

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
NÍVEL DE MESTRADO

NAYRA RODRIGUES DE VASCONCELOS

**DETECÇÃO DE PATÓGENOS PERIODONTAIS
EM MÃES DE BEBÊS PREMATUROS E/OU DE
BAIXO PESO AO NASCER**

São Luís
2014

NAYRA RODRIGUES DE VASCONCELOS

**DETECÇÃO DE PATÓGENOS PERIODONTAIS EM MÃES DE BEBÊS
PREMATUROS E/OU DE BAIXO PESO AO NASCER**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Odontologia da Universidade Federal do Maranhão, para a
obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientadora: Profª. Dra. Fernanda Ferreira Lopes

São Luís
2014

Vasconcelos, Nayra Rodrigues de

Deteccção de patógenos periodontais de mães de bebês prematuros e/ou de baixo peso ao nascer. / Nayra Rodrigues de Vasconcelos. – 2014.

36f.

Impresso por computador (fotocópia)

Orientador: Fernanda Ferreira Lopes.

Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Universidade Federal do Maranhão, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, 2014.

1. Bebês com baixo peso ao nascer 2. Bebê prematuro 3. Doenças Periodontais 4. Bactérias 5. Reação em Cadeira da Polimerase I. Título.

CDU 616.311.2- 002:618.22

NAYRA RODRIGUES DE VASCONCELOS

**DETECÇÃO DE PATÓGENOS PERIODONTAIS EM MÃES DE BEBÊS
PREMATUROS E/OU DE BAIXO PESO AO NASCER**

A Comissão julgadora da Defesa do Trabalho Final de Mestrado em Odontologia, em sessão pública realizada no dia 25/02/2014, considerou a candidata.

() APROVADO

() REPROVADO

1) Examinador: Prof. Dr. Manuel António Gordón-Núñez

2) Examinador: Prof. Dra. Sally Cristina Moutinho Monteiro

3) Presidente (Orientadora): Profa. Dra. Fernanda Ferreira Lopes

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, autor da vida e de tudo, que nos oportuniza com sua criação a evoluirmos no conhecimento e em sabedoria.

A minha orientadora, Prof^ª. Dr^ª. **Fernanda Ferreira Lopes**, pelos ensinamentos compartilhados, competência vivenciada, paciência e orientações empreendedoras ao longo do curso. Sua conduta exemplifica que orientar não se faz apenas acompanhar o fazer de um trabalho, mas dar ao orientando a perspectiva de vida sobre doar-se ao outro. Muito obrigada!

A querida Prof^ª. Dr^ª. **Cláudia Maria Coêlho Alves**, que me introduziu na área de pesquisa ainda na graduação e sempre presente, quando possível, na minha Pós-Graduação. O seu empenho e dedicação agracia a todos também com a criação deste Programa.

A Prof^ª. Dr^ª. **Flávia Castello Branco Vidal** que me ensinou e esteve sempre presente durante toda a parte laboratorial desse trabalho, bem como pela amizade construída ao longo desse período.

Ao coordenador do Programa de Pós-Graduação em Odontologia-Mestrado, Prof. Dr. **Darlon Martins Lima**, pelo constante entusiasmo ao programa, pela oportunidade de crescimento, aprendizado, realização pessoal e profissional.

A todos os **professores** do Programa de Pós-Graduação, que dedicados, prestativos e com seus ensinamentos agregaram à minha vida pessoal e profissional mais conhecimento. Juntos, sem dúvida, compartilhamos este título.

À minha amada mãe, **Lucíola Maria Rodrigues de Vasconcelos**, sempre ao meu lado, por todo apoio, paciência e carinho me ajudando no decorrer da pós-graduação e da vida!

A minha família, meu pai, **Francisco das Chagas de Vasconcelos**, e meus irmãos, **Igor Rodrigues de Vasconcelos**, **Victor Rodrigues de Vasconcelos** e **Caio Rodrigues de Vasconcelos**, por todo apoio e amor.

A minha tia **Maria Lúcia de Aragão do Nascimento**, pelo constante incentivo.

Ao meu namorado, **Francisco Vitor Calixto Goiabeira**, pela compreensão e entendimento nos momentos de ausência e por todo amor e carinho.

Aos meus amigos, **Ethienne Raquel Pires, Glacy Ferreira Soares Neta, Jacqueline Carvalho Galvão da Silva, Lorena Duailibe, Tainá Lima Reis de Pinho, Vinícius de Sousa Carvalho, Vínicius Mendes Albuquerque**, por caminharem comigo mesmo em momentos de ausência dando-me incentivo e apoio.

A todos os meus colegas da **turma V**, com os quais partilhei grandes momentos de aprendizado, dificuldade e alegria. Em especial a **Camila Simas, Flávia Paixão, Halinna Carvalho, e Luana Cantanhede**, vocês tornaram essa caminhada muito mais fácil e agradável. Tenho a certeza que ganhei novas amigas pelo resto da minha vida.

Aos meus colegas de laboratório, **Isaura Danielli Borges de Sousa, Jomar Nunes, Ilka Kassandra Pereira Belfort, Maurício Avelar Fernandes, Sulayne Araújo e Wandson Rodrigues**, por todos os momentos de aprendizado e alegria vivenciados.

As funcionárias do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, **Josinéia Costa Coelho e Annagesse de Carvalho Feitosa**, pela presteza e dedicação.

As funcionárias do Banco de Tumores do Maranhão (BTMA), **Regina, Fátima, Taylande e Kênia**, sempre muito alegres e prestativas.

Ao Banco de Tumores do Maranhão e DNA do Maranhão (BTMA) em pessoa da Dra. **Luciane Maria Oliveira Brito**, por tornar possível a realização desse estudo.

Ao **CNPQ** e a **FAPEMA** pelo apoio e financiamento concedido.

A **Ananda Paiva, Jéssica Costa, Luciene Abreu** pelo auxílio na coleta de dados e realização da fase laboratorial.

As **pacientes voluntárias** pela colaboração e confiança, permitindo a realização desse trabalho.

RESUMO

As bactérias periodontopatogênicas *Prevotella intermedia* (Pi), *Fusobacterium nucleatum* (Fn), *Porphyromonas gingivalis* (Pg), *Treponema denticola* (Td), *Tannerella forsythia* (Tf) e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa) podem estar associadas ao Nascimento Pré-Termo e/ou Baixo Peso ao Nascer (NPT/BPN), pois têm sido encontradas dentro do líquido amniótico de bebês. O presente estudo objetiva estimar a possível relação entre os periodontopatógenos e o nascimento de bebês prematuros (NPT) e/ou de baixo peso ao nascer (BPN). Para isso amostras foram coletadas do biofilme subgengival de quatro sítios mais profundos até 48 horas pós-parto e foram processadas por Reação em Cadeia da Polimerase (RCP) para presença dos periodontopatógenos especificados. As mães foram divididas em grupo caso (bebês com peso < 2500g e/ou idade gestacional < 37 semanas) e grupo controle (bebês com peso ≥ 2500g e idade gestacional ≥ 37 semanas). Os resultados nas análises microbianas não mostraram associação significativa entre prematuridade e baixo peso ao nascer e a maioria dos periodontopatógenos em estudo. Não houve diferença estatisticamente significativa para a presença de periodontopatógenos, não se encontrando associação entre os patógenos periodontais e o BPN/NPT. No entanto, diante da elevada presença de periodontopatógenos no biofilme subgengival das puérperas, sugere-se que os achados dessa pesquisa sirvam de base para futuros estudos sobre a biopatofisiologia envolvida na relação periodontite e nascimento de bebês prematuros e de baixo peso.

Palavras-chaves: Bebês com Baixo Peso ao Nascer. Bebê Prematuro. Doenças Periodontais. Bactérias. Reação em Cadeia da Polimerase.

ABSTRACT

The periodontal pathogens bacteria *Prevotella intermedia* (Pi), *Fusobacterium nucleatum* (Fn), *Porphyromonas gingivalis* (Pg), *Treponema denticola* (Td), *Tannerella forsythia* (Tf) and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa) may be associated with preterm and / or low birth Birth weight (NPT / LBW), since they have been found within the amniotic fluid of infants. The present study aims to estimate the possible relationship between periodontal pathogens in the oral cavity and the birth of Preterm Birth (PTB) and/or Low Birth Weight (LBW). It's a case- control study with the subgingival biofilm samples were collected from four sites up deeper until 48 hours postpartum and were processes by Polymerase Chain Reaction (PCR) for presence the periodontal pathogens *Prevotella intermedia* (Pi), *Fusobacterium nucleatum* (Fn), *Porphyromonas gingivalis* (Pg), *Treponema denticola* (Td), *Tannerella forsythia* (Tf) e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa). The mothers were divided into case grup (babies weighing < 2500g and/or gestational age < 37 weeks) and control group (babies weighing $\geq$ 2500g and gestational age $\geq$ 37 weeks). Chi-square test and the measure of association obtained by Odds Ratio (OR) were used to estimate the association between the variables. Microbial analyses results showed no significant association between PTB and LBW with most periodontal pathogens in the oral cavity, even with association with the clinical presence of periodontitis. However, given the high presence of periodontal pathogens in the biofilm subgingival of recent mothers, it is suggested that the findings of this research serve as the basis for future studies on the pathophysiology involved in the relationship between periodontitis and PTB and/or LBW.

Key-words: Low Birth Weight Infant. Premature Infant. Periodontal Diseases. Bacteria. Polymerase Chain Reaction.

SUMÁRIO

SUMÁRIO	v
ABSTRACT	vi
1. INTRODUÇÃO	08
2. CAPÍTULO I: Detecção de patógenos periodontais em mães de bebês prematuros e/ou de baixo peso ao nascer	12
RESUMO	12
INTRODUÇÃO	13
MATERIAIS E MÉTODOS	11
<i>Desenho do estudo e amostra</i>	<i>11</i>
<i>Informações Demográficas e de Saúde</i>	<i>15</i>
<i>Análise Clínica da Condição Periodontal e Coleta do Biofilme</i>	<i>15</i>
<i>Detecção bacteriana por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)</i>	<i>13</i>
<i>Análise Estatística</i>	<i>15</i>
RESULTADOS	18
DISCUSSÃO	15
REFERÊNCIAS	21
CONSIDERAÇÕES FINAIS	29
REFERÊNCIAS	30
ANEXO A - Aprovação do Comitê de ética	33
ANEXO B - Diretrizes para a publicação de trabalhos na Medicina Oral, Patologia Oral y Cirugía Bucal	34

1. INTRODUÇÃO

Vários fatores maternos, placentários e condições fetais são necessários para conclusão de uma gestação no tempo previsto tendo a criança peso e desenvolvimento normais. Quando uma gravidez termina com um resultado trágico, às vezes diferente, o termo resultados adversos da gestação é usado. Esses resultados abrangem eventos como o nascimento prematuro, muito prematuro, baixo peso ao nascer, pequeno tamanho para a idade gestacional, crescimento intra-uterino restrito e morte fetal. As condições de gestação materna relacionada com a diabetes gestacional e pré-eclâmpsia também são referidos como resultados adversos da gravidez, independentemente do feto ser atingido.¹

Esses efeitos adversos são universalmente definidos como: o nascimento prematuro (NPT) se refere ao nascimento que ocorre antes da conclusão da 37ª semana gestacional, e baixo peso ao nascer (BPN) é o peso inferior a 2.500 g. Muito baixo peso (MBPN) é um termo usado para bebês nascidos com menos de 1.500 g. Crescimento intra-uterino restrito (CIUR) indica que o feto se desenvolveu menos durante a gestação e está intimamente associada com bebês pequenos para a idade gestacional (PIG). Parto muito prematuro (MNPT) geralmente refere-se a nascimentos antes da 32ª semana, mas alguns autores usam o limite antes da 35ª semana.² Enquanto que a pré-eclâmpsia é uma doença hipertensiva perigosa³ que geralmente ocorre após a 20ª semana gestacional, sendo diagnosticada quando uma mulher grávida desenvolve pressão arterial elevada (valores de 140/90mmHg ou mais) e a partir de 300 mg de proteína em uma amostra de urina de 24 horas (proteinúria). A pré-eclâmpsia pode, raramente, progredir para eclâmpsia, uma condição caracterizada pelo aparecimento de convulsões que são potencialmente fatais.⁴

Esses efeitos adversos na gravidez têm causa multifatorial e vários fatores de risco são conhecidamente associados às complicações gestacionais como: a história do nascimento prematuro anterior, abuso de álcool, tabaco e drogas ilícitas, baixo nível educacional, mães muito jovens (<20) ou muito velhas (>40), a falta de assistência pré-natal, o pobre estado nutricional, a obesidade, a diabetes, as infecções e as respostas inflamatórias do hospedeiro.¹

O nascimento prematuro é um problema de saúde, porque está associado com aumento da morbidade e mortalidade neonatal. Assim sendo, os esforços para diminuir a taxa de nascimento pré-termo associadas à morbidade e mortalidade continuam a ser priorizadas nas pesquisas.⁵ Embora com muitos avanços na medicina, a taxa de baixo peso ao nascer associada a parto prematuro não diminuiu no Brasil ao longo das últimas décadas. Os dados

mostram que a prematuridade medida pelo percentual de nascidos vivos com duração da gestação inferior a 37 semanas vinha apresentando discreto aumento ao longo dos últimos anos, à custa especialmente das regiões sudeste e sul, até 2010. Porém em 2011 apresentou forte crescimento em todas as regiões, passando de 7,1 para 9,8% (variação de 37%) na média nacional e na Região Nordeste passou de 6 para 10,5% (variação de 75%),⁶ esse resultado ascendente ressalta a importância de continuar estudando os possíveis fatores associados a tal desfecho.

A Doença Periodontal (DP) têm sido sugerida com uma das infecções possivelmente consideradas como fatores de risco para resultados adversos da gravidez, como prematuridade e baixo peso ao nascer (BPN).⁷ Essas infecções podem estar relacionadas a várias vias de disseminação dos microrganismos, podendo ter acesso à cavidade amniótica de diversas maneiras: ascendente a partir da vagina e do colo do útero, disseminação hematogênica por meio da placenta, pela introdução acidental no momento de procedimentos invasivos (amniocentese) e por propagação retrógrada por meio das trompas de falópio.⁸ Isso pode decorrer do desenvolvimento de um estado pró-inflamatório materno recentemente constatado como tendo um papel chave na via fisiopatológica de complicações obstétricas. Em particular, as infecções uterinas podem ser responsáveis por 25% a 40% de NPTs, e estão fortemente relacionadas a um estado sistêmico de inflamação subclínica.⁹ Infecções na interface materno-fetal são conhecidas por regular a produção de citocinas locais, metaloproteínases, e prostaglandinas que conduzem a um enfraquecimento e rotura prematura das membranas, bem como antecipam as contrações uterinas.¹⁰

Uma cascata de citocinas pró-inflamatórias é desencadeada na doença periodontal, sendo esta uma das duas doenças bucais mais importantes que contribuíram para a carga global de doenças crônicas. Existem diferentes manifestações clínicas da doença periodontal, podendo ser aguda ou crônica. A Gengivite refere-se à inflamação da gengiva causada por bactérias que se acumulam ao longo da margem gengival. Já a Periodontite é uma forma inflamatória mais avançada da doença periodontal que acomete os tecidos de suporte dos dentes. Os sinais clínicos da doença incluem o aprofundamento de bolsas periodontais e perda de inserção clínica, levando progressivamente à mobilidade do dente e, finalmente, à perda do mesmo. A destruição periodontal pode ser causada por fatores locais, tais como o biofilme, ou pode refletir uma resposta imune inadequada. A gengivite e a periodontite também podem ser manifestações de certas doenças sistêmicas, por exemplo, em pessoas com infecção generalizada ou entre pessoas infectadas pelo HIV.¹¹

A doença periodontal é uma das doenças infecciosas crônicas mais comuns em seres humanos com a prevalência de 10 a 90%, dependendo da população e do subgrupo estudado e da definição de caso para doença periodontal utilizada¹². Segundo a Organização Mundial da Saúde, parece que a periodontite pode acometer em maior nível aqueles que vivem na América Latina e América do Sul em comparação com o resto do mundo.¹³ Já no Brasil, na pesquisa nacional de saúde bucal realizada em 2010, cerca de 19,4% dos adultos apresentaram bolsas periodontais rasas e profundas e 50% apresentaram sangramento a sondagem.¹⁴

Durante a gestação, a permeabilidade vascular dos tecidos gengivais é aumentada, facilitando a difusão de bactérias, endotoxinas e outros subprodutos. Sendo assim, alterações na composição da placa subgengival durante a gravidez favorecem o aumento de bactérias anaeróbicas gram-negativas, com maior proporção no segundo trimestre de gestação. Esta alteração ocorre independentemente do desfecho da gestação, criança com peso e idade gestacional normal ou não.¹

Mais de 300 espécies bacterianas podem participar na colonização da cavidade oral, algumas destas podem desempenhar um papel significativo no desenvolvimento da periodontite, tais como *Aggregatibacter* (*Actinobacillus actinomycetemcomitans*), *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* (*Bacteroides forsythus*), como as espécies mais importantes,¹⁵ enquanto que muitas outras espécies são consideradas estritamente associadas a esta relevância clínica, como *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Capnocytophaga* sp. *Parvimonas micra* (*Micromonas micros*), *Campylobacter rectus*, *Treponema denticola*.¹⁶ A presença de tais microrganismos na bolsa periodontal pode ser considerada como um marcador para o desenvolvimento de periodontite ou um indicador na progressão da inflamação.¹⁷

Tais bactérias podem ser divididas principalmente em dois grupos: complexo “laranja” e “vermelho”¹⁸. As bactérias do complexo “laranja” são *Campylobacter rectus*, *Fusobacterium nucleatum*, *Peptostreptococcus micros*, *Prevotella nigrescens* e *Prevotella intermedia*, e as do complexo “vermelho” são *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus* e *Treponema denticola*.¹⁹

Das bactérias do complexo laranja merecem destaque a *Prevotella intermedia* (Pi) e *Fusobacterium nucleatum* (Fn). A *Prevotella intermedia* é um bastonete arredondado, aneróbio, gram-negativo que se pigmenta de negro²⁰ que tem sido associada com indução de gengivite por hormônios na gravidez. Os resultados *in vitro* sugerem que este

microorganismo tem a capacidade de utilizar os hormônios sexuais femininos para favorecer seu crescimento, e assim, podendo estar associado com a gravidez.²¹

Fusobacterium nucleatum é uma das bactérias mais estudadas com conhecida relação com a doença periodontal, sendo um microrganismo dominante no periodonto. É uma espécie anaeróbia, gram-negativa, numericamente dominante em biofilme dental e importante na ecologia do biofilme e das doenças infecciosas humanas. Está associada com o aumento do número de sítios com periodontite, no entanto não é responsável pela doença periodontal destrutiva (uma das principais causas da perda de dentes). Além disso, *Fn* é comumente isolado de infecções intra-uterinas e tem sido associado a complicações da gravidez, incluindo o nascimento de bebês prematuros e de baixo peso ao nascer. Sendo assim, *Fn* é um patógeno importante em infecções humanas, incluindo várias infecções com real impacto social.²²

Deste modo, várias pesquisas²³⁻²⁵ têm se concentrado principalmente na composição da placa subgengival, sugerindo que esta se apresenta como um fator relevante, uma vez que os microrganismos subgengivais são os precursores das infecções periodontais e podem estar associados aos efeitos adversos da gravidez, inclusive já tendo sido detectado a presença de periodontopatógenos no líquido amniótico em bebês prematuros²⁴⁻²⁶. E como ainda não há consenso na literatura acerca da relação desses periodontopatógenos e os efeitos adversos na gravidez, justifica-se o presente estudo, cuja finalidade foi estimar a possível associação entre os periodontopatógenos e o nascimento de bebês prematuros (NPT) e/ou de baixo peso ao nascer (BPN).

2. CAPÍTULO I

Detecção de patógenos periodontais em mães de bebês prematuros e/ou de baixo peso ao nascer

(a ser submetido à Revista *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal*)

RESUMO

O presente estudo objetiva estimar a possível relação entre os periodontopatógenos e o nascimento de bebês prematuros (NPT) e/ou de baixo peso ao nascer (BPN). Para isso amostras foram coletadas do biofilme subgengival de quatro sítios mais profundos até 48 horas pós-parto e foram processadas por Reação em Cadeia da Polimerase (RCP) para presença dos periodontopatógenos especificados. As mães foram divididas em grupo caso (bebês com peso < 2500g e/ou idade gestacional < 37 semanas) e grupo controle (bebês com peso ≥ 2500g e idade gestacional ≥ 37 semanas). Os resultados nas análises microbianas não mostraram associação significativa entre prematuridade e baixo peso ao nascer e a maioria dos periodontopatógenos em estudo. Não houve diferença estatisticamente significativa para a presença de periodontopatógenos, não se encontrando associação entre os patógenos periodontais e o BPN/NPT. No entanto, diante da elevada presença de periodontopatógenos no biofilme subgengival das puérperas, sugere-se que os achados dessa pesquisa sirvam de base para futuros estudos sobre a biopatofisiologia envolvida na relação periodontite e nascimento de bebês prematuros e de baixo peso.

Palavras-chaves: Bebês com baixo peso ao nascer. Bebê Prematuro. Doenças Periodontais. Bactérias. Reação em Cadeia da Polimerase.

INTRODUÇÃO

Cerca de 15 milhões de bebês nascem prematuros (antes das 37 semanas de gestação) e esses bebês têm baixo peso ao nascer (pesam menos que 2.500 g).¹ O nascimento prematuro e baixo peso ao nascer constitui problema de saúde devido ao risco aumentado de mortalidade e morbidade entre bebês nascidos com essa condição,² e, mesmo com os grandes avanços na medicina, a taxa de baixo peso ao nascer associada a parto prematuro não diminuiu no Brasil ao longo das últimas décadas.³

A teoria da infecção focal, redefinida recentemente, sugere que a infecção bucal desempenha um papel nas doenças sistêmicas.⁴ Assim, as infecções orais não se limitam somente a cavidade bucal, mas os patógenos orais também podem induzir efeitos adversos em outras áreas do corpo, como as complicações obstétricas, tais como partos Pré-Termo (PT) e Baixo Peso ao Nascer (BPN).⁵⁻¹⁰

A associação entre a doença periodontal e os resultados adversos da gravidez é objeto de estudo há muito tempo, sendo que alguns autores defendem que existe uma relação significativa entre parto prematuro e doença periodontal.^{2,11,12} bem como há estudos que não revelaram efeitos adversos da periodontite em mulheres grávidas.^{13,14}

Os mecanismos exatos pelos quais a doença periodontal pode afetar adversamente a gravidez ainda permanecem indefinidos.^{15,16} No entanto, alguns estudos mostraram a presença de DNA de patógenos orais associados à periodontite em líquido amniótico,¹⁷⁻¹⁹ tecidos placentários²⁰⁻²³ e trato genital.²⁴

Os periodontipatógenos, *Prevotella intermedia* (Pi), *Fusobacterium nucleatum* (Fn), *Porphyromonas gingivalis* (Pg), *Treponema denticola* (Td) e *Tannerella forsythia* (Tf), foram citados dentre as bactérias detectadas em infecções extra-orais associadas com efeitos

adversos na gravidez.²⁵. Portanto, a identificação de espécies e subespécies bacterianas pode ser plausível para a detecção precoce de riscos às adversidades da gravidez.¹⁷

Mesmo a periodontite sendo considerada um potencial fator de risco ao parto prematuro¹¹, dados contraditórios ainda continuam sendo publicados, sendo necessários mais estudos^{1, 2, 11}. Considerando a ausência de consenso na literatura sobre o tema, este estudo teve por objetivo estimar a possível relação entre a presença de periodontopatógenos *Prevotella intermedia* (Pi), *Fusobacterium nucleatum* (Fn), *Porphyromonas gingivalis* (Pg), *Treponema denticola* (Td), *Tannerella forsythia* (Tf) e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa) na cavidade bucal e o nascimento de bebês prematuros (NPT) e/ou de baixo peso ao nascer (BPN).

MATERIAIS E MÉTODOS

Desenho do estudo e amostra

Foi realizado um estudo caso-controle de base hospitalar na Unidade Materno Infantil do Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão, São Luís – Maranhão – Brasil. O estudo foi conduzido em conformidade com a Resolução nº 466/12 do Ministério da Saúde para pesquisa em seres humanos. Todas as pacientes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). O estudo foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão, Maranhão, Brasil (protocolo nº 002673/2011-60).

A amostra da pesquisa incluiu puérperas do Hospital Universitário Materno Infantil, Universidade Federal do Maranhão, Maranhão, Brasil, que permaneceram na instituição até uma semana após o parto. Foram incluídas na amostra mulheres na faixa etária entre 12 e 45

anos e que deram à luz entre outubro de 2011 a dezembro de 2012. Constituíram o Grupo Caso BPN e/ou NPT, mães de crianças nascidas com peso < 2500g e/ou idade gestacional <37 semanas. As participantes do Grupo Controle eram puérperas que tiveram bebês com peso $\geq$ 2500g e idade gestacional $\geq$ 37 semanas. Foram excluídas mães portadoras de doença cardiovascular e diabetes, as que necessitaram de profilaxia antibiótica para tratamento odontológico ou que foram submetidas a tratamento periodontal na gestação, puérperas portadoras do vírus HIV ou de anemia falciforme, mães que fizeram uso de medicamento abortivo. Todas as participantes foram examinadas durante o mesmo período nos dois grupos de estudo.

Informações Demográficas e de Saúde

Um único entrevistador treinado coletou informações sobre dados demográficos, comportamentos de saúde, como tabaco e bebida alcoólica durante a gestação, hipertensão, diabetes; comportamentos de saúde bucal (tais como escovações dentais diárias, uso regular do fio dental e a experiência de tratamento da saúde bucal durante a gravidez). Também foram coletadas informações obstétricas como história de parto prematuro e baixo peso ao nascer anterior, aborto, número de gestações. Além de informações retiradas dos prontuários hospitalares como peso e idade gestacional do recém-nascido, exames e consultas feitas durante o pré-natal.

Análise Clínica da Condição Periodontal e Coleta do Biofilme

Após a entrevista, um único examinador procedeu ao exame periodontal, feito no leito até 48 horas pós-parto, com auxílio de luz frontal e as puérperas em posição supina. Todas as 267 puérperas, entre casos e controles, foram incluídas para coleta do biofilme

subgingival ao final do exame clínico periodontal, que foi centrado na Profundidade Clínica de Sondagem (PCS) registrada em 6 sítios para cada dente (mésio-vestibular e mésio-lingual, disto-vestibular e disto-lingual e uma medida na região médio-vestibular e médio-lingual). Foram registrados também o Nível de Inserção Clínica (NIC), Sangramento à Sondagem (SS), Índice de Placa (IP). Foi considerada com doença periodontal a voluntária que apresentou pelo menos quatro dentes, com no mínimo um sítio, com profundidade de sondagem ≥ 4 mm, perda de inserção de 3 mm ou mais e sangramento à sondagem, no mesmo sítio.²⁶

O biofilme subgingival foi coletado após a remoção da placa supragengival com gaze estéril, e, então, retirado de quatro sítios diferentes (aqueles com maior profundidade de sondagem de cada quadrante) com curetas periodontais do tipo Gracey 5-6 / 7-8 (Trinity, São Paulo) inserido em toda a profundidade do sítio removendo o biofilme dental. Os biofilmes foram acondicionados em tubos do tipo eppendorfs estéreis contendo solução de Tris-EDTA (150 μ L Tris-EDTA + 100 μ L de solução NaOH) e armazenados em freezer a -20° C.

Deteção bacteriana por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Foi extraído o DNA das amostras conforme descrito pelo manual de uso QIAamp DNA(QIAGENr), com modificações. Em seguida, as mesmas foram analisadas usando a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para detectar a presença dos seguintes patógenos: *Prevotella intermedia* (Pi), *Fusobacterium nucleatum* (Fn), *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa), *Porphyromonas gingivalis* (Pg), *Treponema denticola* (Td) e *Tannerella forsythia* (Tf). Foram realizadas amostras de 50 μ L contendo 45 μ L Mix Platinum de frasco único (Contêm Taq DNA polimerase, Anticorpo anti-Taq planitimum, Magnésio (Mg⁺⁺), DNTPs, glicerol e corantes de rastreamento azul) (Life Technologies, USA), 1,5 μ L

de primer da bactéria em estudo (Invitrogen, USA) e 5µL de DNA da amostra. Os primers utilizados para cada espécie bacteriana estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1 – Primers espécie-específicos que foram utilizadas nas reações de PCR.

Bactéria	Primer 5'- 3'	Referência
<i>Prevotella intermedia</i>	TTT GTT GGG GAG TAA AGC GGG TCA ACA TCT CTG TAT CCT GCG T	Ashimoto, et al 1996 ²⁷
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	ATT GTC GCT AAA AAT TAT AGT T ACC CTC ACT TTG AGG ATT ATA G	Avilla-Campos, et al, 1999 ²⁸
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	AAA CCC ATC TCT GAC TTC TTC TTC ATG CCA ACT TGA AGT TAA AT	Ashimoto, et al 1996 ²⁷
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	AGG CAG CTT GCC ATA CTG CG ACT GTT AGC AAC TAC CGA TGT	Ashimoto, et al 1996 ²⁷
<i>Treponema Denticola</i>	TAA TAC CGA ATG TGC TCA TTT ACA T TCA AAG AAG CAT TCC CTC TTC TTC TTA	Ashimoto, et al 1996 ²⁷
<i>Tannerella forsythia</i>	GCC TAT GTA ACC TGC CCG CA TGC TTC AGT GTC AGT TAT ACC T	Ashimoto, et al 1996 ²⁷

A amplificação foi realizada em termociclador (Perkin Elmer, GeneAmp PCR System 2400, Norwalk, CT, USA). A ciclagem utilizada para *Pi* e *Fn* foi desnaturação inicial a 95° por 3min; seguido de 35 ciclos a 95° por 1 min, 57° por 1 min e a 72° por 2 min. A desnaturação final foi de 72° por 7min.¹⁹ Já para as bactérias *Tf*, *Pg* e *Td* a ciclagem utilizada foi desnaturação inicial a 94° por 3min; seguido de 40 ciclos a 94° por 30s, 62° por 30s e a 72° por 30s. A desnaturação final foi de 72° por 5min.¹⁹ Para bactérias *Aa* a ciclagem utilizada foi desnaturação inicial a 95° por 3min; seguido de 35 ciclos a 95° por 30s, 55° por 30s e a 72°

por 1min. A desnaturação final foi de 72° por 7min.¹⁹

Os produtos da amplificação foram visualizados em eletroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão TBE (Tris 1M, ácido bórico 0.9M, EDTA 0.01M, pH8) (Life Technologies, USA), corados com gel loading (Life Technologies, USA) e Gel red (Uniscience, USA) e fotografados sob um transiluminador com luz UV (BIO-RAD Laboratories, EUA), foi incluído o padrão de peso molecular 100 bp (Uniscience, USA).

Análise Estatística

A variável dependente foi a ocorrência de desfechos adversos gestacionais (BPN e/ou NPT) e as variáveis independentes englobaram a presença de fatores referentes ao perfil da mãe e de periodontopatógenos. Inicialmente foi realizada a estatística descritiva dos dados por meio de frequência absoluta e relativa. As variáveis categóricas foram comparadas entre os grupos por meio do Teste Qui-quadrado e a medida de associação obtida pela Odds Ratio (OR) com seus respectivos intervalos de confiança a 95% (IC95%) foi utilizada para estimar a associação entre presença de periodontopatógenos e fatores referentes ao perfil da mãe com os desfechos gestacionais. O nível de significância adotado foi de 5% ($p < 0.05$).

RESULTADOS

O presente estudo incluiu 261 puérperas no município de São Luís, MA, Brasil, com idade variando de 12 a 43 anos (média $26,04 \pm 6,77$ anos). A amostra foi constituída por 175 puérperas no grupo controle e 86 no grupo caso.

Os grupos caso e controle estavam semelhantes quanto: idade da mãe, quantidade de filhos e presença de infecção urinária. Menor escolaridade, presença de hipertensão e de periodontite foram significativamente mais comuns no grupo caso (Tabela 2).

Tabela 2 – Características da amostra constituída por puérperas sem e com o desfecho gestacional prematuridade e/ou baixo peso ao nascer.

Variáveis	BPN/NPT		
	Controle (%)	Caso (%)	P
Idade da mãe			
<= 25 anos	97(55,43)	44 (51,16)	0,604
>25 anos	78(44,57)	42(48,84)	
Escolaridade			
< = que 10 anos	65(37,14)	44(51,16)	0,042
> que 10 anos	110(62,86)	42(48,84)	
Quantidade de filhos			
<= 2 filhos	139(79,43)	73(84,88)	0,372
> 2 filhos	36(20,57)	13(15,12)	
Hipertensão			
Não	148 (84,57)	48 (55,81)	< 0,001
Sim	27 (15,43)	38 (44,19)	
Infecção urinária			
Não	118 (67,43)	59 (68,60)	0,959
Sim	57 (32,57)	27 (31,40)	
Periodontite			
Não	163(93,14)	65(75,58)	< 0,001
Sim	12 (6,86)	21(24,42)	
	175 (100)	86 (100)	

* Teste do qui-quadrado ($\alpha=0,05$).

As medidas de associação estão expressas na Tabela 3. A probabilidade de haver periodontite ou hipertensão entre as puérperas que tiveram bebês prematuros e/ou de baixo peso é 4 vezes superior, para ambas os fatores, sendo essas duas condições consideradas fatores de risco com forte associação. A menor escolaridade materna também pode ser considerada fator de risco ao desfecho em estudo, por meio de fraca associação.

Tabela 3 – Medida de associação entre prematuridade e/ou baixo peso ao nascer com periodontite, hipertensão e escolaridade em puérperas.

	Prematuridade e/ou baixo peso ao nascer		p*	OR	IC 95% ≤μ≤	
	Controle	Caso				
Periodontite						
<i>Ausente</i>	163	65	< 0,001	4,388	2,041	9,433
<i>Presente</i>	12	21				
Hipertensão						
<i>Ausente</i>	148	48	< 0,001	4,339	2,402	7,839
<i>Presente</i>	27	38				
Escolaridade						
< = que 10 anos	65	44	0,042	1,772	1,051	2,988
> que 10 anos	110	42				
	175	86				

* Teste do qui-quadrado ($\alpha=0,05$). OR = Odds ratio. IC95% = Intervalo de confiança a 95%.

Os resultados nas análises microbianas não mostraram associação significativa entre prematuridade e baixo peso ao nascer e a maioria dos periodontopatógenos em estudo, exceto para *Tannerella forsythia* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Tabela 4).

Tabela 4 – Associação entre prematuridade e/ou baixo peso ao nascer e os periodontopatógenos *Pg*, *Tf*, *Td*, *Pi*, *Fn*, *Aa* detectados em puérperas.

Periodontopatógeno		Grupo		p*
		Controle	Caso	
<i>Pg</i>	Ausente	47(26,86)	31(30,05)	0,167
	Presente	128(73,14)	55(63,95)	
<i>Tf</i>	Ausente	28(16,00)	26(30,23)	0,012
	Presente	147(84,00)	60(69,77)	
<i>Td</i>	Ausente	87(49,72)	37(43,02)	0,375
	Presente	88(50,28)	49(56,98)	
<i>Pi</i>	Ausente	37(21,14)	18(20,93)	0,968
	Presente	138(78,86)	68(79,07)	
<i>Fn</i>	Ausente	09 (5,14)	03 (3,49)	0,775
	Presente	166 (94,86)	83 (95,51)	
<i>Aa</i>	Ausente	39(22,29)	39(45,34)	<0,005
	Presente	136(77,71)	47(54,65)	
Total		175 (100%)	86 (100%)	

* Teste do qui-quadrado ou Exato de Fisher ($\alpha=0,05$).

A Tabela 5 evidencia que o limite inferior do intervalo de confiança para todos os seis

periodontopatógenos estudados foi menor que 1, não podendo ser considerado fator de risco para o desfecho em estudo.

Tabela 5 – Medida de associação entre prematuridade e/ou baixo peso ao nascer com os periodontopatógenos detectados em puérperas.

<i>Periodontopatógenos</i>	<i>p*</i>	<i>OR</i>	<i>IC 95%</i> $\leq \mu \leq$	
<i>Pg</i>	0,167	0,651	0,374	1,132
<i>Tf</i>	0,012	0,439	0,238	0,811
<i>Td</i>	0,375	1,309	0,778	2,201
<i>Pi</i>	0,968	1,012	0,537	1,908
<i>Fn</i>	0,775	1,500	0,395	5,688
<i>Aa</i>	<0,005	0,345	0,198	0,601

* Teste do qui-quadrado ($\alpha=0,05$). OR = Odds ratio. IC95% = Intervalo de confiança a 95%.

DISCUSSÃO

O presente estudo revelou que a periodontite pode ser considerada um fator de risco ao nascimento de bebês prematuros (NPT) e/ou de baixo peso ao nascer (BPN), no entanto, os resultados das análises microbianas não mostraram relação significativa entre os periodontopatógenos detectados nas puérperas e a prematuridade e baixo peso ao nascer dos bebês.

As puérperas de bebês prematuros e/ou baixo peso mostram maior frequência de periodontite e de hipertensão, com diferenças significativas na análise comparativa entre controle e o desfecho avaliado para ambas as variáveis de exposição ($p < 0,001$). Destaca-se que a associação foi forte para periodontite (OR=4,388) e para a hipertensão (OR=4,339), sugerindo ser um fator de risco causal. A literatura menciona que a hipertensão é um fator influenciador já consagrado associado com o desfecho nascimento de prematuros e de baixo peso,²⁹ enquanto, a periodontite tem sido considerada potencial fator de risco ao parto prematuro¹¹, com magnitude de associação variando entre OR de 2,09 a 4,19².

Apesar de haver estudos que encontraram uma relação significativa entre parto prematuro e doença periodontal.^{2,30-32}, há evidências da ausência de efeitos adversos da periodontite em mulheres grávidas.³³ Um dos fatores que podem explicar essa divergência de resultados é o fato de não existir um padrão universalmente aplicado para diagnóstico da periodontite^{2,34}

Observou-se elevada frequência de todos os periodontopatógenos analisados em puérperas, revelando taxa de ocorrência similar entre os grupos caso e controle, exceto para os periodontopatógenos *Tf* e *Aa*. Este resultado corrobora com o já encontrado previamente, inclusive com maior ocorrência de *A. actinomycetemcomitans* em puérperas de bebês a termo.³⁵ Uma possível explicação para estes achados pode estar na hipótese que certos grupos de indivíduos são mais propensos à colonização de *Aa*.³⁶

Ressalta-se a elevada frequência dos periodontopatógenos *Pi* e *Fn* no biofilme subgengival analisado. Resultado que pode ser explicado, pois maior proporção de bactérias do complexo “vermelho” e “laranja” foram encontradas em amostras subgengivais.³⁷ A bactéria *Fn* tendo sido detectada em uma grande variedade de tecidos placentários e fetais, incluindo líquido amniótico, membranas fetais, sangue do cordão umbilical, aspirados gástricos neonatais, pulmão e estômago fetal, associados com corioamnionite, pré-eclâmpsia, parto prematuro e sepse neonatal.³⁸⁻⁴¹ A prevalência de *Fn* detectada no sangue do cordão umbilical da sepse neonatal é igual ou superior à de *E. coli* e *Streptococcus* do Grupo B, colocando *Fn* na mesma escala de importância que esses dois patógenos neonatais bem reconhecidos.³⁸ Destaca-se um relato de caso de morte fetal causada por *Fn* oral, pois trata-se da primeira evidência humana de que a bactéria originada da placa subgingival da mãe translocou-se para a placenta e o feto, causando inflamação aguda e levando o feto a óbito.⁴² A *Fn* é afetada por fatores ambientais, sendo uma das espécies de bactérias mais abundantes da cavidade oral tanto em indivíduos saudáveis e doentes⁴³, o que pôde ser comprovado com

os achados da presente pesquisa.

Apesar de existir a hipótese que a *Pg* pode estar relacionada com resultados adversos da gravidez, incluindo prematuridade e baixo peso ao nascer⁴⁴⁻⁴⁶, os resultados da presente pesquisa não conseguiram comprovar esta relação. No entanto, destaca-se que a grande amplitude do intervalo de confiança registrado para os periodontopatógenos *Pg*, *Td*, *Pi* e *Fn* conduzem estes fatores de exposição desde a classificação de fator de proteção a fator de risco ao desfecho em estudo.

Há o novo modelo de patogênese segundo o qual a periodontite é iniciada por uma comunidade microbiana sinérgica e disbiótica e não por "periopatógenos" selecionados, que convergem para formar e estabilizar uma microbiota provocadora de doenças.⁴⁷ Destaca-se que a presente pesquisa detectou a presença de patógenos, sem determinar o nível e sua proporção em ambos os grupos de estudo, no entanto, a discussão sobre causalidade/casualidade associados à doença periodontal vem ganhando espaço na comunidade científica nos últimos anos,⁴⁸ o que torna estes resultados relevantes. Assim, ainda torna-se importante definir se a relação entre periodontite e o nascimento de bebês prematuros e de baixo peso é casual ou se existe simples associação.³⁵

A presente pesquisa investigou 06 (seis) periodontopatógenos, sendo que mais de 300 espécies bacteriana podem estar presentes na colonização da cavidade oral⁴⁹, portanto, a doença periodontal não é causada somente pelas bactérias estudadas nesta pesquisa. Outro aspecto importante que pode explicar os resultados deste estudo é que durante a gestação os níveis desses patógenos estão aumentados, devido a sua maior facilidade de proliferação.³⁵

Corroborando com este raciocínio, foram encontrados níveis de patógenos mais elevados de periodontopatógenos em gestantes, quando compararam contagem de 10 diferentes espécies bacterianas extraídas do biofilme subgengival de gestantes e não gestantes⁴⁸. Portanto, não se pode deixar de investigar o fato de que os periodontopatógenos

tenham uma relação com o nascimento de bebês prematuros e/ou de baixo peso ao nascer, pois a infecção periodontal materna pode, diretamente e / ou indiretamente, ter potencial para influenciar a saúde da unidade materna-fetal.⁵⁰

A presente pesquisa investigou a relação entre periodontite e a prematuridade e/ou nascimento de bebês de baixo peso, tendo analisado o fator de exposição (periodontite) nos parâmetros clínicos e microbiológicos, sendo que uma das limitações desse estudo foi a ausência de investigação sobre a resposta imuneinflamatória do hospedeiro. No entanto, a pesquisa apresenta vários pontos fortes como critério robusto de diagnóstico da periodontite, tamanho amostral respeitando a relação caso/controle e precisão da técnica de detecção microbiana dos periodontopatógenos.

Desse modo pode-se concluir que existe relação entre o nascimento de bebês prematuros e/ou de baixo peso ao nascer e a periodontite, sugerindo que esta patologia oral pode ser considerada fator de risco a adversidades na gestação, porém, não foi possível atribuir causalidade por meio da presença das bactérias em estudo. No entanto, diante da elevada presença de periodontopatógenos no biofilme subgengival das puérperas, sugere-se que os achados dessa pesquisa sirvam de base para futuros estudos sobre a biopatofisiologia envolvida na relação periodontite e nascimento de bebês prematuros e de baixo peso.

AGRADECIMENTOS

A Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão (FAPEMA) pelo financiamento da pesquisa. Ao Banco de tumores e DNA do Maranhão por permitir a realização dessa pesquisa cedendo suas instalações.

REFERÊNCIAS

1. Zi MY, Longo PL, Bueno-Silva B, Mayer MP. Mechanisms involved in the association between periodontitis and complications in pregnancy. *Front Public Health*. 2014; 2:290.
2. Teshome A & Yitayeh A. Relationship between periodontal disease and reterm low birth weight: systematic review. *Pan African Medical Journal*. 2016; 24:215.
3. Beck S, Wojdyla D, Say L, Betran AP, Merialdi M, Requejo JH, et al. The worldwide incidence of preterm birth: a systematic review of maternal mortality and morbidity. *Bull World Health Organ*. 2010; 88(1):31–8.
4. Offenbacher S, Beck JD. Changing paradigms in the oral disease-systemic disease relationship. *J Periodontol*. 2014; 85: 761–764.
5. Offenbacher S, Katz V, Fertik G, Collins J, Boyd D, Maynor G, et al. Periodontal infection as a possible risk factor for preterm low birth weight. *J Periodontol*. 1996; 67: 1103–1113.
6. Lopez NJ, Smith PC, Gutierrez J. Higher risk of preterm birth and low birth weight in women with periodontal disease. *J Dent Res*. 2002^a; 81: 58–63.
7. Madianos PN, Lieff S, Murtha AP, Boggess KA, Auten RL Jr, Beck JD, et al. Maternal periodontitis and prematurity. Part II: maternal infection and fetal exposure. *Ann Periodontol*. 2001; 6: 175–182.
8. Shanthi v, Vanka a, Bhambal a, Saxena v, Saxena s, Kumar ss. Association of pregnant women periodontal status to preterm and low-birth weight babies: a systematic and evidence-based review. *Dent res j (isfahan)*. 2012; 9(4):368-80.
9. Blanc V, O'Valle F, Pozo E, Puertas A, León R, Mesa F. Oral bacteria in placental tissues: increased molecular detection in pregnant periodontitis patients. *Oral Diseases*. 2015; 21:905–912.
10. Mesa F, Pozo E, Blanc V, Puertas A, Bravo M, O'Valle F. Are periodontal bacterial profiles and placental inflammatory infiltrate in pregnancy related to birth outcomes? *J Periodontol*. 2013; 84: 1327–1336.
11. Walia M, Saini N. Relationship between periodontal diseases and preterm birth: Recent epidemiological and biological data. *Int J Appl Basic Med Res*. 2015; 5(1):2-6.
12. Kunnen A, van Doormaal JJ, Abbas F, Aarnoudse JG, van Pampus MG, Faas MM. Periodontal disease and pre-eclampsia: a systematic review. *J Clin Periodontol*, 2010; 37(12): 1075-87.

13. Vettore MV, Leal Md, Leao AT, da Silva AMM, Lamarca GA, Sheiham A. The relationship between periodontitis and preterm low birthweight. *J Dent Res*. 2008; 87(1):73-8.
14. Cruz SS, costa Mda C, Gomes-filho IS, Barreto ML, dos Santos CA, Martins AG, et al. Periodontal therapy for pregnant women and cases of low birthweight: na intervention study, *Pediatr Int*. 2010; 52(1): 57-64.
15. Michalowicz BS, Gustafsson A, Thumbigere-Math V, Buhlin K. The effects of periodontal treatment on pregnancy outcomes. *J Periodontol*. 2013; 84: 195–208.
16. Ren H & Du M. Role of Maternal Periodontitis in Preterm Birth. *Frontiers in Immunology*. 2017; 8: 1-10.
17. Han YW, Fardini Y, Chen C et al. Term stillbirth caused by oral *Fusobacterium nucleatum*. *Obstet Gynecol*. 2010; 115: 442–45.
18. Mendz G, Kaakoush NO, Quinlivan JA. Bacterial aetiological agents of intra-amniotic infections and preterm birth in pregnant women. *Front Cell Infect Microbiol*. 2013; 3: 58.
19. Ercan E, Eratalay K, Deren O, Gur D, Ozyuncu O, Altun B et al. Evaluation of periodontal pathogens in amniotic fluid and the role of periodontal disease in pre-term birth and low birth weight. *Acta Odontol Scand*. 2013; 71(3-4):553-9.
20. Swati P, Thomas B, Vahab SA, Kapaettu S, Kushtagi P. Simultaneous detection of periodontal pathogens in subgingival plaque and placenta of women with hypertension in pregnancy. *Arch Gynecol Obstet*. 2012; 285: 613–19.
21. Aagaard K, Ma J, Antony KM, Ganu R, Petrosino J, Versalovic J. The Placenta Harbors a Unique Microbiome. *Sci Transl Med*. 2014; 6: 237–65.
22. Ye C, Katagiri S, Miyasaka N, Bharti P, Kobayashi H, Takeuchi Y, et al. The anti-phospholipid antibody-dependent and independent effects of periodontopathic bacteria on threatened preterm labor and preterm birth. *Arch Gynecol Obstet*. 2013; 288(1):65–72.
23. Vanterpool SF, Been JV, Houben ML, Nikkels PG, De Krijger RR, Zimmermann LJ, et al. *Porphyromonas gingivalis* within placental villous mesenchyme and umbilical cord stroma is associated with adverse pregnancy outcome. *PLoS One*. 2016; 11(1):e146157.
24. Cassini MA, Pilloni A, Condò SG, Vitali LA, Pasquantonio G, Cerroni L. Periodontal bacteria in the genital tract: are they related to adverse pregnancy outcome? *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2013; 26(4):931-9.

25. Han YW, Wang X. Mobile Microbiome: Oral Bacteria in Extra-oral Infections and Inflammation. *Journal of Dental Research*. 2013; 92(6):485-491. doi:10.1177/0022034513487559.
26. Gomes-Filho IS, Cruz SS, Rezende EJ, dos Santos CA, Soledade KR, Magalhães MA, et al. Exposure measurement in the association between periodontal disease and prematurity/low birth weight. *J Clin Periodontol*. 2007; 34(11): 957–63.
27. Ashimoto A, Chen C, Bakker I, Slots J. Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. *Oral Microbiol Immunol*. 1996; 11:266-73.
28. Avila-Campos MJ, Sacchi CT, Whitney AM, Steigerwalt AG, Mayer LW. Arbitrarily primed-polymerase chain reaction for identification and epidemiologic subtyping of oral isolates of *Fusobacterium nucleatum*. *J Periodontol*. 1999; 70: 1202-8.
29. Spiegler J, Stichtenoth G, Weichert G, König IR, Schlaud M, Wense AVD. Pregnancy risk factors for very premature delivery: what role do hypertension, obesity and diabetes play? *Arch Gynecol Obstet* 2013; 288:57–64.
30. Haerian-Ardakani A, Eslami Z, Rashidi-Meibodi F, Haerian A, Dallalnejad P, Shekari M, et al. Relationship between maternal periodontal disease and low birth weight babies. *Iran J Reprod Med*. 2013; 11(8):625–30.
31. Alchalabi HÁ, Habashneh RA, Jabali AO, KhaderYS. Association between periodontal disease and adverse pregnancy outcomes in a cohort of pregnant women in Jordan. *Clin Exp Obstet Gynecol*. 2013; 40(3): 399–402.
32. Kothiwale SV, Desai BR, Kothiwale VA, Gandhid M, Konin S. Periodontal disease as a potential risk factor for low birth weight and reduced maternal haemoglobin levels. *Oral Health Prev Dent*. 2014; 12(1):83–90.
33. Tellapragada C, Eshwara VK, Acharya S, Bhat P, Kamath A, Vishwanath S, et al. Prevalence of clinical periodontitis and putative periodontal pathogens amongst south Indian pregnant women. *Int J Microbiol*. 2014:420149.
34. Walia M, Saini N. Relationship between periodontal diseases and preterm birth: Recent epidemiological and biological data. *Int J Appl Basic Med Res*. 2015; 5(1):2-6.
35. Buduneli N, Baylas H, Buduneli E, Turkoglu O, Kose T, Dahlen G. Periodontal infections and pre-term low birth weight: a case-control study. *J Clin Periodontol*. 2005; 32(2): 174-81.
36. Fine DH, Markowitz K, Furgang D, Velliyagounder K. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* as an Early Colonizer of Oral Tissues: Epithelium as a

Reservoir? J Clin Microbiology. 2010; 48(12): 4464–4473.

37. Ximénez-Fyvie LA¹, Haffajee AD, Socransky SS Microbial composition of supra- and subgingival plaque in subjects with adult periodontitis. J Clin Periodontol. 2000 Oct;27(10):722-32.
38. Wang X, Buhimschi CS, Temoin S, Bhandari V, Han YW, Buhimschi IA. Comparative microbial analysis of paired amniotic fluid and cord blood from pregnancies complicated by preterm birth and early-onset neonatal sepsis. PLoS One. 2013; 8:e56131.
39. Bohrer JC, Kamemoto LE, Almeida PG, Ogasawara KK. Acute chorioamnionitis at term caused by the oral pathogen *Fusobacterium nucleatum*. Hawaii J Med Public Health. 2012; 71:280–281.
40. Gauthier S, Tetu A, Himaya E, Morand M, Chandad F, Rallu F, Bujold E. The origin of *Fusobacterium nucleatum* involved in intra-amniotic infection and preterm birth. J Matern Fetal Neonatal Med. 2011; 24:1329–1332.
41. Cahill RJ, Tan S, Dougan G, O'Gaora P, Pickard D, Kennea N, Sullivan MH, Feldman RG, Edwards AD. Universal DNA primers amplify bacterial DNA from human fetal membranes and link *Fusobacterium nucleatum* with prolonged preterm membrane rupture. Mol Hum Reprod. 2005.
42. Han YW, Fardini Y, Chen C, Iacampo KG, Peraino VA, Shamonki JM, Redline RW. Term stillbirth caused by oral *Fusobacterium nucleatum*. Obstet Gynecol. 2010; 115:442–445.
43. Han YW. *Fusobacterium nucleatum*: a commensal-turned pathogen. Curr Opin Microbiol. 2015; 1: 141–147.
44. Machado FC, Cesar DE, Assis AV, Diniz CG, Ribeiro RA. Detection and enumeration of periodontopathogenic bacteria in subgingival biofilm of pregnant women. Braz Oral Res. 2012;26(5):443-9.
45. Emmatty R, Mathew JJ, Kuruvilla J. Comparative evaluation of subgingival plaque microflora in pregnant and non-pregnant women: A clinical and microbiologic study. J Indian Soc Periodontol. 2013;17(1):47-51.
46. Andonova I, Iliev V, Živković N, Sušić E, Bego I, Kotevska V. Can oral anaerobic bacteria cause adverse pregnancy outcomes? Contributions, Sec. Med. Sci. 2015. 36: 137-143.
47. Hajishengallis G, Lamont RJ. Beyond the red complex and into more complexity: the polymicrobial synergy and dysbiosis (PSD) model of periodontal disease

etiology. *Molecular oral microbiology*. 2012;27(6):409-419. doi:10.1111/j.2041-1014.2012.00663.x.

48. Pérez-Chaparro PJ, Gonçalves C, Figueiredo LC, et al. Newly Identified Pathogens Associated with Periodontitis: A Systematic Review. *Journal of Dental Research*. 2014;93(9):846-858. doi:10.1177/0022034514542468.
49. Genco RJ, Kornaman K, Williams R, et al. Consensus report. Periodontal disease: pathogenesis and microbial factors. *Ann Periodontol*. 1996; 1(1): 926-32.
50. Han Y. W. Can oral bacteria cause pregnancy complications? *Womens Health (Lond Engl)*. 2011; 7: 401.

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Frente aos resultados encontrados, pode-se concluir que existe relação entre o nascimento de bebês prematuros e/ou de baixo peso ao nascer e a periodontite, sugerindo que esta patologia oral pode ser considerada fator de risco a adversidades na gestação, porém, não foi possível atribuir causalidade por meio da presença das bactérias em estudo. No entanto, diante da elevada presença de periodontopatógenos no biofilme subgengival das puérperas, sugere-se que os achados dessa pesquisa sirvam de base para futuros estudos sobre a biopatofisiologia envolvida na relação periodontite e nascimento de bebês prematuros e de baixo peso.

Apesar de não se ter encontrado associações positivas, deve-se ressaltar que o desenho do estudo teve a inclusão de dois controles para cada caso com o objetivo de aumentar o poder da análise. Além disso, outro fato importante foi a realização de um estudo duplo-cego para as análises microbianas, reduzindo o risco de viéses.

Ainda assim, sugere-se que mais pesquisas sejam realizadas de modo a avaliar quantitativamente a presença desses e de outros patógenos periodontais, assim como também a presença de citocinas circulantes, afim de que sejam encontrados resultados conclusivos sobre o papel da presença dos periodontopatógenos e o desfecho avaliado.

REFERÊNCIAS

1. Taylor GW, Borgnakke WS, Anderson PF, Shannon MC. Associations between Periodontal Disease and Adverse Pregnancy Outcomes. In: Oral and General Health – Exploring the Connection. Research Review, June 2010. Delta Dental.
2. Wimmer G, Pinlstrom BL. A critical assessment of adverse pregnancy outcome and periodontal disease. J Clin Periodontol. 2008; 35(8): 380-97.
3. ACOG Committee on Obstetric Practice. ACOG practice bulletin. Diagnosis and management of preeclampsia and eclampsia.number 33, january 2002. American College of Obstetricians and Gynecologists. Int J Gynaecol Obstet. 2002;77(1):67-75.
4. Sibai B, Dekker G, Kupferminc M. Pre-eclampsia. Lancet. 2005; 365(9461): 785-99.
5. Clothier B, Stringer M, Jeffcoat MK. Periodontal disease and pregnancy outcomes: exposure, risk and intervention. Best Prac Res Clin Obstet and Gynaecol. 2007; 21(3): 451-66.
6. Consolidação do sistema de informações sobre nascidos vivos – 2011. DataSUS.
7. Challis JR, Lockwood CJ, Myatt L, Norman JE, Strauss JF 3rd, Petraglia F. Inflammation in pregnancy. Reprod Sci. 2009; 16(2): 206-215.
8. Madianos PN, Bobetsis YA, Offenbacher S. Adverse pregnancy outcomes (APOs) and periodontal disease: pathogenic mechanisms. J Periodontol. 2013; 84(4): S170-S80.
9. Gibbs Rs. The relationship between infections and adverse pregnancy outcomes: an overview. Ann Periodontol. 2001; 6(1): 153-63.
10. Cetin I, Pileri P, Villa A, Calabrese S, Ottolenghi L, Abati S. Pathogenic mechanisms linking periodontal diseases with adverse pregnancy outcomes. Reprod Sci. 2012; 19(6): 633-41.
11. Petersen PE & Ogawa H. The global burden of periodontal disease: towards integration with chronic disease prevention and control. Periodontol 2000. 2012; 60(1):15-39.

12. Gomes-Filho IS, Cruz SS, Rezende EJ, dos Santos CA, Soledade KR, Magalhães MA, et al. Exposure measurement in the association between periodontal disease and prematurity/low birth weight. *J Clin Periodontol*. 2007; 34(11): 957–63.
13. Dye BA. Global periodontal disease epidemiology. *Periodontol 2000*. 2012; 58(1): 10-25.
14. Pesquisa Nacional de Saúde Bucal. Sb brasil 2010.
15. Genco RJ, Kornaman K, Williams R, et al. Consensus report. Periodontal disease: pathogenesis and microbial factors. *Ann Periodontol* 1996; 1(1):926-32.
16. Darveau RP, Tanner A, Page RC. The microbial challenge in periodontitis. *Periodontol 2000*. 1997; 14:12-32.
17. Boutaga K, van Winkelhoff AJ, Vandenbrucke-Grauls CM, Savekoul PH. Periodontal pathogens: a quantitative comparison of anaerobic culture and real-time PCR. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2005; 45(2): 191-9.
18. Ximenez-Fyvie LA, Haffajee AD, Socransky SS. Microbial composition of supra- and subgingival plaque in subjects with adult periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2000; 27(10): 722-32.
19. Madianos PN, Lieff S, Murtha AP, Boggess KA, Auten RL Jr, Beck JD, et al. Maternal periodontitis and prematurity. Part II: Maternal infection and fetal exposure. *Ann Periodontol*. 2001; 6(1): 175-82.
20. Lindhe J, Karring T, Lang NP. Tratado de Periodontia Clínica e Implantologia Oral. Cap.4 (Microbiologia da Doença Periodontal), pag 117-118. 4ª Ed. Guanabara Koogan. 2005.
21. Gursoy M, Haraldsson G, Hyvonen M, Sorsa T, Pajukanta R, Kononen E. Does the frequency of *Prevotella intermedia* increase during pregnancy? *Oral Microbiol Immunol*. 2009; 24(4): 299-303.
22. Signat B, Roques C, Poulet P, Duffaut D. *Fusobacterium nucleatum* in Periodontal Health and Disease. *Curr Issues Mol Biol*. 2011; 13(2):25-36.
23. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol*. 1998; 25(2): 134-44.

24. Bearfield C, Davenport ES, Sivapathasundaram V, Allaker RP. Possible association between amniotic fluid micro-organism infection and microflora in the mouth. *BJOG* 2002; 109(5): 527-33.
25. Swati P, Thomas B, Vahab SA, Kapaettu S, Kushtagi P. Simultaneous detection of periodontal pathogens in subgingival plaque and placenta of women with hypertension in pregnancy. *Arch of Gynecol Obstet.* 2012; 285(3): 613-619.
26. Ercan E, Eratalay K, Deren O, Gur D, Ozyuncu O, Altun B et al. Evaluation of periodontal pathogens in amniotic fluid and the role of periodontal disease in pre-term birth and low birth weight. *Acta Odontol Scand.* 2013;71(3-4):553-9.

ANEXO A-APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

	 UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DIRETORIA ADJUNTA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	
PARECER CONSUBSTANCIADO INICIAL	Nº, do Parecer: 240/11 Registro do CEP: 106/11	
PROJETO DE PESQUISA	Nº do Protocolo: 002673/2011-60 Data de Entrada no CEP: 15/07/2011	
	Parecer: APROVADO	

I - Identificação:

Título do projeto: Projeto GeraVIDA - Pesquisa multicêntrica sobre doença periodontal em gestantes e prematuridade/baixo peso ao nascer.

Identificação do Pesquisador Responsável: Cláudia Maria Coelho Alves

Identificação da Equipe executora: Cláudia Maria Coelho Alves, Fernanda Ferreira Lopes, Isaac Suzart Gomes Filho, Maurício Lima Barreto, Johelle de Santana Passos, Maria Icabol pereira Vienna, Simone da Cruz Seixas e Edson José Cerpinheiro Resende.

Instituição onde será realizado: Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão - Unidade Materno Infantil.

Área temática: **Multicêntrico:** Sim **Data de recebimento:** 10.08.11

Cooperação estrangeira: Não **Data de devolução:** 19.08.11

II - Objetivo:

Estimar a possível associação entre doença periodontal materna e prematuridade/baixo peso ao nascer.

III - Sumário do projeto:

Trata-se de um estudo observacional, retrospectivo, do tipo caso controle a ser realizada com puérperas que busquem atendimento em unidades hospitalares dos Estados/Municípios da Bahia (Feira de Santana e Salvador), Maranhão (São Luís), Pernambuco (Petrolina) e Minas Gerais (Montes Claros). Serão incluídas no grupo caso, mães de crianças nascidas com peso inferior a 2500g e com idade gestacional inferior a 37 semanas, na Unidade Hospitalar de cada centro de pesquisa. As participantes do grupo controle serão mães de recém-nascidos do mesmo hospital, com peso igual ou superior a 2500g e idade gestacional maior ou igual a 37 semanas. Os dados relativos ao peso do recém-nato serão coletados a partir do livro de registro de nascido vivos. As mães selecionadas responderão a um questionário e serão submetidas a exames clínicos. Aspectos éticos e análise dos dados contemplados no projeto.

IV - Comentários do relator frente à resolução 196/96 e complementares:

O protocolo de pesquisa possui a seguinte estrutura: Folha de Rosto, Folhas de identificação, Sumário, Introdução, Fundamentação Teórica, Objetivos, Justificativas, Metodologia, Orçamento, Cronograma, Referência Bibliográfica, Currículo Lattes e TCLE. Portanto, em conformidade com o estabelecido na Res. 196/96 CNS/MS.

V - Parecer Consubstanciado do CEP

Assim, mediante a importância social e científica que o projeto apresenta, a sua aplicabilidade e conformidade com os requisitos éticos, somas de parecer favorável à realização do projeto classificando-o como **APROVADO**, pois o mesmo atende aos requisitos fundamentais da Resolução 196/96 e suas complementares do Conselho Nacional de Saúde / MS.

Solicita-se ao (à) pesquisador (a) o envio a este CEP, relatórios parciais sempre quando houver alguma alteração no projeto, bem como o relatório final gravado em CD-ROM.

São Luís, 16 de setembro de 2011


Profª Drª Dórcene Mª Cardoso de Aquino
 Vice-Coordenadora do CEP-HUUFMA
Ethica homini habitat est

Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão
 Rua Barão de Itapary, 227 Centro C.E.P. 65. 020-070 São Luís - Maranhão
 Tel: (98) 2109-1250 E-mail: cep@huufma.br

**ANEXO B-DIRETRIZES PARA PUBLICAÇÃO DE TRABALHO NO
MEDICINA ORAL PATOLOGÍA ORAL Y CIRUGIA BUCAL**