos níveis hormonais facilitaria o crescimento de bactérias específicas (Kornman & Loesche, 1982) e, com isso, aumentaria a inflamação periodontal. No entanto, também é possível que a presença de bactérias específicas seja a consequência e não a causa, uma vez que a maior exposição a hormônios poderia transformar o habitat alterando profundidade de sondagem (Miyazaki *et al.*, 1991), quantidade de fluido gengival e resposta imune e com isso criaria um ambiente propício para a presença destas bactérias.

A influência da gestação sobre a microbiota subgengival foi avaliada em estudos recentes. Adriaens *et al.* (2009) avaliaram através de Checkerboard DNA-DNA hybridization a presença de 37 espécies bacterianas em 20 gestantes na 12^a, 28^a e 36^a semanas de gestação e no pós-parto (4 a 6 semanas após o parto). Os sítios selecionados para as amostras subgengivais não apresentaram diferenças significativas no sangramento subgengival em todos os períodos avaliados ($p=0.71$), apresentando aproximadamente 20% dos mesmos com sangramento subgengival. Foi encontrada uma redução significativa em 17 das 37 espécies bacterianas avaliadas entre o período gestacional e o pós-parto, entre elas *F. nucleatum*. A contagem total bacteriana foi avaliada através do somatório da quantificação das 37 bactérias avaliadas. A média do somatório total foi significativamente maior na 12^a semana de gestação quando comparada à 36^a semana de gestação e ao pós-parto.

Carrillo-de-Albornoz *et al.* (2010) avaliaram a microbiota subgengival de 48 gestantes (1^o, 2^o e 3^o trimestres e 3 meses pós-parto) e 28 não gestantes (avaliadas em 2 momentos) sem periodontite. As amostras de biofilme subgengival foram avaliadas através de cultura bacteriana e os resultados expressos através de unidades formadoras de colônia (CFU). Não encontraram diferenças na contagem total de bactérias durante os diferentes trimestres da gestação e no pós-parto. Proporções de bactérias específicas foram calculadas através do percentual em relação às CFU totais. Proporções significativamente menores de bactérias como *F. nucleatum*, *P. intermedia*, *P. micra*, *P. gingivalis*, *C. rectus*, *A.*

actinomycetemcomitans e *T. forsythia* foram encontradas durante a gestação em comparação com o pós-parto. Além disso, entre as bactérias avaliadas, o *F. nucleatum* foi o patógeno mais frequentemente encontrado (variação de 88.10 – 97.62%) durante a gestação, seguido em ordem decrescente por *P. intermedia* (47.62–66.67%), *P. micra* (42.86–50.00%), *P. gingivalis* (35.71–40.48%), *C. rectus* (11.90–14.29%), *A. actinomycetemcomitans* (9.52–21.43%) e *T. forsythia* (2.38–9.52%).

Em uma análise subsequente deste mesmo estudo (Carrillo-de-Albornoz *et al.*, 2012), os autores avaliaram variáveis preditoras envolvidas com inflamação gengival exacerbada associada com gestação. Concluíram que o desafio bacteriano quantitativamente (através do índice de placa) e qualitativamente (contagem de *P. gingivalis*) está associado com inflamação gengival durante a gestação. Portanto, apesar de escassas, as evidências presentes parecem indicar uma alteração na quantidade e na composição da microbiota subgengival devido à gestação.

2.2 EFEITO DO TRATAMENTO PERIODONTAL DURANTE A GESTAÇÃO

Pacientes com inflamação periodontal apresentam mudanças no perfil microbiano após tratamento periodontal (Sakamoto *et al.*, 2004). Após a desorganização dos biofilmes supra e subgengival, ocorre uma redução na quantidade total de bactérias, uma modificação na proporção das espécies presentes e uma alteração do habitat subgengival. Certas espécies, como por exemplo, os *Streptococcus*, têm uma velocidade de recolonização e proliferação rápida, enquanto que outras bactérias, como por exemplo, bactérias do complexo vermelho (*T. forsythia*, *P. gingivalis* e *T. denticola*), apresentam um retorno lento (Haffajee *et al.* 2006). Sendo assim, como resultado do tratamento periodontal, pode ser observada uma modificação na quantidade de proporção de espécies bacterianas, onde espécies associadas com doença periodontal, como, por exemplo, as dos complexos laranja e vermelho, apresentam uma redução e bactérias associadas com saúde periodontal, como por exemplo *Streptococcus*, apresentam um aumento.

Durante a gestação, o tratamento periodontal também parece apresentar um impacto sobre a microbiota subgengival. Até o presente momento, dois estudos avaliaram essa questão. Offenbacher *et al.* (2006) em um estudo piloto, avaliaram

através de Checkerboard DNA-DNA hybridization oito bactérias (incluindo *P. gingivalis* e *F. nucleatum*) presentes no biofilme subgengival de gestantes em um momento durante a gestação (baseline) e no pós-parto. Como resultado clínico do tratamento periodontal, houve uma redução na profundidade de sondagem (2.28mm para 1.46mm, $p < 0.0001$), redução na perda de inserção clínica (0.61mm para 0.45, $p = 0.01$) e redução no percentual de sangramento a sondagem (43.9% para 11.5%, $p < 0.0001$). Na avaliação microbiológica, as quantidades bacterianas não foram diferentes entre os grupos no baseline, enquanto que o grupo que recebeu intervenção periodontal apresentou estatisticamente menos *P. intermedia* e *P. nigrescens* que o grupo controle quando avaliado no pós-parto.

Novak *et al.* (2008) avaliaram efeito do tratamento periodontal sobre a quantidade e proporção de sete bactérias específicas e a associação destas bactérias com desfechos gestacionais adversos. Neste estudo foi avaliada a microbiota subgengival de todas gestantes incluídas em um ensaio clínico randomizado publicado previamente (Michalowicz BS *et al.* 2006) utilizando a técnica de PCR em tempo real com primers específicos para a região 16S em um exame realizado entre e a 13ª e 16ª semanas de gestação (baseline) e entre a 29ª e 32ª semanas de gestação (segundo exame – pós tratamento). Tanto avaliações transversais (baseline) para prematuridade, quanto avaliações longitudinais (baseline e segundo exame) para avaliação do efeito do tratamento periodontal foram realizadas neste estudo. Como resultado os autores não encontraram diferenças entre gestantes que tiveram parto pré-termo em comparação a gestantes com parto a termo para todas espécies bacterianas avaliadas no exame de baseline. O grupo que recebeu tratamento apresentou uma redução significativa na quantidade de *P. gingivalis*, *T. denticola*, *T. forsythia*, *P. intermedia* e *C. rectus* quando comparado a mulheres não tratadas. Essas mudanças no perfil microbiano não foram diferentes entre mulheres que tiveram parto pré-termo e gestantes com parto a termo. Além disso, correlações positivas, porém modestas, foram encontradas entre profundidade de sondagem e a quantidade de bactérias.

Cabe ressaltar algumas características do estudo do qual se originou a amostra avaliada por Novak *et al.* (2008). O estudo publicado por Michalowicz *et al.* (2006) foi um ensaio clínico randomizado multicêntrico desenhado para avaliar o efeito do tratamento periodontal sobre desfechos gestacionais adversos. Foram incluídas 823 gestantes em 2 grupos, o grupo controle (n=410) e o grupo tratamento

(n=413). Como resultado do tratamento periodontal, o grupo teste apresentou redução significativamente maior do que o grupo controle para a média de sítios com sangramento subgengival (SS) (22% e 2%, $p < 0.0001$, respectivamente). Tendo em vista que o percentual de SS inicial nos grupos avaliados foi de aproximadamente 70% (69.6% no grupo teste e 69% no grupo controle), uma redução percentual de 22% encontrados para o grupo teste pode ser considerada proporcionalmente pequena. Além disso, as reduções na profundidade de sondagem nos grupos teste e controle em sítios com profundidade de sondagem (PS) inicial de 4-6mm (0.88 ± 0.02 mm e 0.38 ± 0.02 mm, $p < 0.001$, respectivamente) e PS inicial ≥ 7 mm (1.84 ± 0.14 mm e 1.07 ± 0.14 mm, $p < 0.001$, respectivamente) deve ser avaliada com cautela, uma vez que sítios com maior profundidade são os que tendem a apresentar uma maior redução média. Nesse estudo, o tratamento periodontal não alterou significativamente as taxas de desfechos gestacionais adversos.

Alterações na composição do biofilme subgengival são mantidas de acordo com a manutenção da melhora nos parâmetros clínicos ao longo do tempo (Cugini *et al.*, 2000) e a magnitude da alteração nos perfis microbianos subgengivais está na dependência da redução da inflamação periodontal obtida com o tratamento (Colombo *et al.*, 2012).

Portanto, em estudos onde a redução da inflamação periodontal for parcial ou muito pequena, espera-se que haja pouca alteração na microbiota subgengival. Considerando que a plausibilidade biológica da relação entre doenças periodontais e parto prematuro e baixo peso ao nascer contempla a disseminação sistêmica de produtos inflamatórios e bacterianos gerados pela presença das doenças periodontais, é pré-requisito de um ensaio clínico que este obtenha resultado de tratamento muito satisfatório, demonstrando que a inflamação periodontal foi tratada de maneira inequívoca.

O ensaio clínico de onde se originam as pacientes para o presente estudo obteve redução expressiva da inflamação periodontal com a intervenção realizada (Weidlich *et al.*, 2013). Além disso, as gestantes incluídas foram avaliadas anteriormente ao tratamento (baseline), durante a gestação (26^a a 28^a semana de gestação) e no pós-parto (30 dias após o parto), o que possibilita uma avaliação secundária tanto comparando casos e controles quanto avaliando o efeito do tratamento periodontal tanto em um momento durante a gestação quanto após o parto. Dessa forma, a hipótese de trabalho da presente tese é de que possa haver

alguma relação entre os desfechos gestacionais de parto prematuro e baixo peso ao nascer com a composição da microbiota subgengival de mulheres submetidas a tratamento periodontal durante a gestação. O presente estudo apresenta como característica peculiar o fato de ter acompanhado gestantes, incluindo momento pós-parto, com recursos clínicos, microbiológicos e imunológicos.

3 OBJETIVOS

Os objetivos da presente tese incluem:

- 1) Comparar a composição da microbiota subgengival (contagem total de bactérias, *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*) e níveis de Interleucina (IL)-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70 e fator de necrose tumoral- α (TNF- α) no fluido crevicular gengival e no soro em gestantes que tiveram parto pré-termo e/ou baixo peso ao nascer com gestantes que tiveram parto a termo (artigo 1);
- 2) Avaliar a associação entre parâmetros clínicos, microbiológicos (contagem total de bactérias, *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*) e níveis de Interleucina (IL)-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70 e fator de necrose tumoral- α (TNF- α) presentes no fluido gengival e no soro em gestantes (artigo 1);
- 3) Comparar o efeito do tratamento periodontal completo *versus* consulta única de raspagem, alisamento e polimento supragengival sobre a microbiota subgengival (contagem total de bactérias, *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*) em gestantes (artigo 2);
- 4) Avaliar a microbiota subgengival (contagem total de bactérias, *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*) de puérperas que receberam tratamento periodontal completo ou consulta única de raspagem, alisamento e polimento supragengival 30 dias após o parto (artigo 2).

4 METODOLOGIA

4.1 AMOSTRA DO ESTUDO

As pacientes deste estudo foram gestantes que participaram de um ensaio clínico que avaliou o efeito do tratamento periodontal nas taxas de prematuridade e baixo peso ao nascer (Weidlich *et al.*, 2013). O Comitê de Ética do Hospital Materno Infantil Presidente Vargas aprovou o estudo (Anexo A) e cada participante assinou o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido após receber informações detalhadas sobre os objetivos e os métodos do estudo.

A metodologia do ensaio clínico será descrita brevemente. Gestantes que procuraram por atendimento pré-natal no Hospital Materno Infantil Presidente Vargas (HMIPV), hospital-maternidade da rede pública de saúde de Porto Alegre, compuseram a amostra. O recrutamento para o estudo foi realizado de abril/2007 a junho/2009, sendo que para ser incluída, a gestante deveria ter entre 18 e 35 anos de idade e possuir ultrassonografia obstétrica indicando idade gestacional igual ou inferior a 20 semanas. Gestantes com gravidez múltipla, em uso de aparelho ortodôntico e apresentando indicação de profilaxia antibiótica para tratamento odontológico não foram incluídas. Um entrevistador treinado aplicou um questionário (Anexo B) composto por dados de identificação, dados demográficos, dados socioeconômicos, hábitos e comportamentos, história médica e odontológica. As informações referentes à evolução da gestação foram obtidas em entrevistas realizadas durante as consultas odontológicas e/ ou de pré-natal. A seguir, três examinadores calibrados (Anexo C) realizavam exame clínico periodontal completo, em seis sítios por dente, composto por Índice de Placa de Silness e Løe (Silness & Løe, 1964), Índice Gengival de Løe e Silness (Løe, 1967), registro da presença de cálculo supragengival, cavidades e restaurações mal adaptadas, profundidade de sondagem, sangramento à sondagem e nível clínico de inserção (exame 1). As pacientes eram então aleatoriamente alocadas para os grupos teste ou controle através de randomização estratificada em bloco.

O tratamento periodontal foi realizado por dois periodontistas (TF e JMR) no HMIPV. O grupo teste recebeu tratamento periodontal não cirúrgico completo antes da 24ª semana de gestação. O tratamento incluiu selamento de cavidades, remoção do excesso de restaurações, exodontias, remoção de cálculo supragengival e

raspagem subgengival sobre anestesia local. Instruções de higiene bucal foram realizadas em cada consulta. Não foi imposto limite do número de consultas para realização do tratamento. Com o objetivo de manter o controle de placa supragengival adequado, após o tratamento periodontal, as pacientes eram chamadas pelo menos uma vez por mês de acordo com as necessidades individuais. O grupo controle recebeu o tratamento odontológico padrão oferecido rotineiramente para todas pacientes do hospital. Este tratamento compreendia uma sessão de remoção de cálculo supragengival e orientação de higiene bucal. O mesmo tratamento periodontal completo oferecido para o grupo teste foi oferecido para o grupo controle após o parto. Quando necessário, as pacientes de ambos os grupos receberam tratamento odontológico de urgência para alívio da dor. Dentes com diagnóstico de pulpíte ou envolvimento endodôntico foram encaminhados para tratamento.

Entre 26-28 semanas gestacionais, todas as pacientes receberam novo exame clínico (exame 2), onde foram avaliados os mesmos parâmetros do exame 1. Trinta dias após o parto foi realizado novo exame clínico (exame 3) similar aos dois anteriores.

Partos que ocorreram antes de completadas as 37 semanas de gestação foram considerados pré-termo e recém-nascidos com baixo peso foram aqueles com peso de nascimento inferior a 2500 gramas, independentemente da idade gestacional (WHO, 2005).

4.2 AMOSTRA DE BIOFILME SUBGENGIVAL

Previamente aos exames clínicos 1, 2 e 3, foram realizadas coletas de biofilme subgengival de quatro sítios por paciente. A seleção dos sítios de coleta era realizada através da randomização de quatro sítios dentes aqueles com maior profundidade de sondagem no exame 1. Os sítios de coleta nos exames 2 e 3 foram os mesmos randomizados no exame 1. O biofilme subgengival foi coletado com um cone de papel esterilizado introduzido no ambiente subgengival por 30 segundos, após secagem da superfície coronária e remoção cuidadosa de placa supragengival. Os quatro cones de papel foram armazenados em tubo esterilizado e identificado contendo 300 µL de solução de meio de transporte reduzido (RTF). As amostras

foram armazenadas a 18°C negativos até análise.

4.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Dois estudos foram realizados a partir da análise das amostras coletadas.

O primeiro estudo teve um delineamento do tipo caso-controle, realizado a fim de estimar o número total de bactérias e os números absolutos e relativos de 2 espécies bacterianas relacionadas com periodontite (*Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*) antes da 20^a semana de gestação, utilizando como caso gestantes que tiveram parto pré-termo e controle aquelas que tiveram parto a termo. Para este estudo, foram incluídas apenas gestantes não fumantes e dois controles foram utilizados para cada caso, a partir de pareamento baseado na idade (± 5 anos) (Fig. 2, Anexo D).

O segundo estudo, com delineamento análise secundária de um ensaio clínico randomizado, foi realizado a fim de avaliar o efeito do tratamento periodontal durante a gestação e no pós-parto sobre o número total de bactérias e os números absolutos e percentuais das mesmas 2 espécies bacterianas avaliadas no estudo de caso-controle. Neste segundo estudo foram alocadas 47 gestantes que realizaram os exames clínicos 1 e 2 e que apresentaram pelo menos 3 dentes com profundidade de sondagem > 4 mm associado a sangramento subgengival (Fig. 1, Anexo D).

4.4 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA

4.4.1 Extração de DNA

A extração de DNA bacteriano das amostras foi realizada através de kits Purelink[®] Genomic DNA conforme o protocolo descrito pelo fabricante. Este kit é específico para essa função e compreende uma série de tampões, centrifugações e filtragens para que o material genético seja extraído e no final re-suspendido em uma solução eluente.

4.4.2 Avaliação da quantidade e qualidade do DNA (Nanodrop)

Após o processo de extração do DNA, as amostras foram analisadas quanto à quantidade e a pureza do DNA por densidade óptica em espectrofotômetro (NanoDrop™1000 Thermo Scientific, USA).

Foram selecionadas amostras com diferentes concentrações de DNA e uma qualidade na faixa aceitável (1.6 – 2.0) na razão 260/280 para serem testadas (piloto da fase laboratorial) com par de primers utilizados no estudo (*P. gingivalis*, *F. nucleatum* e contagem total) a fim de verificar quais os valores limites para que a reação ocorresse adequadamente. Foi observado que com uma concentração de DNA de 1.4 ng em 10 µl a reação apresentava um aproveitamento adequado. Portanto, baseado nestes dados obtidos, as amostras foram diluídas para 0.14ng/µl através da adição de água Milli-Q, a fim de padronizar as concentrações das amostras previamente à amplificação do DNA.

4.4.3 Primers

Números absolutos e percentuais de 2 espécies bacterianas relacionadas com periodontite (*Porphyromonas gingivalis* e *Fusobacterium nucleatum*) foram analisados utilizando-se primers de DNA específicos para região 16S do rDNA e previamente publicados (Rôças *et al.*, 2002, Figuero *et al.*, 2011). Além disso, foi usado um *primer* universal para estimar o número total de bactérias (Nadkarni *et al.*, 2002) em cada amostra, a fim de permitir o cálculo da proporção de cada espécie na amostra de placa. Os primers utilizados no presente estudo estão demonstrados no quadro 1.

Quadro 1 - Espécies e características dos primers

Organismo	Seqüência dos primers (5' – 3')	Tamanho do amplicon (pb)	Temperatura (°C)	Referência
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	AGGCAGCTTGCCTAGAGTCG ACTGTTAGCAACTACCGATGT	404	60	Rôças <i>et al.</i> (2002)
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	TAAAGCGCGTCTAGGTGGTT ACGGCTTTGCAACTCTCTGT	697	56	Figuero <i>et al.</i> (2011)
<i>Primer universal</i>	TCCTACGGGAGGCAGCAGT GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT	466	58	Nadkarni <i>et al.</i> (2002)

4.4.4 Reação de Polimerase em Cadeia (PCR convencional)

Ainda no piloto da fase laboratorial, reações de PCR foram realizadas previamente às reações de PCR em tempo real para adequação dos sistemas utilizados. As reações foram realizadas com base nas informações descritas na literatura para cada sistema específico: *P. gingivalis* (Rôças *et al.*, 2002), *F. nucleatum* (Figuero *et al.*, 2011) e primer universal (Nadkarni *et al.*, 2002). Para cada sistema de primer foi realizada uma reação de PCR contendo 2µl de amostra, 16.8µl de água, 2.5µl de solução tampão, 1.5µl de MgCl₂, 1µl de solução de primers, 1µl de DNTP's e 0.2µl de TAQ, totalizando 25µl por reação.

Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese horizontal em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídio, por aproximadamente 45 minutos a 80V e temperatura ambiente em tampão TAE 1X (Tris Acetato EDTA).

Para avaliação do tamanho do amplicon gerado foi usado marcador molecular (Invitrogen®) gradual de 100pb, uma vez que as reações resultaram em produtos com 404pb (*P. gingivalis*), 697pb (*F. nucleatum*) e 466pb (contagem total). Após a eletroforese, o gel era observado sob luz UV (**Figura 1**).

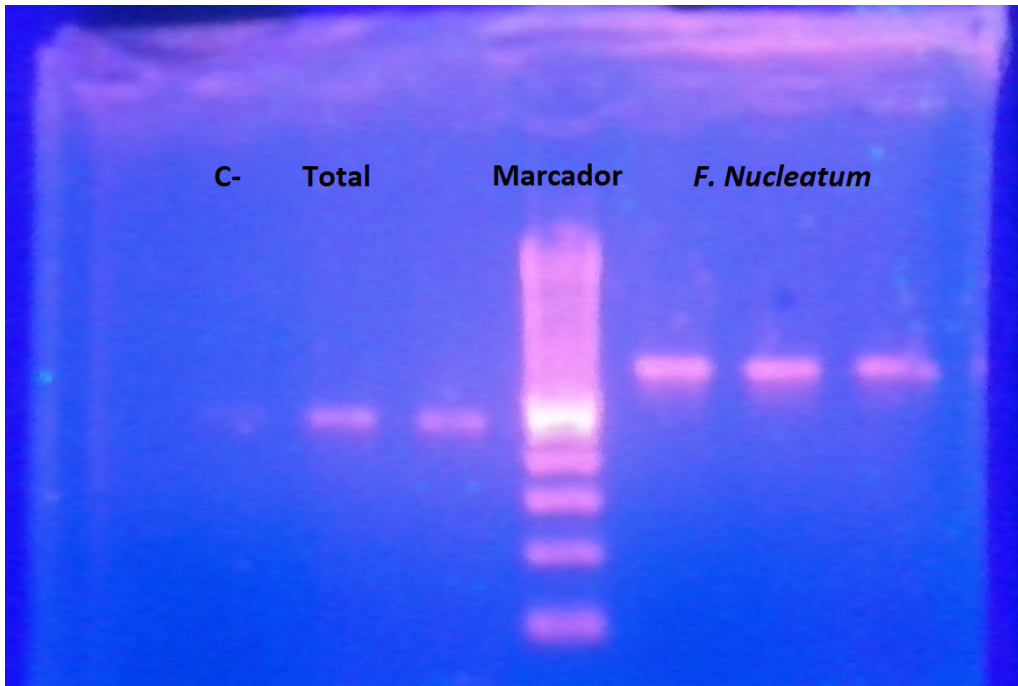


Figura 1 – Eletroforese em gel de agarose demonstrando o produto da amplificação do DNA bacteriano utilizando os primers para contagem total (466pb) e *F. nucleatum* (697pb), com marcador molecular (Invitrogen®) gradual de 100pb.

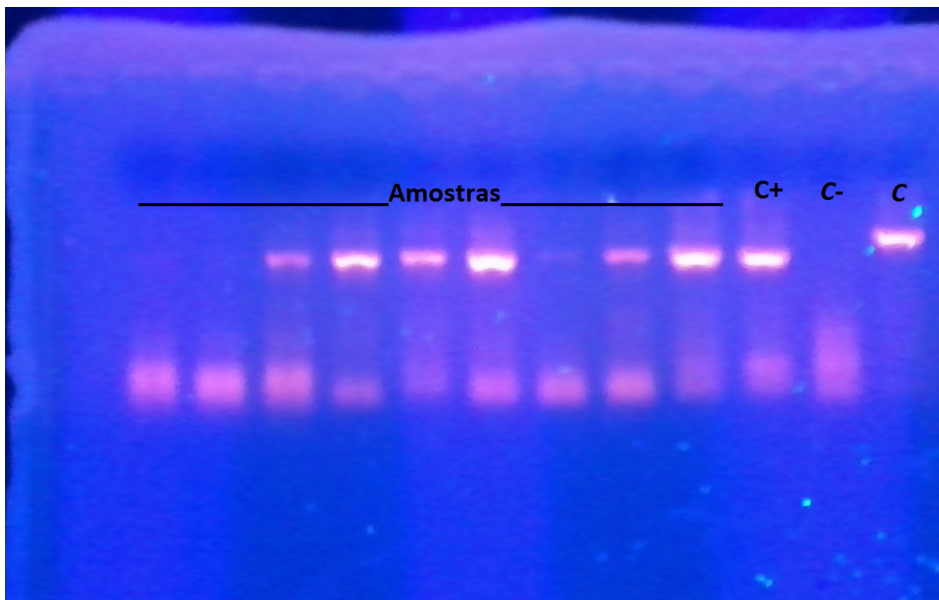


Figura 2 – Eletroforese em gel de agarose da fase piloto do estudo, demonstrando o produto da amplificação do DNA bacteriano de diferentes amostras, controles positivo (C+) e negativo (C-), além de um produto de PCR com tamanho conhecido (C).

As reações foram consideradas positivas se bandas do tamanho apropriado estivessem presentes de forma única. Ajustes na reação foram realizados até que a obtenção de uma reação ideal, sendo que, para tanto, as temperaturas de anelamento que obtiveram melhor resultado foram de 60°C, 56°C e 58°C para *P. gingivalis*, *F. nucleatum* e contagem total, respectivamente. Assim, o protocolo utilizado para as análises de PCR compreendeu as seguintes etapas: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguido por 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 60°C (*P. gingivalis*), 56°C (*F. nucleatum*) ou 58°C (*Primer universal*), e extensão a 72°C por 45 segundos e uma extensão final a 72°C por 10 minutos.

Foi utilizado um controle positivo com DNA extraído de uma bactéria padrão ATCC (*P. gingivalis* ATCC 33277 and *F. nucleatum* ATCC25586), e um controle negativo, onde não era acrescentado DNA bacteriano, a fim de verificar se não havia contaminação em nenhum dos reagentes ou na água MiliQ utilizada. As análises foram repetidas no caso de marcações de bandas inespecíficas (Figura 3) ou de contaminação (Figura 4) até as reações ficarem ajustadas. Após os ajustes necessários, foram definidos os sistemas para reações de PCR em tempo real descritos a seguir.

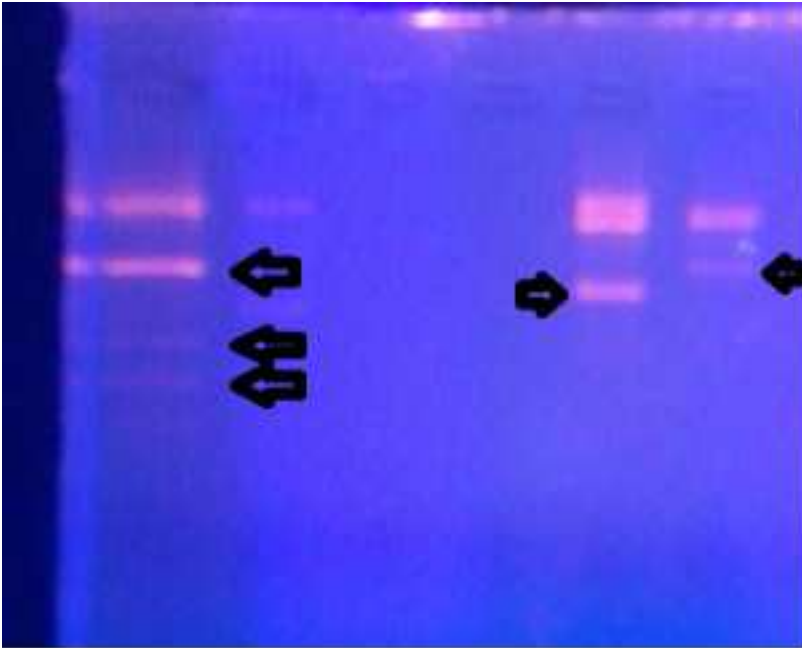


Figura 3– Eletroforese em gel de agarose demonstrando marcações inespecíficas no produto da amplificação do DNA bacteriano de algumas amostras.

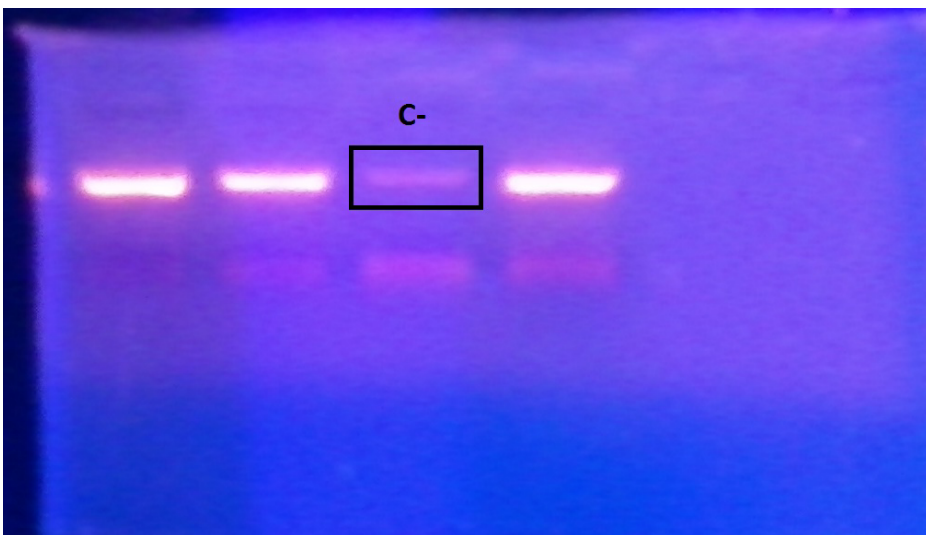


Figura 4– Eletroforese em gel de agarose demonstrando a contaminação do controle negativo (-) por DNA bacteriano.

4.4.5 PCR em tempo real

As amostras foram analisadas por meio de PCR quantitativo (qPCR) utilizando SYBRGreen que, apesar de tecnicamente apresentar uma menor especificidade na detecção bacteriana quando comparado a TaqMan, gera um custo menor com resultados similares (Maeda *et al.*, 2003, Vianna *et al.*, 2006).

Os DNAs extraídos foram amplificados e marcados com o reagente SYBR® Green Master Mix (marca) para PCR em tempo real. O corante SYBR® Green Master Mix utilizado é um marcador fluorescente que possui ligação altamente específica ao DNA dupla-fita e detecta o produto da reação de real time conforme ele se acumula durante os ciclos da reação.

Para a quantificação, as reações de PCR em tempo real foram realizadas em duplicata a partir de: 10.5µL de TaqMan Universal PCR Master Mix 2x, 0,4µL da solução de *primers* (5 pMol/µL, cada) e sonda, 10.1µL de DNA (na concentração de 0.14ng/µl), sendo que no controle negativo foi adicionado 10.1µL de água ao invés do DNA. As condições de ciclagem utilizadas foram: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguido por 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 60°C (*P. gingivalis*), 56°C (*F. nucleatum*) ou 58°C (*Primer universal*), e extensão a 72°C por 45 segundos e uma extensão final a 72°C por 10 minutos. Os valores foram obtidos pela análise dos resultados no programa Step one software v 2.1, Applied Biosystems.

Análises de curva melting foram utilizadas a fim de identificar o fragmento amplificado. A temperatura melting (T_m) é temperatura na qual metade das fitas de DNA está na forma de fita simples e a outra metade na forma de dupla hélice. A T_m é dependente da composição do DNA, de modo que um aumento do conteúdo de G+C no DNA gera um incremento na T_m ocasionado pelo maior número de pontes de H. Portanto, o produto da reação de tempo real deveria apresentar uma T_m específica para cada primer, conforme apresentado na figura 5.

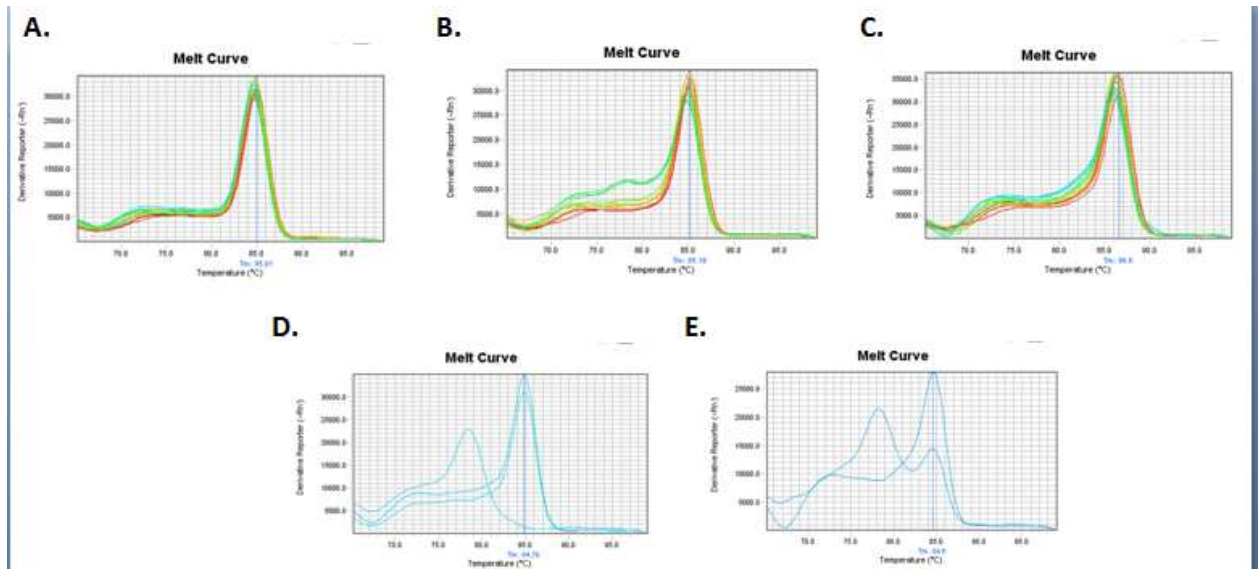


Figura 5– Resultados da curva melting obtidas no programa no programa Step one software v 2.1, Applied Biosystems. A – Curva para pg, B – curva para *F. nucleatum*, C – curva para total, D – exemplo de amostra excluída em reação de *F. nucleatum* pois apresentou curva de temperatura melt incorreta, E – Exemplo de amostra excluída em reação de *F. nucleatum* de por apresentar 2 picos de curva melt.

4.4.6 Curva Padrão

A quantificação do número de genomas bacterianos em cada amostra para cada primer foi baseado na curva padrão obtida através de diluições seriadas múltiplas de 10 feitas com DNA extraído de culturas puras (*P. gingivalis* ATCC 33277 e *F. nucleatum* ATCC25586) e quantificado utilizando a formula: Constante de Avogadro x quantidade de DNA em $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ / (tamanho do genoma x peso molecular por par de base/nucleotídeo).

4.5 ANÁLISE DOS RESULTADOS

A análise dos resultados está contida em cada um dos manuscritos, separadamente, de acordo com cada um dos delineamentos utilizados.

5 MANUSCRITO 1

Clinical, microbiological and immunological periodontal parameters in women who experienced preterm/low birthweight and normal weight deliveries – a case-control approach

José Mariano da Rocha¹

Patricia Weidlich¹

Tiago Dalberto³

Tiago Fiorini¹

Carlos Heitor Cunha Moreira ¹

José Artur Bogo Chies ²

Rui Vicente Oppermann ¹

Cassiano Kuchenbecker Rösing¹

¹Section of Periodontology, School of Dentistry, Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil

² Department of Genetics, Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil

³ Center of Biotechnology, Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil

Running title: Periodontal parameters and adverse pregnancy outcomes

Corresponding author:

José Mariano da Rocha

Rua Ramiro Barcelos, 2492, Porto Alegre, RS, Brasil, 90035-003.

Telephone: +55 (51) 3308 5318

Fax: +55 (51) 3346 6542

E-mail: jmrocha@email.com (e-mail can be published)

KEY WORDS

Premature Birth, Bacteria, Periodontitis, Interleukins, Gingival crevicular fluid

ABSTRACT

Background and Objective: It has been postulated in the literature that distant infections like periodontal diseases may be associated with adverse pregnancy outcomes via microbiological and/or inflammatory pathways. The aim of this study was to compare and correlate clinical, microbiological and immunological periodontal parameters in women that delivered pre-term low birth weight (PTLBW) or term labor and normal weighted infants.

Material and Methods: The present study is a case-control study nested to a Randomized Clinical Trial (RCT). At total 54 pregnant women (18 cases and 36 controls) aged 18-35 years were included. Clinical, microbiological and immunological data were collected up to 20 gestational weeks. Four periodontal sites per subject were selected for gingival crevicular fluid (GCF) and microbiological sampling. *F. nucleatum*, *P. gingivalis* and total bacterial count were analyzed by real time Polymerase Chain Reaction (PCR). GFC and serum levels of interleukins (IL)-1 β , IL-6, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70 and tumor necrosis factor- α (TNF- α) were assessed by flow cytometry.

Results: No statistically significant differences between case and control groups were found for any demographic, socioeconomic, obstetric, clinical, microbiological and immunological parameters evaluated. Means of periodontal probing depth (PPD) and bleeding on probing (BoP) were statistically correlated to GCF IL-1 ($r^2=.31$, $p<.05$ and $r^2=.50$, $p<.001$, respectively) and IL-8 ($r^2=.27$, $p<.05$ and $r^2=.29$, $p<.05$, respectively). BoP was also correlated to *P. gingivalis* ($r^2=.30$, $p<.05$) and total bacterial count ($r^2=.36$, $p<.01$). No statistically significant correlations were found for serum cytokines, except between IL-10 and full mouth bleeding on probing ($r^2=-.31$, $p<.05$).

Conclusions: Women who delivered PTLBW infants were not different in clinical, microbiological and immunological parameters evaluated from those that had term labor and normal weighted infants. Local inflammation does not seem to translate into high systemic levels, which may be an explanation for the lack of effect of periodontal therapy in diminishing PTLBW rates in interventional studies.

KEY WORDS

Premature Birth, Bacteria, Periodontitis, Interleukins, Gingival crevicular fluid

INTRODUCTION

Periodontal diseases are inflammatory disorders that affect surrounding and supporting tissues of teeth and are attributed to the presence of elevated levels of inflammatory mediators and pathogenic bacteria within the gingival crevice (Socransky & Haffajee, 1991, Pihlstrom *et al.*, 2005). This local inflammatory challenge could lead to a systemic pro-inflammatory status, once periodontitis patients have higher serum levels of numerous inflammatory biomarkers including IL-1b, IL-6 and TNF- α (Loos *et al.*, 2005; Andrukhov *et al.*, 2010; Fentoglu *et al.*, 2011).

It has been postulated in the literature that distant infections like periodontal diseases may be associated with adverse pregnancy outcomes. Although the pathophysiological mechanisms explaining these relationships remain unclear, two major pathways to explain this association have been proposed: one direct, in which oral microorganisms and/or their components reach the foetal-placental unit and one indirect, in which Inflammatory mediators circulate and impact the foetal-placental unit (Sanz & Kornman, 2013).

The direct pathway is based on the evidences that showed that subgingival periodontal bacteria as *Porphyromonas gingivalis* (Leon *et al.*, 2007; Katz *et al.*, 2009; Hasegawa-Nakamura *et al.*, 2011) and *Fusobacterium nucleatum* (Cahill *et al.*, 2005; Gauthier *et al.*, 2011; Tateishi *et al.*, 2012) can be found in the amniotic fluid, placenta and foetal membranes of pregnant women with adverse pregnancy outcomes. These bacteria could cause a local acute inflammation in the placenta and lead to foetal demise (Han *et al.*, 2010; Hasegawa-nakamura *et al.*, 2011; Tateishi *et al.*, 2012). The indirect pathway is based on the premise that the local inflammatory periodontal challenge between local microorganisms and host response could locally and systemically increase inflammatory mediators that circulate and trigger adverse pregnancy outcomes (Wang *et al.*, 2006; Conde-Agudelo *et al.*, 2011).

Case-control studies have consistently shown a significant association between adverse pregnancy outcomes and periodontal disease (Corbella *et al.*, 2012). However, the strength of the observed association is modest and seems to vary according to the population studied and periodontal disease definition (Sanz & Kornman, 2013).

Furthermore, the parameters used to define periodontal disease could play an important role in the explanation of such results. It is understood that increased periodontal probing depth and attachment loss may not fully reflect the level of inflammation, which is the core of this association. Therefore, although these associations have been proposed in the literature, there is still a lack of evidence that clinical, microbiological and immunological parameters are linked to one another during pregnancy.

Based on the current uncertainty of the biological plausibility between periodontal infection and preterm/low birthweight,(PTLBW) we designed a case-control study based on the hypothesis that women with PTLBW infants presented more periodontal inflammation than mothers with normal weighted children. Furthermore, this inflammation would be related to higher levels of subgingival bacterial count and/or periodontal cytokines leading to high systemic cytokine levels. The aim of this study was to compare and correlate clinical, microbiological and immunological periodontal parameters in women that delivered PTLBW or term labor and normal weighted infants.

MATERIALS AND METHODS

Study design and sample

The present study is a case-control study nested to a RCT designed to assess the effect of periodontal treatment performed during pregnancy on the reduction of PTLBW rates. The RCT included pregnant women 18-35 years-old and information about inclusion/exclusion criteria can be retrieved elsewhere (Weidlich *et al.*, 2013). All women with complete clinical, microbiological and immunological data who delivered a baby defined as PTLBW were defined as a case. At total, 18 pregnant women were included in the case group. A preterm (PT) delivery was defined as an infant delivered at a gestational age greater than 20 weeks but less than 37 weeks. A low birthweight (LBW) delivery was defined as an infant delivered weighing less than 2,500 grams. For each pregnant woman included in the case group, two controls were defined matched for age (± 5 years). Only non smokers were included in this study.

All data and samples were collected before 20 weeks of gestation. The Ethical Committee of the Maternal Hospital Presidente Vargas, Porto Alegre, Brazil, approved the study protocol and each participant signed an informed consent form.

Periodontal clinical examination

Full-mouth, excluding third molars, six sites per tooth periodontal examination was performed by calibrated examiners using a manual periodontal probe (Neumar, North Carolina Probe 15, São Paulo, Brazil). The parameters recorded in this study include: Plaque Index (Silness & Loe, 1964), Gingival Index (Loe, 1967), supragingival calculus, cavities, overhanging restorations, bleeding on probing (BOP), periodontal probing depth (PPD), and clinical attachment level (CAL). Reproducibility during the study was assessed in 10% of the participants and the intra-class correlation coefficient ranged between .95 and .96 for PPD and .84 and .93 for CAL.

Collection of gingival crevicular fluid and blood samples

Four sites per subject were randomly selected among the deepest periodontal probing depths, excluding distal surfaces of second molars and lingual surfaces of all mandibular teeth, for the collection of gingival crevicular fluid. Teeth were isolated with cotton rolls and gently air-dried. Supragingival plaque was carefully removed with cures, and absorbent paper strips (Periopaper; Oraflow, Plainview, NY, USA) were inserted for 30s into the periodontal pocket. Strips contaminated with blood marks or saliva were discarded. The paper strips were immediately transferred to a plastic tube (Eppendorf do Brasil, São Paulo, Brazil) and stored frozen until analysis.

Five milliliters of blood was withdrawn from each subject by venipuncture into an anticoagulant-free vacuum tube by trained assistants. Samples were immediately centrifuged at 3000g for 5 min, and serum was kept frozen until assayed.

Cytokine assessment

The gingival crevicular fluid was eluted from the frozen Periopaper strips as follows. In brief, the Periopaper strips were placed in an Eppendorf tube containing 200

μL of phosphate-buffered saline and 2 μL of phenylmethanesulfonyl fluoride (20 mM) and incubated for 30 min. This process was repeated in a new Eppendorf tube containing the same reagents and the contents resulting from those two Eppendorf tubes were homogenized and 50 μL of this final solution was used for the analysis of gingival crevicular fluid.

The concentrations of Interleukin (IL)-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70 and tumor necrosis factor- α (TNF- α) present on gingival crevicular fluid and serum cytokines samples were assessed by flow cytometry using a Human Inflammatory Cytokine Kit (BD Biosciences, San Diego, CA, USA). Sample processing and data analysis were performed according to the manufacturers specification using a FACSCalibur flow cytometer (BD Bioscience, San Jose, California, USA). Quantification analysis was performed using BD CBA Analysis Software (BD Bioscience, San Jose, California, USA).

Plaque Sampling and Storage

Subgingival samples were collected using the same four sites selected for gingival crevicular fluid sampling. Teeth were isolated with cotton rolls and gently air-dried. Supragingival plaque was carefully removed with curettes and sterile #30 paper points (Periopaper, Oraflow, New York, USA) were inserted until the bottom of the pocket for 30 seconds in the periodontal pocket. The paper points were immediately transferred to a plastic tube (Eppendorf do Brasil, São Paulo, Brazil) and stored frozen until analysis..

Samples processing

Samples were defrosted and homogenized for 30s by a vortex mixer. DNA extraction (Purelink DNA genomic mini kit, Invitrogen) was performed in a 50 μL aliquot. The resulting product was evaluated in a spectrophotometer (NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer. Thermo Scientific) and dilutions containing 1.4Ng/ μL per 10 μL were prepared to each real time PCR reaction. Previously published species-specific 16S rDNA primers to *P. gingivalis* (5' AGG CAG CTT GCC ATACTGCG 3', 3'ACT GTT AGC

AAC TAC CGA TGT5') (Roças *et al.*, 2002), *F. nucleatum* (5' TAAAGCGCGTCTAGGTGGTT3' 5' ACGGCTTTGCAACTCTCTGT3') (Figuro *et al.*, 2011) and total bacterial count universal primer (5' TCCTACGGGAGGCAGCAGT 3' 5'GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT 3') (Nadkarni *et al.*, 2002) were used. The Genomic DNA was tested by real time PCR reaction using Invitrogen master mix (Platinum SYBR green qPCR supermix, Invitrogen). Briefly, each reaction was prepared containing 10.1µl of genomic DNA, 10.5µl of Invitrogen master mix and .4 µl of primers (5 pMol/µL each).

PCR analyses were performed using the following steps: an initial denaturation at 94°C for 5 minutes, followed by 40 cycles of denaturation at 94°C for 30 seconds, annealing at 58°C (universal primer), 56°C (*F. nucleatum*) or 60°C (*P. gingivalis*), an extension at 72°C for 45 seconds and a final extension at 72°C for 10 minutes. Melting curve analysis was performed to determine the specificity of the PCR products. Melting curve analyses were obtained incubating the PCR products for 15 seconds at 5°C below the annealing temperature for the respective primers and increasing the temperature to 95°C with a ramp rate of 0.1/second. Quantification analysis was performed using qPCR software (Step one software v 2.1, Applied Biosystems).

The quantification of the number of bacterial genome per subject sample for each primer was based in a standard curve obtained through serial dilutions made with DNA extracted from pure bacterial cultures (*P. gingivalis* ATCC 33277 and *F. nucleatum* ATCC25586) and quantified using the formula: Avogadro constant x amount of DNA in µg/µl)/(genome size x molecular weight per base pair/nucleotide).

Statistical analysis

Data analysis was performed using SPSS 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Means and standard deviations for all clinical, microbiological and immunological parameters and frequencies of distribution for demographic, socioeconomic and obstetric data were calculated and reported. Bacterial counts were analyzed and reported in the log scale. To allow for zero counts, a constant value of 10 was added to all results and then computed the logarithm. Differences in clinical parameters and

bacterial counts between groups were assessed using independent t-tests. Differences in cytokine levels between groups were assessed using the Mann-Whitney *U*-test. Sample distribution according to demographic, socioeconomic, obstetric data and frequency of detection of pathogens was compared using chi-square and Fisher's exact tests. All correlations were performed using a Non-parametric test (Spearman's). Statistical significance was set at 5%.

RESULTS

Women included in this study were non smokers with mean of age of 24.5 ± 4.9 in case group and 24.8 ± 4.5 in control group. Distribution of participants according to demographics, socioeconomic status, behavioral and obstetric variables is described in Table 1. Most women were white, with high school education, medium-low socioeconomic status and normal weighted. No statistically significant differences were found among cases and controls in the obstetric data regarding previous and current pregnancies (Table 2).

Participants showed widespread inflammation but limited periodontal destruction with no statistically significant differences between groups in whole mouth scores (Table 3). Additionally, in the sites where microbiological/immunological samples were taken, no statistically significant differences were observed both for BOP and PPD. In relation to the microbiological parameters, no statistically significant differences were observed for *F. nucleatum*, *P. gingivalis* and total bacterial count between groups (Table 4). Frequency of detection of *F. nucleatum* and *P. gingivalis* did not display statistically significant difference between case and control group. *F. nucleatum* was detected in most of the individuals (around 60%) while *P. gingivalis* was detected in less the 50% of the women (Figure 1).

When mean values inflammatory markers are compared between groups, both in the serum as well as in the GCF, no statistically significant differences were found. Compared to serum levels, IL-8 and IL-1b were approximately 40 and 100 times higher in GCF, respectively. GCF levels for other cytokines were consistently higher than serum levels, although differences were within 2 to 3-fold.

Correlations between clinical, microbiological and immunological parameters are demonstrated in Table 7. Modest positive correlations between clinical parameters and bacterial counts were found. In sampled sites, *P. gingivalis* and total bacterial count were correlated to bleeding on probing ($r^2=.32$, $p<.05$ and $r^2=.46$, $p<.001$, respectively) and to periodontal probing depth ($r^2=.32$, $p<.05$ and $r^2=.28$, $p<.05$). Similar results were observed for full mouth scores of bleeding on probing, except for probing depth that did not demonstrate statistically significant correlations. *F. nucleatum* was not correlated to any clinical parameters.

Cytokines in the GCF (TNF- α , IL-6, IL-1 and IL-8) were significantly correlated to clinical and microbiological variables. Especially IL-1 and IL-8 demonstrated statistically significant ($p<0.05$) positive correlations with bleeding on probing, periodontal probing depth, *P. gingivalis* and Total bacterial count (r^2 ranging from 0.27 to 0.50).

No correlations were found between serum cytokines and clinical/microbiological variables, except for IL-10 that showed a statistically significant negative correlation with full mouth bleeding on probing ($r^2=-.31$, $p<.05$) and *P. gingivalis* ($r^2=-.35$, $p<.05$)

DISCUSSION

The present study aimed at comparing clinical, microbiological and immunological periodontal parameters in women presenting PTLBW or normal weighted infants. The idea behind the present study resides in the positive association that has been demonstrated between periodontal disease and the occurrence of PTLBW. In fact, this association has been clear in observational studies (Corbella *et al.*, 2012), however interventional designs failed to demonstrate a real benefit from periodontal therapy during pregnancy in order to prevent PTBLW (Chambrone *et al.*, 2011; Fogacci *et al.*, 2011). Additional studies are therefore warranted in order to try to understand the pathophysiology and the risk profile involved in these events.

In this respect, it has been argued that there are probably several factors involved in the possible explanations of this relationship between PTLBW and periodontal disease, and that there is still space for investigations that would try to elucidate it. Therefore, we designed the present case-control study nested to a RCT that aimed to

verify the effect of periodontal therapy in reducing PTLBW (Weidlich *et al.*, 2013). In such RCT, no reduction in PTLBW was achieved. Thus, comparing women that delivered PTLBW (cases) with women that delivered normal weighted infants could help the understanding of the relationship. From the original study, 18 women were included in the test group and the control group comprised 2 age-matched women for each case, which is recommended in order to increase validity (Rose & Laan, 2009). Only non-smokers were included, in order to avoid the potential confounding bias, since smoking is a well-known potent risk factor for prematurity (Cnattingius, 2004; Goldenberg *et al.*, 2008).

The results concerning demographics, periodontal parameters, previous gestations did not show any statistically significant differences among groups. Total bacterial count, *P.gingivalis* and *F. nucleatum* counts were not different among groups and the same was encountered for the evaluated immunological parameters.

First, it should be noted that the absence of difference especially in the clinical parameters is not in line with most part of the observational epidemiological studies (Vettore *et al.*, 2006; Corbella *et al.*, 2012). However, this should be understood as a different research setting in which therapy was given. It could be expected that if a direct relationship would be present, that clinical parameters would be different. Therefore, we looked at the microbiological and immunological parameters that could be a form of trying to explain the results. Differences were also not found, demonstrating that the direct impact of the periodontal condition could not be depicted.

Analyses of the data from epidemiological studies have pointed that they tend only to include a conjunction of periodontal probing depth and attachment loss, therefore not giving importance for the oral inflammatory burden exacerbated during pregnancy. Additionally, childbearing aged women tend to present generalized inflammation with limited levels of periodontal destruction. Therefore, the analysis of bleeding sites is very important. This is the case in relation to the women included in the present trial, who presented approximately 50% of full mouth bleeding on probing and 80% of bleeding on probing on the sampled sites. Moreover, it seems that the positive associations and the eventual benefits from periodontal therapy to diminish PTLBW are strictly to target

subgroups, which is not the case in the present study. Up to now, targeting important reductions in inflammatory process seems one of the most adequate ways to try to understand this potential relationship.

In relation to the microbiota, *P.gingivalis* and *F.nucleatum* were chosen since they are some of the species that have been more strongly associated with adverse pregnancy outcomes (Sanz & Kornman, 2013). However, based on the premise that this species can be found in foetal-placental unit of pregnant women with adverse pregnancy outcomes (Cahill *et al.*, 2005; Leon *et al.*, 2007; Katz *et al.*, 2009; Hasegawa-Nakamura *et al.*, 2011; Gauthier *et al.*, 2011; Tateishi *et al.*, 2012), differences in quantity and/or the prevalence of individuals positive for these bacteria in samples collected in the mouth environment would be expected. However, this was not what happened in the present study, inferring that maybe the presence of these bacteria in the subgingival biofilm would be necessary but not determinant for the presence of these bacteria in the foetal-placental unit. This could explain, at least in part, the lack of benefit from periodontal therapy.

Continuing the search for explanations, we tried to correlate clinical, microbiological and immunological parameters. This was performed with continuous variables, as recently recommended (Sanz & Kornman, 2013). If the association would have a meaning, this could be more easily determined with a continuous approach. Therefore, we encountered positive associations between bleeding on probing and PPD in the sampled sites with *P.gingivalis* and total bacterial count. This is expected once different bacteria profiles are associated with different PPD and the higher the PPD, greater amount of red complex bacteria, such as *P. gingivalis* (Socransky & Haffajee, 2005).

Additionally, local inflammatory mediators in the GCF were correlated to the clinical parameters. The GCF cytokines that presented correlation were IL-1 and IL-8. These cytokines are higher expressed both in disease and health sites (teeth without inflammation) of patients with periodontal disease (Teles *et al.* , 2010; Trombelli *et al.* , 2010; Tymkiw *et al.* , 2011) which could characterize patients with pro-inflammatory profiles. On the other hand, no correlation was observed between these clinical

parameters and serum inflammatory mediators. This could suggest that the main effect of periodontal disease was local, acting on periodontal mediators in the included women and do not disseminate systemically in concentrations that could generate the indirect pathway for PTLBW. These results are in line with our previous study that showed that cytokines present in the GCF could barely explain the serum cytokine levels (Fiorini *et al.*, 2012). In other words, local inflammation does not seem to translate into high systemic levels, which may be an explanation for the lack of effect of periodontal therapy in diminishing PTLBW rates in interventional studies.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by the National Council of Research – Brazil (CNPq), Grant No 403099/2005-6 and FAPERGS Grant No100350-0. José Mariano da Rocha was supported by the Foundation for Post-Graduate Education (CAPES), grant number 13733-12-5, Brasília, Brazil.

The authors declare not to have conflicts of interest.

REFERENCES

Andrukhov O., Ulm C., Reischl H., Nguyen P.Q., Matejka M., Rausch-Fan X. (2011) Serum cytokine levels in periodontitis patients in relation to the bacterial load. *J Periodontol.* **82**, 885-892.

Cahill R.J., Tan S., Dougan G., O'Gaora P., Pickard D., Kennea N., Sullivan M.H., Feldman R.G., Edwards A.D. (2005) Universal DNA primers amplify bacterial DNA from human fetal membranes and link *Fusobacterium nucleatum* with prolonged preterm membrane rupture. *Mol Hum Reprod.* **11**, 761-766.

Chambrone L., Pannuti C.M., Guglielmetti M.R., Chambrone L.A. (2011) Evidence grade associating periodontitis with preterm birth and/or low birth weight: II: a systematic review of randomized trials evaluating the effects of periodontal treatment. *J Clin Periodontol.* **38**, 902-914.

Cnattingius S. (2004) The epidemiology of smoking during pregnancy: smoking prevalence, maternal characteristics, and pregnancy outcomes. *Nicotine Tob Res.* **6**, S125-140.

Corbella S., Taschieri S., Francetti L., De Siena F., Del Fabbro M. (2012) Periodontal disease as a risk factor for adverse pregnancy outcomes: a systematic review and meta-analysis of case-control studies. *Odontology.* **100**, 232–240.

Conde-Agudelo A., Papageorgiou A., Kennedy S., Villar J. (2011) Novel biomarkers for the prediction of the spontaneous preterm birth phenotype: a systematic review and meta-analysis. *BJOG* **118**, 1042-1054.

Fentoglu O., Koroglu B.K., Hicyilmaz H., Sert T., Özdem M., Sütçü R., Tamer M.N., Orhan H., Ay Z.Y., Öztürk Tonguç M., Kırzioğlu F.Y. (2011) Proinflammatory cytokine levels in association between periodontal disease and hyperlipidaemia. *J Clin Periodontol* **38**, 8–16.

Figuro E., Sánchez-Beltrán M., Cuesta-Frechoso S., Tejerina J.M., del Castro J.A., Gutiérrez J.M., Herrera D., Sanz M. (2011) Detection of periodontal bacteria in atheromatous plaque by nested polymerase chain reaction. *J Periodontol.* **82**, 1469-1477.

Fiorini T., Vianna P., Weidlich P., Musskopf M.L., Moreira C.H., Chies J.A., Rösing C.K., Oppermann R.V., Susin C. (2012) Relationship between cytokine levels in serum and gingival crevicular fluid (GCF) in pregnant women. *Cytokine.* **58**, 34-39.

Fogacci M.F., Vettore M.V., Leão A.T. (2011) The effect of periodontal therapy on preterm low birth weight: a meta-analysis. *Obstet Gynecol.* **117**, 153-65.

Gauthier S., Tétu A., Himaya E., Morand M., Chandad F., Rallu F., Bujold E. (2011) The origin of *Fusobacterium nucleatum* involved in intra-amniotic infection and preterm birth. *J Matern Fetal Neonatal Med.* **24**, 1329-1332.

Goldenberg R.L., Culhane J.F., Iams J.D., Romero R. (2008) Epidemiology and causes of preterm birth. *Lancet.* **371**, 75-84.

Han Y. W., Ikegami A., Bissada N. F., Herbst M., Redline R. W., Ashmead, G. G. (2006). Transmission of an uncultivated *Bergeyella* strain from the oral cavity to amniotic fluid in a case of preterm birth. *Journal of Clinical Microbiology* **44**, 1475-1483.

Hasegawa-Nakamura K., Tateishi F., Nakamura T., Nakajima Y., Kawamata K., Douchi T., Hatae M., Noguchi K. (2011) The possible mechanism of preterm birth associated with periodontopathic *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontal Res.* **46**, 497-504.

Katz J., Chegini N., Shiverick K.T., Lamont R.J. (2009) Localization of *P. gingivalis* in preterm delivery placenta. *J Dent Res.* **88**, 575-578

León R., Silva N., Ovalle A., Chaparro A., Ahumada A., Gajardo M., Martínez M., Gamonal J. (2007) Detection of *Porphyromonas gingivalis* in the amniotic fluid in pregnant women with a diagnosis of threatened premature labor. *J Periodontol.* **78**, 1249-1255.

Loos B.G. (2005) Systemic markers of inflammation in periodontitis. *J Periodontol* **76**, 2106–2115.

Löe H. (1967). The Gingival Index, the Plaque Index and the Retention Index Systems. *Journal of Periodontology* **38**, Suppl:610-616.

Nadkarni M.A., Martin F.E., Jacques N.A., Hunter N. (2002). Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set. *Microbiology*. **148**, 257-266.

Pihlstrom B.L., Michalowicz B.S., Johnson N.W. (2005) Periodontal diseases. *Lancet* **366**, 1809–1820.

Rose S. & Laan M.J. (2009) Why match? Investigating matched case-control study designs with causal effect estimation. *Int J Biostat.* **6**, (1):Article 1

Rôças I.N., Siqueira J.F.Jr, Andrade A.F.B., Uzeda M. (2002). Identification of selected putative oral pathogens in primary root canal infections associated with symptoms. *Anaerobe* **8**, 200-208.

Sanz M. & Kornman K. (2013) Working group 3 of joint EFP/AAP workshop. Periodontitis and adverse pregnancy outcomes: consensus report of the Joint EFP/AAP Workshop on Periodontitis and Systemic Diseases. *J Clin Periodontol.* **40**, S164–S169.

Silness J. & Løe H. (1964). Periodontal Disease in Pregnancy. II. Correlation between Oral Hygiene and Periodontal Condition. *Acta Odontologica Scandinavica* **22**, 121-135.

Socransky S.S., Haffajee A.D. (1991) Microbial mechanisms in the pathogenesis of destructive periodontal diseases: a critical assessment. *J Periodont Res* **26**, 195–209.

Socransky S.S. & Haffajee A.D. (2005) Periodontal microbial ecology. *Periodontol 2000.* **38**, 135-187.

Tateishi F., Hasegawa-Nakamura K., Nakamura T., Oogai Y., Komatsuzawa H., Kawamata K., Douchi T., Hatae M., Noguchi K. (2012) Detection of *Fusobacterium*

nucleatum in chorionic tissues of high-risk pregnant women. *J Clin Periodontol.* **39**, 417-424.

Teles R., Sakellari D., Teles F., Konstantinidis A., Kent R., Socransky S., Haffajee A. (2010) Relationships among gingival crevicular fluid biomarkers, clinical parameters of periodontal disease, and the subgingival microbiota. *J Periodontol* **81**, 89–98.

Tymkiw K.D., Thunell D.H., Johnson G.K., Joly S., Burnell K.K., Cavanaugh J.E., Brogden K.A., Guthmiller J.M. (2011) Influence of smoking on gingival crevicular fluid cytokines in severe chronic periodontitis. *J Clin Periodontol* **38**, 219–228.

Trombelli L., Scapoli C., Carrieri A., Giovannini G., Calura G., Farina R. (2010) Interleukin-1 beta levels in gingival crevicular fluid and serum under naturally occurring and experimentally induced gingivitis. *J Clin Periodontol* **37**, 697–704.

Vettore M.V., Lamarca Gde A., Leão A.T., Thomaz F.B., Sheiham A., Leal Mdo C. (2006) Periodontal infection and adverse pregnancy outcomes: a systematic review of epidemiological studies. *Cad Saude Publica.* **22**, 2041-2053.

Wang T.J., Gona P., Larson M.G., Tofler G.H., Levy D., Newton-Cheh C. (2006) Multiple biomarkers for the prediction of first major cardiovascular events and death. *N Engl J Med* **355**, 2631–2639.

Weidlich P., Moreira C.H., Fiorini T., Musskopf M.L., da Rocha J.M., Oppermann M.L., Aass A.M., Gjermo P., Susin C., Rösing C.K., Oppermann R.V. (2013) Effect of nonsurgical periodontal therapy and strict plaque control on preterm/low birth weight: a randomized controlled clinical trial. *Clin Oral Investig.* **17**, 37-44.

Table 1. Demographic and socioeconomic data at baseline in each group.

	Case (n= 18) n (%)	Control (n= 36) n (%)	p-value
Race			
White	12 (66.7)	22 (61.1)	0.69
Non-White	6 (33.3)	14 (38.9)	
Education			
Elementary	7 (38.9)	9 (25.0)	0.57
High school	9 (50.0)	22 (61.1)	
College	2 (11.1)	5 (13.9)	
Socio Economic Status			
Low	5 (27.8)	8 (22.2)	0.67
Medium-low	8 (44.4)	15 (41.7)	
Medium-High	3 (16.7)	11 (30.6)	
High	2 (11.1)	2 (5.6)	
BMI before gestation (kg/m²)			
<18.5	2 (11.1)	2 (5.6)	0.52
18.6 – 24.99	12 (66.7)	20 (55.6)	
25 – 29,99	2 (11.1)	10 (27.8)	
≥30	2 (11.1)	4 (11.1)	
Chi-Square			

Table 2. Obstetric data regarding previous and current pregnancies.

	Case (n= 18)	Control (n= 36)	p-value
Previous Pregnancy			
Primiparous women (n, %)	8 (44.4%)	18 (50%)	0.70
Previous miscarriage (n, %)	4 (22.2%)	3 (8.3%)	0.20
Previous preterm (n, %)	4 (22.2%)	3 (8.3%)	0.20
Current Pregnancy			
Genitourinary infection(n, %)	3 (16.7%)	5 (13.9%)	0.79
Diabetes(n, %)	1 (5.6%)	2 (5.6%)	1.00
Preeclampsia(n, %)	1 (5.6%)	0 (0%)	0.33
Other disease and conditions*(n, %)	1 (5.6%)	1 (2.8%)	1.00
Antibiotics(n, %)	6 (33%)	10 (27.7%)	0.67
Alcohol consumption(n, %)	0 (0%)	0 (0%)	-

* Uterine dilatation (test) and Renal infection (control)
Chi-square, Fisher

Table3. Clinical parameters expressed as mean (SD) percentage of sites according to the group.

(% sites)	Case (n=18)	Control (n=36)	p-value
Visible plaque	51.5 (28.6)	58.8 (21.9)	0.31
Gingival bleeding	35.4 (22.0)	36.3 (16.0)	0.87
Calculus	23.8 (15.9)	24.3 (16.4)	0.91
BOP	46.6 (24.6)	52.0 (22.0)	0.41
PPD \geq 3mm	52.0 (13.5)	50.6 (15.3)	0.75
PPD \geq 4mm	12.1 (8.7)	12.1 (10.5)	1.00
CAL \geq 1mm	12.1 (20.0)	10.1 (14.1)	0.67
CAL \geq 2mm	6.8 (16.5)	5.3 (9.3)	0.69
BOP Sampled Sites	79.2 (28.8)	83.3 (25.4)	0.59
PPD Sampled Sites	4.2 (0.9)	4.1 (0.6)	0.79

* p<0.05 and ** p<0.01 (Independent T-test)

Table 4. Log of Bacterial count (mean±standard deviation) according to groups.

	Case (n=18)	Control (n=36)	P value
<i>P. gingivalis</i>	5.3 (3.8)	6.1 (4.3)	0.50
<i>F. nucleatum</i>	9.6 (6.0)	9.6(5.7)	0.99
Total Bacterial	14.2 (1.1)	14.3(1.3)	0.79

* p<0.05 and ** p<0.01 (Independent T-test)

Figure 1. Frequency of detection of pathogens according to groups.

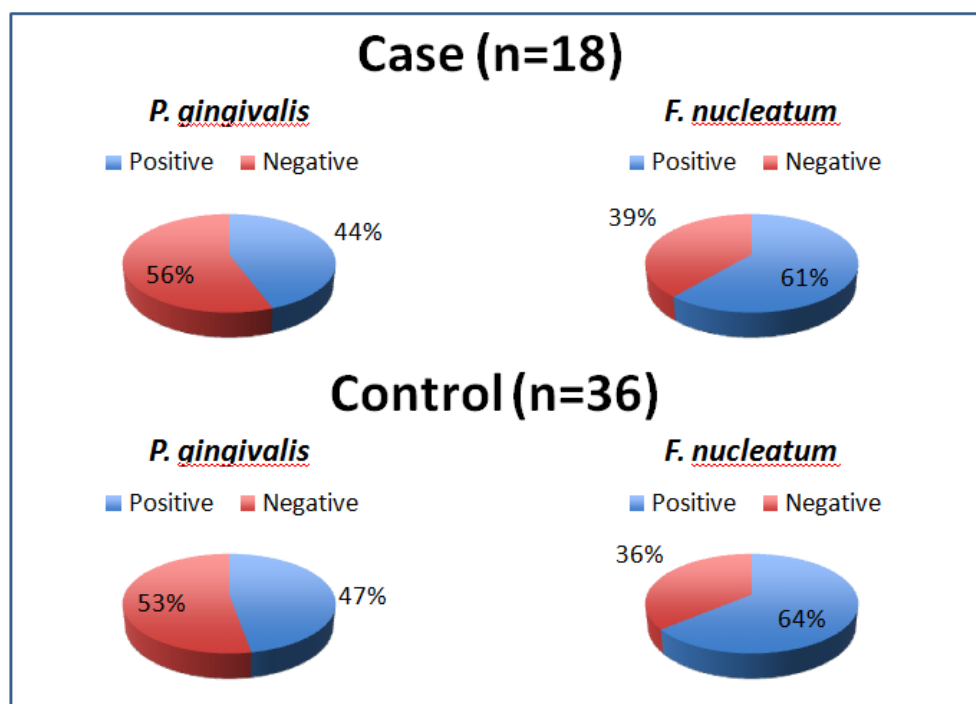


Table 6. Inflammatory markers in serum and Gengival crevicular fluid (mean±SD) according to groups.

	Baseline		p-value
	Case (n=18)	Control (n=36)	
Serum			
IL-12	1.7±0.9	1.7±1.3	0.90
TNF	1.4±0.9	1.2±0.7	0.39
IL-10	1.5±0.8	1.6±1.7	0.34
IL-6	3.3±0.8	4.8±4.3	0.14
IL-1	1.9±0.9	1.8±0.8	0.78
IL-8	11.0±6.0	12.6±14.0	0.98
GCF			
IL-12	2.7±2.3	2.9±3.1	0.45
TNF	2.6±1.9	3.0±2.7	0.71
IL-10	1.6±1.3	1.7±1.7	0.81
IL-6	6.9±5.2	6.4±4.4	0.84
IL-1	149.8±169.0	214.9±253.9	0.26
IL-8	447.4±361.5	577.2±462.1	0.33

* p<0.05 and ** p<0.01 (Mann Whitney U)

Table 7. Correlations between Clinical parameters and Gengival crevicular fluid / Log of Bacterial count.

	Log of Bacterial count			Gengival crevicular fluid					
	<i>Pg</i>	<i>Fn</i>	Total	IL-12	TNF- α	IL-10	IL-6	IL-1	IL-8
BoP Sampled Sites	0.32*	0.23	0.46***	-0.22	-0.22	-0.16	0.18	0.47***	0.22
PPD Sampled Sites	0.32*	0.12	0.28*	-0.04	-0.10	0.01	0.33*	0.48***	0.33*
BoP	0.30*	0.27	0.36**	-0.19	-0.27*	-0.04	0.24	0.50***	0.29*
PPD	0.09	-0.08	0.09	0.14	-0.07	0.15	0.26	0.31*	0.27*

Pg: *P. gingivalis*; *Fn*: *F. nucleatum*; IL: Interleukin, TNF- α : Tumor necrosis factor – α ; BoP: Bleeding on probing; PPD: Probing pocket depth.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, $p < 0.001$ (Spearman's)

6 MANUSCRITO 2

Influence of periodontal treatment on subgingival bacteria in pregnant women

José M. Rocha^{1*}, Patrícia Weidlich¹, Tiago Dalberto³, Tiago Fiorini¹, Carlos H. C. Moreira¹, José A. B. Chies², Rui V. Oppermann¹, Cassiano K. Rösing¹

¹ Section of Periodontology, School of Dentistry, Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil

² Department of Genetics, Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil

³ Center of Biotechnology, Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil

Running head: Periodontal therapy and bacteria during pregnancy

Keywords: *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*, Pregnancy, Bacteria, Periodontitis, Therapy

*Correspondence: José Mariano da Rocha, Rua Ramiro Barcelos, 2492, Porto Alegre, RS, Brasil, 90035-003.

Tel: (+55) (51) 3308 5318; Fax: (+55) (51) 3308 5002; E-mail: jmrocha@email.com

Word count = 4356

SUMMARY

Background and Objective: Little evidence is available concerning the microbiological response to periodontal treatment during pregnancy. The aim of this study was to assess the effect of periodontal therapy on *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis* and total bacterial count during pregnancy and postpartum.

Material and Methods: A subsample of 47 women (18-35 years-old) up to 20 gestational weeks, previously enrolled in a larger randomized clinical trial, was analyzed. The test group received comprehensive nonsurgical periodontal therapy before the 24th gestational week and the control group did not receive comprehensive periodontal therapy. Clinical data and microbiological samples were collected at baseline, 26-28 gestational weeks and 30 days after delivery. A pool of subgingival bacteria was collected in the 4 deepest pocket sites and analyzed for *F. nucleatum*, *P. gingivalis* and total bacterial count by real time PCR.

Results: Periodontal treatment during pregnancy reduced all clinical inflammatory parameters evaluated. Full mouth bleeding on probing was significantly reduced from 60.9% to 12.8% in the test group. *P. gingivalis* levels in test group showed a statistically significant reduction ($p=.007$) between baseline and both 26th-28th gestational week and postpartum ($p=.009$ and $p=.04$, respectively). No significant effect of therapy was observed on *F. nucleatum* and total bacterial count. The same trend was observed for the percentage of detectable bacteria.

Conclusions: Non-surgical periodontal therapy reduces clinical inflammatory parameters and *P. gingivalis* count during pregnancy. No change was observed for *F. nucleatum* and total bacterial count.

INTRODUCTION

It is recognized that the hormonal changes that take place during pregnancy can alter the inflammatory response of periodontal tissues in the presence of plaque. Plaque plays a central role in the development of pregnancy gingivitis, since pregnant women with adequate plaque control tend not to develop gingivitis (Arafat, 1974; Chaikin, 1977). However, in the presence of plaque, there is an exacerbated response of the periodontal tissues, since pregnant women have more severe gingival inflammation when compared to non pregnant counterparts, and this difference remains even when adjusted to plaque levels (Machuca *et al.*, 1999; Tilakaratne *et al.*, 2000; Figuero *et al.*, 2013).

The influence of pregnancy on the subgingival microbiota has been reported. Classical studies with untreated pregnant women showed that along the second trimester there is a change in the proportion of anaerobes/aerobes in the subgingival biofilm as well as an increase of severity of gingival inflammation, despite plaque levels. Evidence from cultivation-based approaches indicated that high levels of estradiol and progesterone during pregnancy can be found in plaque and act as a growth factor for microorganisms, increasing the subgingival levels of black-pigmented *Bacteroides*. (Kornman & Loesche, 1980; Kornman & Loesche, 1982). However, investigations using molecular methods do not corroborate these findings (Jonsson *et al.*, 1988; Yokoyama *et al.*, 2008; Adriaens *et al.*, 2009).

The effect of pregnancy on the subgingival microbiota is unclear. Recent evidence from longitudinal studies showed no significant increase in bacterial levels during pregnancy (Gürsoy *et al.*, 2008). Furthermore, total bacterial count (Adriaens *et al.*, 2009) and count of some specific bacteria such as *Fusobacterium nucleatum* and *Porphyromonas gingivalis* (Anna Carrillo *et al.*, 2010) did not differ throughout pregnancy. The latter showed that 17 out of 37 species evaluated were reduced, 19 did not change and only *Neisseria mucosa* increased after pregnancy. On the other hand, another study showed no changes in all eight species evaluated between pregnancy and postpartum in 30 women that did not receive periodontal treatment (Offenbacher *et al.*, 2006). Thus, at present, there is very little evidence linking pregnancy and preferential colonization by certain bacterial species (Kumar, 2013).

The impact of pregnancy on subgingival microbiota can be better evaluated in studies where periodontal treatment is provided to pregnant women, since the therapy

aiming to drastically reduce plaque and inflammation will allow to evaluate the modifying effect of the hormonal challenge properly. However, response to periodontal treatment during pregnancy has not been extensively demonstrated. The broad pregnancy-related adjustments that occur in mother's immune response and the impact of the hormonal changes in plaque-induced inflammation in the periodontium (Armitage, 2013) allows to expect worse outcomes when periodontal treatment is provided during pregnancy. However, a couple of studies demonstrated that periodontal inflammation can be drastically reduced when periodontal treatment and strict plaque control (Lopez *et al.*, 2002; Weidlich *et al.*, 2013) are delivered during a high hormonal challenge period.

Two interventional studies evaluated bacterial count after periodontal therapy in pregnant women. While a reduction in *P. gingivalis*, but not in *F. nucleatum* could be observed during pregnancy (Novak *et al.*, 2008), at postpartum differences were found between control and treatment group in *F. nucleatum*, but not in *P. gingivalis* (Offenbacher *et al.*, 2006). In this sense, little evidence is available concerning the microbiological response to periodontal treatment during pregnancy. The aim of this study was to assess the effect of periodontal therapy in *F. nucleatum*, *P. gingivalis* and total bacterial count during pregnancy and postpartum.

MATERIALS AND METHODS

Study design and sample

The present study is a secondary analysis of a RCT designed to assess the effect of periodontal treatment performed during pregnancy on the reduction of PTLBW rates (Weidlich *et al.*, 2013). The RCT included pregnant women 18-35 years-old and information about inclusion/exclusion criteria can be retrieved elsewhere (Weidlich *et al.*, 2013). All women that showed 3 or more teeth with PPD greater than 5mm in the collection site at baseline examination were included in the present analysis. Clinical data and microbiological samples were collected at baseline (before 20 weeks of gestation), after treatment (26-28 weeks of gestation) and 30 days postpartum. At total, the present study sample comprises 22 women in the control group (untreated) and 25 in the test group (comprehensive periodontal treatment delivered up to week 24). The Ethical Committee of the Maternal Hospital

Presidente Vargas, Porto Alegre, Brazil, approved the study protocol and each participant signed a consent form.

Periodontal clinical examination

Periodontal clinical examination was performed by calibrated examiners and recorded in preset forms by trained assistants. Full-mouth, excluding third molars, six sites per tooth periodontal examination was carried out using a manual periodontal probe (Neumar, North Carolina Probe 15, São Paulo, Brazil). Plaque Index (Silness & Loe, 1964), Gingival Index (Loe, 1967), supragingival calculus, cavities, overhanging restorations, bleeding on probing (BOP), periodontal probing depth (PPD), and clinical attachment level (CAL) were recorded. Reproducibility during the study was assessed in 10% of the participants and the intra-class correlation coefficient ranged between .95 and .96 for PPD and .84 and .93 for CAL. Participants were examined at baseline, between 26th and 28th gestational weeks and 30 days after delivery.

Plaque Sampling and Storage

Four sites per subject were randomly selected for subgingival plaque collection among the deepest periodontal probing depths in baseline examination, excluding distal surfaces of second molars and lingual face of all mandibular teeth. Teeth were isolated with cotton rolls and gently air-dried. Supragingival plaque was carefully removed with curettes and sterile #30 paper points (Periopaper, Oraflow, New York, USA) were inserted for 30 seconds in the periodontal pocket and immediately stored in plastic tubes at -20°C until analysis. Plaque samples were collected from the same sites at baseline, between weeks 26 and 28 and 30 days after delivery.

Samples processing

The samples were defrosted, homogenized and a 50 µl aliquot used for DNA extraction (Purelink DNA genomic mini kit, Invitrogen). All samples were evaluated in a spectrophotometer (NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer. Thermo Scientific) and dilutions containing 1.4Ng/µl per 10µl were prepared to each reaction. Genomic DNA was tested by real time PCR. Previously published species-specific 16S rDNA primers to *P. gingivalis* (5' AGGCAGCTTGCCATACTGCG 3' 5' ACTGTTAGCAAC

TACCGATGT 3') (Roças *et al.*, 2002), *F. nucleatum* (5' TAAAGCGCGTCTAGGTGGTT3' 5' ACGGCTTTGCAACTCTCTGT3') (Figuro *et al.*, 2011) and total bacterial count universal primer (5' TCCTACGGGAGGCAGCAGT 3' 5' GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT 3') (Nadkarni *et al.*, 2002) were used. The real time PCR reaction mixture was prepared using Invitrogen master mix (Platinum SYBR green qPCR supermix, Invitrogen). Each reaction was prepared contained 10.1ul of genomic DNA, 10.5µl of Invitrogen master mix and .4 µl of primers (5 pMol/µL each).

PCR analysis included an initial denaturation step at 94°C for 5 minutes, followed by 40 cycles of denaturation at 94°C for 30 seconds, annealing at 58°C (universal primer), 56°C (*F. nucleatum*) or 60°C (*P. gingivalis*), an extension at 72°C for 45 seconds and a final extension at 72°C for 10 minutes. After amplification, a melting curve analysis was performed to determine the specificity of the PCR products. For melting curve analysis, PCR products were incubated for 15 seconds at 5°C below the annealing temperature for the respective primers and the temperature increased to 95°C with a ramp rate of 0.1/second.

Quantification analysis was performed using qPCR software (Step one software v2.1, Applied Biosystems). The quantification of the number of bacterial genome per subject sample for each primer was based in a standard curve obtained through serial dilutions made with DNA extracted from pure bacterial cultures (*P. gingivalis* ATCC 33277 and *F. nucleatum* ATCC25586) and quantified using the formula: Avogadro constant x amount of DNA in µg/µl)/(genome size x molecular weight per base pair/nucleotide).

Intervention

Periodontal treatment was performed by two periodontists (TF and JMR) at the dental unit of the Maternal Hospital President Vargas. The test group received comprehensive nonsurgical periodontal therapy before the 24th gestational week, with supra and subgingival scaling and root planning, emphasizing oral hygiene. After treatment completion, patients were seen at least once a month according to individual needs in order to maintain optimal plaque control. The control group did not receive comprehensive periodontal therapy. The same therapy provided to the test group was offered for the control group at least 30 days after delivery. Patients in

both groups received pain relief treatment whenever necessary. No significant differences between test and control groups regarding the occurrence of adverse gestational events were observed. Only minor events related to the periodontal treatment were noted; dentin hypersensitivity was significantly more frequent in the test group.

Statistical analysis

Data analysis was performed using SPSS 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Means and standard deviations for all clinical parameters were calculated and reported. Sample distribution according to demographic, socioeconomic, behavioral data and frequency of detection of pathogens was assessed using Chi-square and Fisher's exact test. All bacterial counts were analyzed in the log scale. To allow for zero counts, a constant value of 10 was added to all results and then computed the logarithm.

Differences between treatment groups and differences among experimental periods were assessed using ANOVA (followed by Tukey test). Statistical significance was set at 5%.

RESULTS

Distribution of participants according to demographics, socioeconomic status and behavioral variables is described in Table 1. Most women were younger than 30 years, white, with high school education, medium-low to low socioeconomic status, never smokers and normal weighted.

At baseline, participants showed widespread inflammation but limited periodontal destruction with no significant differences between treatment groups (Table 2). In the test group, periodontal therapy yielded a significant reduction in plaque, gingival bleeding and calculus and this improvement remained after delivery (Table 2). After treatment, a major reduction in periodontal inflammation was observed in the test group (Table 2).

Probing pocket depth decreased from $2.8 \pm 0.2\text{mm}$ to $2.3 \pm 0.3\text{mm}$ ($p < .001$) in test group after treatment and remained stable ($\text{PPD} = 2.3 \pm 0.2\text{mm}$) after delivery. In addition, the control group had significantly higher percentage of sites with plaque, supragingival calculus, gingival bleeding, bleeding on probing and $\text{PPD} \geq 3\text{mm}$ and

PPD \geq 4mm than the test group, in the post-treatment and after delivery. No significant difference between groups was observed for CAL.

Sampled sites showed no statistically significant differences between test and control groups at baseline (4.7 vs. 4.8mm, $p=.441$), although significant PPD reduction was found after treatment (3.0 vs. 4.2mm, $p<.001$) and postpartum (2.9 vs. 3.9mm, $p<.001$). Positive modest correlations between clinical parameters and bacterial counts were found. Full mouth bleeding on probing was correlated to *P. gingivalis* count ($r^2=.42$, $p<.001$) and probing depth to *P. gingivalis* ($r^2=.28$, $p<.01$), *F. nucleatum* ($r^2=.20$, $p<.05$) and total bacterial count ($r^2=.28$, $p<.01$). Similar results were observed using sampled sites means.

Figure 1 presents Log of bacterial count according to treatment groups and experimental periods. A statistically significant difference was observed for *F. nucleatum* between groups in all experimental periods (Figure 1a). However, the same pattern was observed in both groups along the study. When *P. gingivalis* count is analyzed, test group showed a significantly lower value ($p<.05$) after treatment (Figure 1b). This also happened for total bacterial count ($p<.001$) (Figure 1c). Those differences did not remain statistically significant after delivery. However, it should be noted that total bacterial count presented a borderline p-value after delivery ($p=.07$).

When overtime differences are concerned in each group, no statistically significant difference was found except for *P. gingivalis* levels in the test group, that showed a statistically significant reduction ($p=.007$) between baseline and both 26th-28th gestational week and postpartum ($p=.009$ and $p=.04$, respectively).

Table 3 shows the proportion of samples with detectable *F. nucleatum* and *P. gingivalis*. No statistically significant difference was found in *P. gingivalis* count at baseline ($p=.771$). These proportions were significantly different between control (50.0%) and test (20.0%) group after treatment ($p<.05$), but not at postpartum ($p=.74$). *F. nucleatum* showed no statistically significant difference between control (72.7%) and test (44%) group ($p=.08$) at baseline. These proportions were significantly different after treatment ($p<.05$) and postpartum ($p<.01$).

DISCUSSION

The purpose of this study was to assess the effect of periodontal therapy in *F. nucleatum*, *P. gingivalis* and total bacterial count during pregnancy and postpartum.

To the best of our knowledge, this is the first study that evaluated the microbiological changes that occur after periodontal treatment, both during pregnancy and postpartum. In the present study, non-surgical periodontal therapy significantly reduced periodontal inflammation and *P. gingivalis* count during pregnancy and those results remained stable postpartum. In addition, no change was observed for *F. nucleatum* and total bacterial count throughout all evaluated periods.

Clinical benefits from periodontal therapy are frequently associated with major shifts in the oral microbiota. This is probably due to the alterations rendered in the local environment. However, this might not be achieved in 100% of the cases (Jervøe-Storm *et al.*, 2007). Additionally, pregnancy is a period of time in which major alterations in the body take place, with significant availability of hormones including the crevice. The effect of periodontal therapy, taking this into consideration, could be less evident. Therefore, the present study was designed in order to better understand the relationship between clinical e microbiological parameters during pregnancy. Thus, comparing results during pregnancy and postpartum allows for understanding the probable effect of hormonal alterations in clinical and microbiological outcomes of periodontal therapy.

The clinical results of the present study demonstrated that comprehensive periodontal therapy with strict plaque control is effective in reducing parameters of gingival inflammation clinically. The analysis of what was obtained in the microbiota is essential for a better understanding of the pattern of periodontal response to therapy. Therefore, total bacterial count and levels of *F. nucleatum* and *P. gingivalis* were assessed.

In relation to the total load of bacteria, despite that no intra-group difference in subgingival total bacterial count was found, inter-group analyses showed a lower quantity of bacteria after treatment in test group during pregnancy ($p < .05$). This was achieved summing the reduction in test group and an increase in control group. At postpartum, the bacterial count in control group returned to the baseline values and the statistically significant difference was no longer present. In seeking explanation to this finding, the possible participation of drastic hormonal changes that take place during pregnancy and after delivery should not be ruled out (Carrillo-de-Albornoz *et al.*, 2010; Adriaens *et al.*, 2009). The literature in this respect is scarce. Both studies that evaluated the effect of periodontal treatment in subgingival microbiota showed

partial reductions in bacterial count (Novak *et al.*, 2008; Offenbacher *et al.*, 2006), but none of those studies showed the total bacterial load. Dynamic changes in bacterial species resulting from periodontal treatment (Haffajee *et al.*, 2006) in conjunction with alterations in the subgingival microbiota due to pregnancy (Carrillo-de-Albornoz *et al.*, 2010; Adriaens *et al.*, 2009) could explain these results.

The present study showed that comprehensive periodontal therapy with strict supragingival plaque control during pregnancy significantly reduced the bacterial count of *P. gingivalis*. This difference between control and test groups for *P. gingivalis* count found after treatment was not present at postpartum. Furthermore, the proportion of pregnant women that had detectable *P. gingivalis* in test group was significantly reduced during pregnancy from 64% to 20% ($p < .01$). The changes observed in *P. gingivalis* count are in agreement with previous studies that found significant reductions of *P. gingivalis* in treated women during pregnancy (Novak *et al.*, 2008). In relation to postpartum, Offenbacher *et al.* (2006) also did not find such differences.

The analysis of *F. nucleatum* demonstrated a statistically significant difference at baseline. However, the pattern of both groups was virtually the same overtime. Therefore, no effect of periodontal treatment during pregnancy could be observed in the *F. nucleatum* count in this study. This has also been demonstrated by Novak *et al.* 2008. On the other hand, in a pilot study that reported the effect of periodontal treatment during pregnancy on subgingival microbiota, borderline differences ($p = .05$) between treatment and control groups were found at postpartum. In this study, the authors used a molecular approach with a broad spectrum (DNA-DNA hybridization checkerboard method), which enables screening of several species at the same time (Novak *et al.*, 2008). The present study was performed with real time PCR in order to quantify specific bacteria and no differences were found.

The major strengths of the present investigation reside on the evaluation of the impact of periodontal treatment in the microbiota both during pregnancy and postpartum. The majority of studies do not comprise these two arms, therefore not enabling comparison. Additionally, the study design (RCT) is one with the highest capacity of generating evidence, since the majority of possible intervenient factors are similarly distributed. A secondary analysis of a RCT could be seen as a limitation. However, the existence of clear inclusion criteria for including women in this analysis,

with at least moderate degree of subgingival inflammation tends to diminish this possible weakness. Therefore, the number of included women is limited, which has also been studied in different settings (Del Peloso Ribeiro *et al.*, 2008; Jervøe-Storm *et al.*, 2007)

Since differences in probing depth are associated with different bacteria profiles (Socransky & Haffajee, 2005), a reduction in bacterial count could be expected. The results of the present study point differences in *P. gingivalis* after treatment. This finding is interesting also in pregnancy since *P. gingivalis* has been considered one of the important putative periodontal pathogens, also encountered in metastatic regions. In conclusion, non-surgical periodontal therapy reduces clinical inflammatory parameters and *P. gingivalis* count during pregnancy. Hormonal alterations might account for differences encountered throughout pregnancy.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by the National Council of Research – Brazil (CNPq), Grant No 403099/2005-6 and FAPERGS Grant No100350-0. José Mariano da Rocha was supported by the Foundation for Post-Graduate Education (CAPES), grant number 13733-12-5, Brasília, Brazil.

The authors declare not to have conflicts of interest.

REFERENCES

Adriaens L.M., Alessandri R., Spörri S. et al. (2009) Does pregnancy have an impact on the subgingival microbiota? *J Periodontol.* **80**:72-81.

Arafat A.H. (1974) Periodontal status during pregnancy. *J Periodontol* **45**: 641-3.

Armitage G.C. (2013) Bi-directional relationship between pregnancy and periodontal disease. *Periodontol 2000.* **61**:160-76.

Carrillo-de-Albornoz A., Figuero E., Herrera D. et al. (2010) Gingival changes during pregnancy: II. Influence of hormonal variations on the subgingival biofilm. *J Clin Periodontol.* **37**:230-40.

Chaikin B.S. (1977) Incidence of gingivitis in pregnancy. *Quintessence Int Dent Dig.* **8**: 81-9.

Del Peloso Ribeiro E., Bittencourt S., Sallum E.A. et al. (2008) Periodontal debridement as a therapeutic approach for severe chronic periodontitis: a clinical, microbiological and immunological study. *J Clin Periodontol.* **35**:789-98.

Figuero E., Carrillo-de-Albornoz A., Martín C. et al. (2013) Effect of pregnancy on gingival inflammation in systemically healthy women: a systematic review. *J Clin Periodontol.* **40**:457-73.

Figuero E., Sánchez-Beltrán M., Cuesta-Frechoso S. et al. (2011) Detection of periodontal bacteria in atheromatous plaque by nested polymerase chain reaction. *J Periodontol.* **82**:1469-1477.

Gürsoy M., Haraldsson G., Hyvönen M. et al. (2009) Does the frequency of *Prevotella intermedia* increase during pregnancy? *Oral Microbiol Immunol.* **24**:299-303.

Haffajee A.D., Teles R.P. and Socransky S.S. (2006) The effect of periodontal therapy on the composition of the subgingival microbiota. *Periodontol 2000*. **42**:219-58.

Jervøe-Storm P.M., AlAhdab H., Semaan E. et al. (2007) Microbiological outcomes of quadrant versus full-mouth root planing as monitored by real-time PCR. *J Clin Periodontol*. **34**:156-63.

Jonsson R., Howland B.E. and Bowden G.H. (1988) Relationships between periodontal health, salivary steroids, and *Bacteroides intermedius* in males, pregnant and non-pregnant women. *J Dent Res*. **67**:1062-9.

Kornman K.S. and Loesche W.J. (1980) The subgingival microbial flora during pregnancy. *J Periodontal Res*. **15**:111-22.

Kornman K.S. and Loesche W.J. (1982) Effects of estradiol and progesterone on *Bacteroides melaninogenicus* and *Bacteroides gingivalis*. *Infect Immun*. **35**:256-63.

Kumar P.S. (2013) Sex and the subgingival microbiome: do female sex steroids affect periodontal bacteria? *Periodontol 2000*. **61**:103-24.

Löe H. (1967) The Gingival Index, the Plaque Index and the Retention Index Systems. *J Periodontol* **38**:Suppl:610-6.

López N.J., Smith P.C. and Gutierrez J. (2002) Periodontal therapy may reduce the risk of preterm low birth weight in women with periodontal disease: a randomized controlled trial. *J Periodontol*. **73**:911-24.

Machuca G., Khoshfeiz O., Lacalle J.R. et al. (1999) The influence of general health and socio-cultural variables on the periodontal condition of pregnant women. *J Periodontol*. **70**:779-85.

Nadkarni M.A., Martin F.E., Jacques N.A. et al. (2002) Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set. *Microbiology*. **148**:257-66.

Novak M.J., Novak K.F., Hodges J.S. et al. (2008) Periodontal bacterial profiles in pregnant women: response to treatment and associations with birth outcomes in the obstetrics and periodontal therapy (OPT) study. *J Periodontol*. **79**:1870-9.

Offenbacher S., Lin D., Strauss R. et al. (2006) Effects of periodontal therapy during pregnancy on periodontal status, biologic parameters, and pregnancy outcomes: a pilot study. *J Periodontol* **77**:2011-24.

Rôças I.N., Siqueira J.F.Jr., Andrade, A.F.B. et al. (2002) Identification of selected putative oral pathogens in primary root canal infections associated with symptoms. *Anaerobe* **8**:200-208.

Silness J. and Loe H. (1964) Periodontal Disease in Pregnancy. II. Correlation between Oral Hygiene and Periodontal Condition. *Acta Odontol Scand* **22**:121-35.

Socransky S.S. and Haffajee A.D. (2005) Periodontal microbial ecology. *Periodontol 2000*. **38**:135-87.

Tilakaratne A., Soory M., Ranasinghe A.W. et al. (2000) Periodontal disease status during pregnancy and 3 months post-partum, in a rural population of Sri-Lankan women. *J Clin Periodontol*. **27**:787-92.

Weidlich P., Moreira C.H., Fiorini T. et al. (2013) Effect of nonsurgical periodontal therapy and strict plaque control on preterm/low birth weight: a randomized controlled clinical trial. *Clin Oral Investig*. **17**:37-44.

Yokoyama M., Hinode D., Yoshioka M. et al. (2008) Relationship between *Campylobacter rectus* and periodontal status during pregnancy. *Oral Microbiol Immunol*. **23**:55-9.

[TABLES]

Table 1. Demographic, socioeconomic and behavioral data at baseline in each group.

	Test (n= 25) n (%)	Control (n= 22) n (%)	p-value
Age (years)			
18-24	14 (56.0%)	8 (36.4%)	0.18
25-30	6 (24.0%)	11 (50%)	
31-35	5 (20.0%)	3 (13.6%)	
Race			
White	14 (56.0%)	16 (72.7%)	0.23
Non-White	11 (44.0%)	6 (27.3%)	
Education			
Elementary	13 (52.0%)	7 (31.8%)	0.35
High school	11 (44.0%)	13 (59.1%)	
College	1 (4.0%)	2 (9.1%)	
Socioeconomic Status			
Low	8 (32.0%)	5 (22.7%)	0.28
Medium-low	10 (40.0%)	12 (54.5%)	
Medium-High	4 (16.0%)	5 (22.7%)	
High	3 (12.0%)	0 (0.0%)	
Smoking			
Never	14(56.0%)	11 (50.0%)	0.68
Current/Former	11 (44.0%)	11 (50.0%)	
BMI before gestation (kg/m ²)			
<18.5	2 (8.0%)	1 (4.5%)	0.61
18.6 – 24.99	13 (52.0%)	10 (45.5%)	
25 – 29,99	6 (24.0%)	9 (40.9%)	
≥30	4 (16.0%)	2 (9.1%)	

Table 2. Clinical parameters expressed as mean (SD) percentage of sites according to the experimental period.

(% sites)	Baseline			26 th - 28 th gestational week			Postpartum*		
	Test (n=25)	Control (n=22)	p-value	Test (n=25)	Control (n=22)	p-value	Test (n=19)	Control (n=16)	p-value
Visible plaque	62.0 (17.2)	56.2 (29.9)	0.432	8.4 (14.2)	44.4 (29.0)	<0.001	12.3 (17.8)	44.3 (27.6)	0.001
Gingival bleeding	41.7 (17.1)	37.3 (20.9)	0.432	9.8 (6.3)	29.2 (19.8)	<0.001	11.8 (9.6)	33.1 (21.6)	0.002
Calculus	29.1 (16.8)	27.0 (16.3)	0.662	0.3 (0.7)	24.0 (18.1)	<0.001	0.7 (1.4)	24.4 (15.5)	<0.001
BOP	60.9 (17.6)	58.7 (22.1)	0.710	12.8 (8.2)	51.4 (24.0)	<0.001	14.9 (12.0)	46.6 (23.3)	<0.001
PPD≥3mm	55.2 (12.9)	59.8 (11.4)	0.210	30.7 (17.9)	57.9 (12.0)	<0.001	28.4 (16.9)	55.1 (13.4)	<0.001
PPD≥4mm	20.8 (8.6)	24.5 (16.4)	0.343	5.7 (6.0)	25.0 (16.4)	<0.001	4.0 (4.2)	23.6 (15.0)	<0.001
CAL ≥1mm	22.0 (26.2)	27.0 (33.1)	0.565	18.3 (23.1)	21.5 (30.9)	0.683	17.6 (19.8)	22.8 (25.7)	0.499
CAL ≥2mm	11.2 (17.9)	18.0 (30.2)	0.361	8.9 (17.3)	12.3 (24.1)	0.574	7.2 (15.6)	13.1 (24.9)	0.369

Table 3. Frequency of detection of pathogens according to treatment groups and experimental period.

	Baseline		26 th - 28 th gestational week		Postpartum	
	Test	Control	Test	Control	Test	Control
	(n=25)	(n=22)	(n=25)	(n=22)	(n=19)	(n=16)
	% (n)	% (n)	% (n)	% (n)	% (n)	% (n)
<i>P. gingivalis</i>	64.0 (16)	59.1% (13)	20.0 (5) ##*	50.0% (11)	42.1 (8)	50.0% (8)
<i>F. nucleatum</i>	44.0(11)	72.7 (16)	48.0(12)*	81.8 (18)	57.9 (11)**	100 (16) #

* p<0.05, ** p<0.01 – Statistically significant difference between test and control

p<0.05, ## p<0.01 – Statistically significant difference comparing to baseline

[FIGURE LEGENDS]

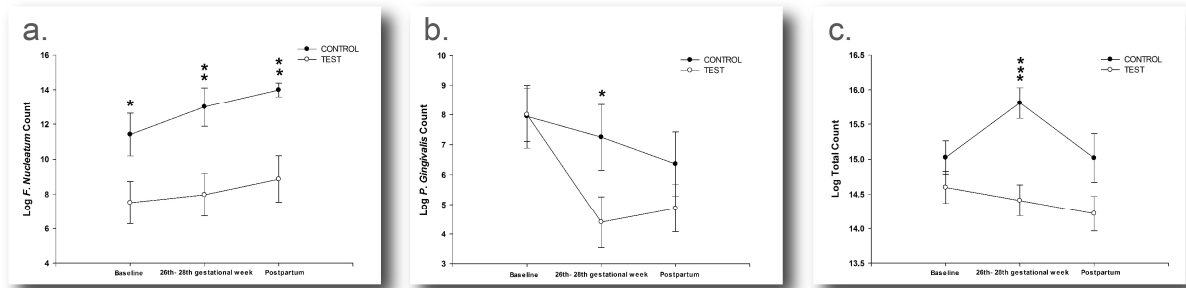


Figure 1. Line graphs of mean and standard error for Log of *F. nucleatum* (a), *P. gingivalis* (b) and total bacterial count (c) according to treatment groups and experimental period.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A associação entre doenças periodontais e desfechos gestacionais adversos aparece de forma consistente nos achados de estudos transversais. A plausibilidade para essa associação se baseia em duas possíveis vias. A via direta, na qual bactérias presentes na cavidade oral poderiam se disseminar sistemicamente até a unidade feto-placentária gerando uma resposta inflamatória local e desencadeando o parto prematuro. A via indireta, através do aumento da resposta inflamatória sistêmica que resultaria em desfechos gestacionais adversos.

A presente tese avaliou questões importantes desta possível relação. Para tanto, foram selecionadas na literatura as bactérias com maior potencial de explicar essa relação (*F. nucleatum* e *P. gingivalis*). Na literatura periodontal, diversas técnicas já foram empregadas, incluindo cultura bacteriana, Checkerboard DNA-DNA hybridization e PCR em tempo real. Cada uma dessas técnicas possui vantagens e desvantagens de acordo com o desenho e objetivo do estudo. As avaliações realizadas nesta tese tiveram como objetivo detectar quantidades mínimas de bactérias, quantificar e comparar bactérias específicas no biofilme subgengival entre indivíduos. Por este motivo, entre as técnicas disponíveis, a técnicas de PCR em tempo real foi escolhida por ser, entre as técnicas disponíveis, a mais adequada às necessidades desta tese.

Em relação aos resultados encontrados, no primeiro estudo intitulado **“Clinical, microbiological and immunological periodontal parameters in women who experienced preterm/low birthweight and normal weight deliveries – a case-control approach”**, pode-se concluir que o perfil clínico periodontal, a microbiota subgengival e a resposta inflamatória local não foram diferentes entre gestantes que tiveram desfechos gestacionais adversos comparado a gestantes com parto a termo e peso normal. Alguns resultados deste primeiro estudo merecem ser destacados.

Primeiro, ao contrário de demais estudos transversais, não houve diferença na quantidade de inflamação clínica periodontal entre casos e controles. Apesar disso, diferenças na microbiota e/ou resposta inflamatória nos indivíduos no grupo de casos poderiam ser encontradas. Isso porque existem diferenças na composição da microbiota subgengival entre indivíduos e algum dos grupos poderia apresentar uma média ou prevalência diferente de bactérias com potencial de desencadear

mecanismos que levariam ao parto prematuro, corroborando com a via direta de explicação etiopatogênica para a associação em tela. Neste estudo, foram avaliadas as duas principais bactérias descritas na literatura (*P. gingivalis* e *F. nucleatum*) com potencial de desencadear mecanismos para desfechos gestacionais adversos. Nas gestantes examinadas, os achados para essas bactérias não foram diferentes entre os grupos, mostrando que a prevalência e quantidade possivelmente não foram responsáveis pela diferença de desfechos gestacionais adversos.

Cabe resaltar, ainda, que este estudo avaliou apenas duas bactérias periodontopatógenas específicas presentes no biofilme subgengival. *P. gingivalis* e *F. nucleatum* estavam presentes em 44.4% e 61.1% das gestantes no grupo caso, respectivamente. Portanto, poder-se-ia especular que elas fossem necessárias mas não suficientes para desencadear tais desfechos. Além disso, este estudo avaliou a sua presença apenas no biofilme subgengival e não diretamente na unidade feto-placentária, o que também deve ser objeto de reflexão. Essas bactérias, apesar de serem consideradas as com maior potencial para ocasionar desfechos gestacionais adversos, não são as únicas presentes na microbiota subgengival e, portanto, não se pode descartar a possibilidade de que outras bactérias estejam relacionadas com desfechos gestacionais adversos.

A mesma linha de pensamento pode ser aplicada para a resposta inflamatória destas gestantes. Apesar da ausência de diferenças nos parâmetros clínicos periodontais, gestantes poderiam apresentar uma resposta pró-inflamatória elevada no grupo de casos. Porém, não foi resultado encontrado pelo presente estudo, onde casos e controles não diferiram na quantidade de marcadores inflamatórios (periodontais e sistêmicos). Esses achados sugerem que, para as gestantes com essas características clínicas, a inflamação local não estava associada com parto prematuro e/ou baixo peso.

Tentando aprofundar mais essa questão, associações entre parâmetros clínicos, microbiológicos e imunológicos (periodontais e sistêmicos) foram avaliadas. Como resultado, foi encontrado que profundidade de sondagem e sangramento subgengival estavam associados a *P. gingivalis*, contagem total bacteriana e algumas citocinas presentes no fluido gengival, mas não associados a marcadores inflamatórios sistêmicos. Esses achados demonstram que nesses indivíduos avaliados a inflamação local não parece se traduzir em um aumento de marcadores

inflamatórios sistêmicos. Porém, cabe lembrar que essa é uma amostra de conveniência, incluindo mulheres grávidas, jovens (18 a 35 anos) que apresentavam inflamação gengival com limitada perda de inserção e que indivíduos com uma maior quantidade de doença possam apresentar resultados diferentes. Entretanto, subgrupos com essas características não foram o foco do presente estudo. Cabe ressaltar, também, que as mulheres incluídas no presente ensaio são semelhantes à maioria das mulheres em idade fértil, não se constituindo em grupo especial de risco, como encontrado em alguns estudos. Esse fato incrementa a possibilidade de generalização de resultados para mulheres em período que estão sujeitas a engravidar.

Dados sobre as alterações na microbiota subgengival de gestantes submetidas ou não a tratamento periodontal ainda são escassos na literatura. No segundo artigo intitulado “**Influence of periodontal treatment on subgingival bacteria in pregnant women**”, a gestação não teve impacto sobre *P. gingivalis*, *F. nucleatum* e contagem total bacteriana. Apesar dos demais artigos encontrados na literatura sobre o assunto que demonstram decréscimo em algumas bactérias específicas entre a gestação e o pós-parto, os resultados do presente estudo não demonstraram alterações nas bactérias avaliadas nos diferentes períodos avaliados (antes da 20ª semana, entre 26ª e 28ª semanas e no pós-parto).

O tratamento periodontal nessas gestantes resultou em uma melhora nos parâmetros clínicos periodontais, bem como foi capaz de reduzir a quantidade e proporção de *P. gingivalis* durante o período gestacional. Por outro lado, quantidades de *F. nucleatum* não se alteraram em função do tratamento. Tendo em vista a possível via direta de associação entre doenças periodontais e parto prematuro, seria desejado que ambas bactérias fossem reduzidas em consequência do tratamento. Sendo assim, estes resultados podem explicar, pelo menos em parte, os resultados encontrados na literatura, que mostram uma ausência de redução nas taxas de prematuridade apesar da melhora nos parâmetros clínicos.

As contribuições do presente trabalho são inequívocas e corroboram os achados recentes de que a abordagem periodontal por si só tem pouco potencial de minimizar os eventos gestacionais adversos diretamente. Entretanto, os esforços de atenção integral à saúde da gestante devem ser contínuos, com benefícios

provavelmente ainda não mensuráveis, mas que podem ter potencial de garantir melhores indicadores de saúde populacionais.

REFERÊNCIAS

- Adriaens, L.M., Alessandri, R., Spörri, S., Lang, N.P., Persson, G.R. (2009) Does pregnancy have an impact on the subgingival microbiota? *J Periodontol.* **80**, 72-81.
- Barak, S., Oettinger-Barak, O., Machtei, E. E., Sprecher, H. & Ohel, G. (2007). Evidence of periopathogenic microorganisms in placentas of women with preeclampsia. *Journal of Periodontology* **78**, 670-676.
- Cahill, R.J., Tan, S., Dougan, G., O'Gaora, P., Pickard, D., Kennea, N., Sullivan, M.H., Feldman, R.G., Edwards, A.D. (2005) Universal DNA primers amplify bacterial DNA from human fetal membranes and link *Fusobacterium nucleatum* with prolonged preterm membrane rupture. *Mol Hum Reprod.* **11**, 761-766.
- Carrillo-de-Albornoz, A., Figuero, E., Herrera, D., Bascones-Martínez, A. (2010). Gingival changes during pregnancy: II. Influence of hormonal variations on the subgingival biofilm. *J Clin Periodontol.* **37**, 230-240.
- Carrillo-de-Albornoz, A., Figuero, E., Herrera, D., Cuesta, P., Bascones-Martínez, A. (2012). Gingival changes during pregnancy: III. Impact of clinical, microbiological, immunological and socio-demographic factors on gingival inflammation. *J Clin Periodontol.* **39**, 272-283.
- Chambrone, L., Pannuti, C.M., Guglielmetti, M.R., Chambrone, L.A. (2011) Evidence grade associating periodontitis with preterm birth and/or low birth weight: II: a systematic review of randomized trials evaluating the effects of periodontal treatment. *J Clin Periodontol.* **38**, 902-914.
- Colombo, A.P., Bennet, S., Cotton, S.L., Goodson, J.M., Kent, R., Haffajee, A.D., Socransky, S.S., Hasturk, H., Van Dyke, T.E., Dewhirst, F.E., Paster, B.J. (2012) Impact of Periodontal Therapy on the Subgingival Microbiota of Severe Periodontitis: Comparison between Good Responders and "Refractory" Subjects by the Human Oral Microbe Identification Microarray (HOMIM). *J Periodontol.* **10**, 1279-87.

Conde-Agudelo, A., Papageorghiou, A., Kennedy, S., Villar, J. (2011) Novel biomarkers for the prediction of the spontaneous preterm birth phenotype: a systematic review and meta-analysis. *BJOG*. **118**, 1042-54.

Corbella, S., Taschieri, S., Francetti, L., De Siena, F., Del Fabbro, M. (2012) Periodontal disease as a risk factor for adverse pregnancy outcomes: a systematic review and meta-analysis of case-control studies. *Odontology*. **100**, 232–240.

Cugini, M.A., Haffajee, A.D., Smith, C., Kent, R.L. Jr., Socransky, S.S. (2000) The effect of scaling and root planing on the clinical and microbiological parameters of periodontal diseases: 12-month results. *J Clin Periodontol*. **27**, 30-36.

Figuro, E., Sánchez-Beltrán, M., Cuesta-Frechoso, S., Tejerina, J.M., del Castro. J.A., Gutiérrez, J.M., Herrera, D., Sanz, M. (2011) Detection of periodontal bacteria in atheromatous plaque by nested polymerase chain reaction. *J Periodontol*. **82**, 1469-1477.

Fogacci, M.F., Vettore, M.V., Leão, A.T. (2011) The effect of periodontal therapy on preterm low birth weight: a meta-analysis. *Obstet Gynecol*. **117**, 153-65.

Gauthier, S., Tétu, A., Himaya, E., Morand, M., Chandad, F., Rallu, F., Bujold, E. (2011) The origin of *Fusobacterium nucleatum* involved in intra-amniotic infection and preterm birth. *J Matern Fetal Neonatal Med*. **24**, 1329-1332.

Han, Y. W., Ikegami, A., Bissada, N. F., Herbst, M., Redline, R. W. & Ashmead, G. G. (2006). Transmission of an uncultivated *Bergeyella* strain from the oral cavity to amniotic fluid in a case of preterm birth. *Journal of Clinical Microbiology* **44**, 1475-1483.

Hasegawa-Nakamura, K., Tateishi, F., Nakamura, T., Nakajima, Y., Kawamata, K., Douchi, T., Hatae, M., Noguchi, K. (2011) The possible mechanism of preterm birth associated with periodontopathic *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontal Res*. **46**, 497-504.

Jarjoura, K., Devine, P. C., Perez-Delboy, A., Herrera-Abreu, M., D'Alton, M. & Papapanou, P. N. (2005). Markers of periodontal infection and preterm birth. *American Journal of Obstetrics & Gynecology* **192**, 513-519.

Katz J, Chegini N, Shiverick KT, Lamont RJ. (2009) Localization of *P. gingivalis* in preterm delivery placenta. *J Dent Res.* **88**, 575-8

Kornman, K.S., Loesche, W.J. (1982) Effects of estradiol and progesterone on *Bacteroides melaninogenicus* and *Bacteroides gingivalis*. *Infect Immun.* **35**, 256-263.

León, R., Silva, N., Ovalle, A., Chaparro, A., Ahumada, A., Gajardo, M., Martinez, M., Gamonal, J. (2007) Detection of *Porphyromonas gingivalis* in the amniotic fluid in pregnant women with a diagnosis of threatened premature labor. *J Periodontol.* **78**, 1249-1255.

Lin, D., Moss, K., Beck, J. D., Hefti, A. & Offenbacher, S. (2007). Persistently high levels of periodontal pathogens associated with preterm pregnancy outcome. *Journal of Periodontology* **78**, 833-841.

Löe, H. (1967). The Gingival Index, the Plaque Index and the Retention Index Systems. *Journal of Periodontology* **38**, Suppl:610-616.

Maeda, H., Fujimoto, C., Haruki, Y., Maeda, T., Kokeyuchi, S., Petelin, M., Arai, H., Tanimoto, I., Nishimura, F., Takashiba, S. (2003) Quantitative realtime PCR using TaqMan and SYBR Green for *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, tetQ gene and total bacteria. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* **39**, 81–6.

Michalowicz B.S., Hodges J.S., DiAngelis A.J., Lupo V.R., Novak M.J., Ferguson J.E., Buchanan W., Bofill J., Papapanou P.N., Mitchell D.A., Matseoane S., Tschida P.A. (2006) Treatment of periodontal disease and the risk of preterm birth. *N Engl J Med.* **355**, 1885-94.

Miyazaki, H., Yamashita, Y., Shirahama, R., Goto-Kimura, K., Shimada, N., Sogame, A., Takehara, T. (1991) Periodontal condition of pregnant women assessed by CPITN. *J Clin Periodontol.* **18**, 751-754.

Nadkarni, M.A., Martin, F.E., Jacques, N.A., Hunter, N. (2002). Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set. *Microbiology.* **148**, 257-66.

Novak, M. J., Novak, K. F., Hodges, J. S., Kirakodu, S., Govindaswami, M., Diangelis, A., Buchanan, W., Papapanou, P. N. & Michalowicz, B. S. (2008). Periodontal bacterial profiles in pregnant women: response to treatment and associations with birth outcomes in the obstetrics and periodontal therapy (OPT) study. *Journal of Periodontology* **79**, 1870-1879.

Polyzos, N.P., Polyzos, I.P., Mauri, D., Tzioras, S., Tsappi, M., Cortinovis, I., Casazza, G. (2009). Effect of periodontal disease treatment during pregnancy on preterm birth incidence: a metaanalysis of randomized trials. *Am J Obstet Gynecol* **3**, 225-232.

Rôças, I.N., Siqueira, J.F.Jr, Andrade, A.F.B., Uzeda, M. (2002). Identification of selected putative oral pathogens in primary root canal infections associated with symptoms. *Anaerobe* **8**, 200-208.

Sakamoto, M., Huang, Y., Ohnishi, M., Umeda, M., Ishikawa, I., Benno, Y. (2004) Changes in oral microbial profiles after periodontal treatment as determined by molecular analysis of 16S rRNA genes. *J Med Microbiol.* **53**, 563-571.

Sanz, M. & Kornman, K. (2013) Working group 3 of joint EFP/AAP workshop. Periodontitis and adverse pregnancy outcomes: consensus report of the Joint EFP/AAP Workshop on Periodontitis and Systemic Diseases. *J Clin Periodontol.* **40**(Suppl 14), S164–S169.

Silness, J. & Løe, H. (1964). Periodontal Disease in Pregnancy. II. Correlation between Oral Hygiene and Periodontal Condition. *Acta Odontologica Scandinavica* **22**, 121-135.

Tateishi, F., Hasegawa-Nakamura, K., Nakamura, T., Oogai, Y., Komatsuzawa, H., Kawamata, K., Douchi, T., Hatae, M., Noguchi, K. (2012) Detection of *Fusobacterium nucleatum* in chorionic tissues of high-risk pregnant women. *J Clin Periodontol.* **39**, 417-424.

Urbán, E., Radnai, M., Novák, T., Gorzó, I., Pál, A., Nagy, E. (2006) Distribution of anaerobic bacteria among pregnant periodontitis patients who experience preterm delivery. *Anaerobe.* **12**, 52-57.

Vettore, M.V., Leão, A.T., Leal, M.C., Feres, M., Sheiham, A. (2008) The relationship between periodontal disease and preterm low birthweight: clinical and microbiological results. *J Periodontal Res.* **43**, 615-626.

Vianna, M.E., Horz, H.P., Gomes, B.P., Conrads, G. (2006) In vivo evaluation of microbial reduction after chemo-mechanical preparation of human root canals containing necrotic pulp tissue. *Int Endod J.* **39**, 484-492.

Wang, T.J., Gona, P., Larson, M.G., Tofler, G.H., Levy, D., Newton-Cheh, C. (2006) Multiple biomarkers for the prediction of first major cardiovascular events and death. *N Engl J Med.* **355**, 2631–2639.

Weidlich, P., Moreira, C.H., Fiorini, T., Musskopf, M.L., da Rocha, J.M., Oppermann, M.L., Aass, A.M., Gjermo, P., Susin, C., Rösing, C.K., Oppermann, R.V. (2013). Effect of nonsurgical periodontal therapy and strict plaque control on preterm/low birth weight: a randomized controlled clinical trial. *Clin Oral Investig* **17**, 37-44.

WHO (2005) *ICD-10 International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems*, 2nd edition. Geneva: WHO.

ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

**Prefeitura Municipal de Porto Alegre
Secretaria Municipal de Saúde
Hospital Materno Infantil Presidente Vargas**



Porto Alegre, 18 de abril de 2007

Ilmo (a) Sr. (a)

Rui Vicente Oppermann

Informamos que o projeto de pesquisa intitulado "**Desfechos Bucais e Sistêmicos do Tratamento Periodontal Durante a Gestação**" protocolado neste CEP sob nº 04/07, foi **aprovado** pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HMIPV em 18/4/2007, estando ética e metodologicamente adequado às Diretrizes e Normas Regulamentadoras da Pesquisa envolvendo Seres Humanos – (Resolução 196/96) – do Conselho Nacional de Saúde.

Atenciosamente,

Dr. Ricardo Meyer
Comitê de Ética em Pesquisa/HMIPV

ANEXO B – FICHA DE COLETA DE DADOS

Entrevista: _____

Nome: _____ Registro pesquisa: _____

Endereço: _____

Telefones para contato: _____

Endereço parentes para contato: _____

Telefones: _____

UBS no qual o pré-natal está sendo acompanhado: _____

Idade: _____ Data de nascimento: _____

Estado civil (no papel): _____

Você tem companheiro? Não Sim Mora com você? Não Sim

Raça: Branca Não branca

Nível educacional: _____ Anos de estudo: _____

1 <input type="checkbox"/> nunca estudou	2 <input type="checkbox"/> 1 ^a a 4 ^a série 1 ^o grau	3 <input type="checkbox"/> 5 ^a a 8 ^a série do 1 ^o grau
4 <input type="checkbox"/> 2 ^o grau incompleto	5 <input type="checkbox"/> 2 ^o g completo	6 <input type="checkbox"/> universitário incompleto
		7 <input type="checkbox"/> universitário completo

SM 1 até 1 2 1 a 2 3 2 a 3 4 3 a 5 5 5 a 10 6 10 a 20

 7 +20 8 não respondeu 9 não recebe salário

Posse de itens:

Televisão em cores:

Rádio:

Banheiro:

Automóvel:

Empregada mensalista:

Aspirador de pó:

Máquina de lavar:

Videocassete e/ou DVD:

Geladeira:

Freezer (aparelho independente ou parte de geladeira duplex)

Grau de instrução do chefe da família:

Analfabeto/primário incompleto

Primário completo/Ginasial incompleto

Ginasial completo/Colegial incompleto

Colegial completo/Superior incompleto

Superior completo

Dados obstétricos:

Esta foi a primeira vez que você ficou grávida? Não Sim

Você teve algum aborto? Não

Sim

Provocado

Quantos?

Espontâneo

Quantos?

Número de gestações prévias?

Quantos de seus filhos nasceram de parto normal?

E de cesariana?

Todos os seus filhos nasceram vivos? Sim

Não

Quantos nasceram mortos?

Desta vez você queria ficar grávida? Sim

Não

Início dos cuidados pré-natal:

Data da última menstruação:

Peso anterior:

Estatura:

Hospitalização na gravidez:

Número de dias:

Motivo:

Antecedentes Familiares: Sim Não

Diabetes

Hipert. Art.

Gemelares

Outros

Antecedentes Pessoais: Sim Não

Infecção urinária

Infertilidade

Diabetes

Hipert. Crônica

Cirurg. Pélv. Uterina

Hábitos de fumo:

Você fuma ou fumava Não, nunca

Sim, fumo Sim, parei

Há quanto tempo você parou de fumar? Anos

meses

dias

Quantos cigarros por dia você fuma?

Cigarros/dia

Por quanto tempo fuma ou fumou? Anos

meses

dias

Com que idade iniciou a fumar?

Consumo de bebidas alcoólicas:

Você ingere bebidas alcoólicas:

1 frequentemente

2 algumas vezes

3 raramente

4 nunca

Qual tipo:

1 nenhum

2 cerveja

3 cachaça

4 vinho

5 outros

Quantas doses/copos você, geralmente, ingere por semana:

Uso de drogas:

Sim

Não

Tipo de droga utilizada:

Hábitos bucais:

Frequência de escovação:

Limpeza entre os dentes: Sim

Não

Fio dental

palito

esc.interdental

outros

Frequência: uma vez por semana

2-5 vezes por semana

Uma vez por dia

mais de uma vez por dia

Tipo de escova: macia média dura

Dentífrício:

Frequência: Uma vez ao dia duas vezes/dia três vezes/dia outra

Presença de sangramento gengival: Não Sim
 Provocado Espontâneo

Sensibilidade nos dentes: Não Sim
 Provocada Espontânea

Presença de gengivas inchadas: Não Sim

Presença de mau gosto na boca : Não Sim

Presença de dentes frouxos: Não Sim

Nos últimos seis meses, por causa de problemas com seus dentes, sua boca ou dentadura:

1 – Você teve problemas para falar alguma palavra?

nunca () raramente () às vezes () repetidamente () sempre ()

2 – Você sentiu que o sabor dos alimentos tem piorado?

nunca () raramente () às vezes () repetidamente () sempre ()

3 – Você sentiu dores em sua boca ou nos seus dentes?

nunca () raramente () às vezes () repetidamente () sempre ()

4 – Você se sentiu incomodada ao comer algum alimento?

nunca () raramente () às vezes () repetidamente () sempre ()

5 – Você ficou preocupada?

nunca () raramente () às vezes () repetidamente () sempre ()

6 – Você se sentiu estressada?

nunca () raramente () às vezes () repetidamente () sempre ()

7 – Sua alimentação ficou prejudicada?

nunca () raramente () às vezes () repetidamente () sempre ()

8 – Você teve que parar suas refeições?

nunca () raramente () às vezes () repetidamente () sempre ()

9 – Você encontrou dificuldade para relaxar?

nunca () raramente () às vezes () repetidamente () sempre ()

10 – Você se sentiu envergonhada?

nunca () raramente () às vezes () repetidamente () sempre ()

11 – Você ficou irritada com outras pessoas?

nunca () raramente () às vezes () repetidamente () sempre ()

12 – Você teve dificuldade para realizar suas atividades diárias?

nunca () raramente () às vezes () repetidamente () sempre ()

13 – Você sentiu que a vida, em geral, ficou pior?

nunca () raramente () às vezes () repetidamente () sempre ()

ANEXO C – CALIBRAGEM DOS EXAMINADORES

Tabela 1 – Dados de reprodutibilidade inter examinadores e intra examinador para profundidade de sondagem e nível clínico de inserção realizados antes do início do estudo.

	Profundidade de sondagem		Nível clínico de inserção	
	Kappa	Kappa ponderado (± 1 mm)	Kappa	Kappa ponderado (± 1 mm)
Interexaminadores 1 e 2	0,47	0,96	0,48	0,86
Interexaminadores 1 e 3	0,38	0,94	0,31	0,83
Intraexaminador 1	0,62	0,92	0,43	0,88
Intraexaminador 2	0,44	0,91	0,38	0,81
Intraexaminador 3	0,49	0,92	0,45	0,86

Tabela 2 – Dados de reprodutibilidade inter examinadores e intra examinador para profundidade de sondagem e nível clínico de inserção realizados durante o estudo.

	Profundidade de sondagem		Nível clínico de inserção	
	Kappa	Kappa ponderado (± 1 mm)	Kappa	Kappa ponderado (± 1 mm)
Interexaminadores 1 e 2	0,46	0,90	0,56	0,89
Interexaminadores 1 e 3	0,40	0,88	0,33	0,84
Intraexaminador 1	0,43	0,89	0,55	0,82
Intraexaminador 2	0,42	0,89	0,52	0,86
Intraexaminador 3	0,35	0,89	0,38	0,87

ANEXO D - FLUXOGRAMAS

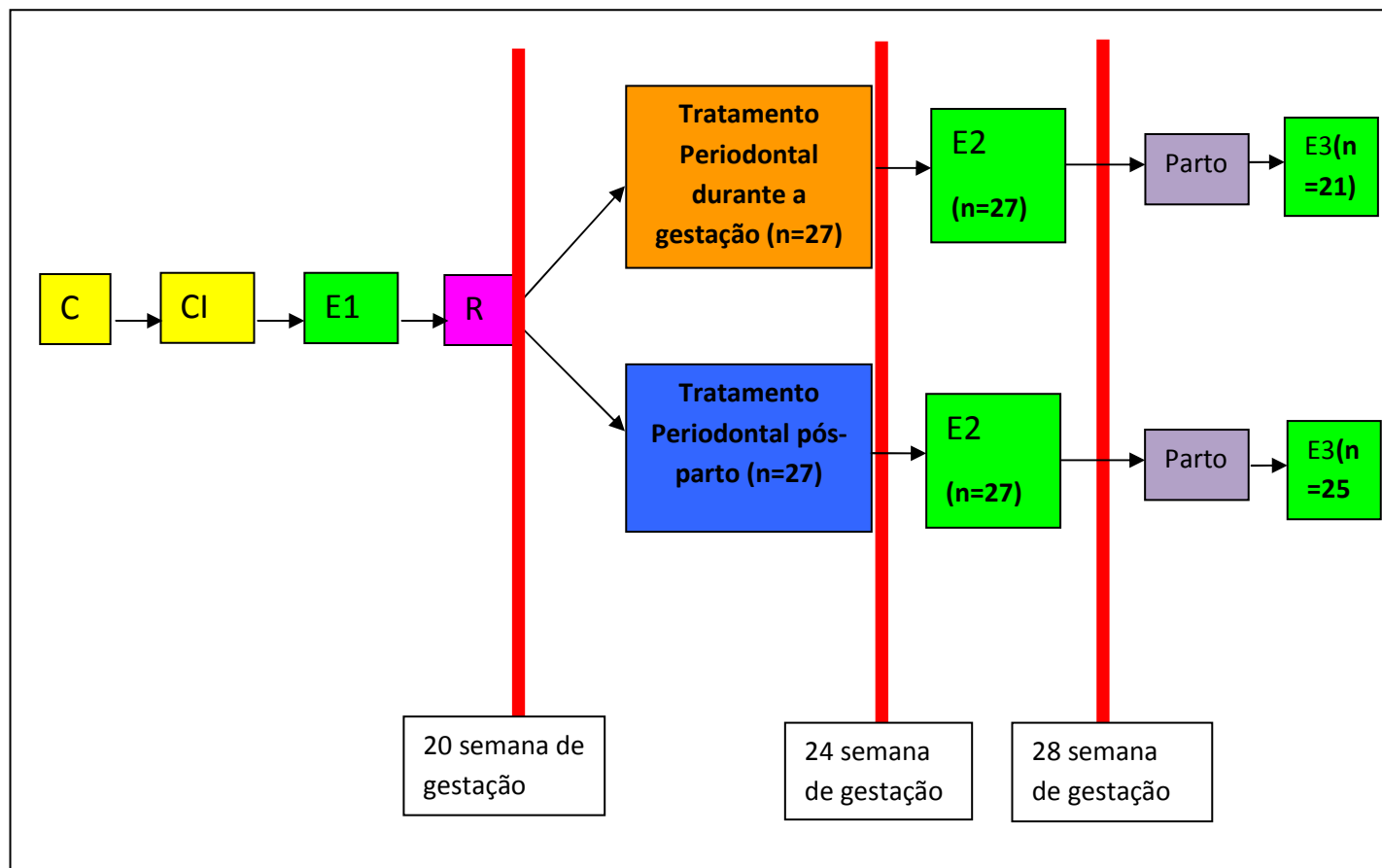


Figura 1. Desenho experimental do Ensaio Clínico Randomizado

C= convite

CI= consentimento informado

R= randomização

P= parto

E1, E2 e E3= exames 1, 2 e 3

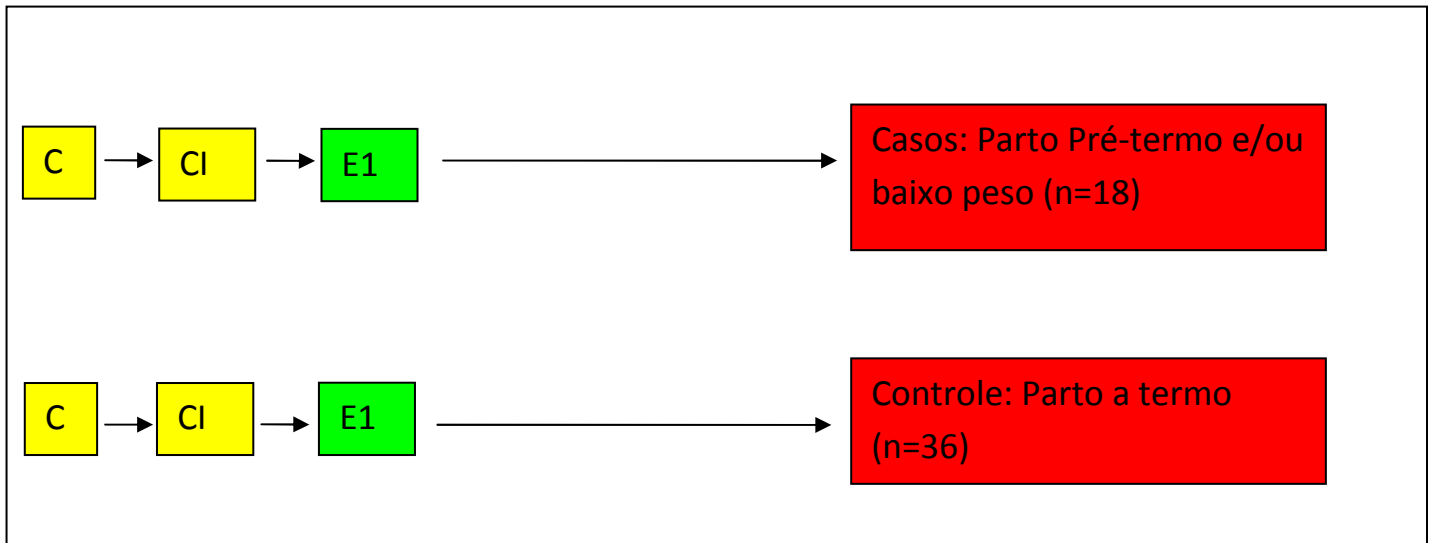




Figura 2. Desenho experimental do estudo de caso-controle (1:2)

ANEXO E – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO MANUSCRITO 2

Molecular Oral Microbiology - Manuscript ID MOM-06-14-0533 [email ref: SE-6-a]   Close Fullscreen ☆

From: anne.nixon@dsl.pipex.com 6/5/14 at 12:36 PM ⓘ

05-Jun-2014

Dear Dr. da Rocha:

Your manuscript entitled "Influence of periodontal treatment on the subgingival microbiota in pregnant women" by da Rocha, José; Weidlich, Patrícia; Dalberto, Tiago; Fiorini, Tiago; Moreira, Carlos; Chies, José; Oppermann, Rui; Rösing, Cassiano, has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in Molecular Oral Microbiology.

Co-authors: Please contact the Editorial Office as soon as possible if you disagree with being listed as a co-author for this manuscript.

Your manuscript ID is MOM-06-14-0533.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to ScholarOne Manuscripts at <http://mc.manuscriptcentral.com/mom> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <http://mc.manuscriptcentral.com/mom>.

Thank you for submitting your manuscript to Molecular Oral Microbiology.

Sincerely,
Molecular Oral Microbiology Editorial Office