

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

Tese

NÍVEIS SISTÊMICOS E PERIODONTAIS DE CITOCINAS DURANTE A GESTAÇÃO:  
CORRELAÇÕES E EFEITO DA TERAPIA PERIODONTAL

TIAGO FIORINI

Porto Alegre, março de 2012

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

NÍVEIS SISTÊMICOS E PERIODONTAIS DE CITOCINAS DURANTE A GESTAÇÃO:  
CORRELAÇÕES E EFEITO DA TERAPIA PERIODONTAL

Linha de Pesquisa

Epidemiologia, etiopatogenia e repercussão das doenças da cavidade bucal e estruturas anexas

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia, Nível Doutorado, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito final para a obtenção do título de Doutor em Odontologia, Clínicas Odontológicas, Periodontia.

TIAGO FIORINI

Orientador: Prof. Dr. Rui Vicente Oppermann

Co-Orientador: Prof. Dr. Cristiano Susin

Porto Alegre, março de 2012

### CIP - Catalogação na Publicação

Fiorini, Tiago

Níveis sistêmicos e periodontais de citocinas durante a gestação: correlações e efeito da terapia periodontal / Tiago Fiorini. -- 2012.

82 f.

Orientador: Rui Vicente Oppermann.

Coorientador: Cristiano Susin.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Odontologia, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Porto Alegre, BR-RS, 2012.

1. Terapia periodontal. 2. Inflamação sistêmica de baixa intensidade. 3. Gravidez. 4. Interleucinas. 5. Fluido crevicular gengival. I. Oppermann, Rui Vicente, orient. II. Susin, Cristiano, coorient. III. Título.

## *Dedicatória*

**“A MENTE HUMANA, UMA VEZ EXPANDIDA POR UMA IDÉIA NOVA,  
JAMAIS RETORNA A SUA DIMENSÃO ORIGINAL”**

*Oliver Wendell Holmes, em O Autocrata à Mesa do Desjejum*

Dedico esta tese ao meu avô, Aurélio Sordi.

## Agradecimentos

Para algumas pessoas, a seção de agradecimentos após a conclusão de um trabalho, seja ele acadêmico ou não, pode soar apenas como uma formalidade. Claramente, este não é o meu caso. Por mais estranho que possa parecer, escrever os agradecimentos foi extremamente difícil para mim. Difícil pois o caminho até aqui foi tão longo, e há tantas coisas as quais e tantas pessoas a quem devo agradecer, que realmente tive dificuldade de expressar em palavras minha gratidão. Não sabia nem ao menos por onde começar. Resolvi usar a frase de Lewis Carroll, em Alice no País das Maravilhas: “Comece pelo começo, siga até chegar ao fim e então, pare”.

E o começo de minha história inicia muito antes de eu entrar no doutorado. Jamais teria ido tão longe sem o suporte da minha família. Os valores morais que mais prezo sempre me foram ensinados em casa. O senso de justiça, a honestidade, a generosidade e a perseverança de meus pais, Darci e Marilene, serão sempre uma referência pela qual procuro guiar meus atos. Obrigado por todo o amor e apoio incondicional que vocês me deram durante toda a minha vida. Ao meu irmão, Cristhian, repito pela enésima vez aquilo que ele já sabe. Deus nos fez irmãos, mas eu o escolhi como meu melhor amigo. E isso diz tudo! Agradeço também a tua família, a Denise e aos pequenos Bibi e Vini, que muito alegraram meus dias pelo skype quando estive longe e me sentindo só.

Agradeço também a minha namorada Juliana Scopel, outra pessoa para a qual as palavras parecem insuficientes para expressar minha gratidão. Agradeço pelo teu amor, pelo teu respeito, pela paciência, pelas tantas vezes que você me ajudou a levantar depois dos tropeços ao longo do caminho. Depois de tanto tempo juntos (e por algum tempo separados fisicamente), vejo que nossa relação está cada vez mais madura e mais forte. Espero que eu possa te ajudar na tua caminhada o tanto quanto tu me ajudaste na minha. Te amo Ju.

O doutorado é o fim (será mesmo?) de um longo processo, que iniciou na especialização e passou pelo mestrado. Cheguei em Porto Alegre no início de 2003 para minha especialização e desde então fiz muitos progressos, em grande parte devido ao grupo de professores de periodontia da UFRGS: Marilene Issa Fernandes,

Cassiano Kuchenbecker Rösing, Alex Haas, Patrícia Weidlich, Fernando Daudt e Sabrina Carvalho Gomes. Muito obrigado por tudo! Em especial agradeço ao professor Rui Vicente Oppermann, meu orientador no doutorado e que acompanha meus passos desde os primeiros seminários e cirurgias, lá na especialização. Obrigado por todos os ensinamentos e oportunidades que me foram dadas ao longo de todo esse caminho. Minha história na periodontia está diretamente ligada ao senhor.

Esta tese é fruto de um trabalho em grupo. Jamais teria conseguido chegar até aqui sem a ajuda, o companheirismo e o trabalho árduo dos meus colegas DOPEG, Patrícia Weidlich, Carlos Heitor Cunha Moreira, José Mariano da Rocha e Marta Liliana Musskopf. Todos vocês foram mais que colegas de trabalho, foram realmente amigos quando precisei. Nossos bolsistas (foram tantos, que aqui represento-os pela chefe do “sindicato dos bolsistas” e atual mestrande, Luciana Daudt) e todo pessoal do Hospital Presidente Vargas também foram fundamentais para isso. O trabalho que fizemos foi gigantesco, e ainda estamos começando a colher os frutos dele. Tenho certeza que boas coisas ainda estão por vir. Agradeço também a todo pessoal da perio, meus colegas de doutorado Eduardo Gaio, Juliano Cavagni, Sara Cioccarri Oliveira e Vanessa Chaves e também as funcionárias, em especial a Adriana e a Edinete.

Agradeço a Priscila Vianna e ao José Arthur Bogo Chies pelo auxílio na análise imunológica e desenvolvimento dessa tese. Espero que possamos continuar cooperando no futuro.

Como havia comentado, o caminho até aqui foi longo. E incluiu umas das etapas mais transformadoras da minha vida, que foi o período que passei nos Estados Unidos. Um amigo me disse no primeiro dia desta etapa: “Bem vindo ao primeiro dia do resto de sua vida”. Sábias palavras. Tive a felicidade de conhecer algumas das pessoas mais fantásticas com quem convivi na vida, a começar pelo professor Ulf Wikesjö. Foram tantos ensinamentos, tantas oportunidades oferecidas, tanta paciência com alguém que tinha imensa dificuldade para se expressar, que as vezes ainda custo a acreditar. Uma frase que você disse sintetiza muito do que você é: “Go against the stream, and always tell the truth. Tell it so many times that, eventually, someone will believe you”. Sempre original, e sempre verdadeiro. Thanks “El Lobo”! Agradeço também ao Jaebum Lee e sua família. Foram vários bons momentos naquele um ano e meio em Augusta, e tenho

certeza que iremos manter nossa amizade por toda a vida. Agradeço a Jamie Ann De Stefano. Você é, com certeza, uma das pessoas mais generosas que eu conheci. Jamais vou esquecer nossas viagens e nossas conversas, onde éramos bem “modestos” tentando encontrar soluções para o Brasil e para o mundo. O período em Augusta foi muito marcante, e várias pessoas contribuíram para isso, incluindo Debbie Dye, Teresa Langham, James Yoon, Brent Wenzel, Allen Sawyer, Brian Stancoven e muitos outros. Meu sincero agradecimentos a todos vocês. Thank “y’all” so much!

Por fim, agradeço ao Cristiano Susin e sua esposa, Lisiane. Jamais conseguirei agradecer a tudo o que vocês fizeram por mim. Vocês foram tudo nesse tempo que estive aí, minha família, meus amigos e meus orientadores. Vida de bolsista não é fácil, nem mesmo a de “fellows emergentes”. E vocês me ajudaram em absolutamente tudo. Desde o auxílio para dar a (minha!) data de nascimento correta no seguro social, passando pelas inúmeras pesquisas de preço até achar as coisas mais baratas pra casa, caronas depois de acidentes automobilísticos, auxílio “logístico” em desastres naturais como grandes nevascas...Tenho certeza absoluta que não conseguirei listar todas as coisas que vocês fizeram por mim. O que me conforta é que vocês sabem o quanto eu sou grato. Vocês merecem tudo o que tem!

Agradeço a CAPES pelo auxílio financeiro ao longo do doutorado.

Agradeço a Deus, por me dar saúde, persistência e capacidade de chegar até aqui.

## Sumário

<b>RESUMO</b> .....	<b>9</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>11</b>
<b>APRESENTAÇÃO</b> .....	<b>13</b>
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
O IMPACTO SISTÊMICO DA DOENÇA PERIODONTAL.....	16
A INFLAMAÇÃO SISTÊMICA CRÔNICA DE BAIXA INTENSIDADE .....	18
DOENÇA PERIODONTAL E PARTO PRETERMO.....	19
CITOCINAS.....	24
O PARADIGMA TH1/TH2 E AS NOVAS DESCOBERTAS .....	25
<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>29</b>
<b>OBJETIVO</b> .....	<b>30</b>
<b>METODOLOGIA</b> .....	<b>31</b>
ORIGEM.....	31
DELINEAMENTO DO ESTUDO .....	31
AMOSTRA .....	31
DADOS MATERNOS .....	32
EXAME CLÍNICO PERIODONTAL.....	34
INTERVENÇÃO .....	34
COLETA DAS AMOSTRAS DE SANGUE E FCG.....	35
MENSURAÇÃO DAS CITOCINAS.....	35
ANÁLISE DOS DADOS .....	36
<b>MANUSCRITO 1</b> .....	<b>38</b>
<b>MANUSCRITO 2</b> .....	<b>45</b>
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>64</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>68</b>
<b>ANEXO 1</b> .....	<b>75</b>
<b>ANEXO 2</b> .....	<b>76</b>
<b>ANEXO 3</b> .....	<b>77</b>
<b>ANEXO 4</b> .....	<b>82</b>



## Resumo

A doença periodontal tem sido frequentemente associada ao parto pretermo. A plausibilidade biológica para tal associação baseia-se na hipótese de uma inflamação sistêmica de baixa intensidade de origem periodontal. Entretanto, os estudos de intervenção que investigaram o efeito da terapia periodontal durante a gestação não observaram reduções significativas na incidência de prematuridade. Como diversas citocinas têm sido associadas tanto a doença periodontal quanto ao parto pretermo, cogita-se que elas desempenhem um papel importante na associação observada. Até o presente momento, pouco se sabe a respeito da correlação entre os níveis de citocinas no soro e no fluido crevicular gengival (FCG), assim como do efeito da terapia periodontal sobre esses marcadores de inflamação em gestantes. O objetivo desta tese foi avaliar a relação entre níveis sistêmicos e periodontais de biomarcadores inflamatórios relacionados com a resposta imune periodontal e também com os mecanismos de parto. Também investigou-se o efeito da terapia periodontal sobre os níveis dessas citocinas durante a gestação e 30 dias após o parto. Esta tese é composta por dois estudos que utilizaram uma sub-amostra de mulheres que haviam sido recrutadas para um ensaio clínico randomizado maior que investigou o efeito da terapia periodontal sobre a incidência de prematuridade. Mulheres entre 18-35 anos e com até 20 semanas de gestação foram aleatoriamente alocadas para receber tratamento periodontal não cirúrgico completo até a 24<sup>a</sup> semana de gestação (grupo teste) ou apenas uma consulta de uma remoção de cálculo supragingival (grupo controle). Dados clínicos e amostras de sangue e FCG foram coletadas no início do estudo, entre 26-28 semanas de gestação e 30 dias após o parto. Quatro sítios periodontais por paciente foram aleatoriamente selecionados para coleta de FCG entre aqueles com maior profundidade de sondagem. Os níveis de IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70 e FNT- $\alpha$  foram analisados por citometria de fluxo. No estudo 1, investigou-se a correlação e concordância entre os níveis periodontais e sistêmicos dessas citocinas em 100 pacientes, utilizando dados coletados até a 20<sup>a</sup> semana de gestação. As pacientes apresentaram extensa inflamação e limitada destruição periodontal. A correlação entre os níveis de citocinas no soro e no FCG foi baixa e não significativa,

com exceção da IL-12p70 que mostrou uma correlação moderada, porém significativa, entre as duas fontes ( $r=0.32$ ,  $p=0.001$ ). Os níveis de citocinas observados no FCG explicaram menos de 10% dos respectivos níveis observados no soro, com exceção da IL-12p70 em que eles foram responsáveis por 23% dos níveis séricos ( $p=0.0001$ ,  $r^2=0.23$ ). A profundidade de sondagem e o sangramento a sondagem estiveram significativamente associados com os níveis de IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-8 no FCG, mas tiveram efeitos limitados sobre os níveis sistêmicos de todas as citocinas. No estudo 2, comparou-se o efeito da terapia periodontal durante a gestação ( $n=30$ ) com uma consulta única de remoção de cálculo supragingival ( $n=30$ ) sobre os níveis periodontais e sistêmicos dessas citocinas durante a gestação e 30 dias após o parto. Após o tratamento, uma redução drástica da inflamação periodontal foi observada no grupo teste, com o percentual de sangramento a sondagem reduzindo de 49.62% para 11.66% dos sítios ( $p<0.001$ ). A terapia também reduziu significativamente os níveis de IL-1 $\beta$  e IL-8 ( $p<0.001$ ) no FCG. Entretanto, nenhum efeito significativo do tratamento foi observado em relação aos níveis sistêmicos dessas citocinas. Após o parto, os níveis periodontais de IL-1 $\beta$  no grupo teste permaneceram significativamente menores que no grupo controle, enquanto que nenhuma diferença foi observada em relação aos níveis sistêmicos das outras citocinas avaliadas. Pode-se concluir que os níveis de citocinas no soro e FCG não estão significativamente associados em mulheres com extensa inflamação mas limitada destruição periodontal. Embora a terapia periodontal durante a gestação reduza significativamente o nível de citocinas no FCG, ela parece não ter um impacto considerável sobre os níveis sistêmicos desses biomarcadores.

Palavras-chave: terapia periodontal, fluido crevicular gengival, inflamação sistêmica de baixa intensidade, interleucinas, gravidez, doença periodontal.

## **Abstract**

Periodontal disease has been frequently associated with preterm birth. The biological plausibility for this association relies on the hypothesis of a low-grade systemic inflammation originated from periodontal disease. However, clinical studies that investigated the effect of periodontal therapy during pregnancy did not observe significant reductions in the incidence of prematurity. Several cytokines have been associated with both periodontal disease and preterm birth, and might play a key role in the observed association. To date, little is known about the correlation between serum and gingival crevicular fluid (GCF) cytokine levels, as well as the effect of periodontal therapy on these inflammatory markers in pregnant women. The aim of this thesis was to investigate the relationship between periodontal and systemic levels of inflammatory biomarkers related to periodontal immune response and also with the mechanisms of delivery. We also investigated the effect of periodontal therapy on serum and GCF cytokine levels during pregnancy and 30 days postpartum. This thesis consists of two studies that used a sub-sample of women who had been previously enrolled in a larger randomized controlled trial investigating the effect of periodontal therapy on the incidence of preterm birth. Women aged between 18-35 years and up to 20 weeks of gestation were randomly assigned to receive comprehensive nonsurgical periodontal treatment before the 24<sup>th</sup> gestational week (test group) or a single appointment of supragingival calculus removal (control group). Clinical data, blood and GCF samples were collected at baseline, between 26-28 weeks of gestation and 30 days postpartum. Four periodontal sites per patient were randomly selected for GCF collection among those with deepest probing depth. IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70 and TNF- $\alpha$  levels were analyzed using a cytometric bead array. In the study one, we investigated the correlation and agreement between periodontal and systemic levels of these cytokines in 100 patients, using data collected until 20 weeks of gestation. Patients presented widespread periodontal inflammation but limited destruction. The correlation between serum and GCF cytokine levels was low and not significant, except for IL-12p70, which showed a moderate but significant correlation between the two sources ( $r = 0.32$ ,  $p = 0.001$ ). The GCF cytokine levels observed explained less than 10% of the respective

serum levels observed, except for IL-12p70, which was responsible for 23% of serum levels ( $p = 0.0001$ ,  $r^2 = 0.23$ ). Probing depth and bleeding on probing were significantly associated with IL-1 $\beta$ , IL-6 and IL-8 GCF levels, but had limited effects on systemic levels of all cytokines. In the study two, we compared the effect of periodontal therapy during pregnancy ( $n=30$ ) or a single appointment for supragingival calculus removal ( $n=30$ ) on periodontal and systemic levels of these cytokines during pregnancy and 30 days postpartum. After treatment, a remarkable reduction of periodontal inflammation was observed in the test group, with bleeding on probing reducing from 49.62% to 11.66% of the sites ( $p<0.001$ ). Periodontal therapy also significantly reduced IL-1 $\beta$  and IL-8 GCF levels ( $p<0.001$ ). However, no significant differences due to therapy were observed regarding systemic levels of these cytokines. After delivery, IL-1 $\beta$  GCF levels in the test group remained significantly lower than in the control group, whereas no difference was observed for systemic levels of any other cytokine evaluated. It can be concluded that serum and GCF cytokine levels are not significantly associated in women with widespread periodontal inflammation but limited destruction. Although periodontal therapy during pregnancy significantly reduces GCF cytokine levels, it seems to have a negligible impact on systemic levels of these biomarkers.

Keywords: periodontal therapy, gingival crevicular fluid, low-grade systemic inflammation, interleukins, pregnancy, periodontal disease

## **Apresentação**

A presente tese é parte integrante do projeto “Desfechos Bucais e Sistêmicos do Tratamento Periodontal durante a Gestação”. Este projeto abordou questões clínicas, imunológicas, microbiológicas e de qualidade de vida envolvendo o periodonto nos períodos gestacional e pós-parto. O projeto representou uma colaboração entre a Faculdade de Odontologia da UFRGS, o Hospital Materno Infantil Presidente Vargas e a Faculdade de Odontologia da Universidade de Oslo.

O objetivo desta tese foi avaliar a relação entre níveis sistêmicos e periodontais de biomarcadores inflamatórios relacionados com a resposta imune periodontal e também com os mecanismos de parto. Ela contém uma introdução geral ao tema, seguida de dois manuscritos, além de considerações finais. Esse modelo está de acordo com a Resolução Nº 093/2007 da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Manuscrito 1: Relationship Between Cytokine Levels in Serum and Gingival Crevicular Fluid (GCF) in Pregnant Women

Manuscrito 2: Effect of Nonsurgical Periodontal Therapy on Serum and Gingival Crevicular Fluid Cytokine Levels During Pregnancy and Pospartum

## Introdução

As doenças periodontais são infecções causadas por microrganismos que colonizam a interface dento-gengival. Embora mais de 700 diferentes espécies bacterianas tenham sido descritas na cavidade bucal, apenas algumas delas são capazes de induzir doença, e a maior parte dos sítios gengivais mantém-se saudável ao longo da vida. O fato de que determinadas bactérias são necessárias mas não suficientes para o estabelecimento e progressão da doença periodontal destrutiva faz com que a compreensão da resposta imune do hospedeiro seja de fundamental importância. Os mecanismos de defesa imune associados a doença periodontal são complexos e envolvem tanto a resposta inata quanto a adaptativa. A resposta imune inata é a primeira linha de defesa do hospedeiro contra os patógenos periodontais, e responde essencialmente da mesma maneira a diferentes tipos de injúrias. Ela envolve inicialmente o reconhecimento de componentes bacterianos pelas células de defesa através de receptores de reconhecimento padrão (RRP), como os receptores do tipo toll (Toll Like Receptor – TLR) ou do tipo NOD (nucleotide binding oligomerization domain). Estudos recentes descreveram o papel dos receptores TLR-2 e TLR-4 no reconhecimento de patógenos periodontais como *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* e *Tannerella forsythensis* (Kikkert, Laine et al. 2007; Nussbaum, Ben-Adi et al. 2009). Após o reconhecimento bacteriano, uma cascata de sinalização celular acontece, com a liberação de várias citocinas pró-inflamatórias como IL-1 $\beta$ , IL-6, fator de necrose tumoral- alfa (FNT- $\alpha$ ) e interferon-gama (IFN- $\gamma$ ). Essas citocinas estão envolvidas em diversas atividades, tanto de defesa como de destruição tecidual (Garlet 2010). A resposta imune inata também estimula e influencia a natureza e intensidade da resposta imune adaptativa. A resposta imune adaptativa é caracterizada pela capacidade de memória, onde as células do hospedeiro respondem de maneira bastante específica a diferentes antígenos. Os mecanismos de iniciação da resposta imune adaptativa são semelhantes ao da resposta inata, com o reconhecimento bacteriano pelos RRP que entram em contato com os patógenos periodontais através de células apresentadores de antígeno, como por exemplo as células dendríticas (Cutler and Jotwani 2004). Dependendo do padrão de citocinas

expressado, essas células podem polarizar (direcionar) respostas associadas a imunidade celular (resposta Th1) ou a imunidade humoral (resposta Th2). Apesar de certa controvérsia, a maior parte dos estudos descreve a resposta imunológica de lesões periodontais iniciais ou estáveis como semelhante a reação de hipersensibilidade tardia (associada a células T), enquanto lesões progressivas estariam mais associadas a presença de células B e células plasmáticas. Sugere-se então que as lesões iniciais ou estáveis são mediadas por células Th1, enquanto que lesões progressivas por células Th2 (Gemmell and Seymour 2004). Apesar de simples e útil sob alguns aspectos, o paradigma Th1/Th2 têm sido contestado recentemente em função da descoberta de novas linhagens de células T CD4+ (Th17 e Treg). Esse aspecto será abordado em detalhes na sequência do texto.

As células envolvidas na resposta adaptativa celular em lesões periodontais têm sido descritas em vários estudos, os quais normalmente utilizam técnicas de imunofluorescência ou imunohistoquímica para caracterização do infiltrado inflamatório. Diferentes tipos celulares são encontrados em lesões periodontais, com predomínio de células plasmáticas (em torno de 50% do total de células), sendo que células B, células T, neutrófilos, macrófagos e diversas outras células de defesa também compõe o perfil celular do hospedeiro. A proporção de células B é maior que a proporção de células T, e as células T helper se apresentam em maior quantidade que as células T citotóxicas. Além disso, aparentemente lesões crônicas e agressivas apresentam perfis celulares bastante parecidos (Berglundh and Donati 2005).

Estima-se que pacientes com doença periodontal não tratada possuam uma área de epitélio dentogengival entre 8 a 20 cm<sup>2</sup>, variando de 1 a 44 cm<sup>2</sup> (Hujoel, White et al. 2001). Apesar de nem toda essa área estar ulcerada, áreas de necrose são comuns, o que facilitaria a entrada de patógenos periodontais. Episódios de bacteremia após procedimentos periodontais são frequentemente observados, e a incidência e intensidade desses episódios está correlacionada com a extensão e severidade da doença periodontal (Kinane, Riggio et al. 2005). Além disso, bactérias periodontais têm sido observadas em placas de aterosclerose (Haraszthy, Zambon et al. 2000), infecções pulmonares (Scannapieco, Wang et al. 2001) e até mesmo infecções do sistema nervoso central (Mueller, Saldamli et al. 2009). Estes achados, associados com

a intensa reação inflamatória observada, fez com que vários estudos começassem a investigar o impacto sistêmico da doença periodontal.

### **O impacto sistêmico da doença periodontal**

Vários estudos têm procurado investigar o impacto sistêmico da doença periodontal através da mensuração de diferentes parâmetros, como por exemplo número de células brancas sanguíneas, níveis glicêmicos e lipídicos, além de diversos mediadores de inflamação (citocinas, proteínas de fase aguda, moléculas de adesão celular, fatores de coagulação, etc.). Em relação ao número de células brancas, um artigo de revisão demonstrou um leve, porém consistente, aumento no número de leucócitos na corrente sanguínea de pacientes com doença periodontal quando comparados com controles saudáveis, sendo que parece haver uma correlação positiva entre o número de células brancas e a extensão e severidade da doença periodontal (Loos 2005). Em um estudo clássico da década de 90 que acompanhou por dois anos uma amostra de índios Pima com diabetes tipo-II (não insulino dependente), Taylor et al. observaram que a doença periodontal esteve associada a um controle glicêmico inadequado (Taylor, Burt et al. 1996). Pacientes com doença periodontal também demonstraram níveis sistêmicos elevados de IL-1 $\beta$  (Fentoglu, Koroglu et al. 2011), IL-6 (Nakajima, Honda et al. 2010), IL-2, IL-10, IFN- $\gamma$ , FNT- $\alpha$  (Gorska, Gregorek et al. 2003; Andrukhov, Ulm et al. 2010) e proteína C-reativa - PCR (Paraskevas, Huizinga et al. 2008) quando comparados com pacientes sem doença.

Além dos estudos observacionais comparando os níveis sistêmicos de mediadores inflamatórios em pacientes com doença periodontal e controles saudáveis, também estudos de intervenção investigaram o efeito da terapia periodontal sobre esses marcadores. Uma revisão sistemática recente demonstrou que a terapia periodontal reduz significativamente os níveis de hemoglobina glicosilada em pacientes diabéticos (Teeuw, Gerdes et al. 2010). Entretanto, os autores ressaltam que o efeito da terapia é modesto (redução de 0,40% após 3 meses) e que existe um número pequeno de estudos com grande heterogeneidade entre eles. Resultados similares foram encontrados em relação ao efeito da terapia periodontal sobre os níveis séricos de PCR (Paraskevas, Huizinga et al. 2008), onde o tratamento também resultou em reduções



modestas da proteína (DMP= 0.50 mg/L). Já em relação aos níveis séricos de citocinas, os resultados são mais controversos. Enquanto alguns estudos demonstraram reduções significativas nos níveis de IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12p70 e FNT- $\alpha$  (D'Aiuto, Parkar et al. 2004; D'Aiuto, Nibali et al. 2005; O'Connell, Taba et al. 2008; Duarte, da Rocha et al. 2010) em até seis meses pós-tratamento, outros não observaram tais diferenças (Ide, McPartlin et al. 2003; Yamazaki, Honda et al. 2005). Na tentativa de realizar uma avaliação mais ampla do efeito da terapia periodontal, um estudo recente investigou 19 biomarcadores inflamatórios, incluindo IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, FNT- $\alpha$ , PCR, inibidor do ativador do plasminogênio-1 (PAI-1), selectina E, molécula de adesão intercelular (ICAM) e MMP-9 (Behle, Sedaghatfar et al. 2009). Os autores também criaram um “escore inflamatório geral”, avaliando todos os biomarcadores em conjunto, numa tentativa de mensurar a inflamação total do paciente. Um mês após o término da terapia, apenas 3 dos 19 biomarcadores avaliados apresentaram reduções significativas (selectina E, ICAM e proteína amilóide sérica). Em relação ao escore inflamatório geral, houve uma grande heterogeneidade na resposta. Um terço dos pacientes apresentaram uma redução marcante após a terapia, um quarto deles um aumento pronunciado, enquanto que no restante ele permaneceu praticamente inalterado. As mudanças no escore inflamatório geral não foram positivamente correlacionadas com a resposta clínica ou microbiológica dos pacientes.

Tonetti et al., em um ensaio clínico randomizado com 120 pacientes, avaliaram o efeito de um tratamento periodontal intensivo sobre a função endotelial, mensurada através da dilatação fluxo-mediada da artéria braquial (Tonetti, D'Aiuto et al. 2007). Como desfechos secundários, os autores avaliaram os níveis de PCR, IL-6, selectina E, fator de von Willebrand, PAI-1 e contagem neutrofílica plasmática. Após 24 horas, a dilatação fluxo-mediada da artéria braquial foi significativamente menor no grupo teste do que no grupo controle ( $p=0,002$ ). Essa tendência se inverteu e após 48 horas ambos os grupos apresentavam valores praticamente idênticos, sendo que após 60 e 180 dias o grupo teste apresentou um percentual de dilatação significativamente maior que o grupo controle. Em relação aos demais marcadores, foi observado um aumento significativo 24 horas após o tratamento. Entretanto, na análise de 180 dias, o grupo teste e controle apresentaram valores muito semelhantes de PCR, IL-6, fator de von

Willebrand e inibidor do ativador do plasminogênio-1 (PAI-1), sem diferenças estatisticamente significativas. O grupo teste apresentou menores níveis de selectina E assim como contagem neutrofílica diminuída. Em uma amostra de gestantes, Michalowicz et al. investigaram o efeito da terapia periodontal sobre os níveis de PCR, prostaglandina E2, MMP 9, fibrinogênio IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 e FNT- $\alpha$  em mulheres que receberam o tratamento até a 21<sup>a</sup> semana de gestação (Michalowicz, Novak et al. 2009). Nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos experimentais. Interessantemente, poucas mulheres (menos de 10% da amostra) apresentaram níveis detectáveis de IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 e FNT- $\alpha$ , o que inviabilizou a comparação dos níveis desses biomarcadores.

A literatura disponível até o momento demonstra que, de um modo geral, existe uma grande variabilidade na resposta do hospedeiro a terapia periodontal. Frequentemente existe um aumento significativo nos níveis de biomarcadores inflamatórios imediatamente após o tratamento periodontal intensivo (full-mouth scaling), indicando uma resposta sistêmica aguda. Esse fato pode ser interpretado como uma prova de princípio de que uma bacteremia associada a inflamação aguda periodontal, ambas de grande intensidade, podem ter um impacto sistêmico. Em contraste, a ausência de uma repercussão sistêmica, mesmo sob essas condições extremas, tornaria pouco provável que a doença periodontal induzisse a alterações em condições de normalidade. Com o passar do tempo, a literatura demonstra que há uma tendência de retorno aos valores prévios ao tratamento para a maior parte dos marcadores avaliados. Aparentemente a doença periodontal destrutiva pode ter um efeito modesto, porém significativo, sobre alguns marcadores inflamatórios. A questão que permanece em aberto é se níveis “moderados” de inflamação e bacteremia, como os mais frequentemente encontrados em pacientes com doença periodontal crônica destrutiva, poderiam gerar uma inflamação sistêmica de baixa intensidade.

### **A inflamação sistêmica crônica de baixa intensidade**

Os recentes avanços na biologia molecular fizeram com a mensuração da inflamação passasse de um caráter clínico para a análise de mediadores moleculares inflamatórios, tornando o processo consideravelmente mais sensível. Isso fez com que

a etiologia e a patogenia de diversas doenças fossem reconsideradas dentro desse novo paradigma inflamatório, incluindo diabetes (Dandona, Aljada et al. 2004), aterosclerose (Libby, Okamoto et al. 2010), parto prematuro (Romero, Espinoza et al. 2006), depressão (Alexopoulos and Morimoto 2011), Alzheimer (Lee, Han et al. 2010) e diversos tipos de câncer (Mantovani 2010). Essa nova abordagem das doenças é mais ampla, complexa e de caráter sistêmico, onde os eventos biológicos estariam mais interligados do que se imaginava inicialmente.

Episódios agudos de inflamação estão associados a respostas sistêmicas significativas, como febre, edema e linfadenopatia. Portanto, é pouco provável que esses episódios agudos tenham um papel preponderante na etiologia de diferentes doenças ou condições crônicas, visto que são relativamente raros. De um modo geral, a literatura descreve como elo de ligação entre essas diferentes doenças uma inflamação sistêmica crônica de baixa intensidade. Embora não exista um conceito claro na literatura do que seria essa inflamação de baixa intensidade, o que se vê frequentemente é um aumento de diversas moléculas que de uma forma ou de outra estão ligadas a inflamação, incluindo citocinas, proteínas de fase aguda, moléculas de adesão celular, fatores de crescimento, enzimas, componentes do sistema complemento e outros.

Dentro desse contexto, a doença periodontal têm sido associada a diversas doenças, incluindo doenças cardiovasculares (Kebuschull, Demmer et al. 2010), diabetes (Mealey 2006), Alzheimer (Watts, Crimmins et al. 2008) e parto prematuro e/ou baixo peso ao nascer (Chambrone, Guglielmetti et al. 2011). A resposta inflamatória sistêmica originada a partir da doença periodontal tem sido apontada como responsável por essa associação.

### **Doença periodontal e parto prematuro**

Vários estudos têm investigado a associação entre a doença periodontal e desfechos obstétricos adversos. Duas teorias explicariam a possível influência da doença periodontal sobre o parto prematuro (Michalowicz and Durand 2007). Na primeira, mulheres com doença periodontal poderiam apresentar episódios mais graves e frequentes de bacteremia do que mulheres periodontalmente saudáveis. Essas

bactérias entrariam na corrente sanguínea, colonizariam a unidade materno-fetal e iniciariam uma cascata inflamatória que levaria ao parto prematuro. Na segunda, citocinas geradas dentro do tecido periodontal doente entrariam na circulação sistêmica e precipitariam uma cascata inflamatória similar, mesmo sem a colonização bacteriana na unidade materno-fetal. Independente desta questão, mecanismos inflamatórios é que desencadeariam o processo de parto. Atualmente, a teoria mais aceita é de que a doença periodontal estaria associada ao parto pretermo através de uma inflamação sistêmica de baixa intensidade (Klebanoff and Searle 2006; Moutsopoulos and Madianos 2006).

O parto pretermo e o parto a termo apresentam fundamentalmente a mesma manifestação clínica, diferindo apenas na idade gestacional em que ocorrem. Clinicamente, esses mecanismos se manifestam por contrações uterinas, amadurecimento cervical e ativação da membrana corioamniótica, culminando na ruptura da membrana (Romero, Mazor et al. 1994). Diversas citocinas inflamatórias são fundamentais em todas as etapas gestacionais, incluindo estabelecimento e manutenção da gestação (Bowen, Chamley et al. 2002; Bowen, Chamley et al. 2002). Os biomarcadores inflamatórios também têm sido associados a desfechos obstétricos adversos como aborto espontâneo (Jasper, Tremellen et al. 2007) e parto prematuro (Vogel, Thorsen et al. 2005). Atualmente sabe-se que a inflamação é responsável por uma fração substancial dos nascimentos prematuros, particularmente naqueles ocorridos antes da 32<sup>a</sup> semana de gestação (Goldenberg, Hauth et al. 2000). Citocinas coletadas no líquido amniótico, fluido cervicovaginal, urina, soro e plasma têm sido usadas na tentativa de prever a ocorrência de parto pretermo (Goldenberg, Goepfert et al. 2005). Um aumento na expressão da resposta Th2 e supressão da resposta Th1 estaria associado com uma gravidez normal, embora o paradigma Th1/Th2 possa ser uma simplificação de um sistema muito mais complexo (Chaouat 2007). Uma descrição mais detalhada das características de citocinas associadas a doença periodontal e ao parto pretermo está descrita na tabela 1.

Tabela 1 - Características das citocinas avaliadas no presente estudo

Citocina	Principais Fontes	Principais Atividades Biológicas	Relação com Periodontite	Relação com Prematuridade
IL-1 $\beta$	Principalmente macrófagos. Muitas outras células como neutrófilos, células endoteliais e epiteliais, além de outras citocinas como FNT- $\alpha$ também podem induzir sua produção.	Em baixas concentrações, atua como um mediador local da inflamação, aumentando a expressão de moléculas de adesão leucocitária nas células endoteliais. Em altas concentrações, induz a produção de proteínas de fase aguda, o recrutamento de PMN e mudanças vasculares que podem resultar em destruição tecidual e reabsorção óssea.	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Aumento significativo nos tecidos periodontais e no FCG em sítios doentes comparados com sítios saudáveis (Masada, Persson et al. 1990; Stashenko, Fujiyoshi et al. 1991)</li> <li>- Induz a produção de colagenase e MMPs e a diminuição da produção de inibidores teciduais das MMPs (Ohshima, Otsuka et al. 1994)</li> <li>- Potente citocina associada à reabsorção óssea (Liu, Lerner et al. 2010)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Níveis elevados no líquido amniótico aumentam o risco de nascimentos &lt;34 semanas de gestação(Hillier, Witkin et al. 1993)</li> <li>- Certos polimorfismos (IL-1<math>\beta</math>+3953/3954) estão associados a prematuridade em revisões sistemáticas (Varner and Esplin 2005)</li> <li>- Níveis sistêmicos elevados estiveram significativamente associados ao nascimento com &lt;35 semanas em mulheres com corioamnionite histológica (Gargano, Holzman et al. 2008)</li> </ul>
IL-6	Macrófagos, fibroblastos, células vasculares endoteliais e até mesmo outras citocinas, como a IL-1 $\beta$ e o FNT- $\alpha$ .	Na imunidade inata, estimula a produção de proteínas de fase aguda pelos hepatócitos e contribui para os efeitos sistêmicos da inflamação. Na imunidade adaptativa, estimula a produção de linfócitos B que se diferenciaram em produtores de anticorpos.	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Induz a reabsorção óssea e formação de osteoclastos (Liu, Lerner et al. 2010)</li> <li>- Pacientes com periodontite agressiva apresentam maior produção que pacientes com periodontite crônica e saudáveis (Radvar, Tavakkol-Afshari et al. 2008)</li> <li>- Expressão aumentada está associada a destruição periodontal em diabéticos (Duarte, de Oliveira et al. 2007)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Valores elevados de IL-6 na amniocentese entre a 16<sup>a</sup> e 18<sup>a</sup> semana de gestação conferem risco aumentado de nascimentos antes da 32<sup>a</sup> semana de gestação (Goldenberg, Goepfert et al. 2005)</li> <li>-Níveis elevados no líquido amniótico e secreção cervicovaginal estão associados a prematuridade em gestantes assintomáticas (Vogel, Thorsen et al. 2005)</li> </ul>

---

IL-8	Principalmente monócitos e macrófagos. Outras células como fibroblastos, células endoteliais e epiteliais também são capazes de produzir.	Recrutamento, ativação e degranulação neutrofílica. Também envolvida no processo de angiogênese.	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Reduz sua expressão no FCG após a terapia periodontal (Thunell, Tymkiw et al. 2009)</li> <li>- Níveis elevados de IL-8 no FCG estiveram correlacionados positivamente com maior profundidade de sondagem(Engebretson, Vossughi et al. 2006)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Os níveis séricos estiveram elevados em mulheres que tiveram parto pretermo comparadas as mulheres do grupo controle (Bogavac and Brkic 2009)</li> <li>- Níveis séricos elevados estiveram significativamente associados a prematuridade em mulheres com história prévia de prematuridade (Vogel, Goepfert et al. 2007)</li> </ul>
------	---	--	---	---

---

IL-10	Principalmente macrófagos e linfócitos T, mas outras células como as células dendríticas e células epiteliais também são capazes de produzir.	Funciona como uma inibidora dos macrófagos ativados e células dendríticas, além de inibir a produção de IL-12. Está envolvida no controle da resposta imune inflamatória.	<p>Pacientes com genótipos produzem maior quantidade de IL-10 apresentaram menor progressão de doença periodontal num período de 5 anos (Cullinan, Westerman et al. 2008)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Sítios saudáveis apresentaram níveis maiores de IL-10 comparados a sítios doentes, e os níveis de IL-10 foram elevados após a terapia periodontal (Goutoudi, Diza et al. 2004)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Um aumento nos níveis séricos de IL-10 esteve associado a manutenção da gravidez (Wu, Chen et al. 2001)</li> <li>- Mulheres com aborto recorrente apresentaram níveis menores de IL-10 comparadas a mulheres com gestação normal (Velez, Fortunato et al. 2008)</li> </ul>
-------	---	---	--	---

---

IL-12 (p70)	Macrófagos e células dendríticas. Várias outras células também são capazes de produzir.	Principal mediador da resposta imune inata precoce. Estimula a diferenciação das células CD4+ naive em células Th1, induzindo a produção de IFN- $\gamma$ .	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Os níveis de IL-12 no fluido crevicular gengival são maiores em pacientes com periodontite crônica que sítios com gengivite e sítios saudáveis (Tsai, Tsai et al. 2005).</li> <li>- A terapia periodontal reduziu os níveis sistêmicos de IL-12 em pacientes com diabetes tipo II, independente do uso ou não de antibióticos. (O'Connell, Taba et al. 2008).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Níveis sistêmicos elevados estiveram significativamente associados ao nascimento com &lt;35 semanas em mulheres com corioamnionite histológica (Gargano, Holzman et al. 2008)</li> <li>- Altos níveis séricos de IL-12, quando associados a baixos níveis de IL-18, aumentaram o risco de nascimentos com &lt;34 semanas de gestação (Ekelund, Vogel et al. 2008)</li> </ul>
FNT- $\alpha$	Principalmente macrófagos em resposta a estímulos bacterianos. Outras células como neutrófilos, células NK, células epiteliais e endoteliais também podem produzir.	Recrutamento de neutrófilos e macrófagos para os sítios com infecção e a ativação destas células para erradicação microbiana.	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Antagonistas de FNT- <math>\alpha</math> diminuíram a perda óssea alveolar e a degradação tecidual na periodontite experimental em macacos (Graves, Delima et al. 1998; Delima, Oates et al. 2001)</li> <li>- Está presente em altas concentrações no FCG e nos tecidos periodontais de pacientes doentes, aonde está positivamente correlacionada com MMPs e RANKL (Garlet, Martins et al. 2004; Graves 2008)</li> <li>- Induz a produção de outros mediadores inflamatórios perpetuando a inflamação (Graves and Cochran 2003)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Aumenta a produção in vitro de prostaglandina e cortisol (Haider and Knofler 2009)</li> <li>- Níveis séricos elevados de FNT-<math>\alpha</math> no 1º trimestre gestacional estão associados a nascimentos entre a 34ª e 36ª semanas de gestação (Curry, Thorsen et al. 2009)</li> <li>- O tratamento com inibidores de FNT-<math>\alpha</math> aumentou a taxa de nascidos vivos em gestantes com aborto espontâneo recorrente (Winger and Reed 2008)</li> </ul>

## **Citocinas**

Citocinas são pequenas proteínas, geralmente com peso molecular menor que 25kDa, produzidas em resposta a diversos antígenos e que medeiam/regulam reações imunes e inflamatórias (Abbas, Lichtman et al. 2007). O conceito de proteínas dedicadas ao recrutamento e ativação de células em locais de inflamação é conhecido desde o século XIX, embora apenas na década de 1970 o termo "citocinas" tenha sido introduzido para se referir a peptídeos envolvidos em uma ampla gama de sinalização e ativação celular (Apostolakis, Vogiatzi et al. 2009). Até recentemente, as citocinas eram nomeadas aleatoriamente, sem uma definição clara de qual sistema estava sendo utilizado. Inicialmente, as citocinas produzidas por monócitos foram denominadas monocinas, enquanto as produzidas por linfócitos foram chamadas linfocinas. As citocinas produzidas por leucócitos e que agem sobre outros leucócitos foram chamadas interleucinas. Entretanto, este termo é imperfeito, porque por razões históricas muitas citocinas que são sintetizadas apenas por leucócitos e que agem apenas sobre os leucócitos não são denominadas interleucinas, enquanto que muitas interleucinas são produzidas ou agem em outras células que não leucócitos. Mesmo assim, o termo tem sido útil porque novas citocinas são descobertas constantemente e numeradas em sequência (IL-1, IL2 e assim por diante), mantendo assim uma nomenclatura padrão (Abbas, Lichtman et al. 2007). Atualmente, mais de 300 citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento foram descritos e têm sido usados para predição, diagnóstico e tratamento de inúmeras doenças (Commins, Borish et al. 2010). Sabe-se que citocinas afetam basicamente todos os processos biológicos, incluindo formação e desenvolvimento embrionário, diferenciação de células tronco, resposta específica e não específica a antígenos, progressão de processos degenerativos relacionados à idade, eficácia de vacinas e rejeição de enxertos. Elas são estudadas em praticamente todos os campos da biologia, com ênfase nas áreas de inflamação, imunologia, aterosclerose e câncer (Dinarello 2007).

A secreção de citocinas é um evento transitório e autolimitado. Não existem reservatórios dessas moléculas, e uma vez sintetizadas elas são rapidamente secretadas, resultando em uma intensa liberação quando necessário. Uma das



características mais marcantes dessas proteínas é o fato de que elas muitas vezes têm efeitos pleiotrópicos e redundantes. Pleiotropismo se refere à capacidade de uma mesma citocina agir em diferentes tipos celulares. Esta propriedade permite que uma citocina possa mediar efeitos biológicos diversos; entretanto, limita seu uso terapêutico devido aos possíveis efeitos colaterais indesejados resultantes. A redundância refere-se ao fato de que diferentes citocinas podem desempenhar as mesmas funções. Devido a essa característica, antagonistas usados contra uma citocina podem não ter o efeito desejado, pois dentro da complexa rede de sinalização celular outras citocinas podem realizar a mesma função. Outra característica marcante em comum das citocinas é a capacidade de estimular a produção de outras citocinas, levando a cascatas em que uma segunda ou terceira citocina possa mediar os efeitos biológicos da primeira. Duas citocinas podem ter efeito antagônico sobre a ação de outra, produzirem efeitos aditivos, ou, em alguns casos, até mesmo sinérgicos. A maioria das citocinas agem próximas de onde eles são produzidas, tanto na mesma célula que a secreta (ação autócrina) quanto em uma célula vizinha (ação parácrina). Quando produzidas em grandes quantidades, as citocinas podem entrar na circulação e agir a distância do local de produção (ação endócrina). As respostas celulares à maioria das citocinas consistem em mudanças na expressão gênica em células-alvo, resultando na expressão de novas funções e, por vezes, na proliferação das células-alvo. É importante ressaltar que os ensaios imunológicos atualmente utilizados detectam apenas a presença do antígeno de determinada citocinas, e não sua atividade biológica. O efeito de uma citocina depende da sua concentração extracelular, da presença (ou ausência) do receptor de superfície específico na célula alvo, e dos sinais que são enviados em cascata após a ligação ao receptor (de Jager, Bourcier et al. 2009).

### **O paradigma Th1/Th2 e as novas descobertas**

Em 1986, Mosmann et al. em um estudo clássico num modelo murino, descreveram pela primeira vez dois subconjuntos de células T helper (Th) CD4+ baseados no tipo de citocinas que essas células produziam em resposta a determinados antígenos. Surgiam então os conceitos de células Th1, que secretavam IFN- $\gamma$  e IL-2; e células Th2, que secretavam IL-4 e IL-5, sendo esses subconjuntos

mutuamente antagônicos (Mosmann, Cherwinski et al. 1986). Esse modelo de diferenciação celular postula que, embora as células Th CD4<sup>+</sup> indiferenciadas estão atreladas a um antígeno em particular, devido ao seu receptor de células T específico, elas não estão comprometidas com um perfil de secreção de citocinas em particular. Na verdade, quem determina o modo pelo qual a célula T irá se diferenciar é o microrganismo invasor (antígeno) para o qual a célula T é específica em combinação com a célula apresentadora de antígeno, sendo que essa combinação resultará presumivelmente na resposta imunológica mais apropriada (Gaffen and Hajishengallis 2008). Como o número de citocinas descritas vem aumentando constantemente, o paradigma Th1/Th2 precisou adaptar-se, incluindo outras citocinas que não são necessariamente secretadas por células T CD4<sup>+</sup>, mas que promovem tanto o desenvolvimento de células Th1 quanto de células Th2. Assim, citocinas como a IL-12, que embora não seja secretada por células T, foram associadas a resposta Th1, enquanto citocinas como a IL-10 e a IL-13 foram associadas a resposta Th2 (Gor, Rose et al. 2003). Desde a descoberta inicial de Mosmann e colaboradores, passaram-se mais de 20 anos e praticamente todas as doenças ou condições com algum componente inflamatório foram examinadas e interpretadas dentro deste paradigma, incluindo a doença periodontal e o parto pretermo.

De uma maneira geral, o padrão Th1 de resposta imune estaria associado a presença de citocinas pró-inflamatórias e a uma resposta imune celular, enquanto o padrão Th2 de resposta imune estaria associado a presença de citocinas anti-inflamatórias e a uma resposta imune humoral (Murphy and Reiner 2002). Apesar de sua simplicidade encantadora, o modelo Th1/Th2 não explica adequadamente muitos aspectos da imunidade celular. Embora seja indiscutível que as células T CD4<sup>+</sup> apresentem perfis polarizados de secreção de citocinas (Th1 ou Th2), estas respostas extremamente polarizadas são geralmente observadas apenas em condições artificiais de pesquisa. O verdadeiro desafio ao paradigma Th1/Th2 vem quando se tenta aplicar esta dicotomia simplista na explicação e resolução de doenças complexas do sistema imunológico. Em condições que se aproximam da realidade, várias citocinas não se encaixam de maneira óbvia em nenhum dos subconjuntos, pois podem induzir tanto a resposta Th1 quanto a Th2. Além disso, nem todas as citocinas de um subconjunto

agem de maneira similar. Por exemplo, a IL-4 e a IL-13 (citocinas Th2) aumentam significativamente a secreção de IL-12 (Th1) por macrófagos e células dendríticas, enquanto que a IL-10 (Th2) suprime a produção de IL-12 pelas mesmas células. Outro exemplo é o da IL-18, que quando combinada com a IL-12 induz a produção de IFN- $\gamma$  levando a clássica resposta Th1. Entretanto, na ausência de IL-12, a IL-18 induz a uma resposta Th2 (Dinarello 2007). Estes dados indicam que a análise individual do papel de cada citocina é mais produtiva do que o uso de subconjuntos Th1 ou Th2, porque nem todas as citocinas dentro de um determinado subconjunto irão mediar funções idênticas.

Recentemente, duas novas linhagens de células T CD4<sup>+</sup> foram descritas: Th17 e Treg (regulatory T-cells), sendo que a primeira induz a resposta inflamatória enquanto a segunda suprime a mesma. Esses subconjuntos de células T não só têm funções antagônicas, como também inibem a produção um do outro. As principais citocinas associadas a resposta Treg são a IL-2, a IL-10 e TGF- $\beta$ , enquanto que a IL-6 e a IL-21 são citocinas importantes na diferenciação das células T em direção a uma resposta Th17, e a IL-23 é fundamental para expansão, sobrevivência e patogenicidade dessas células (Jankovic and Trinchieri 2007; Stockinger and Veldhoen 2007). Essa descoberta de novas linhagens de células T fez com que fosse necessário revisar o paradigma Th1/Th2. Muito do que se sabe a respeito do papel das células Th1 em várias doenças é baseado num modelo murino “IL-12 deficiente”, o qual contém uma deleção da subunidade IL-12p40. No entanto, a subunidade IL-12p40 também é parte componente da IL-23. Assim, uma deleção na subunidade IL-12p40 afeta não só a IL-12, mas também a IL-23, fazendo com que os resultados antes creditados a resposta Th1 possam ter, na verdade, um componente Th17 (Trinchieri, Pflanz et al. 2003).

Tendo o acima exposto, paradigma Th1/Th2 tem sido questionado recentemente. Alguns autores sugerem que os defensores da dicotomia Th1/Th2 são excessivamente cuidadosos em fazer com que os dados fiquem em conformidade com o modelo, assim como Procusto, personagem da mitologia grega esticava ou amputava seus convidados até que se ajustassem ao tamanho exato de sua cama (Gor, Rose et al. 2003). Outros consideram esse paradigma, apesar de útil, demasiadamente simplista (Chaouat 2007), sendo que mesmo citocinas consideradas prejudiciais no contexto inflamatório (como

por exemplo IFN- $\gamma$  e FNT- $\alpha$ ) podem desempenhar importantes papéis no controle de infecções.

## **Justificativa**

A doença periodontal tem sido frequentemente associada ao parto pretermo. A plausibilidade biológica para tal associação baseia-se numa inflamação sistêmica de baixa intensidade de origem periodontal. Entretanto, os estudos de intervenção que investigaram o efeito do tratamento periodontal durante a gestação não observaram reduções significativas na incidência de prematuridade. Como diversas citocinas têm sido associadas tanto a doença periodontal quanto ao parto pretermo, supõe-se que elas desempenhem um papel importante nessa associação. Entretanto, nenhum estudo investigou a correlação entre níveis sistêmicos e periodontais desses biomarcadores ao longo da gestação, assim como poucos estudos avaliaram o impacto da terapia periodontal durante a gestação sobre esses biomarcadores.

Nossa hipótese inicial era de que se uma relação causal entre a inflamação periodontal e sistêmica existisse, uma forte correlação deveria ser observada entre os níveis sistêmicos e periodontais de marcadores moleculares de inflamação. Se essa hipótese fosse confirmada, a terapia periodontal teria tanto um efeito local quanto sistêmico nos níveis de biomarcadores inflamatórios.

## Objetivo

### **Objetivo geral:**

Avaliar a relação entre níveis sistêmicos e periodontais de biomarcadores inflamatórios relacionados com a resposta imune periodontal e também com os mecanismos de parto.

### **Objetivos específicos:**

- A. Avaliar a correlação e concordância dos níveis de IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70 e FNT- $\alpha$  no soro e no fluido crevicular gengival (FCG) em gestantes.
- B. Avaliar o efeito da terapia periodontal não cirúrgica sobre os níveis de IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70 e FNT- $\alpha$  no soro e no fluido crevicular gengival (FCG) em gestantes.

## **Metodologia**

### **Origem**

A presente tese é composta por dois estudos aninhados a um ensaio clínico randomizado que avaliou o impacto do tratamento periodontal não cirúrgico durante a gestação sobre a incidência de prematuridade (Weidlich, Moreira et al. 2012). Este ensaio clínico randomizado será chamado aqui de Estudo Inicial, visto que a partir dele desenvolveram-se outros estudos, incluindo os dois que compõem essa tese. O primeiro estudo da tese é uma avaliação transversal onde utilizou-se os dados coletados no exame inicial do Estudo Inicial. O segundo estudo da tese é um ensaio clínico no qual utilizou-se uma sub-amostra do Estudo Inicial, com dados coletados no exame inicial, em 26-28 semanas e após o parto.

### **Delineamento do estudo**

As participantes do Estudo Inicial foram aleatoriamente alocadas ao grupo teste ou controle após uma estratificação quanto ao hábito de fumar (figura 1). Mulheres que fumavam mais de 5 cigarros por dia no momento da entrevista inicial foram consideradas fumantes. A randomização foi realizada através de uma tabela de números aleatórios gerada por computador. A alocação ao tratamento foi por envelopes opacos numerados em série que foram abertos após o término do exame clínico. As participantes do grupo teste receberam tratamento periodontal não cirúrgico completo, enquanto as pacientes do grupo controle receberam apenas uma sessão de remoção de cálculo supragingival e instrução de higiene bucal. O Comitê de Ética do Hospital Materno Infantil Presidente Vargas aprovou o protocolo do estudo (Anexo 1) e as pacientes assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 2) concordando em participar do estudo.

### **Amostra**

Todas as mulheres que procuraram atendimento prenatal no Hospital Materno Infantil Presidente Vargas (HMIPV) foram consideradas elegíveis para o Estudo Inicial. O recrutamento para o estudo aconteceu de abril de 2007 a junho de 2009. Para serem incluídas, as mulheres deveriam ter entre 18 e 35 anos e apresentarem idade

gestacional menor que 20 semanas. Mulheres com múltiplos fetos, recebendo tratamento ortodôntico ou que necessitassem de profilaxia antimicrobiana não foram incluídas no estudo. Todas as mulheres que preencheram os critérios de inclusão e assinaram o consentimento informado foram incluídas, independente do estado periodontal. Para o estudo 1 desta tese, as primeiras 100 pacientes que apresentaram dados clínicos e demográficos completos, assim como amostras de soro e fluido crevicular gengival foram incluídas. Para o estudo 2 desta tese, todas as pacientes que apresentaram dados clínicos e demográficos completos, assim como amostras de soro e fluido crevicular gengival no exame 1, 2 e 3 foram incluídas. Sendo assim, 30 pacientes no grupo teste e 30 pacientes no grupo controle foram incluídas.

### **Dados maternos**

Um questionário estruturado compreendendo dados demográficos, sócio econômicos, e história médica e odontológica foi usado para coletar dados maternos (Anexo 3) Resumidamente, dados antropométricos, ocorrências gestacionais prévias e atuais, hospitalização durante a gestação, uso de medicações, histórico de doenças sexualmente transmissíveis, história médica pessoal e familiar, consumo de álcool e tabaco, assim como hábitos de higiene bucal foram coletados. Durante o estudo, a ocorrência de problemas gestacionais como infecção urinária ou vaginal, pré-eclâmpsia, diabetes gestacional, uso de medicações e internações hospitalares foram coletados usando dados do prontuário hospitalar. O questionário foi previamente testado e dados foram coletados por examinadores treinados. A reprodutibilidade foi avaliada através da avaliação repedita de questões chave em 10% da amostra após uma semana ( $\kappa=0.79$ ).

A idade gestacional foi determinada por um ginecologista usando informações de exames físicos, dados de ciclos menstruais e ultrassonografias. Os recém-nascidos foram examinados por neonatologistas não envolvidos no estudo, através dos procedimentos hospitalares de rotina.



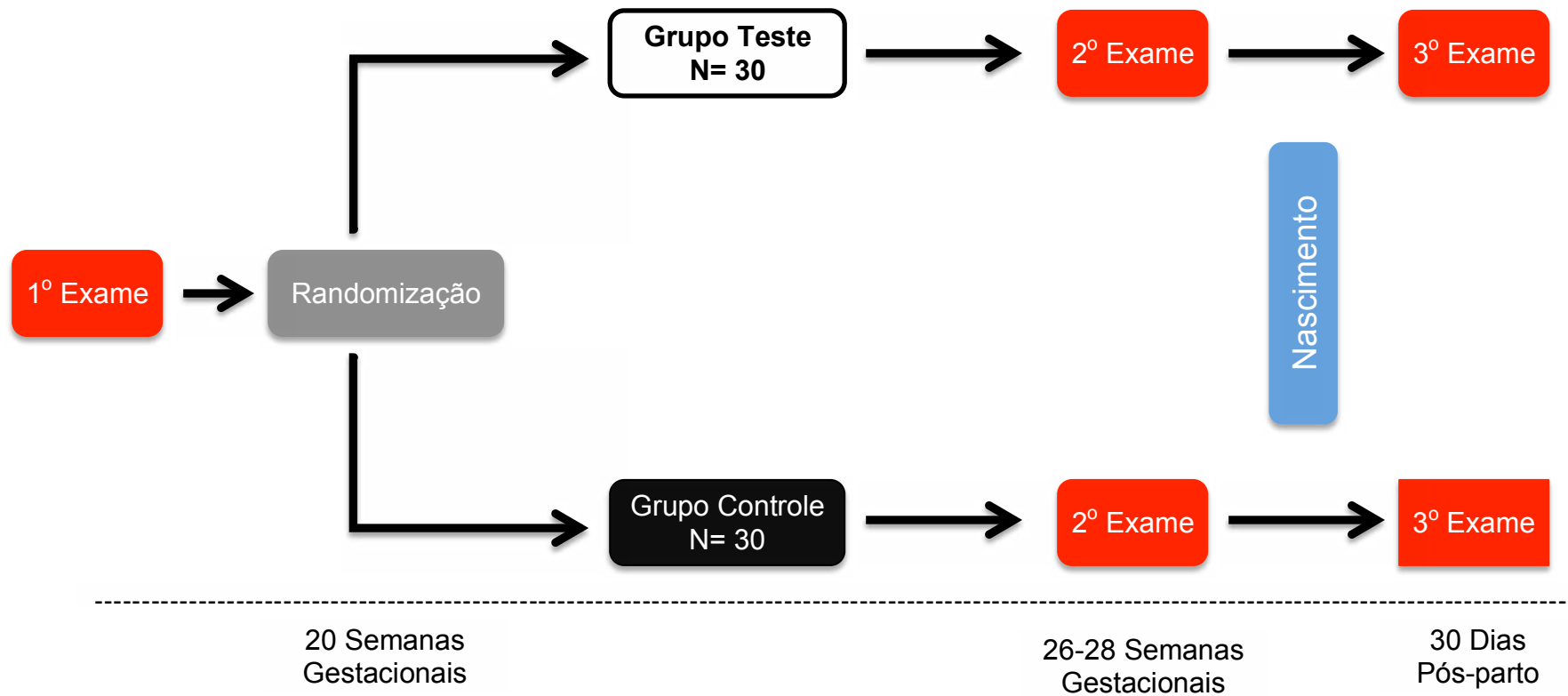


Figura 1. Desenho experimental dos estudos que compõem a tese.

(Estudo 1 – Avaliação transversal com dados coletados no 1º Exame. Estudo 2 – Avaliação longitudinal de dados coletados no 1º, 2º e 3º exames).

## **Exame clínico periodontal**

O exame clínico periodontal foi realizado por 3 examinadores treinados e calibrados. Os dados foram anotados por um assistente treinado em fichas de anotação (Anexo 4). Todos os dentes permanentes erupcionados, excluindo-se os terceiros molares, foram examinados. Os parâmetros foram registrados em seis sítios por dente, utilizando espelho bucal plano e sonda periodontal (Neumar, NCP 15, São Paulo, Brasil). Índice de placa (Silness and Loe 1964), Índice gengival (Loe 1967), presença de fatores retentivos de placa, profundidade de sondagem (PS), sangramento à sondagem (SS) e nível de inserção clínica (NIC) foram avaliados. A reprodutibilidade dos examinadores foi acessada em 10% das pacientes com pelo menos uma hora de intervalo entre os exames clínicos. O coeficiente de correlação intraclasse variou entre 0.95 e 0.96 para PS e entre 0.84 e 0.93 para NIC. O kappa ponderado ( $\pm 1\text{mm}$ ) variou de 0.89 a 0.90 para PS e 0.84 a 0.88 para NIC. Todas as participantes foram examinadas no exame inicial, entre 26-28 semanas e 30 dias após o parto.

## **Intervenção**

O tratamento periodontal foi realizado por dois periodontistas na unidade odontológica do HMIPV. O grupo teste recebeu tratamento periodontal não cirúrgico até a 24<sup>a</sup> semana de gestação. O tratamento consistiu na remoção de fatores retentivos de placa (incluindo a remoção de cálculo supragingival e restos radiculares, selamento de cavidades de cárie, e adaptação de restaurações e próteses mal adaptadas), assim como na raspagem subgengival e alisamento radicular com anestesia local. Instruções de higiene bucal eram fornecidas em cada consulta de acordo com necessidades individuais. Não houve limite em relação ao número de consultas empregado para completar o tratamento. Após o tratamento, as pacientes eram vistas pelo menos uma vez por mês, de acordo com necessidades individuais, para assegurar um bom controle de placa. O grupo controle recebeu o tratamento padrão oferecido a todas as pacientes do HMIPV, que consistia de uma sessão única de remoção de cálculo supragengival e instrução de higiene bucal. O mesmo tratamento fornecido ao grupo teste foi oferecido ao grupo controle após o parto. As pacientes de ambos os grupos receberam tratamento de urgência sempre que necessário.

## **Coleta das amostras de sangue e FCG**

Quatro sítios por paciente foram selecionados dentre aqueles com maior profundidade de sondagem para a coleta de FCG. Se dois ou mais sítios apresentassem a mesma profundidade de sondagem, eles eram aleatoriamente selecionados para coleta. Os sítios selecionados foram adequadamente isolados com rolos de algodão e/ou gaze, e gentilmente secos com jatos de ar. A placa supragengival foi cuidadosamente removida com curetas, e tiras de papel absorvente (Periopaper, Oraflow, New York, USA) foram inseridas por 30 segundos na bolsa/sulco periodontal. Tiras com marcas de sangue ou saliva foram descartadas. As tiras de papel foram imediatamente transferidas para um eppendorf e congeladas até a análise. As amostras de sangue foram coletadas pela manhã, após 8 horas de jejum, por assistentes treinados. Cinco mililitros de sangue foram coletados por paciente através de punção venosa e armazenados em um tubo de vácuo sem anticoagulante. As amostras foram imediatamente centrifugadas a  $3.000 \times g$  por 5min, e o soro foi mantido congelado até análise.

## **Mensuração das citocinas**

A concentração de citocinas no soro e no FCG foi determinada por citometria de fluxo usando o BD™ Cytometric Bead Array (BD Biosciences, San Diego, CA). As tiras de papel contendo o FCG foram eluídas em um tubo eppendorf com 200ul de uma solução tampão fosfato salina e 2ul (20 mM) de fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) por 30 minutos. Na sequência, as tiras foram transferidas para um segundo tubo eppendorf, com a mesma solução, por mais 30 minutos. O conteúdo dos dois tubos eppendorfs foi homogeneizado e 50uL da solução foram utilizados para a análise do FCG. O kit utilizado (Human Inflammatory Cytokine Kit - BD Biosciences, San Diego, CA) permite a discriminação das seguintes citocina: IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70 e FNT- $\alpha$ . O processamento das amostras e a análise dos dados foram realizados de acordo com as especificações do fabricante. De maneira resumida, as amostras de soro e FCG foram incubadas com micro esferas de diferentes intensidades do fluorógeno PE sensibilizadas com anticorpos anti-IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70 e FNT- $\alpha$  durante 3hs, em temperatura ambiente e protegidas da luz. As amostras foram então lavadas

com solução tampão fornecida pelo fabricante e os níveis de citocinas foram avaliados através de um citômetro de fluxo (FACS Calibur - BD Biosciences, San Diego, CA). Os dados foram gerados e tabulados por um software específico (BD CBA Analysis Software - BD Biosciences, San Diego, CA).

### **Análise dos dados**

Os dados foram analisados utilizando o programa estatístico STATA 11.1 (Stata for Mac, Stata Corporation, College Station, TX, USA). Médias e desvios padrão para todos os parâmetros clínicos foram calculados e reportados, assim como distribuição de frequências para dados demográficos, socioeconômicos e comportamentais.

#### *Manuscrito 1*

Os níveis de citocinas no soro e no FCG foram apresentados através de médias, desvios padrão, medianas, percentis 25% e 75%. A concordância e a correlação entre os níveis de citocinas no soro e FCG foram avaliados pelo cálculo do coeficiente de correlação de concordância (CCC) e pelo coeficiente de correlação de Pearson ( $r$ ), respectivamente. Gráficos de dispersão foram utilizados para representar os níveis de citocinas no soro e no FCG. Uma análise de regressão linear ranqueada foi realizada para avaliar o efeito dos níveis periodontais de citocinas sobre os níveis sistêmicos. Uma regressão linear ranqueada também foi utilizada para avaliar o efeito da média de PS e do percentual médio de SS sobre os níveis de citocinas no soro e no FCG. Uma análise estratificada foi realizada para avaliar o impacto de variáveis comportamentais, condições médicas e medicamentos sobre a associação entre os níveis de citocinas no soro e FCG. As análises foram estratificadas de acordo com tabagismo, infecções genitourinárias e uso de antibióticos. O indivíduo foi considerado a unidade analítica e o nível de significância estatística foi estabelecido em 5%.

#### *Manuscrito 2*

Médias e desvios padrão para todos os parâmetros clínicos foram calculados e reportados. Diferenças entre os grupos foram testadas através de teste-t independente. Diferenças quanto a distribuição de dados demográficos, socioeconômicos e comportamentais foram avaliadas através do teste de chi-quadrado e do teste exato de Fisher. Os níveis de citocinas no soro e FCG foram apresentados como medianas, percentis 25% e 75%. Diferenças entre os grupos foram testadas através da prova de

Mann-Whitney e diferenças dentro de um mesmo grupo ao longo do tempo foram acessadas através da prova de Wilcoxon. O método de Bonferroni foi utilizado para ajustar para múltiplas comparações. O indivíduo foi considerado a unidade analítica e o nível de significância estatística foi estabelecido em 5%.

# *Manuscrito 1*

*Relationship between cytokine levels in serum and gingival crevicular fluid (GCF) in pregnant women*

Cytokine 58, April 2012, pp. 34-39



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Cytokine

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/issn/10434666](http://www.elsevier.com/locate/issn/10434666)

## Relationship between cytokine levels in serum and gingival crevicular fluid (GCF) in pregnant women

Tiago Fiorini<sup>a,b,\*</sup>, Priscila Vianna<sup>c</sup>, Patricia Weidlich<sup>a</sup>, Marta Liliana Musskopf<sup>a</sup>, Carlos Heitor Cunha Moreira<sup>a</sup>, José Artur Bogo Chies<sup>c</sup>, Cassiano Kuchenbecker Rösing<sup>a</sup>, Rui Vicente Oppermann<sup>a</sup>, Cristiano Susin<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Section of Periodontology, School of Dentistry, Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil

<sup>b</sup>Departments of Periodontics & Oral Biology, Georgia Health Sciences University, College of Dental Medicine, USA

<sup>c</sup>Department of Genetics, Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 2 August 2011

Received in revised form 24 November 2011

Accepted 22 December 2011

Available online 18 January 2012

#### Keywords:

Periodontal disease

Interleukins

Gingival crevicular fluid

Cross-sectional study

Low-grade inflammation

### ABSTRACT

**Background:** Periodontal disease has been linked to systemic diseases/disorders and a low-grade systemic inflammatory status originated from periodontitis has been proposed as a possible explanation for this association. This study evaluates the relationship, early in pregnancy, between gingival crevicular fluid (GCF) and serum levels of a panel of cytokines that have been implicated in PTB and periodontal disease.

**Methods:** One hundred pregnant women aged 18–35 years old with a gestational age up to 20 weeks were included (mean  $\pm$  SD gestational age: 16.1  $\pm$  3.5 weeks). Four periodontal sites per subject were randomly selected for GCF collection. Serum and GCF levels of IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70 and TNF- $\alpha$  were analyzed using a cytometric bead array. Regression and correlation analyses were used to assess the relationship between serum and GCF cytokine levels.

**Results:** Participants had widespread periodontal inflammation but limited periodontal destruction. Cytokine levels were significantly higher in GCF than serum for all cytokines but IL-10. GCF levels had small but significant effect on serum levels for IL-10 ( $\beta = 0.34 \pm 0.09$ ,  $p < 0.01$ ), IL-12p70 ( $\beta = 0.48 \pm 0.08$ ,  $p < 0.01$ ) and TNF- $\alpha$  ( $\beta = 0.29 \pm 0.09$ ,  $p < 0.01$ ). Periodontal probing depth and bleeding on probing were significantly associated with GCF levels for IL-1 $\beta$ , IL-6 and IL-8; however, they had negligible effect on serum cytokine levels. Correlation between GCF and serum levels was non-significant, except for IL-12p70, which showed a significant but small correlation between the two sources ( $r = 0.32$ ,  $p = 0.001$ ).

**Conclusions:** GCF cytokine levels were not strongly associated with serum cytokine levels in pregnant women with widespread periodontal inflammation but limited periodontal destruction.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

A low-grade systemic inflammation has been linked to several diseases including atherosclerosis [1], diabetes [2], adverse gestational outcomes [3], cancer [4] and Alzheimer's disease [5]. Although the pathophysiological mechanisms explaining these relationships remain unclear, higher serum levels of pro-inflammatory mediators have been proposed to play a key role. In this regard, attempts have been made to use cytokines and other inflammatory biomarkers to predict disease outcomes [6,7].

Recently, periodontal diseases have been linked to systemic conditions including cardiovascular disease and adverse obstetric outcomes including miscarriage, stillbirth and preterm birth

\* Corresponding author. Address: Ramiro Barcelos, 2492, Porto Alegre, RS 90035-003, Brazil. Tel.: +55 (51) 3308 5318; fax: +55 (51) 3346 6542.

E-mail address: [fiorintiago@gmail.com](mailto:fiorintiago@gmail.com) (T. Fiorini).

(PTB) [8,9]. Periodontal diseases are inflammatory disorders that affect surrounding and supporting tissues of teeth and are caused by pathogenic oral microorganisms [10]. Whereas bacteria are necessary for disease onset, the inflammatory host response determines the severity of tissue destruction [11]. Patients affected by destructive periodontal disease have been shown to produce higher local levels of numerous cytokines associated with connective tissue breakdown and bone resorption, including IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  [12]. In contrast, periodontal treatment is associated with decreased local cytokines levels [13]. In this context, GCF has been consistently used to measure cytokines and other biomarkers released within the periodontal tissues.

A low-grade inflammatory status originated from periodontitis that contributes to create a systemic inflammatory phenotype has been proposed as a possible explanation for the link between periodontal diseases and several other systemic diseases/disorders [14,15]. Corroborating this hypothesis, studies have observed that

periodontitis patients have higher serum levels of numerous inflammatory biomarkers including CRP, IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$ , suggesting a systemic pro-inflammatory status [16–18]. However, recent clinical studies have failed to demonstrate reductions in PTB rates after periodontal therapy questioning a causal relationship [19,20]. To date, few studies have investigated the relationship between GCF and serum cytokine levels. Our hypothesis was that if a causal relationship between periodontal and systemic inflammation existed, a strong correlation should be observed between serum and GCF cytokine levels. The aim of this study was to assess the relationship between serum and GCF levels of a panel of cytokines in a pregnant sample.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Study design and sample

The present study sample comprised a subsample of pregnant women previously enrolled in a clinical trial designed to assess the effect of nonsurgical periodontal treatment performed during pregnancy on the reduction of preterm/low birth weight rates [21]. Eligible single-term pregnant women aged between 18 and 35 years with a gestational age up to 20 weeks were included (mean  $\pm$  SD gestational age: 16.1  $\pm$  3.5 weeks). Gestational age was established by a gynecologist using information of sequential physical exams, data from menstrual cycles and ultrasound. Clinical data and immunological samples were collected up to 20 weeks of gestation. The first 100 consecutive women with complete socio-demographic and clinical data, and available serum and GCF samples were included in the present analysis. The Ethical Committee of the Maternal Hospital Presidente Vargas, Porto Alegre, Brazil, approved the study protocol and each participant signed an informed consent form.

### 2.2. Maternal data

A questionnaire comprising demographics, socioeconomic status, medical and dental histories were used. In brief, anthropometric data, previous and current pregnancy conditions, hospitalization during pregnancy, use of medications, personal and family history of diseases, smoking, alcohol consumption and oral hygiene habits were assessed. The questionnaire used was previously tested and trained interviewers collected data. Reproducibility of this information was tested by repeated assessment of key-questions in 10% of the sample with one-week interval ( $\kappa$  = 0.79). Socio-demographic and clinical data were collected at 16.1 ( $\pm$ 3.5) gestational weeks.

### 2.3. Oral health status

Periodontal clinical examination was performed by three calibrated examiners and recorded in preset forms by trained assistants. Full-mouth, six sites per tooth periodontal examination was carried out using a manual periodontal probe (Neumar, North Carolina Probe 15, São Paulo, Brazil). Plaque Index [22], Gingival Index [23]; supragingival calculus, cavities, overhanging restorations; bleeding on probing (BOP), periodontal probing depth (PPD) and clinical attachment level (CAL) were recorded. BOP was recorded when periodontal bleeding was observed after gentle probing at the bottom of the sulcus/pocket. PPD was defined as the distance from the free gingival margin to the bottom of the pocket/sulcus. CAL was defined as the distance from the cemento-enamel junction to the bottom of the pocket/sulcus. Measurements were made in millimeters, rounded to the closest whole millimeter [24]. Participants were examined up to 20 weeks of gestation.

Reproducibility during the study was assessed in 10% of the participants and the intraclass correlation coefficient ranged between 0.95 and 0.96 for probing depth and 0.84 and 0.93 for attachment loss.

### 2.4. GCF and blood samples collection

Four sites per subject were selected for GCF collection among the deepest periodontal probing depths. If two or more sites showed the same PPD, an electronic device was used to select sites for GCF sampling. Teeth were isolated with cotton rolls and gently air-dried. Supragingival plaque was carefully removed with curettes and absorbent paper strips (Periopaper, Oraflow, New York, USA) were inserted for 30 s in the periodontal pocket. Strips with blood marks or saliva were discarded. The volume for each strip was measured with a calibrated meter (Periotron 8000, Oraflow, New York, USA). Paper strips were immediately transferred to an eppendorf tube pooled and stored frozen until analysis. Blood samples were collected in the morning after 8 h of fasting by trained assistants. Five milliliters of blood were withdrawn from each subject by venipuncture into a free-anticoagulant vacuum tube. Samples were immediately centrifuged at 3000g for 5 min, and serum was kept frozen until assayed. GCF and serum samples were collected at 16.1 ( $\pm$ 3.3) and 16.0 ( $\pm$ 3.5) gestational weeks, respectively.

### 2.5. Cytokines assessment

The concentration of GCF and serum cytokines was determined by flow cytometry using the BD™ Cytometric Bead Array (CBA). The frozen GCF strips were eluted in an eppendorf with 200  $\mu$ l phosphate buffered saline and 2  $\mu$ l phenylmethylsulfonyl fluoride (20 mM) solution for 30 min. Then, strips were transferred to a second eppendorf with the same solution for additional 30 min. The content of the two eppendorfs was homogenized and 50  $\mu$ l of this solution was used for the GCF analysis. The Human Inflammatory Cytokine Kit (BD Biosciences, San Diego, CA) used allows the discrimination of the following cytokines: IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70 and TNF- $\alpha$ . These biomarkers were chosen based on previous studies that showed an important role of these cytokines in periodontal disease [25] and premature birth [26]. Sample processing and data analysis were performed according to the manufacturer's specification. Briefly, GCF and serum samples were incubated with the six cytokine capture beads and PE-conjugated detection antibodies for 3 h at room temperature and protected from light. Samples were washed and cytokine levels were assessed using a FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences, San Diego, CA). Sample results were generated in graphical and tabular format using the BD CBA Analysis Software (BD Biosciences, San Diego, CA).

### 2.6. Statistical analysis

Data analysis was performed using Stata 11.1 for Mac (Stata, College Station, TX, USA). Means and standard deviations for all clinical parameters, and frequencies of distribution for demographic, socioeconomic and behavioral data were calculated. Serum and GCF cytokine levels were presented as mean, standard deviation, median, 25% and 75% percentile. Serum and GCF cytokine levels were presented using scatterplots. Agreement and correlation between GCF and serum levels were assessed by calculating Concordance Correlation Coefficient (CCC) and Pearson correlation coefficient ( $r$ ), respectively. A ranked regression analysis was performed to evaluate the effect of GCF levels on serum cytokine levels and to evaluate the effect of mean PPD and BOP on serum levels and GCF cytokine levels. Stratified analysis was conducted to assess the impact of behavioral variables, medical condi-



tions and medications on the association between GCF and serum cytokine levels. Analyses were stratified according to smoking (ever/never), genitourinary infections (yes/no) and antibiotic use (yes/no). Patients were considered the unit of analysis and statistical significance was set at 5%.

### 3. Results

Most women included in present study were younger than 30 year-old, non-white, with high school or less, medium–low socioeconomic status, non-smoking, normal weight and did not have a previous history of miscarriage or preterm birth. One quarter of the patients used antibiotics, mainly due to genitourinary infections, and very few women presented other medical conditions (Table 1). All participants declared no regular alcohol consumption during pregnancy. The mean number of teeth present was 25.53 ( $\pm 3.77$ ). Periodontal parameters are presented in Table 2. Overall, widespread periodontal inflammation and localized periodontal destruction was observed affecting most of the participants. Selected GCF sites showed overly inflammation as assessed by bleeding on probing (>75% of sites) and probing depth ( $3.85 \pm 0.64$  mm), and limited attachment loss.

All six cytokines evaluated presented low serum levels with IL-8 and IL-6 having the highest serum concentration (Table 3). In contrast, a wide range of values was observed in GCF with IL-8 and IL-1 $\beta$  having the highest GCF levels. Compared to serum levels, IL-8 and IL-1 $\beta$  were approximately 40 and 80 times higher in GCF. GCF levels for other cytokines were consistently higher than serum levels, although differences were within 2-fold.

The effect of GCF levels on serum cytokine levels was evaluated by a ranked regression analysis (Table 4). A significant association was observed for IL-10, IL-12p70 and TNF- $\alpha$ , but not for IL-1 $\beta$ , IL-6 and IL-8. Adjusting for important co-factors did not significantly affect the estimates. In spite of these significant associations, GCF levels of IL-10 and TNF- $\alpha$  only explained approximately 10% of their serum levels ( $r^2 = 0.11$  and  $r^2 = 0.09$ , respectively) whereas

**Table 1**  
Demographic, socioeconomic, behavioral and gestational data.

N = 100		
Age (years)	18–24	42
	25–30	42
	31–35	16
Race	White	65
	Non-white	35
Education	Elementary	31
	High school	58
	College/University	11
Socio economic status	Low	22
	Medium–low	48
	Medium–High	23
	High	7
Smoking	Never	73
	Former	6
	Current	21
BMI before gestation (kg/m <sup>2</sup> )	<18.5	8
	18.6–24.99	54
	25–29.99	22
	$\geq 30$	16
Current medical/obstetric data	Diabetes	4
	Preeclampsia	2
	Alcohol consumption	0
	Genitourinary infection	14
	Antibiotics use	25
Previous medical/obstetric data	Primiparous women	45
	Previous miscarriage	13
	Previous preterm	10

**Table 2**  
Mean ( $\pm$ SD) for clinical parameters.

	Full mouth	GCF sampled sites
Visible plaque (% sites)	53.59 (48.69–58.50)	58.50 (51.41–65.59)
Gingival bleeding (% sites)	34.07 (30.49–37.65)	40.50 (34.65–46.35)
Calculus (% sites)	21.20 (18.39–24.00)	20.0 (14.49–25.51)
BOP%	47.21 (42.82–51.60)	76.0 (70.15–81.85)
PPD $\geq 3$ mm (% sites)	48.69 (45.80–51.59)	99.30 (98.4–100)
PPD $\geq 4$ mm (% sites)	09.66 (08.04–11.29)	68.50 (60.50–76.50)
CAL $\geq 1$ mm (% sites)	10.48 (07.76–13.20)	13.80 (8.60–19.00)
CAL $\geq 2$ mm (% sites)	04.73 (03.10–06.37)	7.80 (3.80–11.70)

IL-12p70 GCF levels explained approximately 23% of IL-12p70 serum levels.

The effect of PPD on serum and GCF levels is presented in Table 5. No significant associations could be observed between PPD and serum cytokine levels. On the other hand, PPD was significantly associated with GCF levels of IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 and IL-10, but not IL-12p70 and TNF- $\alpha$ . Table 6 presents the effect of BOP on serum and GCF levels. TNF- $\alpha$  was the only serum cytokine significantly associated with BOP. Regarding GCF cytokines, IL-1 $\beta$ , IL-6 and IL-8 were significantly associated with BOP, but not IL-10, IL-12p70 and TNF- $\alpha$ .

Correlation between GCF and serum levels was generally low (Fig. 1). An exception was IL-12p70, which showed a significant but small correlation between periodontal and systemic levels ( $r = 0.32$ ,  $p = 0.001$ ). Similar to correlation, concordance between GCF and serum levels was also generally low ranging from  $-0.02$  to  $0.14$ . A stratified analysis was conducted to assess the impact of behavioral variables, medical conditions and medications on the relationship between GCF and serum cytokine levels. Only small differences on the estimates of association were observed after stratifying to smoking, genitourinary infections and antibiotic use (data not shown). Diabetes, preeclampsia and alcohol consumption affected too few subjects to allow for a specific analysis.

### 4. Discussion

The present study evaluated the relationship between serum and GCF levels of six cytokines related to periodontal disease and PTB in a sample of 100 pregnant women. To the best of our knowledge, this is the first study to investigate this relationship in pregnant women. Low serum levels were observed for all cytokines, whereas a wider range was observed in GCF levels. Serum and GCF levels were significantly associated for IL-10, IL-12p70 and TNF- $\alpha$ ; however, GCF cytokine levels poorly explained serum levels except for IL-12p70. PPD was associated with IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 and IL-10 GCF levels, whereas it had negligible effects on serum cytokines levels. BOP was associated with IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 GCF levels and serum TNF- $\alpha$ . Overall, concordance and correlation between serum and GCF levels were low. An exception was IL-12p70, which showed a moderate but significant correlation between periodontal and systemic levels.

Several inflammatory mediators have been found in periodontal tissues surrounding teeth in health and disease. GCF, a blood serum transudate primarily composed by host inflammatory cells, bacterial components, enzymes and antibodies, has been proposed as a surrogate to assess early inflammatory changes within periodontal tissues. High levels of several cytokines including IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF and interferon-gamma have been associated with destructive periodontal disease (periodontitis) and increased risk of disease progression [12,27,28]. Moreover, healthy sites (teeth without inflammation) in patients affected by periodontal disease have also been shown to express higher levels of IL-1 $\beta$  and IL-8 [29–31] suggesting that GCF cytokine levels might be used to infer patient pro-inflammatory profiles.

**Table 3**  
Mean, standard deviation, median, 25% and 75% percentile of serum and GCF cytokine levels (pg/mL).

	Serum		GCF		p-Value <sup>a</sup>
	Mean (±SD)	Median (25/75 percentile)	Mean (±SD)	Median (25/75 percentile)	
IL-1β	1.9 (±1.0)	1.7 (1.3–2.2)	156.2 (±182.2)	102.4 (50.7–204.6)	<0.001
IL-6	4.3 (±3.2)	3.7 (2.8–4.4)	5.8 (±4.7)	4.5 (2.6–7.6)	0.011
IL-8	11.0 (±9.4)	9.0 (7.0–11.2)	435.3 (±377.3)	301.8 (189.1–503.4)	<0.001
IL-10	1.5 (±1.1)	1.0 (1.0–1.8)	1.8 (±1.7)	1.0 (0.9–1.6)	0.595
IL-12p70	1.7 (±0.8)	1.3 (1.2–2.0)	3.0 (±3.1)	1.5 (1.3–2.8)	<0.001
TNF-α	1.3 (±1.0)	1.1 (0.9–1.1)	2.8 (±2.5)	1.7 (1.1–3.6)	<0.001

<sup>a</sup> Wilcoxon signed-rank test.

**Table 4**  
Effect of GCF cytokine levels on serum cytokine levels (ranked linear regression).

	β (±SE)	p-Value	r <sup>2</sup>
<i>Crude</i>			
IL-1β	0.02 (±0.10)	0.81	0.00
IL-6	0.07 (±0.10)	0.46	0.01
IL-8	0.14 (±0.10)	0.17	0.02
IL-10	0.34 (±0.09)	0.0001	0.11
IL-12p70	0.48 (±0.08)	0.0001	0.23
TNF-α	0.29 (±0.09)	0.002	0.09
<i>Adjusted*</i>			
IL-1β	0.05 (±0.11)	0.67	0.09
IL-6	0.11 (±0.10)	0.28	0.21
IL-8	0.11 (±0.10)	0.30	0.22
IL-10	0.32 (±0.09)	0.001	0.17
IL-12p70	0.42 (±0.09)	0.0001	0.32
TNF-α	0.30 (±0.08)	0.0001	0.24

\* Adjusted for age, smoking status, race and body mass index.

To date, few studies have assessed concomitantly GCF and systemic cytokines levels. Orozco et al. evaluated serum and GCF levels of IL-1β, IL-12p40, IL-12p70 and IL-18 in 10 gingivitis and 10 periodontitis patients. While IL-12p40 presented significant higher serum levels compared to GCF, small amounts of IL-1β, IL-12p70 and IL-18 were detected in serum [32]. Trombelli et al. also reported limited amounts of serum IL-1β in experimentally induced gingivitis, while the GCF levels were significantly higher [31]. Fentoglu et al. evaluated the serum and GCF levels of IL-1β, IL-6 and TNF-α in 123 hyperlipidemic patients and 68 systemically healthy controls [18] and found consistently higher serum than GCF levels of all cytokines evaluated, irrespectively of periodontal status or lipid status. Direct comparisons of these results with our findings are not possible since specific evaluation of the relationship between GCF and serum cytokine levels was not performed in these studies.

**Table 6**  
Effect of bleeding on probing (BOP) on serum and GCF cytokine levels (ranked linear regression).

	BOP full-mouth			BOP 4 deepest sites		
	β ± SE	p-Value	r <sup>2</sup>	β ± SE	p-Value	r <sup>2</sup>
<i>Serum</i>						
IL-1β	-0.11 ± 0.14	0.42	<0.01	-3.38 ± 10.37	0.74	<0.01
IL-6	0.13 ± 0.13	0.31	0.01	0.10 ± 9.91	0.99	<0.01
IL-8	0.20 ± 0.12	0.09	0.02	15.18 ± 8.58	0.08	0.02
IL-10	-0.16 ± 0.13	0.23	0.01	-12.68 ± 8.31	0.13	0.01
IL-12p70	-0.11 ± 0.13	0.38	<0.01	-9.10 ± 9.61	0.35	<0.01
TNF-α	-0.26 ± 0.13	0.04	0.04	-19.34 ± 8.21	0.02	0.04
<i>GCF</i>						
IL-1β	0.61 ± 0.09	<0.001	0.21	43.18 ± 8.81	<0.001	0.19
IL-6	0.41 ± 0.11	<0.001	0.09	28.87 ± 9.06	0.002	0.08
IL-8	0.42 ± 0.12	<0.001	0.10	22.01 ± 9.78	0.03	0.05
IL-10	0.20 ± 0.12	0.10	0.02	-1.57 ± 9.40	0.87	<0.01
IL-12p70	0.02 ± 0.12	0.88	<0.01	-8.72 ± 10.26	0.40	<0.01
TNF-α	0.04 ± 0.12	0.77	<0.01	-8.02 ± 8.89	0.37	<0.01

**Table 5**  
Effect of periodontal probing depth (PPD) on serum and GCF cytokine levels (ranked linear regression).

	PPD full-mouth			PPD deepest sites		
	β ± SE	p-Value	r <sup>2</sup>	β (±SE)	p-Value	r <sup>2</sup>
<i>Serum</i>						
IL-1β	-1.77 ± 11.76	0.88	<0.01	0.37 ± 4.99	0.94	<0.01
IL-6	1.56 ± 10.80	0.89	<0.01	1.54 ± 4.26	0.72	<0.01
IL-8	9.06 ± 10.69	0.40	<0.01	7.72 ± 4.03	0.06	<0.01
IL-10	-2.99 ± 11.68	0.80	<0.01	-3.15 ± 4.34	0.47	<0.01
IL-12p70	-2.97 ± 11.25	0.79	<0.01	-4.31 ± 4.35	0.32	<0.01
TNF-α	-10.40 ± 10.98	0.35	0.01	-2.71 ± 5.03	0.59	<0.01
<i>GCF</i>						
IL-1β	38.38 ± 7.96	<0.001	0.13	20.26 ± 4.11	<0.001	0.20
IL-6	40.10 ± 9.49	<0.001	0.14	15.06 ± 4.59	0.001	0.11
IL-8	35.08 ± 9.56	<0.001	0.11	13.22 ± 5.03	0.01	0.08
IL-10	25.87 ± 9.58	<0.01	0.07	2.69 ± 4.66	0.56	<0.01
IL-12p70	14.43 ± 10.14	0.16	0.02	0.62 ± 4.45	0.89	<0.01
TNF-α	13.56 ± 9.72	0.17	0.02	0.02 ± 4.60	0.99	<0.01

Our findings are in agreement with other studies that have also reported low serum levels of IL-1β, IL-6, IL-8 and TNF-α in pregnant women [33,34]. Furthermore, the correlation between cytokine levels in serum and other sources during pregnancy seems to be weak. Vogel et al. did not find significant correlations between cytokine levels of serum and cervicovaginal secretions for a broad panel of cytokines in 62 pregnant women in the early second trimester of gestation [26]. Similar results were observed by Chow et al. for serum and amniotic fluid concentrations of 27 different cytokines [35]. Collectively, studies show that the correlation between cytokine levels in different tissues and body fluids during pregnancy appears to be small and several factors may influence cytokine production, including maternal age, bone mass index and previous history of preterm birth.

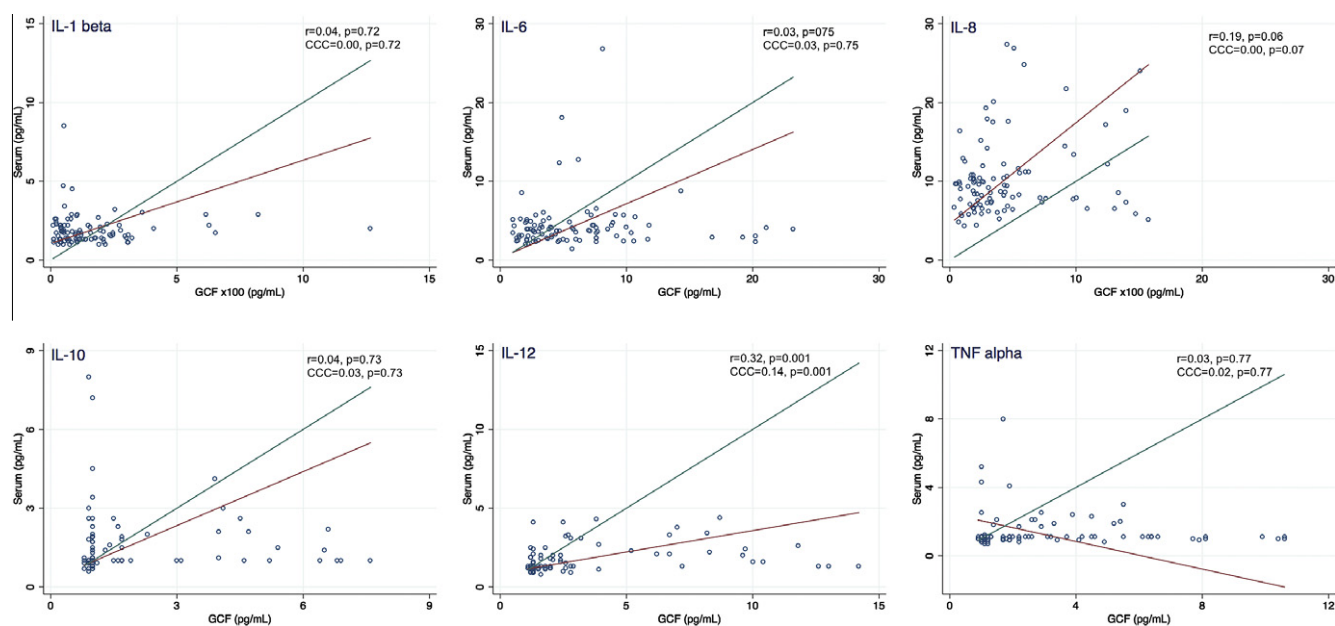


Fig. 1. Scatterplot of the distribution of serum and GCF cytokines levels ( $n = 100$ ;  $r$  = Pearson correlation coefficient; CCC = concordance correlation coefficient).

Within the framework of this study, we tested the hypothesis that periodontal inflammation may be associated with a low-grade inflammatory systemic condition by assessing the relationship between GCF and serum cytokine levels. Serum and GCF cytokine levels were significantly associated for IL-10, IL-12p70 and TNF- $\alpha$ ; however, GCF levels could only moderately explain serum levels for IL-12p70. Moreover, concordance and correlations were low for 5 out of 6 cytokines, indicating that not only the actual concentrations of cytokines found in GCF were not observed in serum, but also that subjects with higher concentrations of GCF levels did not have higher serum levels. Therefore, our results do not support the hypothesis that periodontal disease could lead to a low-grade systemic inflammatory status in pregnant women.

Among the limitations of the present study is the small percentage of the women who had severe periodontal destruction. The disease pattern observed in this sample is consistent with women in childbearing age in this population [36,37] and the inclusion of only women with severe destructive periodontitis could limit the external validity of our findings. Nevertheless, it is important to acknowledge that the localized nature of the disease may have an impact on the results if this relationship is heavily dependent on disease severity. Thus, extrapolation of our findings to other subpopulations should be made with caution. Moreover, the present results are limited to the reduced number of cytokines evaluated in this study, and the relationship between serum and GCF levels of other biomarkers could be different.

In conclusion, GCF levels poorly explained serum levels of a panel of pro-inflammatory cytokines. The high GCF levels of certain cytokines do not seem to translate into high systemic levels in pregnant women with widespread periodontal inflammation but limited periodontal destruction. Future studies addressing the complex cytokine network and its interactions with genetic and environment factors may help to better elucidate the oral-systemic connections.

## Funding

This study was supported by the National Council of Research–Brazil (CNPq), Grant No. 403099/2005-6 and Grant No. 402396/2008-1.

## Conflict of interest

The authors declare not to have conflicts of interest.

## References

- Libby P, Okamoto Y, Rocha VZ, Folco E. Inflammation in atherosclerosis: transition from theory to practice. *Circ J* 2010;74:213–20.
- Garcia C, Feve B, Ferre P, Halimi S, Baizri H, Bordier L, et al. Diabetes and inflammation: fundamental aspects and clinical implications. *Diabetes Metab* 2010;36:327–38.
- Blank V, Hirsch E, Challis JR, Romero R, Lye SJ. Cytokine signaling, inflammation, innate immunity and preterm labour—a workshop report. *Placenta* 2008;29(Suppl. A):S102–4.
- Mantovani A. Molecular pathways linking inflammation and cancer. *Curr Mol Med* 2010;10:369–73.
- Lee YJ, Han SB, Nam SY, Oh KW, Hong JT. Inflammation and alzheimer's disease. *Arch Pharm Res* 2010;33:1539–56.
- Conde-Agudelo A, Papageorgiou A, Kennedy S, Villar J. Novel biomarkers for the prediction of the spontaneous preterm birth phenotype: a systematic review and meta-analysis. *BJOG* 2011.
- Wang TJ, Gona P, Larson MG, Toffler GH, Levy D, Newton-Cheh C. Multiple biomarkers for the prediction of first major cardiovascular events and death. *N Engl J Med* 2006;355:2631–9.
- Kebschull M, Demmer RT, Papapanou PN. “Gum bug, leave my heart alone!”—epidemiologic and mechanistic evidence linking periodontal infections and atherosclerosis. *J Dent Res* 2010;89:879–902.
- Chambrone L, Guglielmetti MR, Pannuti CM, Chambrone LA. Evidence grade associating periodontitis to preterm birth and/or low birth weight: I. A systematic review of prospective cohort studies. *J Clin Periodontol* 2011.
- Pihlstrom BL, Michalowicz BS, Johnson NW. Periodontal diseases. *Lancet* 2005;366:1809–20.
- Van Dyke TE. The management of inflammation in periodontal disease. *J Periodontol* 2008;79:1601–8.
- Graves D. Cytokines that promote periodontal tissue destruction. *J Periodontol* 2008;79:1585–91.
- Thunell DH, Tymkiw KD, Johnson GK, Joly S, Burnell KK, Cavanaugh JE, et al. A multiplex immunoassay demonstrates reductions in gingival crevicular fluid cytokines following initial periodontal therapy. *J Periodontol Res* 2010;45:148–52.
- Moutsopoulos NM, Madianos PN. Low-grade inflammation in chronic infectious diseases: paradigm of periodontal infections. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1088:251–64.
- Klebanoff M, Searle K. The role of inflammation in preterm birth—focus on periodontitis. *BJOG* 2006;113(Suppl 3):43–5.
- Loos BG. Systemic markers of inflammation in periodontitis. *J Periodontol* 2005;76:2106–15.
- Andrukhov O, Ulm C, Reischl H, Nguyen PQ, Matejka M, Rausch-Fan X. Serum cytokine levels in periodontitis patients in relation to the bacterial load. *J Periodontol* 2010.

- [18] Fentoglu O, Koroglu BK, Hicyilmaz H, Sert T, Ozdem M, Sutcu R, et al. Pro-inflammatory cytokine levels in association between periodontal disease and hyperlipidaemia. *J Clin Periodontol* 2011;38:8–16.
- [19] Macones GA, Parry S, Nelson DB, Strauss JF, Ludmir J, Cohen AW, et al. Treatment of localized periodontal disease in pregnancy does not reduce the occurrence of preterm birth: results from the Periodontal Infections and Prematurity Study (PIPS). *Am J Obstet Gynecol* 2010;202:147 e1–148.
- [20] Offenbacher S, Beck JD, Jared HL, Mauriello SM, Mendoza LC, Couper DJ, et al. Effects of periodontal therapy on rate of preterm delivery: a randomized controlled trial. *Obstet Gynecol* 2009;114:551–9.
- [21] Weidlich P, Cunha Moreira CH, Fiorini T, Muszkopf ML, Mariano da Rocha J, Oppermann MLR, et al. Effect of nonsurgical periodontal therapy and strict plaque control on preterm/lowbirth weight: a randomized controlled clinical trial. *Clin Oral Investig* 2011, in press.
- [22] Silness J, Loe H. Periodontal disease in pregnancy li correlation between oral hygiene and periodontal condition. *Acta odontologica Scandinavica* 1964;22:121–35.
- [23] Loe H. The gingival index, the plaque index and the retention index systems. *J Periodontol* 1967;38(Suppl.):610–6.
- [24] Armitage GC. The complete periodontal examination. *Periodontol* 2000 2004;34:22–33.
- [25] Liu YC, Lerner UH, Teng YT. Cytokine responses against periodontal infection: protective and destructive roles. *Periodontol* 2000 2010;52:163–206.
- [26] Vogel I, Goepfert AR, Thorsen P, Skogstrand K, Hougaard DM, Curry AH, et al. Early second-trimester inflammatory markers and short cervical length and the risk of recurrent preterm birth. *J Reprod Immunol* 2007;75:133–40.
- [27] Fitzsimmons TR, Sanders AE, Slade GD, Bartold PM. Biomarkers of periodontal inflammation in the Australian adult population. *Aust Dent J* 2009;54:115–22.
- [28] Reinhardt RA, Stoner JA, Golub LM, Lee HM, Nummikoski PV, Sorsa T, et al. Association of gingival crevicular fluid biomarkers during periodontal maintenance with subsequent progressive periodontitis. *J Periodontol* 2010;81:251–9.
- [29] Teles R, Sakellari D, Teles F, Konstantinidis A, Kent R, Socransky S, et al. Relationships among gingival crevicular fluid biomarkers, clinical parameters of periodontal disease, and the subgingival microbiota. *J Periodontol* 2010;81:89–98.
- [30] Tymkiw KD, Thunell DH, Johnson GK, Joly S, Burnell KK, Cavanaugh JE, et al. Influence of smoking on gingival crevicular fluid cytokines in severe chronic periodontitis. *J Clin Periodontol* 2011;38:219–28.
- [31] Trombelli L, Scapoli C, Carrieri A, Giovannini G, Calura G, Farina R. Interleukin-1 beta levels in gingival crevicular fluid and serum under naturally occurring and experimentally induced gingivitis. *J Clin Periodontol* 2010;37:697–704.
- [32] Orozco A, Gemmel E, Bickel M, Seymour GJ. Interleukin-1beta, interleukin-12 and interleukin-18 levels in gingival fluid and serum of patients with gingivitis and periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* 2006;21:256–60.
- [33] Michalowicz BS, Novak MJ, Hodges JS, DiAngelis A, Buchanan W, Papananou PN, et al. Serum inflammatory mediators in pregnancy: changes after periodontal treatment and association with pregnancy outcomes. *J Periodontol* 2009;80:1731–41.
- [34] Offenbacher S, Lin D, Strauss R, McKaig R, Irving J, Barros SP, et al. Effects of periodontal therapy during pregnancy on periodontal status, biologic parameters, and pregnancy outcomes: a pilot study. *J periodontol* 2006;77:2011–24.
- [35] Chow SS, Craig ME, Jones CA, Hall B, Catteau J, Lloyd AR, et al. Differences in amniotic fluid and maternal serum cytokine levels in early midtrimester women without evidence of infection. *Cytokine* 2008;44:78–84.
- [36] Susin C, Dalla Vecchia CF, Oppermann RV, Haugejorden O, Albandar JM. Periodontal attachment loss in an urban population of Brazilian adults: effect of demographic, behavioral, and environmental risk indicators. *J Periodontol* 2004;75:1033–41.
- [37] Susin C, Haas AN, Valle PM, Oppermann RV, Albandar JM. Prevalence and risk indicators for chronic periodontitis in adolescents and young adults in south Brazil. *J Clin Periodontol* 2011;38:326–33.

# *Manuscrito 2*

*Effect of Nonsurgical Periodontal Therapy on Serum and Gingival  
Crevicular Fluid Cytokine Levels During Pregnancy and  
Pospartum*

Submetido ao Journal of Periodontal Research

## **Effect of Nonsurgical Periodontal Therapy on Serum and Gingival Crevicular Fluid Cytokine Levels During Pregnancy and Postpartum**

Tiago Fiorini <sup>1 2</sup>

José Mariano da Rocha<sup>1</sup>

Patricia Weidlich <sup>1</sup>

Priscila Vianna <sup>3</sup>

Carlos Heitor Cunha Moreira <sup>1</sup>

José Artur Bogo Chies <sup>3</sup>

Cassiano Kuchenbecker Rösing <sup>1</sup>

Cristiano Susin <sup>2</sup>

Rui Vicente Oppermann <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Section of Periodontology, School of Dentistry, Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil

<sup>2</sup> Departments of Periodontics & Oral Biology, Georgia Health of Sciences University, College of Dental Medicine, USA

<sup>3</sup> Department of Genetics, Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil

**Running title:** Effect of Periodontal Therapy on Cytokines During Pregnancy

**Corresponding author:**

Tiago Fiorini

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

Telephone: +55 (51) 3308 5318

Fax: +55 (51) 3346 6542

E-mail: [fiorintiago@gmail.com](mailto:fiorintiago@gmail.com) (e-mail can be published)

**KEY WORDS**

Cytokines, low-grade systemic inflammation, Periodontal-systemic disease interactions, non-surgical periodontal treatment, randomized controlled clinical trial

**Funding:** This study was supported by the National Council of Research – Brazil (CNPq), Grant No 403099/2005-6 and Grant No 402396/2008-1.

**Conflict of interest:** The authors declare not to have conflicts of interest

**Manuscript information:** the manuscript has 2982 words and 4 tables.

## **ABSTRACT**

*Background and Objective:* A low-grade systemic inflammatory status originated from periodontal infection has been proposed to explain the association between periodontal disease and systemic conditions including adverse obstetric outcomes. The aim of this study was to evaluate the effect of periodontal therapy during pregnancy on gingival crevicular fluid (GCF) and serum levels of six cytokines associated with periodontal disease and preterm birth.

*Material and Methods:* A subsample of 60 women (18-35 years-old) up to 20 gestational weeks previously enrolled in a larger randomized clinical trial was used. Participants were randomly allocated to receive comprehensive nonsurgical periodontal therapy before 24 gestational weeks (n=30, test group) or only one appointment of supragingival calculus removal (n=30, control group). Clinical data, blood and GCF samples were collected at baseline, 26-28 gestational weeks and 30 days after delivery. IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70 and TNF- $\alpha$  levels were analyzed by flow cytometry.

*Results:* After treatment, a major reduction in periodontal inflammation was observed in the test group with bleeding on probing decreasing from 49.62% to 11.66% of sites (p<0.001). Periodontal therapy significantly reduced GCF levels of IL-1 $\beta$  and IL-8 (p<0.001). However, no significant effect of therapy was observed on serum cytokine levels. After delivery, GCF levels of IL-1 $\beta$  in test group were significantly lower than in control group (p<0.001), but there were no significant differences between test and control groups regarding serum cytokine levels.

*Conclusions:* Although periodontal therapy during pregnancy successfully reduced periodontal inflammation and GCF cytokine levels, it did not have a significant impact on serum biomarkers.

## **KEY WORDS**

Cytokines, Inflammation, Periodontal medicine, Nonsurgical periodontal therapy, Inflammatory mediator, Systemic host effect



Periodontitis has been associated with several systemic conditions including cardiovascular diseases\_(1), diabetes (2) and adverse obstetric outcomes (3). The biological plausibility for such relationship is based on the inflammatory response that is initiated and perpetuated by cytokines released in response to periodontal infection. This inflammatory burden may have repercussions beyond the oral cavity, leading to a low-grade systemic inflammatory status that may affect the course of gestation (4).

Early observational studies reported a strong association between destructive periodontal disease and adverse obstetric outcomes (5, 6). Although initial findings were confirmed by epidemiological studies (7, 8) and some randomized clinical trials (9-11) larger interventional studies could not confirm a beneficial effect of periodontal therapy on PTLBW (12-15). This lack of effectiveness in reducing preterm rates could be explained, at least in part, by the conflicting evidence about the impact of periodontal treatment on systemic pro-inflammatory mediators. While some clinical studies have shown serum cytokine levels reduction after periodontal therapy (16, 17) other investigations did not confirm this systemic effect (18, 19).

To the best of our knowledge, no studies have concomitantly evaluated the effect of periodontal therapy on GCF and serum cytokine levels during pregnancy and after delivery. Our hypothesis was that although periodontal therapy has a local effect on cytokine levels, this local effect does not have a significant impact on systemic cytokine levels. The aim of this study was to evaluate the effect of nonsurgical periodontal therapy on gingival crevicular fluid (GCF) and serum cytokine levels.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Study design and sample**

The present study used a subsample of pregnant women previously enrolled in a randomized controlled clinical trial designed to assess the effect of the periodontal treatment performed during pregnancy on the reduction of PTLBW rates (20). The first 60 women who had complete clinical and immunological data available according to study design were selected. Recruitment for the study was performed from April/2007 to June/2009. Women aged 18 to 35 years old with a gestational age up to 20 weeks were randomly allocated to the test or control groups using a block-stratified

strategy according to smoking status. A randomization table was computer generated and allocation to treatment was concealed in an opaque, sealed and serially numbered envelope that was opened after the completion of the baseline examination. Gestational age was established by a gynecologist using information of sequential physical exams, data from menstrual cycles and ultrasound. Women with multiple fetuses, conditions that needed antibiotic prophylaxis for dental treatment or under orthodontic therapy were not included. Clinical data and immunological samples were collected at baseline (before 20 weeks of gestation), after treatment (26-28 weeks of gestation) and 30 days postpartum. Study sample comprised 30 women in the control group and 30 in the test group. GCF and blood samples for 3 patients were lost during processing, so data for 57 women were available for analysis. The Ethical Committee of the Maternal Hospital Presidente Vargas, Porto Alegre, Brazil, approved the study protocol and each participant signed an informed consent form.

### **Maternal data**

A structured questionnaire comprising demographics, socioeconomic status, medical and dental histories was used. In brief, anthropometric data, previous and current pregnancy conditions, hospitalization during pregnancy, medications, personal and family history of diseases, smoking, alcohol consumption and oral hygiene habits were assessed. During the study, the occurrence of gestational events such as vaginosis, urinary infections, preeclampsia, gestational diabetes, medications and hospitalization were recorded using hospital records. The questionnaire used was previously tested and trained interviewers collected data. Reproducibility of this information was tested by repeated assessment of key-questions in 10% of the sample with one-week interval ( $\kappa=0.79$ ).

### **Periodontal clinical examination**

Periodontal clinical examination was performed by three 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 (21),

Gingival Index (22), 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 intraclass correlation coefficient ranged between 0.95 and 0.96 for PPD and 0.84 and 0.93 for CAL. Participants were examined at baseline, between 26 and 28 gestational weeks and 30 days after delivery.

### **GCF and Blood Samples Collection**

Four sites per subject were randomly selected for the GCF collection among the deepest periodontal probing depths. Teeth were isolated with cotton rolls and gently air-dried. Supragingival plaque was carefully removed with curettes and absorbent paper strips (Periopaper, Oraflow, New York, USA) were inserted for 30 seconds in the periodontal pocket. Strips with blood marks or saliva were discarded. The volume for each strip was measured with a calibrated meter (Periotron 8000, Oraflow, New York, USA). Paper strips were immediately transferred to an Eppendorf tube and stored frozen until analysis. Blood samples were collected in the morning after 8 hours of fasting by trained assistants. Five milliliters of blood were withdrawn from each subject by venipuncture into a anticoagulant-free vacuum tube. Samples were immediately centrifuged at 3000×g for 5min, and serum was kept frozen until assayed

### **Cytokine Assessment**

The concentration of GCF and serum cytokines was determined by flow cytometry (BD™ Cytometric Bead Array). The frozen GCF strips were eluted inserted in an Eppendorf tube with a 200 µl phosphate buffered saline and 2 µl phenylmethylsulfonyl fluoride (20 mM) solution for 30 minutes. Then strips were transferred to a second Eppendorf tube with the same solution for additional 30 minutes. The content of two Eppendorf tubes were homogenized and 50 µl of this solution were used for the GCF analysis. The Human Inflammatory Cytokine Kit (BD Biosciences, San Diego, USA ) used allows the discrimination of the following cytokines: IL-1β, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, and TNF-α. Sample processing and data analysis were performed according to the manufacturer's specification. Briefly, GCF and serum samples were incubated with

the six cytokine capture beads and PE-conjugated detection antibodies for 3hs at room temperature and protected from light. Samples were washed and cytokine levels were assessed using a FACSCalibur flow cytometer. Sample results were generated in graphical and tabular format using the BD CBA Analysis Software.

### **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. Treatment included excavation and sealing of cavities, removal of overhanging restorations, extraction of hopeless teeth, supragingival calculus removal, and subgingival scaling and root planning under local anesthesia. Oral hygiene instructions were given in each appointment. No limits were imposed to the number of dental visits needed to accomplish periodontal therapy. 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 received the standard dental treatment rendered to all patients at the Hospital, comprising a one-hour session of supragingival calculus removal and oral hygiene instruction. The same comprehensive periodontal therapy provided to the test group was offered for the control group after delivery. Patients in both experimental groups received pain relief treatment whenever necessary. No significant differences between test and control groups regarding the occurrence of gestational events were observed (data not shown). 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 Stata 11.1 for Mac (Stata, College Station, USA). Means and standard deviations for all clinical parameters were calculated and reported. Differences between groups were assessed using independent t-tests. Sample distribution according to demographic, socioeconomic and behavioral data was assessed using chi-square and fisher's exact test. Serum and GCF cytokine levels were presented as median, 25% and 75% percentile. Differences between treatment groups

were assessed by Mann-Whitney test and differences among experimental periods were assessed using Wilcoxon signed-rank test. Holm-Bonferroni method was used to adjust for multiple comparisons. Statistical significance was set at 5%.

## RESULTS

Distribution of participants according to demographics, socioeconomic status and behavioral variables is described on Table 1. GCF and blood samples for three patients were lost during processing, so data for 57 women were available for analysis. Most women were younger than 30 years, white, with high school education, medium-low socioeconomic status, never smokers, normal weight, non-primiparous and did not have previous history of miscarriage or preterm birth. No significant differences were observed between treatment groups with regards to these characteristics.

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 with bleeding on probing decreasing from 49.62% to 11.66% of sites ( $p < 0.001$ ) and PPD $\geq$ 4mm decreasing from 9.79% to 2.32% of sites ( $p < 0.001$ ). These parameters remained stable after delivery. On the other hand, the control group had significantly higher percentage of sites with plaque, supragingival calculus, gingival bleeding, bleeding on probing and PPD $\geq$ 3mm and PPD $\geq$ 4mm than the test group post-treatment and after delivery. Only borderline significant differences between groups were observed for CAL after periodontal treatment and delivery.

Table 3 presents GCF cytokine levels according to treatment groups and experimental periods. Compared to serum levels, GCF amounts of IL-1 $\beta$  and IL-8 were consistently higher. No significant differences were observed for IL-6, IL-10, IL-12p70 and TNF- $\alpha$  between treatment groups or among experimental periods. Periodontal therapy significantly reduced GCF levels of IL-1 $\beta$  and this reduction remained statistically significant after delivery. The test group had significantly lower IL-1 $\beta$  GCF levels than the control group after treatment and delivery. Regarding IL-8, there were no

significant differences between treatment groups throughout the study. When analyses within groups through the experimental periods were performed, only the test group had significantly decreased IL-8 GCF level after treatment, but this difference did not remain significantly after delivery.

Serum cytokine levels are presented in Table 4. No significant differences were observed between groups or among experimental periods for IL-1 $\beta$ , IL-10, IL-12p70 and TNF- $\alpha$  serum levels. Inconsistent trends were observed for IL-6 and IL-8 serum levels, with both cytokines levels increasing over time reaching statistical significance after delivery among controls. In the test group, IL-6 did not change significantly during the study, whereas IL-8 postpartum was significantly higher than post-treatment but no differences were observed between baseline and postpartum.

## **DISCUSSION**

The present analysis was carried out to assess the effect of nonsurgical periodontal treatment on systemic and local inflammatory biomarkers during pregnancy and postpartum. To the best of our knowledge, this is the first study that concomitantly evaluated the effect of periodontal therapy on serum and GCF levels of six cytokines that have been associated with periodontal disease and preterm birth. Although periodontal therapy during pregnancy successfully reduced clinical signs of periodontal inflammation and GCF levels of IL-8 and IL-1 $\beta$ , it did not seem to have a major impact on serum inflammatory biomarkers.

The systemic impact of local periodontal inflammation has been hypothesized as a possible explanation for the observed association between periodontal disease and systemic disorders (4, 23). Corroborating this hypothesis, periodontitis patients have shown higher total number of leukocytes and plasma levels of C-reactive protein (CRP) than healthy controls (24). Compared to healthy individuals, periodontitis patients also presented higher serum levels of IL-1 $\beta$  (25), IL-6 (26, 27), TNF- $\alpha$  and IL-10 (28) and IL-12 (29). These findings have been used to support the notion that periodontitis may perpetuate a low-grade systemic inflammation status.

Results concerning the impact of periodontal therapy on systemic inflammation in pregnant samples are scarce. Recently, a multicenter study with 823 women evaluated

the effect of periodontal treatment on serum levels of CRP, PGE<sub>2</sub>, MMP-9, fibrinogen, endotoxin, IL-1 β, IL-6, IL-8 and TNF-α (30). No significant differences were observed between groups for any of the biomarkers evaluated. In contrast to our results, high levels of periodontal inflammation was still observed after periodontal therapy (13). An early pilot study by Offenbacher et al. comprising 53 patients evaluated the effect of periodontal therapy during pregnancy on serum and GCF biomarkers after delivery (10). Similar to our findings, a significant impact of periodontal therapy on IL-1β GCF levels was observed, whereas no differences were observed between experimental groups for IL-6.

Conflicting evidence of the systemic impact of periodontal therapy in non-pregnant samples have been observed in interventional studies. D’Aiuto et al. showed that non-surgical periodontal treatment significantly reduced serum levels of IL-6 (17, 31). O’Connell et al also showed reduced systemic inflammatory biomarkers in diabetic patients after periodontal treatment including IL-6 and IL-12p70 (16). Full-mouth extraction of periodontally compromised teeth significantly decreased serum levels of CRP, plasminogen activator inhibitor-1, fibrinogen and white cells counts in advanced periodontitis patients (32). However, others clinical studies did not observe significant differences on IL-1β, IL-6 and TNF-α serum levels after periodontal treatment (18, 19). Collectively, these inconsistent results in studies with pregnant and non-pregnant samples question the hypothesis that periodontal disease may lead to a significant increase on subclinical markers of systemic inflammation.

The present study used a subsample of pregnant women previously enrolled in a randomized clinical trial that investigated the effect of periodontal treatment and strict plaque control during pregnancy on preterm/low birth weight rates (20). Although the therapy significantly reduced periodontal inflammation, it did not affect the occurrence of adverse obstetric outcomes. The incidence of preterm births was not significantly different between test and control groups (11.72% and 9.09%, respectively), and was similar to the incidence observed in Porto Alegre population (10.7%) (33). Additional analysis of the baseline cytokine levels in this sample did not reveal a strong correlation between GCF and serum (34). The incidence of adverse gestational events in the subsample of the present study was somewhat similar to the incidence observed in the

study of Weidlich et al. (2012), where the whole sample was analyzed (20). Test group presented 3 preterm births and 1 low birth weight whereas the control group presented 2 preterm births. However, the evaluation of adverse gestational events was not the aim of this study, and due to the limited sample size and number of events any comparison with other studies is not feasible.

Among the strengths of present study that should be mentioned is the efficacy of periodontal therapy that reduced bleeding on probing to 11% of sites. Although it is stated that *“when RCTs are being designed to evaluate the effect of periodontal therapy on general health outcomes, it is critically important that a clinically acceptable targeted endpoint for successful periodontal therapy be included in the study design”* and reductions of bleeding on probing to less than 15% has been proposed (35), few clinical trials performed in pregnant women have reached this threshold of reduction on periodontal inflammation. Moreover, the longitudinal evaluation of a panel of 6 cytokines on GCF and serum provides a better understanding of the periodontal therapy impact on local and systemic inflammation. The study design also provided the opportunity to evaluate not only the effect of periodontal therapy during pregnancy but also the effect of pregnancy *per se*, since the control group did not reduce periodontal inflammation during pregnancy. One of the possible limitations of the present study is the small percentage of women with severe periodontal destruction. However, the disease pattern observed in this sample is consistent with women in childbearing age in this same population (36, 37) and the inclusion of only women with severe destructive periodontitis could limit the external validity of our findings. It is also important to acknowledge that the complex immunological events occurring during pregnancy may limit the ability to assess the systemic effect of periodontal therapy, since studies have shown that pregnant women exhibit higher production of several cytokines depending on gestational period and pregnancy outcome.

In conclusion, periodontal therapy was effective in reducing GCF cytokine levels in pregnant women. However, it did not have an impact on systemic biomarkers of inflammation. These findings may explain, at least in part, the lack of effectiveness of periodontal therapy in decreasing the incidence of preterm birth.



## ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by the Brazilian National Council of Research (CNPq - Brazil - Grants No 403099/2005-6 and 402396/2008-1). The authors declare not to have conflicts of interest.

## REFERENCES

1. Dave S, Van Dyke T. The link between periodontal disease and cardiovascular disease is probably inflammation. *Oral Dis* 2008;**14**:95-101.
2. Gurav A, Jadhav V. Periodontitis and risk of diabetes mellitus. *J Diabetes* 2011;**3**:21-8.
3. Gravett MG, Rubens CE, Nunes TM, Group GR. Global report on preterm birth and stillbirth (2 of 7): discovery science. *BMC Pregnancy Childbirth* 2010;**10 Suppl 1**:1-22.
4. Klebanoff M, Searle K. The role of inflammation in preterm birth--focus on periodontitis. *BJOG* 2006;**113 Suppl 3**:43-5.
5. Offenbacher S, Katz V, Fertik G, et al. Periodontal infection as a possible risk factor for preterm low birth weight. *J Periodontol* 1996;**67**:1103-13.
6. Dasanayake AP. Poor periodontal health of the pregnant woman as a risk factor for low birth weight. *Ann Periodontol* 1998;**3**:206-12.
7. Agueda A, Ramon JM, Manau C, Guerrero A, Echeverria JJ. Periodontal disease as a risk factor for adverse pregnancy outcomes: a prospective cohort study. *J Clin Periodontol* 2008;**35**:16-22.
8. Moliterno LF, Monteiro B, Figueredo CM, Fischer RG. Association between periodontitis and low birth weight: a case-control study. *J Clin Periodontol* 2005;**32**:886-90.
9. López NJ, Smith PC, Gutierrez J. Periodontal therapy may reduce the risk of preterm low birth weight in women with periodontal disease: a randomized controlled trial. *J Periodontol* 2002;**73**:911-24.
10. Offenbacher S, Lin D, Strauss R, et al. Effects of periodontal therapy during pregnancy on periodontal status, biologic parameters, and pregnancy outcomes: a pilot study. *J Periodontol* 2006;**77**:2011-24.
11. Tarannum F, Faizuddin M. Effect of periodontal therapy on pregnancy outcome in women affected by periodontitis. *J Periodontol* 2007;**78**:2095-103.
12. Macones GA, Parry S, Nelson DB, et al. Treatment of localized periodontal disease in pregnancy does not reduce the occurrence of preterm birth: results from the Periodontal Infections and Prematurity Study (PIPS). *Am J Obstet Gynecol* 2010;**202**:147.e1-8.
13. Michalowicz BS, Hodges JS, DiAngelis AJ, et al. Treatment of periodontal disease and the risk of preterm birth. *N Engl J Med* 2006;**355**:1885-94.
14. Newnham JP, Newnham IA, Ball CM, et al. Treatment of periodontal disease during pregnancy: a randomized controlled trial. *Obstet Gynecol* 2009;**114**:1239-48.
15. Offenbacher S, Beck JD, Jared HL, et al. Effects of periodontal therapy on rate of preterm delivery: a randomized controlled trial. *Obstet Gynecol* 2009;**114**:551-9.

16. O'Connell PA, Taba M, Nomizo A, et al. Effects of periodontal therapy on glycemic control and inflammatory markers. *J Periodontol* 2008;**79**:774-83.
17. D'Aiuto F, Parkar M, Andreou G, et al. Periodontitis and systemic inflammation: control of the local infection is associated with a reduction in serum inflammatory markers. *J Dent Res* 2004;**83**:156-60.
18. Yamazaki K, Honda T, Oda T, et al. Effect of periodontal treatment on the C-reactive protein and proinflammatory cytokine levels in Japanese periodontitis patients. *J Periodontol Res* 2005;**40**:53-8.
19. Ide M, McPartlin D, Coward PY, Crook M, Lumb P, Wilson RF. Effect of treatment of chronic periodontitis on levels of serum markers of acute-phase inflammatory and vascular responses. *J Clin Periodontol* 2003;**30**:334-40.
20. Weidlich P, Moreira CH, Fiorini T, et al. Effect of nonsurgical periodontal therapy and strict plaque control on preterm/low birth weight: a randomized controlled clinical trial. *Clin Oral Investig* 2012.
21. Silness J, Loe H. Periodontal Disease in Pregnancy. II. Correlation between Oral Hygiene and Periodontal Condition. *Acta Odontol Scand* 1964;**22**:121-35.
22. Loe H. The Gingival Index, the Plaque Index and the Retention Index Systems. *J Periodontol* 1967;**38**:Suppl:610-6.
23. Moutsopoulos NM, Madianos PN. Low-grade inflammation in chronic infectious diseases: paradigm of periodontal infections. *Ann N Y Acad Sci* 2006;**1088**:251-64.
24. Loos BG. Systemic markers of inflammation in periodontitis. *J Periodontol* 2005;**76**:2106-15.
25. Fentoglu O, Koroglu BK, Hicyilmaz H, et al. Pro-inflammatory cytokine levels in association between periodontal disease and hyperlipidaemia. *J Clin Periodontol* 2011;**38**:8-16.
26. Loos BG, Craandijk J, Hoek FJ, Wertheim-van Dillen PM, van der Velden U. Elevation of systemic markers related to cardiovascular diseases in the peripheral blood of periodontitis patients. *J Periodontol* 2000;**71**:1528-34.
27. Nakajima T, Honda T, Domon H, et al. Periodontitis-associated up-regulation of systemic inflammatory mediator level may increase the risk of coronary heart disease. *J Periodontol Res* 2010;**45**:116-22.
28. Andrukhov O, Ulm C, Reischl H, Nguyen PQ, Matejka M, Rausch-Fan X. Serum cytokine levels in periodontitis patients in relation to the bacterial load. *J Periodontol* 2011;**82**:885-92.
29. Sanchez-Hernandez PE, Zamora-Perez AL, Fuentes-Lerma M, Robles-Gomez C, Mariaud-Schmidt RP, Guerrero-Velazquez C. IL-12 and IL-18 levels in serum and gingival tissue in aggressive and chronic periodontitis. *Oral Dis* 2011;**17**:522-9.
30. Michalowicz BS, Novak MJ, Hodges JS, et al. Serum inflammatory mediators in pregnancy: changes after periodontal treatment and association with pregnancy outcomes. *J Periodontol* 2009;**80**:1731-41.
31. D'Aiuto F, Nibali L, Parkar M, Suvan J, Tonetti MS. Short-term effects of intensive periodontal therapy on serum inflammatory markers and cholesterol. *J Dent Res* 2005;**84**:269-73.
32. Taylor BA, Tofler GH, Carey HM, et al. Full-mouth tooth extraction lowers systemic inflammatory and thrombotic markers of cardiovascular risk. *J Dent Res* 2006;**85**:74-8.

33. Cunha J. Information system about live births in Rio Grande do Sul (SINASC 2005). [Accessed on December, 12th 2005]; Available from: <http://www.saunders.gov.br/wsa/portal/indexjsp/menu=organograma&cod=01085>.
34. Fiorini T, Vianna P, Weidlich P, et al. Relationship between cytokine levels in serum and gingival crevicular fluid (GCF) in pregnant women. *Cytokine* 2012.
35. Armitage GC. Effect of periodontal therapy on general health--is there a missing component in the design of these clinical trials? *J Clin Periodontol* 2008;**35**:1011-2.
36. Susin C, Dalla Vecchia CF, Oppermann RV, Haugejorden O, Albandar JM. Periodontal attachment loss in an urban population of Brazilian adults: effect of demographic, behavioral, and environmental risk indicators. *J Periodontol* 2004;**75**:1033-41.
37. Susin C, Haas AN, Valle PM, Oppermann RV, Albandar JM. Prevalence and risk indicators for chronic periodontitis in adolescents and young adults in south Brazil. *J Clin Periodontol* 2011;**38**:326-33.

Table 1. Demographic, socioeconomic and behavioral data at baseline according to the treatment groups (Test=27, Control=30; mean  $\pm$  SD)

	Test (n=27)	Control (n=30)	p-value
Age (years)			
18-24	9 (33.3%)	9 (30%)	0.84
25-30	12 (44.4%)	12 (40%)	
31-35	6 (22.3%)	9 (30%)	
Race			
White	19 (70.4%)	23 (76.7%)	0.76
Non-White	8 (29.6%)	7 (23.3%)	
Education			
Elementary	8 (29.6%)	10 (33.3%)	0.91
High school	18 (66.7%)	18 (60%)	
College	1 (3.7%)	2 (6.7%)	
Socio Economic Status			
Low	4 (14.8%)	6 (20%)	0.70
Medium-low	15 (55.6%)	16 (53.3%)	
Medium-High	5 (18.5%)	7 (23.3%)	
High	3 (11.1%)	1 (3.4%)	
Smoking			
Never	21(77.8%)	20 (66.7%)	0.39
Current/Former	6 (22.2%)	10 (33.3%)	
BMI before gestation (kg/m <sup>2</sup> )*			
<18.5	1 (3.7%)	3 (10%)	0.35
18.6 – 24.99	9 (33.3%)	15 (50%)	
25 – 29,99	9 (33.3%)	5 (16.7%)	
$\geq$ 30	6 (22.2%)	6 (20%)	
Primiparous women	11 (40.7%)	15 (50%)	0.60
Previous miscarriage	2 (7.4%)	4 (13.6%)	0.90
Previous preterm	3 (11.1%)	4 (13.6%)	0.89

\* Data for 3 individuals were not available

Table 2. Clinical parameters according to the experimental period (Test=27, Control=30; mean  $\pm$  SD)

(% sites)	Baseline			After Treatment			Postpartum		
	Test	Control	p-value	Test	Control	p-value	Test	Control	p-value
Visible plaque	56.04 ( $\pm$ 23.01)	49.71 ( $\pm$ 23.01)	0.31	6.88 ( $\pm$ 10.21)	33.51 ( $\pm$ 24.17)	<0.001	8.69 ( $\pm$ 12.32)	21.71 ( $\pm$ 20.16)	0.005
Gingival bleeding	33.26 ( $\pm$ 15.06)	33.84 ( $\pm$ 17.05)	0.89	9.06 ( $\pm$ 8.18)	23.45 ( $\pm$ 12.57)	<0.001	11.30 ( $\pm$ 6.87)	23.87 ( $\pm$ 13.00)	<0.001
Calculus	22.71 ( $\pm$ 13.43)	17.36 ( $\pm$ 10.62)	0.10	0.38 ( $\pm$ 1.08)	12.67 ( $\pm$ 11.96)	<0.001	0.76 ( $\pm$ 1.48)	14.14 ( $\pm$ 11.92)	<0.001
BOP	49.62 ( $\pm$ 20.74)	45.65 ( $\pm$ 17.52)	0.44	11.66 ( $\pm$ 8.46)	37.15 ( $\pm$ 18.87)	<0.001	12.29 ( $\pm$ 8.04)	30.32 ( $\pm$ 17.17)	<0.001
PPD $\geq$ 3mm	50.21 ( $\pm$ 12.85)	47.76 ( $\pm$ 13.39)	0.48	27.82 ( $\pm$ 15.38)	52.03 ( $\pm$ 13.98)	<0.001	38.79 ( $\pm$ 17.26)	52.81 ( $\pm$ 13.16)	0.001
PPD $\geq$ 4mm	9.79 ( $\pm$ 7.52)	9.11 ( $\pm$ 7.14)	0.72	2.32 ( $\pm$ 4.00)	13.56 ( $\pm$ 10.15)	<0.001	3.58 ( $\pm$ 3.77)	12.62 ( $\pm$ 11.31)	<0.001
CAL $\geq$ 1mm	13.50 ( $\pm$ 17.66)	14.59 ( $\pm$ 18.55)	0.82	11.13 ( $\pm$ 10.59)	19.08 ( $\pm$ 21.32)	0.07	12.88 ( $\pm$ 12.53)	20.05 ( $\pm$ 18.14)	0.08
CAL $\geq$ 2mm	5.39 ( $\pm$ 8.42)	8.41 ( $\pm$ 13.13)	0.31	3.28 ( $\pm$ 4.26)	6.42 ( $\pm$ 10.14)	0.12	2.74 ( $\pm$ 3.98)	6.11 ( $\pm$ 9.38)	0.08

Table 3. GCF cytokines levels (Median - 25/75 percentile; Test=27, Control=30) according to treatment groups and experimental period

Cytokine	Baseline		After Treatment		Postpartum	
	Test	Control	Test	Control	Test	Control
IL-1 $\beta$	114.90 <sup>Aa</sup> (67.00/239.80)	134.15 <sup>Aa</sup> (54.05/248.63)	57.90 <sup>Ba</sup> (15.90/94.10)	136.05 <sup>Ab</sup> (60.30/247.80)	55.80 <sup>Ba</sup> (40.40/76.10)	129.90 <sup>Ab</sup> (67.60/248.90)
IL-6 <sup>NS</sup>	5.40 (3.00/9.20)	3.8 (2.50/7.23)	4.40 (2.40/6.70)	4.30 (2.38/9.10)	3.30 (2.10/7.70)	4.30 (2.38/6.78)
IL-8	322.50 <sup>Aa</sup> (249.7/498.40)	296.00 <sup>Aa</sup> (209.18/500.8)	238.30 <sup>Ba</sup> (64.00/383.20)	269.25 <sup>Aa</sup> (161.98/620.9)	256.90 <sup>ABa</sup> (144.20/550.10)	322.60 <sup>Aa</sup> (207.3/514.65)
IL-10 <sup>NS</sup>	1.00 (0.90/1.50)	1.00 (0.90/1.18)	1.00 (0.90/1.10)	1.00 (0.90/1.45)	1.00 (0.90/1.00)	1.00 (0.90/1.03)
IL-12p70 <sup>NS</sup>	1.60 (1.20/2.40)	1.30 (1.28/2.55)	1.30 (1.30/2.10)	1.30 (1.20/2.40)	1.70 (1.20/2.10)	1.40 (1.20/2.53)
TNF- $\alpha$ <sup>NS</sup>	1.70 (1.10/3.70)	1.15 (1.00/2.23)	1.20 (1.10/3.00)	1.80 (1.10/2.63)	1.30 (1.10/3.00)	1.20 (1.10/2.83)

Significant differences among experimental periods within treatment groups are represented by different capital letters. Significant differences between treatment groups within experimental periods are represented by different lower case letters.

NS: No significant differences were observed between treatment groups or among experimental periods.

Table 4. Serum cytokines levels (pg/ml; Median – 25/75 percentile; Test=27, Control=30) according to treatment groups and experimental period

Cytokine	Baseline		After Treatment		Postpartum	
	Test	Control	Test	Control	Test	Control
IL-1 $\beta$ <sup>NS</sup>	1.70 (1.40/2.00)	1.70 (1.37/2.20)	1.70 (1.30/2.10)	2.00 (1.47/2.22)	1.50 (1.40/1.90)	1.85 (1.37/2.42)
IL-6	4.15 <sup>Aa</sup> (3.40/5.70)	3.55 <sup>Aa</sup> (2.80/4.47)	5.20 <sup>Aa</sup> (4.20/7.20)	4.15 <sup>ABb</sup> (3.35/4.90)	4.45 <sup>Aa</sup> (3.62/6.35)	4.40 <sup>Ba</sup> (3.40/5.50)
IL-8	10.90 <sup>Aa</sup> (8.35/15.10)	7.85 <sup>Aa</sup> (6.65/10.65)	9.85 <sup>ABa</sup> (8.20/12.02)	8.20 <sup>ABa</sup> (6.90/11.47)	14.70 <sup>ACa</sup> (10.80/19.30)	11.45 <sup>Ba</sup> (9.47/15.80)
IL-10 <sup>NS</sup>	1.00 (1.00/1.90)	1.00 (0.97/1.62)	1.00 (1.00/1.40)	1.10 (1.00/1.70)	1.00 (1.00/1.70)	1.00 (0.97/1.50)
IL-12p70 <sup>NS</sup>	1.30 (1.20/1.70)	1.30 (1.20/2.42)	1.30 (1.20/1.70)	1.50 (1.30/2.12)	1.30 (1.20/2.00)	1.30 (1.20/1.92)
TNF- $\alpha$ <sup>NS</sup>	1.10 (0.97/1.10)	1.05 (0.90/1.12)	1.10 (1.00/1.10)	1.00 (0.97/1.32)	1.00 (0.90/1.10)	1.10 (1.00/1.10)

Significant differences among experimental periods within treatment groups are represented by different capital letters. Significant differences between treatment groups within experimental periods are represented by different lower case letters.

NS: No significant differences were observed between treatment groups or among experimental periods.

## Considerações finais

O presente estudo avaliou a relação entre os níveis séricos e periodontais de 6 citocinas que foram previamente associadas tanto com a doença periodontal quanto com o parto pretermo (manuscrito 1). Foram observados baixos níveis séricos para todas as citocinas avaliadas, enquanto que uma grande variabilidade foi observada em relação aos níveis no FCG. O impacto dos níveis de citocinas periodontais sobre os níveis sistêmicos dessas mesmas citocinas foi avaliado através de uma regressão linear ranqueada. Embora os níveis periodontais e sistêmicos de IL-10, IL-12p70 e FNT- $\alpha$  estiveram significativamente associados, apenas os valores de IL-12p70 no FCG tiveram algum efeito, mesmo que limitado, sobre os níveis sistêmicos observados. A profundidade de sondagem esteve associada com os níveis de IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 e IL-10 no FCG, enquanto que efeitos limitados sobre os níveis sistêmicos foram observados. O sangramento a sondagem esteve associado com os níveis periodontais de IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 e com os níveis séricos de FNT- $\alpha$ . De um modo geral, a concordância e a correlação entre os níveis sistêmicos e periodontais de citocinas foram baixas. A única exceção foi a IL-12p70, que mostrou uma correlação moderada, porém estatisticamente significativa, entre os níveis no soro e no FCG ( $r=0.32$ ,  $p=0.001$ ). Além disso, também investigou-se o efeito da terapia periodontal não cirúrgica sobre os níveis sistêmicos e periodontais destas mesmas citocinas durante a gestação e 30 dias após o parto (manuscrito 2). Tanto as mulheres do grupo teste quanto as do grupo controle apresentaram, no exame inicial, inflamação generalizada com limitada destruição periodontal. A terapia periodontal foi eficaz para todos os parâmetros avaliados, especialmente os níveis de placa visível (decaindo de 56.04% para 6.88% dos sítios,  $p<0.001$ ) e sangramento a sondagem (decaindo de 49.62% para 11.66% dos sítios,  $p<0.001$ ), sendo que esses valores permaneceram estáveis após o parto. Novamente foram observados baixos níveis séricos para as citocinas avaliadas e grande variabilidade nos níveis no FCG. Embora a terapia periodontal durante a gestação conseguiu reduzir os níveis de algumas citocinas no FCG, notadamente a IL-1 $\beta$  e a IL-8, ela não parece ter um impacto sistêmico considerável.



Existe um consenso na literatura de que existe uma associação entre a doença periodontal e o parto pretermo (Chambrone, Guglielmetti et al. 2011), a qual parece ser influenciada pelos critérios que definem doença periodontal (Manau, Echeverria et al. 2008). Entretanto, até o presente momento não foi observada uma relação de causa e efeito, pois a maior parte dos estudos que realizaram uma intervenção periodontal durante a gestação não foi eficaz em reduzir a incidência de prematuridade (Fogacci, Vettore et al. 2011). Coletivamente, os nossos achados imunológicos não suportam a hipótese de que exista uma relação direta entre os níveis sistêmicos e periodontais de biomarcadores inflamatórios. Similarmente, não parece haver um benefício inflamatório sistêmico associado a terapia periodontal. Esses achados corroboram os resultados do Estudo Inicial (Weidlich, Moreira et al. 2012) que não demonstrou nenhuma redução significativa da incidência de prematuridade após a terapia periodontal não cirúrgica durante a gestação.

O período gestacional está associado a significativas mudanças hormonais que afetam praticamente todos os órgãos e sistemas humanos, incluindo o sistema cardiovascular, respiratório, gastrointestinal, urogenital e endócrino (Suresh and Radfar 2004). Os tecidos periodontais podem ser considerados tecidos-alvo de hormônios sexuais que estão aumentados na gestação (marcadamente estrógeno e progesterona) devido à presença de receptores específicos a eles presentes no periodonto (Vittek, Hernandez et al. 1982). Clinicamente, tem sido relatado um aumento na prevalência de inflamação gengival, incluindo aumento na profundidade de sondagem (PS), no sangramento a sondagem (Moreira 2009) e exsudato gengival (Hugoson 1971), mas sem alterações consideráveis nos níveis de placa (Loe and Silness 1963) e inserção clínica (Lief, Boggess et al. 2004). Coletivamente, estas observações demonstram que a gravidez, por si só, leva a uma alteração do sistema imune. O exato papel da doença periodontal nessa complexa equação ainda permanece desconhecido.

É importante lembrar que mesmo em situações de parto a termo, análises de transcriptoma da membrana corioamniótica apresentavam sinais moleculares de inflamação, mesmo na ausência de sinais histológicos de inflamação da membrana (Haddad, Tromp et al. 2006). Também os receptores de reconhecimento padrão TLR-2 e TLR-4 estavam expressados de maneira elevada na membrana corioamniótica de

mulheres com gravidez a termo (Kim, Romero et al. 2004). Além disso, diversos genes associados a inflamação foram expressos de maneira aumentada após a dilatação do colo do útero, marcadamente o da IL-8, CXCL-1 e CXCL-2 (Haddad, Tromp et al. 2006). Coletivamente, esses resultados demonstram a importância de mecanismos moleculares de inflamação também no processo de parto a termo.

Dentre as limitações deste estudo, incluem-se o pequeno percentual de mulheres que apresentaram severa destruição periodontal. Entretanto, é importante ressaltar que o padrão de doença observado nessa amostra é consistente com mulheres em idade fértil dessa mesma população (Susin, Dalla Vecchia et al. 2004; Susin, Haas et al. 2011). A inclusão de apenas mulheres com severa destruição periodontal poderia limitar a validade externa dos achados. Mesmo assim, se a correlação entre os níveis sistêmicos e periodontais destas citocinas for dependente da severidade de destruição, a natureza localizada da doença pode ter tido um impacto sobre os resultados. Portanto, a extrapolação dos achados para outras populações deve ser feita com cautela. Outro ponto a ser considerado é o limitado número de biomarcadores investigados no presente estudo. Como inúmeras outras moléculas estão associadas ao processo inflamatório, não se pode descartar que elas possam apresentar um comportamento diferente das citocinas avaliadas neste estudo. Entretanto, vale ressaltar que as citocinas avaliadas nesta tese foram escolhidas devido aos importantes papéis que desempenham tanto na etiologia da doença periodontal quanto no parto pretermo. A IL-1 $\beta$  e o FNT- $\alpha$  são as duas citocinas mais estudadas na literatura, com diversas funções descritas em praticamente todos os tecidos humanos (Preshaw and Taylor 2011). A IL-12p70 é a citocina clássica associada a resposta Th1 (Gaffen and Hajishengallis 2008; Zhang and Wang 2008), enquanto a IL-10 é historicamente associada a efeitos de regulação da inflamação (Treg) (Scumpia and Moldawer 2005; Gaffen and Hajishengallis 2008). A IL-6 é associada a resposta Th17 (Kimura and Kishimoto 2010) e a IL-8 é considerada o protótipo da quimiocina, molécula responsável pela sinalização e recrutamento celular (Apostolakis, Vogiatzi et al. 2009). Embora normalmente se dê ênfase as funções inflamatórias dessas citocinas, as características de pleiotropismo e redundância inerentes a essas proteínas fazem

com que não se possa descartar diversas outras ações derivadas dessa complexa rede de sinalização molecular.

Por fim, pode-se concluir que os níveis de citocinas no soro e no FCG não estão significativamente correlacionados em mulheres com extensa inflamação mas limitada destruição periodontal. Embora a terapia durante a gestação reduza significativamente o nível de citocinas no FCG, ela parece não ter um impacto considerável sobre os níveis sistêmicos desses biomarcadores. Estes achados questionam a hipótese de uma inflamação sistêmica de baixa intensidade de origem periodontal como responsável pela associação observada entre a prematuridade e a doença periodontal em populações com características semelhantes a dessa amostra. Outros estudos, abordando amostras com maior severidade de doença e incluindo diferentes marcadores inflamatórios podem confirmar esses achados.

## Referências

- Abbas, A. K., A. H. Lichtman, et al. (2007). Cellular and Molecular Immunology. Philadelphia, Saunders Elsevier.
- Alexopoulos, G. S. and S. S. Morimoto (2011). "The inflammation hypothesis in geriatric depression." International journal of geriatric psychiatry.
- Andrukhov, O., C. Ulm, et al. (2010). "Serum Cytokine Levels in Periodontitis Patients in Relation to the Bacterial Load." J Periodontol.
- Apostolakis, S., K. Vogiatzi, et al. (2009). "Interleukin 8 and cardiovascular disease." Cardiovascular research **84**(3): 353-360.
- Behle, J. H., M. H. Sedaghatfar, et al. (2009). "Heterogeneity of systemic inflammatory responses to periodontal therapy." Journal of clinical periodontology **36**(4): 287-294.
- Berglundh, T. and M. Donati (2005). "Aspects of adaptive host response in periodontitis." Journal of clinical periodontology **32 Suppl 6**: 87-107.
- Bogavac, M. A. and S. Brkic (2009). "Serum proinflammatory cytokine - interleukin-8 as possible infection site marker in preterm deliveries." J Perinat Med.
- Bowen, J. M., L. Chamley, et al. (2002). "Cytokines of the placenta and extra-placental membranes: roles and regulation during human pregnancy and parturition." Placenta **23**(4): 257-273.
- Bowen, J. M., L. Chamley, et al. (2002). "Cytokines of the placenta and extra-placental membranes: biosynthesis, secretion and roles in establishment of pregnancy in women." Placenta **23**(4): 239-256.
- Chambrone, L., M. R. Guglielmetti, et al. (2011). "Evidence grade associating periodontitis to preterm birth and/or low birth weight: I. A systematic review of prospective cohort studies." Journal of clinical periodontology **38**(9): 795-808.
- Chaouat, G. (2007). "The Th1/Th2 paradigm: still important in pregnancy?" Seminars in immunopathology **29**(2): 95-113.
- Commings, S. P., L. Borish, et al. (2010). "Immunologic messenger molecules: cytokines, interferons, and chemokines." The Journal of allergy and clinical immunology **125**(2 Suppl 2): S53-72.
- Cullinan, M. P., B. Westerman, et al. (2008). "Progression of periodontal disease and interleukin-10 gene polymorphism." J Periodontal Res **43**(3): 328-333.
- Curry, A. E., P. Thorsen, et al. (2009). "First-trimester maternal plasma cytokine levels, pre-pregnancy body mass index, and spontaneous preterm delivery." Acta Obstet Gynecol Scand **88**(3): 332-342.
- Cutler, C. W. and R. Jotwani (2004). "Antigen-presentation and the role of dendritic cells in periodontitis." Periodontology 2000 **35**: 135-157.
- D'Aiuto, F., L. Nibali, et al. (2005). "Short-term effects of intensive periodontal therapy on serum inflammatory markers and cholesterol." Journal of dental research **84**(3): 269-273.
- D'Aiuto, F., M. Parkar, et al. (2004). "Periodontitis and systemic inflammation: control of the local infection is associated with a reduction in serum inflammatory markers." Journal of dental research **83**(2): 156-160.

- Dandona, P., A. Aljada, et al. (2004). "Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes." Trends in immunology **25**(1): 4-7.
- de Jager, W., K. Bourcier, et al. (2009). "Prerequisites for cytokine measurements in clinical trials with multiplex immunoassays." BMC immunology **10**: 52.
- Delima, A. J., T. Oates, et al. (2001). "Soluble antagonists to interleukin-1 (IL-1) and tumor necrosis factor (TNF) inhibits loss of tissue attachment in experimental periodontitis." J Clin Periodontol **28**(3): 233-240.
- Dinarello, C. A. (2007). "Historical insights into cytokines." European journal of immunology **37 Suppl 1**: S34-45.
- Duarte, P. M., M. da Rocha, et al. (2010). "Serum levels of cytokines in subjects with generalized chronic and aggressive periodontitis before and after non-surgical periodontal therapy: a pilot study." Journal of periodontology **81**(7): 1056-1063.
- Duarte, P. M., M. C. de Oliveira, et al. (2007). "Overexpression of interleukin-1beta and interleukin-6 may play an important role in periodontal breakdown in type 2 diabetic patients." J Periodontal Res **42**(4): 377-381.
- Ekelund, C. K., I. Vogel, et al. (2008). "Interleukin-18 and interleukin-12 in maternal serum and spontaneous preterm delivery." Journal of reproductive immunology **77**(2): 179-185.
- Engelbrecht, S. P., F. Vossughi, et al. (2006). "The influence of diabetes on gingival crevicular fluid beta-glucuronidase and interleukin-8." J Clin Periodontol **33**(11): 784-790.
- Fentoglu, O., B. K. Koroglu, et al. (2011). "Pro-inflammatory cytokine levels in association between periodontal disease and hyperlipidaemia." J Clin Periodontol **38**(1): 8-16.
- Fogacci, M. F., M. V. Vettore, et al. (2011). "The effect of periodontal therapy on preterm low birth weight: a meta-analysis." Obstetrics and gynecology **117**(1): 153-165.
- Gaffen, S. L. and G. Hajishengallis (2008). "A new inflammatory cytokine on the block: rethinking periodontal disease and the Th1/Th2 paradigm in the context of Th17 cells and IL-17." Journal of dental research **87**(9): 817-828.
- Gargano, J. W., C. Holzman, et al. (2008). "Mid-pregnancy circulating cytokine levels, histologic chorioamnionitis and spontaneous preterm birth." Journal of reproductive immunology **79**(1): 100-110.
- Garlet, G. P. (2010). "Destructive and protective roles of cytokines in periodontitis: a reappraisal from host defense and tissue destruction viewpoints." Journal of dental research **89**(12): 1349-1363.
- Garlet, G. P., W. Martins, Jr., et al. (2004). "Matrix metalloproteinases, their physiological inhibitors and osteoclast factors are differentially regulated by the cytokine profile in human periodontal disease." Journal of clinical periodontology **31**(8): 671-679.
- Gemmell, E. and G. J. Seymour (2004). "Immunoregulatory control of Th1/Th2 cytokine profiles in periodontal disease." Periodontology 2000 **35**: 21-41.
- Goldenberg, R. L., A. R. Goepfert, et al. (2005). "Biochemical markers for the prediction of preterm birth." American journal of obstetrics and gynecology **192**(5 Suppl): S36-46.
- Goldenberg, R. L., A. R. Goepfert, et al. (2005). "Biochemical markers for the prediction of preterm birth." Am J Obstet Gynecol **192**(5 Suppl): S36-46.
- Goldenberg, R. L., J. C. Hauth, et al. (2000). "Intrauterine infection and preterm delivery." The New England journal of medicine **342**(20): 1500-1507.

- Gor, D. O., N. R. Rose, et al. (2003). "TH1-TH2: a procrustean paradigm." Nature immunology **4**(6): 503-505.
- Gorska, R., H. Gregorek, et al. (2003). "Relationship between clinical parameters and cytokine profiles in inflamed gingival tissue and serum samples from patients with chronic periodontitis." Journal of clinical periodontology **30**(12): 1046-1052.
- Goutoudi, P., E. Diza, et al. (2004). "Effect of periodontal therapy on crevicular fluid interleukin-1beta and interleukin-10 levels in chronic periodontitis." J Dent **32**(7): 511-520.
- Graves, D. (2008). "Cytokines that promote periodontal tissue destruction." Journal of periodontology **79**(8 Suppl): 1585-1591.
- Graves, D. T. and D. Cochran (2003). "The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction." J Periodontol **74**(3): 391-401.
- Graves, D. T., A. J. Delima, et al. (1998). "Interleukin-1 and tumor necrosis factor antagonists inhibit the progression of inflammatory cell infiltration toward alveolar bone in experimental periodontitis." J Periodontol **69**(12): 1419-1425.
- Haddad, R., G. Tromp, et al. (2006). "Human spontaneous labor without histologic chorioamnionitis is characterized by an acute inflammation gene expression signature." American journal of obstetrics and gynecology **195**(2): 394 e391-324.
- Haider, S. and M. Knofler (2009). "Human tumour necrosis factor: physiological and pathological roles in placenta and endometrium." Placenta **30**(2): 111-123.
- Haraszthy, V. I., J. J. Zambon, et al. (2000). "Identification of periodontal pathogens in atheromatous plaques." Journal of periodontology **71**(10): 1554-1560.
- Hillier, S. L., S. S. Witkin, et al. (1993). "The relationship of amniotic fluid cytokines and preterm delivery, amniotic fluid infection, histologic chorioamnionitis, and chorioamnion infection." Obstet Gynecol **81**(6): 941-948.
- Hugoson, A. (1971). "Gingivitis in pregnant women. A longitudinal clinical study." Odontologisk revy **22**(1): 65-84.
- Hujoel, P. P., B. A. White, et al. (2001). "The dentogingival epithelial surface area revisited." Journal of periodontal research **36**(1): 48-55.
- Ide, M., D. McPartlin, et al. (2003). "Effect of treatment of chronic periodontitis on levels of serum markers of acute-phase inflammatory and vascular responses." J Clin Periodontol **30**(4): 334-340.
- Jankovic, D. and G. Trinchieri (2007). "IL-10 or not IL-10: that is the question." Nature immunology **8**(12): 1281-1283.
- Jasper, M. J., K. P. Tremellen, et al. (2007). "Reduced expression of IL-6 and IL-1alpha mRNAs in secretory phase endometrium of women with recurrent miscarriage." Journal of reproductive immunology **73**(1): 74-84.
- Kebschull, M., R. T. Demmer, et al. (2010). "'Gum bug, leave my heart alone!'"--epidemiologic and mechanistic evidence linking periodontal infections and atherosclerosis." Journal of dental research **89**(9): 879-902.
- Kikkert, R., M. L. Laine, et al. (2007). "Activation of toll-like receptors 2 and 4 by gram-negative periodontal bacteria." Oral microbiology and immunology **22**(3): 145-151.
- Kim, Y. M., R. Romero, et al. (2004). "Toll-like receptor-2 and -4 in the chorioamniotic membranes in spontaneous labor at term and in preterm parturition that are associated with chorioamnionitis." American journal of obstetrics and gynecology **191**(4): 1346-1355.

- Kimura, A. and T. Kishimoto (2010). "IL-6: regulator of Treg/Th17 balance." European journal of immunology **40**(7): 1830-1835.
- Kinane, D. F., M. P. Riggio, et al. (2005). "Bacteraemia following periodontal procedures." Journal of clinical periodontology **32**(7): 708-713.
- Klebanoff, M. and K. Searle (2006). "The role of inflammation in preterm birth--focus on periodontitis." BJOG : an international journal of obstetrics and gynaecology **113 Suppl 3**: 43-45.
- Lee, Y. J., S. B. Han, et al. (2010). "Inflammation and Alzheimer's disease." Archives of pharmacal research **33**(10): 1539-1556.
- Libby, P., Y. Okamoto, et al. (2010). "Inflammation in atherosclerosis: transition from theory to practice." Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society **74**(2): 213-220.
- Lieff, S., K. A. Boggess, et al. (2004). "The oral conditions and pregnancy study: periodontal status of a cohort of pregnant women." Journal of periodontology **75**(1): 116-126.
- Liu, Y. C., U. H. Lerner, et al. (2010). "Cytokine responses against periodontal infection: protective and destructive roles." Periodontology 2000 **52**(1): 163-206.
- Loe, H. (1967). "The Gingival Index, the Plaque Index and the Retention Index Systems." Journal of periodontology **38**(6): Suppl:610-616.
- Loe, H. and J. Silness (1963). "Periodontal Disease in Pregnancy. I. Prevalence and Severity." Acta odontologica Scandinavica **21**: 533-551.
- Loos, B. G. (2005). "Systemic markers of inflammation in periodontitis." Journal of periodontology **76**(11 Suppl): 2106-2115.
- Manau, C., A. Echeverria, et al. (2008). "Periodontal disease definition may determine the association between periodontitis and pregnancy outcomes." Journal of clinical periodontology **35**(5): 385-397.
- Mantovani, A. (2010). "Molecular pathways linking inflammation and cancer." Current molecular medicine **10**(4): 369-373.
- Masada, M. P., R. Persson, et al. (1990). "Measurement of interleukin-1 alpha and -1 beta in gingival crevicular fluid: implications for the pathogenesis of periodontal disease." J Periodontal Res **25**(3): 156-163.
- Mealey, B. L. (2006). "Periodontal disease and diabetes. A two-way street." Journal of the American Dental Association **137 Suppl**: 26S-31S.
- Michalowicz, B. S. and R. Durand (2007). "Maternal periodontal disease and spontaneous preterm birth." Periodontology 2000 **44**: 103-112.
- Michalowicz, B. S., M. J. Novak, et al. (2009). "Serum inflammatory mediators in pregnancy: changes after periodontal treatment and association with pregnancy outcomes." Journal of periodontology **80**(11): 1731-1741.
- Moreira, C. H. C. (2009). Doenças periodontais na gravidez : curso clínico e resposta ao tratamento PhD, UFRGS.
- Mosmann, T. R., H. Cherwinski, et al. (1986). "Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins." Journal of immunology **136**(7): 2348-2357.
- Moutsopoulos, N. M. and P. N. Madianos (2006). "Low-grade inflammation in chronic infectious diseases: paradigm of periodontal infections." Annals of the New York Academy of Sciences **1088**: 251-264.

- Mueller, A. A., B. Saldamli, et al. (2009). "Oral bacterial cultures in nontraumatic brain abscesses: results of a first-line study." Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics **107**(4): 469-476.
- Murphy, K. M. and S. L. Reiner (2002). "The lineage decisions of helper T cells." Nature reviews. Immunology **2**(12): 933-944.
- Nakajima, T., T. Honda, et al. (2010). "Periodontitis-associated up-regulation of systemic inflammatory mediator level may increase the risk of coronary heart disease." J Periodontal Res **45**(1): 116-122.
- Nussbaum, G., S. Ben-Adi, et al. (2009). "Involvement of Toll-like receptors 2 and 4 in the innate immune response to *Treponema denticola* and its outer sheath components." Infection and immunity **77**(9): 3939-3947.
- O'Connell, P. A., M. Taba, et al. (2008). "Effects of periodontal therapy on glycemic control and inflammatory markers." Journal of periodontology **79**(5): 774-783.
- O'Connell, P. A., M. Taba, et al. (2008). "Effects of periodontal therapy on glycemic control and inflammatory markers." J Periodontol **79**(5): 774-783.
- Ohshima, M., K. Otsuka, et al. (1994). "Interleukin-1 beta stimulates collagenase production by cultured human periodontal ligament fibroblasts." J Periodontal Res **29**(6): 421-429.
- Paraskevas, S., J. D. Huizinga, et al. (2008). "A systematic review and meta-analyses on C-reactive protein in relation to periodontitis." Journal of clinical periodontology **35**(4): 277-290.
- Preshaw, P. M. and J. J. Taylor (2011). "How has research into cytokine interactions and their role in driving immune responses impacted our understanding of periodontitis?" Journal of clinical periodontology **38 Suppl 11**: 60-84.
- Radvar, M., J. Tavakkol-Afshari, et al. (2008). "The effect of periodontal treatment on IL-6 production of peripheral blood monocytes in aggressive periodontitis and chronic periodontitis patients." Iran J Immunol **5**(2): 100-106.
- Romero, R., J. Espinoza, et al. (2006). "Inflammation in preterm and term labour and delivery." Seminars in fetal & neonatal medicine **11**(5): 317-326.
- Romero, R., M. Mazon, et al. (1994). "The preterm labor syndrome." Annals of the New York Academy of Sciences **734**: 414-429.
- Scannapieco, F. A., B. Wang, et al. (2001). "Oral bacteria and respiratory infection: effects on respiratory pathogen adhesion and epithelial cell proinflammatory cytokine production." Annals of periodontology / the American Academy of Periodontology **6**(1): 78-86.
- Scumpia, P. O. and L. L. Moldawer (2005). "Biology of interleukin-10 and its regulatory roles in sepsis syndromes." Critical care medicine **33**(12 Suppl): S468-471.
- Silness, J. and H. Loe (1964). "Periodontal Disease in Pregnancy. Ii. Correlation between Oral Hygiene and Periodontal Condition." Acta odontologica Scandinavica **22**: 121-135.
- Stashenko, P., P. Fujiyoshi, et al. (1991). "Levels of interleukin 1 beta in tissue from sites of active periodontal disease." J Clin Periodontol **18**(7): 548-554.
- Stockinger, B. and M. Veldhoen (2007). "Differentiation and function of Th17 T cells." Current opinion in immunology **19**(3): 281-286.
- Suresh, L. and L. Radfar (2004). "Pregnancy and lactation." Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics **97**(6): 672-682.



- Susin, C., C. F. Dalla Vecchia, et al. (2004). "Periodontal attachment loss in an urban population of Brazilian adults: effect of demographic, behavioral, and environmental risk indicators." Journal of periodontology **75**(7): 1033-1041.
- Susin, C., A. N. Haas, et al. (2011). "Prevalence and risk indicators for chronic periodontitis in adolescents and young adults in south Brazil." Journal of clinical periodontology **38**(4): 326-333.
- Taylor, G. W., B. A. Burt, et al. (1996). "Severe periodontitis and risk for poor glycemic control in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus." Journal of periodontology **67**(10 Suppl): 1085-1093.
- Teeuw, W. J., V. E. Gerdes, et al. (2010). "Effect of periodontal treatment on glycemic control of diabetic patients: a systematic review and meta-analysis." Diabetes care **33**(2): 421-427.
- Thunell, D. H., K. D. Tymkiw, et al. (2009). "A multiplex immunoassay demonstrates reductions in gingival crevicular fluid cytokines following initial periodontal therapy." J Periodontal Res.
- Tonetti, M. S., F. D'Aiuto, et al. (2007). "Treatment of periodontitis and endothelial function." The New England journal of medicine **356**(9): 911-920.
- Trinchieri, G., S. Pflanz, et al. (2003). "The IL-12 family of heterodimeric cytokines: new players in the regulation of T cell responses." Immunity **19**(5): 641-644.
- Tsai, I. S., C. C. Tsai, et al. (2005). "Interleukin-12 and interleukin-16 in periodontal disease." Cytokine **31**(1): 34-40.
- Varner, M. W. and M. S. Esplin (2005). "Current understanding of genetic factors in preterm birth." BJOG **112** **Suppl 1**: 28-31.
- Velez, D. R., S. J. Fortunato, et al. (2008). "Patterns of cytokine profiles differ with pregnancy outcome and ethnicity." Hum Reprod **23**(8): 1902-1909.
- Vittekk, J., M. R. Hernandez, et al. (1982). "Specific estrogen receptors in human gingiva." The Journal of clinical endocrinology and metabolism **54**(3): 608-612.
- Vogel, I., A. R. Goepfert, et al. (2007). "Early second-trimester inflammatory markers and short cervical length and the risk of recurrent preterm birth." Journal of reproductive immunology **75**(2): 133-140.
- Vogel, I., P. Thorsen, et al. (2005). "Biomarkers for the prediction of preterm delivery." Acta obstetrica et gynecologica Scandinavica **84**(6): 516-525.
- Watts, A., E. M. Crimmins, et al. (2008). "Inflammation as a potential mediator for the association between periodontal disease and Alzheimer's disease." Neuropsychiatric disease and treatment **4**(5): 865-876.
- Weidlich, P., C. H. Moreira, et al. (2012). "Effect of nonsurgical periodontal therapy and strict plaque control on preterm/low birth weight: a randomized controlled clinical trial." Clinical oral investigations.
- Winger, E. E. and J. L. Reed (2008). "Treatment with tumor necrosis factor inhibitors and intravenous immunoglobulin improves live birth rates in women with recurrent spontaneous abortion." Am J Reprod Immunol **60**(1): 8-16.
- Wu, M. Y., H. F. Chen, et al. (2001). "Increase in the production of interleukin-10 early after implantation is related to the success of pregnancy." Am J Reprod Immunol **46**(6): 386-392.

- Yamazaki, K., T. Honda, et al. (2005). "Effect of periodontal treatment on the C-reactive protein and proinflammatory cytokine levels in Japanese periodontitis patients." J Periodontal Res **40**(1): 53-58.
- Zhang, S. and Q. Wang (2008). "Factors determining the formation and release of bioactive IL-12: regulatory mechanisms for IL-12p70 synthesis and inhibition." Biochemical and biophysical research communications **372**(4): 509-512.

**ANEXO 1**  
**PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA DO HMIPV**



**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 Gestaçãõ**" 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 2

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Odontologia

Programa de Pós-Graduação em Odontologia

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nós gostaríamos de convidar você para participar de um estudo que estamos realizando chamado “Desfechos bucais e sistêmicos do tratamento periodontal durante a gestação”. Este trabalho busca conhecer as características de dentes e gengivas nas mulheres durante a gravidez e estudar a relação entre os problemas gengivais e o nascimento de bebês prematuros e com baixo peso. Com estes dados coletados, poderemos oferecer novas informações para o atendimento odontológico durante a gravidez e para os programas de acompanhamento de gestantes e seus recém-nascidos.

Caso decida por participar do estudo, você responderá a um questionário, e terá sua boca examinada em quatro momentos, dois durante a gravidez, um no hospital e outro algumas semanas depois do nascimento do bebê. Nestes exames, serão coletados placa bacteriana e saliva. Os exames de sangue solicitados pelo seu médico durante as consultas do pré-natal também serão analisados na pesquisa, assim como serão realizadas outras análises com esse material. O material será usado somente nessa pesquisa e destruído após o uso. Com relação ao seu bebê, serão coletados dados relativos ao seu peso e altura ao nascer. Você receberá tratamento das gengivas durante ou após a gravidez, conforme sorteio que será realizado a seguir. Se você for sorteada para receber tratamento depois da gestação, receberá um encaminhamento para tratamento das gengivas no Sistema Único de Saúde. A realização do tratamento não oferece riscos à sua saúde nem a do seu bebê. Em decorrência do tratamento, você terá menos sangramento nas gengivas, menos mau hálito e ausência de gengivas doloridas. Os exames e o tratamento não serão dolorosos e logo após o tratamento você poderá sentir sensibilidade passageira nos dentes. Frente a qualquer desconforto, estaremos à disposição para agendar pronto atendimento pelo telefone 9288 7959. O tratamento que você receberá não inclui aparelhos ortodônticos, próteses e implantes. Se você decidir não participar, receberá tratamento das gengivas se o exame mostrar essa necessidade.

Os possíveis resultados do estudo são que o tratamento ajuda ou não a reduzir o risco de partos prematuros e nascimento de bebês com baixo peso. Entretanto, até hoje, não se tem nenhuma informação correta a respeito dessa interferência.

Se você decidir participar, as suas respostas serão apresentadas sem sua identificação, pois os questionários e todos os dados coletados serão numerados e codificados. Assim, com a sua participação no estudo, você estará colaborando para que sejam conhecidos quais cuidados com as gengivas são importantes durante e após a gravidez, a fim de proporcionar o melhor atendimento para as mães e seus bebês.

Se você tiver alguma dúvida, pode perguntar antes de se decidir. Você poderá retirar-se do estudo em qualquer momento se assim o desejar, sem qualquer prejuízo para o acompanhamento das suas visitas do pré-natal.

Não haverá qualquer custo para a sua participação no estudo, sendo que será fornecido custeio para seu deslocamento até o hospital através de vale transporte.

Se houver necessidade de contato, ligue para 9288 7959 e fale os Dr. Carlos Heitor Moreira ou Dra. Patrícia Weidlich.

---

Pesquisador

---

Entrevistada

Data:

Pesquisador responsável: Prof. Rui Vicente Oppermann

Comitê de Ética do Hospital Materno Infantil Presidente Vargas: 3289-3377

## ANEXO 3 ENTREVISTA

Registro pesquisa: \_\_\_\_\_ Número do prontuário: \_\_\_\_\_

### I - IDENTIFICAÇÃO

1- Nome : \_\_\_\_\_ Profissão: \_\_\_\_\_

2- Endereço \_\_\_\_\_

3- Telefones para contato: \_\_\_\_\_

4- Endereço da mãe (da gestante) para contato: \_\_\_\_\_

5 - Telefones: \_\_\_\_\_

6 - Idade: \_\_\_\_\_ 7 - Data de nascimento: \_\_\_\_\_ 8 - Idade do pai do bebê: \_\_\_\_\_

9 - Estado civil (no papel): \_\_\_\_\_

10 - Você tem companheiro? 1 Não  2 Sim  11 - Mora com você? 1 Não  2 Sim

12 - Raça: 1 branca  2 preta  3 amarela  4 parda  5 indígena

### II - NÍVEL EDUCACIONAL

13 - Anos de estudo: \_\_\_\_\_

14 - Até que nível você estudou?

- 1) nunca estudou  2) 1ª a 4ª série 1º grau  3) 5ª a 8ª série do 1º grau   
 4) 2º grau incompleto  5) 2º g completo  6) universitário incompleto  7) universitário completo

### III - NÍVEL SÓCIO ECONÔMICO:

15 - Quanto você recebe por mês:

- 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 responde  9) não recebe salário

16 - Quais desses itens você possui na sua casa? Qual a quantidade de cada um deles?

Posse de itens	Quantidade	Pontos
Televisão em cores		
Rádio		
Banheiro		
Automóvel		
Empregada mensalista		

Posse de itens	Quantidade	Pontos
Aspirador de pó		
Máquina de lavar		
Viodeocassete e/ou DVD		
Geladeira		
Freezer (aparelho independente ou parte de geladeira duplex)		

17 - Qual o estudo do chefe da sua casa?

- 1  Analfabeto/ 1ª a 4ª série incompleto 2  1ª a 4ª série completo/ 5ª a 8ª série incompleto  
 3  5ª a 8ª série completo/ 2º grau incompleto  2º grau completo/ 3º grau incompleto  5 3º grau

### IV - DADOS OBSTÉTRICOS

18 - Esta é a primeira vez que você engravidou? 1 Não  2 Sim (pular para questão 2)

19 - Quantas vezes você ficou grávida? \_\_\_\_

20 - Quantos filhos você tem? \_\_\_\_

21 - Você teve abortos? 1 Não (pular para questão 24)  2 Sim

22 - Se teve aborto, quantos foram "tirados" (provocados)? \_\_\_\_

23 - Se teve aborto, quantos "vieram sozinhos" (espontâneos)? \_\_\_\_

24 - Quanto tempo (em anos) entre um parto e outro? 1) < 2 an  2) 2-3 an  3) > 3 an

25 - Algum dos seus filhos nasceu morto ou morreu antes de 1 mês de vida? 1 Não (pular para questão 27)  2 Sim

26 - Se afirmativo, listar cada um e a provável causa de morte: \_\_\_\_\_

27 - Você já teve partos antes do tempo? 1 Não (pular para questão 2)  2 Sim

28 - Se afirmativo, diga o tempo de gestação no momento do parto e se foi espontâneo (entrou em trabalho de parto sozinho?) ou indicação médica ("tiveram que tirar o nenê antes do tempo").

Partos antes do tempo	Tempo de gestação	Espontâneo	Indicação médica

29 - Você usava pílula ou injeção para não engravidar? 1 Não (pular para questão )  2 Sim

30 - Se afirmativo, até: 1) a última menstruação ou 2 meses antes  2)  $\geq$  3 meses antes da última menstruação

31 - Você menstruou todos os meses nos últimos 6 meses antes de engravidar? 1 Não  2 Sim

32 - Você já "baixou" em outro hospital antes da hora do parto? 1 Não (pular para questão )  2 Sim

33 - Se afirmativo, listar cada internação, hospital e o possível motivo:

Internação	Motivo	Hospital

34 - Seus pais ou irmãos já tiveram alguma dessas doenças?

1) Não 2) Sim

Açúcar no sangue (diabetes)

Pressão alta

Gêmeos

Ataque do coração (infarto)

Ponte de safena

35 - Você já teve alguma dessas doenças?

1) Não 2) Sim

Cistite (infecção urinária)

- |                               |                          |                          |
|-------------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Corrimento (infecção vaginal) | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| Problemas p/ engravidar       | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| Açúcar no sangue (diabetes)   | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| Pressão alta                  | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| Cirurgia no útero             | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| Doença venérea ("pegada")     | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |

## V - HÁBITOS

36 - Você fuma ou já fumou? 1 Não (pular para a questão 4)  2 Sim, fun  3 Sim, parei (ir para questão 4)

37 - Há quanto tempo você fuma? anos  meses  dias

38 - Quantos cigarros por dia você fuma agora? \_\_\_\_\_cigarros/dia

39 - Quantos cigarros por dia fumava antes da gravidez? \_\_\_\_\_cigarros/dia

40 - Com que idade você iniciou a fumar? \_\_\_\_\_

41 - Há quanto tempo você parou de fumar? anos  meses  dias

42 - Quantos cigarros por dia você fumava antes de parar? \_\_\_\_\_cigarros/dia

43 - Por quanto tempo você fumou? anos  meses  dias

44 - Você toma bebidas alcoólicas?

1 nunca (pular para questão 46)  2 raramente  3 algumas vezes  4 frequentemente

45 - Qual tipo? 1 nenhum  2 cerveja  3 cachaça  4 vinho  5 outros

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

46 - Você utiliza algum tipo de droga? 1 Não (pular para questão 4)  2 Sim

47 - Se afirmativo, qual é o tipo? \_\_\_\_\_

## VI - DADOS ODONTOLÓGICOS

48 - Quando você limpa os dentes? \_\_\_\_\_

49 - O que você usa para limpar os dentes? \_\_\_\_\_

50 - Você faz a limpeza entre os dentes? 1 Não (pular para a questão 5)  2 Sim

51 - O que você usa para limpar entre os dentes? \_\_\_\_\_

52 - Quantas vezes você usa esse instrumento na semana? \_\_\_\_\_

53 - Qual o tipo de escova que você usa? macia  média  dura

53 - Qual o tipo de pasta de dentes que você usa? \_\_\_\_\_

54 - Você nota sangramento nas suas gengivas? 1 Não (pular para questão 4)  2 Sim

55 - Se afirmativo, quando ele ocorre? \_\_\_\_\_

56 - Você sente sensibilidade nos dentes? 1 Não  2 Sim

57 - Você tem as gengivas inchadas? 1 Não  2 Sim

58 - Você sente mau gosto na boca? 1 Não  2 Sim

59 - Você sente seus dentes frouxos? 1 Não  2 Sim

## VII – ORAL HEALTH IMPACT PROFILE 14 ANTES DA GESTAÇÃO

**Antes de você ficar grávida**, por causa de problemas com seus dentes, sua boca ou dentadura:

60 – Você teve problemas para falar alguma palavra?

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

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

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

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

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

63 – Você se sentiu incomodada ao comer algum alimento?

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

64 – Você ficou preocupada?

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

65 – Você se sentiu estressada?

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

66 – Sua alimentação ficou prejudicada?

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

67 – Você teve que parar suas refeições?

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

68 – Você encontrou dificuldade para relaxar?

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

69 – Você se sentiu envergonhada?

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

70 – Você ficou irritada com outras pessoas?

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

71 – Você teve dificuldade para realizar suas atividades diárias?

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

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

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

73 – Você ficou totalmente incapaz de fazer suas atividades diárias?

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

---

**Durante a sua gravidez**, por causa de problemas com seus dentes, sua boca ou dentadura:

74 – Você teve problemas para falar alguma palavra?

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

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

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

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

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

77 – Você se sentiu incomodada ao comer algum alimento?

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

78 – Você ficou preocupada?

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

79 – Você se sentiu estressada?



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

80 – Sua alimentação ficou prejudicada?

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

81 – Você teve que parar suas refeições?

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

82 – Você encontrou dificuldade para relaxar?

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

83 – Você se sentiu envergonhada?

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

84 – Você ficou irritada com outras pessoas?

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

85 – Você teve dificuldade para realizar suas atividades diárias?

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

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

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

87 – Você ficou totalmente incapaz de fazer suas atividades diárias?

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

