

GABRIEL TILLI POLITANO

**DOENÇA PERIODONTAL, ALTERAÇÕES
INFLAMATÓRIAS E PRÉ-ECLÂMPsia:
AVALIAÇÃO CLÍNICA E IMUNOLÓGICA**

Tese de Doutorado

ORIENTADOR: Prof. Dr. RENATO PASSINI JÚNIOR

**Unicamp
2009**

GABRIEL TILLI POLITANO

**DOENÇA PERIODONTAL, ALTERAÇÕES
INFLAMATÓRIAS E PRÉ-ECLÂMPسيا:
AVALIAÇÃO CLÍNICA E IMUNOLÓGICA**

Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do Título de Doutor em Tocoginecologia, área de Ciências Biomédicas

ORIENTADOR: Prof. Dr. RENATO PASSINI JÚNIOR

**Unicamp
2009**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

P759d	Politano, Gabriel Tilli Doença periodontal, alterações inflamatórias e pré-eclâmpsia: avaliação clínica e imunológica / Gabriel Tilli Politano. Campinas, SP: [s.n.], 2009. Orientador: Renato Passini Júnior Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. 1. Doença periodontal. 2. Pré-eclâmpsia. 3. Citocinas. I. Passini Júnior, Renato. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.
-------	---

Título em inglês: Periodontal disease, inflammatory alterations and preeclampsia: clinical and immunological evaluation

Keywords:

- Periodontitis
- Preeclampsia
- Cytokines

Titulação: Tocoginecologia
Área de concentração: Ciências Biomédicas

Banca examinadora:
Prof. Dr. Renato Passini Júnior
Profa. Dra. Helaine Maria Besteti Pires Mayer Milanez
Profa. Dra. Mary Ângela Parpinelli
Profa. Dra. Gabriela Azevedo de Vasconcelos Cunha Bonini
Profa. Dra. Daniela Prócida Raggio

Data da defesa: 18 – 12 – 2009

Diagramação e arte-final: Assessoria Técnica do CAISM (ASTEC)

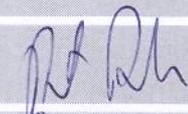
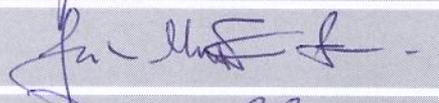
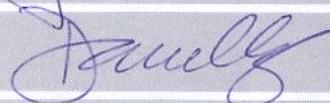
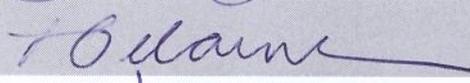
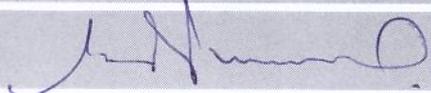
C,
R-383

BANCA EXAMINADORA DA TESE DE DOUTORADO

Aluno: GABRIEL TILLI POLITANO

Orientador: Prof. Dr. RENATO PASSINI JÚNIOR

Membros:

- 1. 
- 2. 
- 3. 
- 4. 
- 5. 

Curso de Pós-Graduação em Tocoginecologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas

Data: 18/12/2009

xxxxxxxx

Dedico este trabalho...

“A Deus, por permitir minha existência e me dar forças para que eu pudesse concluir mais esta etapa de minha vida profissional”

*Às quatro pessoas mais importantes de minha vida:
meus pais, minha irmã e minha esposa.*

*Especialmente à minha esposa que,
durante quatro anos “aguentou” firmemente meus momentos de ausência e dificuldades, sacrificando seus próprios interesses em detrimento dos meus.
Déia, saiba que você é uma pessoa muito especial e que tenho orgulho de ser seu marido. Obrigado por tudo.*

*Aos meus pais,
por me educarem de modo que eu pudesse chegar onde cheguei. Sem isso, talvez não tivesse condições, vontade ou capacidade de chegar até aqui.
Agradeço especialmente ao meu pai, como médico obstetra, por todo auxílio no momento de dúvidas relacionadas à sua área. Tenho grande orgulho de poder contar com este amparo sempre constante e de qualidade.*

Agradecimentos

Ao Prof. Aníbal Eusébio Faúndes Latham, agradeço imensamente pela cooperação em nosso trabalho. Sua participação foi fundamental para que conseguíssemos iniciar e concluir esta jornada. Obrigado pela simplicidade e disponibilidade com que me atendeu sempre que necessário.

Agradeço ao Prof. Dr. Renato Passini Júnior, um exemplo de profissional e professor. Serei eternamente grato por ter me aceito como seu orientado na Faculdade de Ciências Médicas. Meu sonho era poder realizar uma pesquisa como esta e fiz o possível para não decepcioná-lo. Agradeço por todos os conhecimentos transmitidos durante estes últimos quatro anos. Espero poder continuar em contato com o senhor a fim de ampliar ainda mais meus conhecimentos. Em uma visão de aluno, enxergo-o como um profissional extremamente competente, responsável e ético. Obrigado por tudo.

Agradeço ao Dr. Marcelo Nomura que não mediu esforços em auxiliar a minha pesquisa. Aliás, foi o responsável por me apresentar ao Dr. Renato no início de 2006. Com certeza, sua participação foi fundamental para meu ingresso neste curso. Espero que continue sendo um exemplo de profissional e de competência no que faz.

Às Profas. Dras. Mary Ângela Parpinelli e Fernanda G. Castro Surita, muito obrigado pelo auxílio na captação de pacientes no Ambulatório de Hipertensão e também por todos os ensinamentos em diversos momentos.

Agradeço a todos que participaram do desenvolvimento desta tese. Muitas foram as pessoas que, de alguma maneira, contribuíram para que eu pudesse concluir minha pesquisa. Dentre elas estão médicos, enfermeiros, auxiliares de enfermagem, recepcionistas das unidades do CAISM, ou seja, todos que facilitaram a realização da minha pesquisa. Agradecimento especial às técnicas que gentilmente realizaram as coletas de sangue para esta pesquisa.

À Maternidade de Campinas, meu muito obrigado por permitir a realização de parte da pesquisa. Agradeço à diretoria, aos médicos e residentes que me auxiliaram na coleta dos dados.

Agradeço a todos os professores do Departamento de Tocoginecologia da FCM/UNICAMP. Tenho um imenso orgulho de ter realizado meu doutoramento com pessoas tão qualificadas e reconhecidas internacionalmente.

Um agradecimento especial também à Dra. Regina Maura Coli Siegl, coordenadora da Saúde Bucal de Serra Negra, que além de propiciar a avaliação das gestantes em sua cidade, participou ativamente da minha pesquisa, auxiliando-me nas análises laboratoriais. À Dra. Mariana Pellegrinetti e à Dra. Alline Fray, que também sempre se prontificaram a me auxiliar no que fosse preciso.

Agradeço ao Dr. Lício A. Velloso, responsável pelo laboratório de Sinalização Celular, local onde tive a oportunidade de aprender muito e realizar toda parte laboratorial de minha pesquisa. Obrigado pela gentileza em liberar minha entrada neste laboratório. Agradeço especialmente a Josiane Morari, doutoranda do departamento de Fisiopatologia da FCM/UNICAMP. Tenho que deixar muito claro aqui, que sem ela não seria possível a realização desta pesquisa. Pessoa de confiança do Dr. Lício, e com uma capacidade ímpar, foi fundamental em todos os momentos da análise laboratorial. Obrigado Josi, serei eternamente grato por tudo que você me ensinou e auxiliou.

Um agradecimento muito especial a todas as gestantes que aceitaram o convite de participar desta pesquisa. Com os resultados desta pesquisa, talvez possamos melhorar ainda mais os conhecimentos a respeito da gestação.

Agradeço aos Profs. Drs. José Guilherme Cecatti e Helaine Milanez por todas as relevantes considerações realizadas na qualificação desta tese.

Agradeço à Sirlei, estatística do Departamento de Tocoginecologia da UNICAMP, que, sempre disponível, foi responsável por toda análise desta tese.

Agradeço à FAPESP, por ter nos auxiliado com verba para a realização desta pesquisa.

Sumário

Símbolos, Siglas e Abreviaturas	xiii
Resumo	xv
Summary	xvii
1. Introdução	19
1.1. Pré-eclâmpsia.....	19
1.2. Doença periodontal	23
1.3. Pré-eclâmpsia x Doença periodontal	24
2. Objetivos	27
2.1. Objetivo Geral.....	27
2.2. Objetivos Específicos	27
3. Sujeitos e Método	29
3.1. Desenho do estudo	29
3.2. Tamanho amostral.....	29
3.3. Seleção dos sujeitos.....	30
3.3.1. Critérios de inclusão das gestantes com pré-eclâmpsia	31
3.3.2. Critérios de inclusão das gestantes normotensas	31
3.3.3. Critérios de exclusão.....	31
3.4. Variáveis e Conceitos.....	32
3.4.1. Variáveis independentes.....	32
3.4.2. Variável dependente	34
3.4.3. Variáveis descritivas	34
3.4.4. Variáveis de controle.....	34
3.5. Técnicas, testes e exames	36
3.5.1. Coleta e processamento do sangue periférico	36
3.5.2. Avaliação clínica periodontal.....	40
3.6. Coleta de dados	41
3.7. Processamento e análise dos dados	43
3.8. Aspectos Éticos	43

4. Publicações	45
4.1. Artigo 1	46
4.2. Artigo 2	65
5. Discussão	93
6. Conclusões.....	103
7. Referências Bibliográficas.....	105
8. Anexos	113
8.1. Anexo 1 – Carta de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da FCM-UNICAMP	113
8.2. Anexo 2 – Carta de Aprovação da Prefeitura Municipal de Campinas	115
8.3. Anexo 3 – Carta de Aprovação da Prefeitura Municipal de Serra Negra.....	116
8.4. Anexo 4 – Lista de Verificação	117
8.5. Anexo 5 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	118
8.6. Anexo 6 – Questionário aplicado às gestante	120

Símbolos, Siglas e Abreviaturas

°C	grau(s) Celsius
ABEP	Associação Brasileira de Empresas de Pesquisa
CAISM	Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher
CCEB	Critério de Classificação Econômica Brasil
Ct	<i>Threshold Cycle</i>
DEPC	Água tratada com dietilpirocarbonato
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
FCM	Faculdade de Ciências Médicas
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IL-6	Interleucina-6
mm	milímetro(s)
OR	<i>odds ratio</i>
PCR	reação de polimerização em cadeia
RNA_m	RNA mensageiro
rpm	rotações por minuto
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TNFα	Fator de Necrose Tumoral-alfa
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas

Resumo

Introdução: A doença periodontal, afecção que pode acometer os tecidos de sustentação dos dentes, induz à liberação local e sistêmica de mediadores inflamatórios. A pré-eclâmpsia, caracterizada pela hipertensão e proteinúria em gestantes, também parece ter sua etiopatogenia parcialmente relacionada ao sistema imunológico, com aumento dos níveis plasmáticos de algumas citocinas.

Objetivos: Esta pesquisa teve os seguintes objetivos: revisar a literatura quanto à associação entre doença periodontal e pré-eclâmpsia, analisar a influência do Fator de Necrose Tumoral-alfa (TNF α) e da Interleucina-6 (IL-6) na pré-eclâmpsia e avaliar a associação entre a doença periodontal e o desenvolvimento de pré-eclâmpsia, incluindo a análise das citocinas inflamatórias sistêmicas neste processo.

Método: inicialmente procedeu-se à revisão de literatura sobre a relação entre doença periodontal e pré-eclâmpsia, seguida de estudo do tipo caso-controle, realizado em 58 gestantes com pré-eclâmpsia (casos) e 58 gestantes normotensas (controles). Foi realizada a coleta do sangue periférico para avaliação laboratorial da expressão sistêmica do RNA mensageiro (RNAm) das citocinas inflamatórias IL-6 e TNF α por meio do exame de Reação de Polimerização em Cadeia em Tempo Real (PCR em Tempo Real). Todas as gestantes tiveram o periodonto

avaliado para se estabelecer presença ou ausência de periodontite. Para avaliação da homogeneidade entre os grupos foram utilizados o teste exato de Fisher, teste de Mann-Whitney, teste T de Student e teste qui-quadrado. O teste de Mann-Whitney também foi utilizado para comparação dos dados periodontais e de citocinas entre os grupos. Foram calculados *odds ratio* bruto e ajustado, através da regressão logística, para os fatores de exposição. A correlação entre todas as variáveis periodontais e a expressão das citocinas foi realizada por meio do teste de correlação de Spearman. O Risco Atribuível Populacional foi avaliado através da Fórmula de Levin. **Resultados:** Gestantes com pré-eclâmpsia apresentaram maior expressão do RNAm do TNF α , mas não diferiram do grupo-controle em relação à IL-6. Os dados evidenciaram associação entre a periodontite e a pré-eclâmpsia [*odds ratio* ajustado = 3,73 (IC 95% 1,32 a 10,58)]. Não houve correlação entre a periodontite e a expressão do RNAm das citocinas TNF α e IL-6. **Conclusão:** Observou-se associação clínica significativa entre a periodontite e a pré-eclâmpsia; no entanto, não se pôde confirmar a atuação das citocinas inflamatórias neste processo. Além disso, a maior expressão do TNF α em gestantes com pré-eclâmpsia reforça o envolvimento do sistema imunológico na doença.

Summary

Introduction: Periodontitis, an infectious disease affecting the supporting structures of the teeth, leads to local and systemic liberation of various inflammatory mediators. Preeclampsia, a disorder that occurs only during pregnancy and the postpartum period is characterized by high blood pressure and the presence of protein in the urine and also seems to have an immunological etiology, with increased plasma levels of some cytokines. **Objectives:** the aim of the present study was to explore existing literature surrounding the association between periodontitis and preeclampsia as well as to evaluate the influence of Tumor necrosis factor-alpha (TNF α) and Interleukin-6 (IL-6). This work also aimed to evaluate the association between periodontitis and preeclampsia development, including the analysis of systemic inflammatory cytokines. **Methods:** A review of the literature on the relationship between periodontal disease and preeclampsia was initially performed, followed by a case-control analysis of 116 pregnant women, 58 with preeclampsia (cases) and 58 normotense pregnant women (controls). Peripheral blood samples were also collected for laboratorial analysis of IL-6 and TNF α messenger RNA (mRNA) systemic expression, through real-time polymerase chain reaction (Real Time PCR). All participants underwent a

clinical periodontal examination in order to assess the presence or absence of periodontal disease. Crude and adjusted odds ratio were calculated by multivariate logistic regression for exposure factors. Student's t-test, Mann-Whitney U-test, Fisher's exact test and Chi-Square test were used to ensure homogeneity of the groups. Mann-Whitney U-test was also used for intragroup comparison regarding level of cytokines and periodontal data. Correlations between all periodontal data and cytokines expression were determined by Spearman rank test. Population attributable risks were estimated using Levin's Formula. **Results:** the results showed increased TNF α mRNA expression from pre-eclamptic women as compared with normal pregnant women. There were no statistically significant differences in IL-6 between case and control groups. There was an association between periodontitis and preeclampsia [adjusted odds ratio = 3,73 (IC 95% 1,32 to 10,58)]. There was no correlation between periodontitis and IL-6 and TNF α messenger RNA (mRNA) expression. **Conclusion:** There was a significant clinical correlation between periodontitis and preeclampsia; however, an immunologic correlation via inflammatory cytokines could not be determined in our study. In addition, the high expression of TNF- α mRNA in pregnant women emphasizes the immunological mechanisms involved in periodontal disease.

1. Introdução

1.1. Pré-eclâmpsia

A pré-eclâmpsia é uma doença caracterizada por elevação da pressão arterial ($\geq 140/90$ mmHg), a partir da 20^a semana de gestação, na presença de proteinúria (≥ 300 mg/ em 24 horas). No Brasil e no mundo a pré-eclâmpsia é uma das maiores causas de morbimortalidade materna e perinatal, acometendo 5% a 8% das gestantes dos países em desenvolvimento (1).

Diversos fatores de risco têm sido associados à pré-eclâmpsia; no entanto, a etiologia desta alteração ainda permanece sem respostas convincentes. Dentre esses fatores, os aspectos inflamatórios e sua correlação com a disfunção endotelial estão entre os mais pesquisados (2,3,4) principalmente no que se refere à atuação das citocinas inflamatórias Fator de Necrose Tumoral-alfa (TNF α) e Interleucina-6 (IL-6) (2,3,5,6,7,8,9,10,11,12).

Durante a pseudovasculogênese ocorrida na gestação, a migração do trofoblasto e o remodelamento das arteríolas espiraladas, fenômenos que

propiciariam um sistema local de baixa resistência arteriolar, são processos que parecem estar alterados em gestantes com pré-eclâmpsia (12,13). Nestes casos, a invasão das arteríolas espiraladas é limitada, sendo que apenas entre 30% a 50% delas sofrem a invasão do trofoblasto. A média do diâmetro das arteríolas espiraladas de gestantes com pré-eclâmpsia é metade daquela observada na gravidez normal (14).

Este defeito local conduz à segunda fase da doença, em que respostas sistêmicas maternas resultam em hipertensão, proteinúria e alterações em vários órgãos, principalmente em decorrência da disfunção endotelial (12).

A possível atuação de citocinas inflamatórias na disfunção endotelial induziu alguns autores a avaliarem o polimorfismo de seus genes codificadores. Stonek et al. (15), em estudo multicêntrico sobre polimorfismo do TNF α (G308A) e IL-6 (G174C), e Bombell e McGuire (16), em metanálise sobre o polimorfismo do TNF α (-308A) na pré-eclâmpsia, concluíram não haver consistência nas pesquisas, sugerindo mais estudos até que a detecção do polimorfismo possa ser clinicamente utilizada.

Por outro lado, a ativação dos leucócitos circulantes, um processo associado às gestações normais, acontece com maior amplitude em gestantes com pré-eclâmpsia (17,18). Esta ativação exacerbada estaria associada ao aumento nos níveis plasmáticos de algumas citocinas inflamatórias, como a IL-6 (19, 20) e o TNF α (8,20).

O TNF α e outras citocinas parecem contribuir para o desenvolvimento normal da gestação, participando de modo ativo na regulação do crescimento e invasão trofoblástica (21). Por outro lado, as células endoteliais dos vasos sanguíneos sistêmicos são uma das principais áreas de atuação de alguns desses mediadores (8).

Luppi e Deloia (22) demonstraram, *in vitro*, que os monócitos circulantes de gestantes com pré-eclâmpsia liberaram mais IL-6 do que as células de gestantes normotensas. Estes resultados indicaram que os monócitos podem representar uma potente fonte de citocinas inflamatórias em gestantes com hipertensão.

A IL-6 é uma citocina com múltiplas funções, já que regula respostas imunes, reações de fase aguda e hematopoiese, mostrando-se muito importante nas defesas naturais do organismo. Como exemplo, ela pode ser produzida no sítio inflamatório e induzir a liberação hepática de proteínas de fase aguda (23).

Ao avaliarem pacientes que haviam sofrido infarto do miocárdio, Erzen et al. (24) realizaram avaliação ultrassonográfica e análise de citocinas inflamatórias sistêmicas como IL-6 e TNF α . Segundo os autores, a IL-6 mostrou-se o mais valioso marcador para disfunção endotelial.

Rinehart et al. (25) demonstraram, por meio de reação de polimerização em cadeia (PCR), que placentas de gestantes com pré-eclâmpsia evidenciaram maior expressão de citocinas como Interleucina 1-beta, Interleucina-10 e TNF α , sugerindo ligação entre estes achados e a disfunção endotelial global observada nestas mulheres.

Apesar de a literatura concordar sobre o processo inflamatório da pré-eclâmpsia, os estudos que analisam os níveis sistêmicos de diversas citocinas encontraram resultados conflitantes. No que se refere ao TNF α , algumas pesquisas evidenciaram maiores níveis plasmáticos em gestantes com pré-eclâmpsia (7,8,11,12), enquanto outras não encontraram esta diferença (2,5). Em relação à IL-6, alguns estudos também relataram maiores níveis em gestantes com pré-eclâmpsia (2,3,6,9,10,12), enquanto outros não encontraram diferenças (7).

Todas as pesquisas citadas acima utilizaram métodos para determinação direta da quantidade de citocinas, por exemplo, por meio do método ELISA. No entanto, há outra forma de avaliação do processo inflamatório, que é por meio da detecção do RNAm (26).

A diferença entre a análise das citocinas por meio do método ELISA ou do PCR está justamente no que se detecta com os exames. Enquanto o método ELISA, o mais utilizado nas pesquisas citadas acima, detecta a proteína circulante, o PCR detecta o RNAm que participaria da produção desta proteína. O PCR em Tempo Real, uma derivação do exame PCR, permite ainda a comparação entre as amostras amplificadas (27).

Portanto, toda vez que há um estímulo ao sistema imunológico, o que acontece no caso das gestantes com pré-eclâmpsia, o RNAm é transcrito e traduzido, produzindo as proteínas (citocinas). Alguns estudos têm evidenciado que a detecção das proteínas presentes no sangue pode ser difícil ou apresentar valores não confiáveis já que muitas vezes seu tempo de meia-vida é curto, dificultando

sua detecção. Ainda, alguns estudos sugerem que a rápida captação da citocina pelo receptor também impede sua detecção no plasma sanguíneo. Por outro lado, o PCR em Tempo Real, ao detectar o estímulo gênico para a produção da proteína, poderia apresentar maior sensibilidade. Em teoria, bastaria uma fita de RNAm de alguma citocina específica, que a mesma seria detectada, amplificada e teria seus valores comparados com outras amostras (26, 27).

1.2. Doença periodontal

A doença periodontal engloba as alterações dos tecidos que envolvem os dentes. Inclui a gengivite, quando a alteração é somente nos tecidos moles, geralmente caracterizada por inflamação gengival, e a periodontite quando o tecido de suporte (osso alveolar) é atingido. Estas doenças ocorrem na dependência direta do acúmulo de biofilme dentário e cálculo salivar próximo à região cervical do dente. Caso estes agentes agressores não sejam removidos periodicamente, por meio de higiene bucal ou limpeza profissional, eles tendem a atingir o tecido de suporte dos dentes, o osso alveolar, e estimular sua reabsorção, por meio de reação inflamatória (28).

As bactérias subgengivais (encontradas na região do ligamento periodontal), principalmente as gram-negativas (29), estimulam a liberação excessiva de citocinas inflamatórias como a interleucina 1-beta, prostaglandina E₂ (30), IL-6 e TNF α (31). Sabe-se que algumas destas citocinas podem ter seus níveis aumentados na corrente sanguínea em decorrência da doença periodontal (32,33).

Por exemplo, imediatamente após o tratamento periodontal, que consiste de raspagem da região afetada com curetas, o plasma sanguíneo apresenta valores aumentados de IL-6 e TNF α . Pode-se explicar este aumento de duas maneiras: ou pela disseminação das citocinas ou pela disseminação de bactérias, induzindo à produção das citocinas sistemicamente (34).

Justamente calcados na disseminação destas citocinas e/ou bactérias, e por meio de mecanismos inflamatórios, acredita-se haver associação entre a doença periodontal crônica e o aumento do risco de algumas alterações sistêmicas, principalmente *diabetes mellitus* (35), alterações cardiovasculares (29), partos prematuros (36), prematuros de baixo peso (37) e pré-eclâmpsia (38,39,40,41,42,43,44,45).

1.3. Pré-eclâmpsia x Doença periodontal

Apesar da etiologia da pré-eclâmpsia ainda permanecer parcialmente desconhecida, relaciona-se a alguns fatores de risco, como primiparidade, obesidade, alterações renais, dentre outras. No entanto, nos últimos anos tem-se evidenciado a influência das infecções nesta condição mórbida, sendo que, dentre elas, pode-se incluir a doença periodontal (39).

Conde-Agudelo et al. (46), ao realizarem revisão sistemática e metanálise sobre a influência das infecções no risco da pré-eclâmpsia, concluíram que a periodontite é o quadro mais associado a este tipo de hipertensão. Alguns estudos epidemiológicos também encontraram um aumento do risco para o desenvolvimento

da pré-eclâmpsia em gestantes com periodontite (38,39,40,41,42,43,44,45), enquanto outras não puderam confirmar estes resultados (47,48).

As explicações para esta relação poderiam se basear, por exemplo, nas lesões endoteliais frequentemente encontradas em gestantes com pré-eclâmpsia. Sabe-se que algumas citocinas inflamatórias, principalmente o TNF α , têm capacidade de lesar o endotélio vascular (49), sendo que este fator é também um daqueles produzidos e disseminados na presença de doença periodontal.

Outras pesquisas encontraram patógenos periodontais em placas de ateroma após análises laboratoriais (50), sugerindo relação da doença periodontal com aterosclerose, sendo que a literatura relata também a similaridade entre as lesões vasculares placentárias e as lesões ateroscleróticas (38).

Deve-se lembrar que gestantes com pré-eclâmpsia, independentemente de afecções bucais, parecem apresentar aumento dos níveis plasmáticos de algumas citocinas, como: IL-6, IL-8 (6,9), TNF-alfa (8), IL-10 (6). O aumento dos níveis destas citocinas seria decorrente de um estado inflamatório generalizado; no entanto a significância destas alterações na patogênese da pré-eclâmpsia ainda permanece obscura (9).

Tendo em vista a importância da presença destas citocinas no sangue das gestantes com pré-eclâmpsia, para que a sua relação com a doença periodontal possa ser realmente estabelecida, há a necessidade de pesquisar se gestantes com periodontite apresentam maiores níveis destas citocinas no plasma sanguíneo quando comparadas com aquelas sem periodontite, sugerindo a

disseminação sistêmica dos mediadores sabidamente liberados no local. Estes resultados evidenciam se há alguma relação entre a presença da doença bucal e o nível de mediadores no plasma de gestantes. O estudo de Oettinger-Barak et al. (40) encontrou maiores quantidades de PGE₂, IL-1beta e TNF-alfa nas bolsas periodontais de gestantes com pré-eclâmpsia, mas não avaliou as citocinas no sangue materno.

Não foram encontrados na literatura analisada estudos que avaliassem a presença sistêmica de algumas das citocinas mais ligadas à pré-eclâmpsia (TNF α e IL-6) e à presença de doença periodontal, de modo a estabelecer uma relação entre as duas afecções. Em função disto, foi proposto o presente estudo.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Avaliar a associação clínica e imunológica entre a doença periodontal e a pré-eclâmpsia.

2.2. Objetivos Específicos

- Revisar a literatura quanto à associação entre a doença periodontal e a presença de pré-eclâmpsia.
- Avaliar a correlação entre a expressão do RNAm do TNF α e IL-6 nos leucócitos de gestantes e a presença de pré-eclâmpsia.
- Avaliar a associação clínica entre doença periodontal e pré-eclâmpsia, analisando também a influência da expressão sistêmica do RNAm do TNF α e IL-6 nesta relação.

3. Sujeitos e Método

3.1. Desenho do estudo

Foi realizada revisão de literatura utilizando as bases de dados PUBMED e todas aquelas pertencentes à Biblioteca Virtual em Saúde (www.bireme.br) seguida de estudo caso-controle não pareado com gestantes com pré-eclâmpsia (casos) e gestantes sem pré-eclâmpsia (controles).

3.2. Tamanho amostral

Para o cálculo do tamanho da amostra utilizaram-se estudos que apresentam as medidas de saúde bucal em mulheres com e sem pré-eclâmpsia (Tabela 1) e aqueles que avaliaram a presença de citocinas inflamatórias (IL-6 e TNF-alfa) em gestantes com e sem pré-eclâmpsia (Tabela 2).

Tabela 1. Medidas de saúde bucal em gestantes com e sem pré-eclâmpsia

Variável	pré-eclâmpsia em gestantes		N*	Autores
	com	sem		
Profundidade de sondagem (mm)	2,99 ± 0,4	2,3 ± 0,3	6	Canakci et al., 2004
Perda de inserção (mm)	3,2 ± 0,5	2,5 ± 0,4	8	Canakci et al., 2004
Índice de sangramento (% de sítios)	40,6 ± 13,9	24,7 ± 11,8	14	Canakci et al., 2004
Prevalência da doença periodontal	46,3%	21,9%	58	Canakci et al., 2004

*Teste qui-quadrado

Tabela 2. Avaliação sanguínea das citocinas inflamatórias (IL-6 e TNF α) em gestantes com e sem pré-eclâmpsia

Variável	pré-eclâmpsia em gestantes		N*	Autores
	com	sem		
IL-6 sanguíneo (pg/ml) Média \pm desvio padrão	17,6 \pm 1,5	7,3 \pm 1,4	2	Madazli et al., 2003
IL-6 sanguíneo (pg/ml) Média	13	3,3	16	Jonsson et al., 2006
IL-6 sanguíneo (pg/ml) Média \pm desvio padrão	5,8 \pm 4,8	3,0 \pm 2,4	26	Afshari et al., 2005
TNF-alfa sanguíneo (pg/ml) Média	4,7	3,3	50	Hayashi et al., 2005

* Teste T Student

Foi então adotado o maior tamanho da amostra dentre os calculados, o que resultou em uma amostra final de, no mínimo, 58 gestantes para cada grupo, totalizando 116 gestantes. Foi utilizado o programa SAS 9.02, com nível de significância de 5% e poder do teste de 80%.

3.3. Seleção dos sujeitos

As mulheres com pré-eclâmpsia foram selecionadas no Ambulatório de Pré-Natal Especializado e na Enfermaria de Patologia Obstétrica do Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher (CAISM) da UNICAMP e na Maternidade de Campinas. As gestantes normotensas foram avaliadas no Centro de Saúde Barão Geraldo (CBG), localizado em Campinas e na Unidade Básica de Saúde Praça Lyons, em Serra Negra. A pesquisa nestes locais foi aprovada pela Faculdade de Ciências Médicas (FCM) da UNICAMP (ANEXO 1), pela Prefeitura Municipal de Campinas (ANEXO 2) e pela Prefeitura Municipal de Serra Negra (ANEXO 3).

3.3.1. Critérios de inclusão das gestantes com pré-eclâmpsia

- Ter o diagnóstico de pré-eclâmpsia, ou seja, estar acima de 20 semanas de gestação, apresentar pressão arterial $\geq 140/90$ mmHg e proteinúria ≥ 300 mg/24 horas (1).

3.3.2. Critérios de inclusão das gestantes normotensas

- Ser normotensa antes e/ou durante a presente gestação.

3.3.3. Critérios de exclusão

- Diagnóstico de pré-eclâmpsia em gestação anterior;
- Diabetes gestacional ou pré-gestacional;
- Nefropatias;
- Gestação múltipla;
- Alteração cardíaca valvar;
- Diagnóstico de qualquer alteração cardíaca com necessidade de antibioticoprofilaxia para tratamento dentário;
- Realização de tratamento periodontal durante a gestação;
- Apresentar o vírus da Imunodeficiência Humana (HIV);
- Apresentar menos de 15 dentes na boca;
- Evidência de alguma outra infecção, diferente da doença periodontal, no momento da avaliação.

3.4. Variáveis e Conceitos

3.4.1. Variáveis independentes

- **Periodontite:** Doença que acomete os tecidos de sustentação do órgão dentário (osso alveolar, ligamento periodontal e cemento radicular) (28), medida em todos os dentes, em seis pontos por dente (mesiovestibular, vestibular, distovestibular, mesiolingual/palatina, lingual/palatina, distoligual/palatina), após avaliação da profundidade de sondagem, perda de inserção e sangramento à sondagem, por meio de sonda periodontal milimetrada Goldman-Fox/Willians (Hu-Friedy®): categorizada em presente (presença de dois ou mais sítios com profundidade de sondagem $\geq 4\text{mm}$ e perda de inserção $\geq 4\text{mm}$, com sangramento à sondagem); ou ausente (41).
- **Biofilme dentário:** Acúmulo de bactérias e proteínas salivares na superfície dentária (28), avaliada em seis pontos por dente (mesiovestibular, vestibular, distovestibular, mesiolingual/palatina, lingual/palatina, distoligual/palatina), por meio de sonda periodontal milimetrada; categorizada em cada ponto em: presente (caso fosse detectado biofilme na sonda após sondagem próxima à margem gengival) e ausente (caso não houvesse presença de biofilme na sonda após sondagem próxima à margem gengival).
- **Sangramento à sondagem:** Caracterizado pelo sangramento gengival após toque da sonda periodontal na margem gengival, avaliada em seis pontos por dente (mesiovestibular, vestibular, distovestibular, mesiolingual/palatina, lingual/palatina, distoligual/palatina); presente (caso houvesse sangramento após até 15 segundos da sondagem) ou ausente (caso não houvesse sangramento após sondagem).
- **Perda de inserção:** Distância entre a junção cimento-esmalte do dente e o fundo da bolsa periodontal ou sulco gengival (38), avaliada

em seis pontos por dente (mesiovestibular, vestibular, distovestibular, mesiolingual/palatina, lingual/palatina, distoligual/palatina) por meio da sonda periodontal milimetrada; valores apresentados em milímetros.

- **Profundidade de Sondagem:** Distância entre a margem gengival e o fundo da bolsa periodontal ou sulco gengival (38), avaliada em seis pontos por dente (mesiovestibular, vestibular, distovestibular, mesiolingual/palatina, lingual/palatina, distoligual/palatina) por meio da sonda periodontal milimetrada; valores apresentados em milímetros.
- **Retração gengival:** Distância entre a margem gengival e a junção cimento-esmalte do dente (38), avaliada em seis pontos por dente (mesiovestibular, vestibular, distovestibular, mesiolingual/palatina, lingual/palatina, distoligual/palatina) por meio da sonda periodontal milimetrada; valores apresentados em milímetros.
- **Expressão do RNAm da Interleucina-6 nos leucócitos:** Quantidade de RNAm (RNA que seria utilizado para produção da citocina Interleucina 6) que é produzido por leucócitos ativados na presença de infecção e responsável por defesas do organismo (51), avaliada no sangue da gestante, coletado na quantidade de 3ml e medido pelo exame laboratorial PCR em Tempo Real, sendo expressa quantitativamente em curva de comparação com as outras amostras.
- **Expressão do RNAm do Fator de Necrose Tumoral Alfa nos leucócitos:** Quantidade do RNAm (RNA que seria utilizado para produção da citocina TNF α) que é produzido por leucócitos, responsável por defesas do organismo (51), avaliada no sangue da gestante, coletado na quantidade de 3ml e medido pelo exame laboratorial PCR em Tempo Real, sendo expressa quantitativamente em curva de comparação com as outras amostras.

3.4.2. Variável dependente

- **Pré-eclâmpsia:** Doença que acomete gestantes, caracterizada por hipertensão arterial a partir da 20^a semana de gestação e presença de proteinúria; avaliada por meio da pressão arterial elevada medida em duas ocasiões com 4 horas de diferença e proteinúria medida por meio da urina coletada em 24 horas; categorizada em presente (pressão arterial \geq 140/90mmHg e proteinúria \geq 300mg) e ausente (Pressão arterial \leq 140/90mmHg e proteinúria $<$ 300mg) (1).

3.4.3. Variáveis descritivas

- **Estado marital:** Situação conjugal, conforme referido pela gestante: com companheiro ou sem companheiro.
- **Utilização de álcool:** Ato de ingerir quaisquer bebidas alcoólicas durante a atual gestação, referida pela mulher: categorizada em: consumo diário, consumo semanal ou consumo mensal.

3.4.4. Variáveis de controle

- **Classe econômica:** Classe a que um indivíduo pertence, baseada na capacidade financeira que o mesmo tem para adquirir um bem, classificada após pontuação final referente a uma série de questões realizadas à gestante, segundo as categorias descritas pela Associação Brasileira de Empresas de Pesquisa (52): classe A1, classe A2, classe B1, classe B2, classe C, classe D, classe E.
- **Cuidado pré-natal:** Fato de a gestante estar realizando consultas de pré-natal até o período da avaliação pelo pesquisador, segundo consta no prontuário médico ou conforme referido pela paciente (caso o pré-natal seja realizado em outra instituição): sim, não.

- **Idade:** Número de anos da gestante desde o nascimento até a entrevista, calculada por meio da data de nascimento no documento de identificação (RG): número de anos completos.

- **Cor/Raça:** Cor da pele da mulher, autotclassificada pelo sujeito, segundo as categorias utilizadas no censo demográfico de 2000, pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (53): branca, preta, parda, amarela, indígena ou outra.

- **Idade gestacional:** Período da gestação em que a mulher se encontra no momento da pesquisa, segundo consta do prontuário médico: categorizado em semanas de gestação.

- **Tabagismo:** Ato de fumar cigarro durante a atual gestação, referida pela mulher: categorizada conforme o número médio de cigarros fumados por dia.

- **Número de gestações prévias:** Número de vezes que a mulher engravidou anteriormente à presente gestação, segundo consta no prontuário médico: nenhuma vez, uma vez, mais de uma vez.

- **Número de partos prévios:** Número de partos a que a mulher foi submetida anteriormente à presente gestação, segundo consta do prontuário médico: nenhuma vez, uma vez, mais de uma vez.

- **Índice de massa corpórea (IMC) pré-gravídica:** critério de avaliação do grau de obesidade da mulher imediatamente antes da atual gestação, calculado pelo pesquisador por meio dos dados do prontuário médico no momento da primeira consulta de pré-natal. Foi calculado por meio do peso, em quilogramas, dividido pelo quadrado da altura, em metros: categorizado em magreza (< 18,5); normal (18,5 a 24,9); sobrepeso (25 a 29,9); obesidade (> ou igual a 30) (54).

3.5. Técnicas, testes e exames

As gestantes incluídas no estudo foram submetidas à coleta do sangue venoso periférico e ao exame clínico (avaliação do periodonto para diagnóstico da doença periodontal), conforme explicitado abaixo:

3.5.1. Coleta e processamento do sangue periférico

Uma enfermeira realizou a coleta de 3ml do sangue venoso periférico da gestante, material imediatamente acondicionado em frasco contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) e levado ao Laboratório de Sinalização Celular da FCM-UNICAMP, onde foi armazenado em geladeira a 4°C por, no máximo, 24 horas.

Para extração do RNAm, o sangue total foi colocado em um tubo cônico e centrifugado (4°C e 2500 rotações por minuto – rpm -, por 5 minutos) para separação dos leucócitos, plasma e hemácias. O plasma (porção superficial) foi removido e ao restante foi adicionado 1ml de cloreto de amônio 2M e 140µl de bicarbonato de amônio 1M, sendo este volume completado com água ultrapura para 14ml. Estas soluções de cloreto de amônio e bicarbonato de amônio foram necessárias para a lise das hemácias e para que isto ocorresse de maneira eficiente, o sangue já diluído com estas soluções passou por uma agitação de 10 minutos e nova centrifugação (4°C e 3000rpm, por 10 minutos) agora para que os leucócitos fossem isolados no fundo do tubo. Aos leucócitos isolados foram adicionados 2ml de Trizol (Invitrogen Brasil[®]), sendo o volume final dividido em 2 tubos de 1,5ml.

■ Isolamento do RNA e construção do cDNA

O isolamento do RNAm dos leucócitos foi realizado por meio do reagente Trizol[®] (Invitrogen, Brasil), conforme especificações do reagente. O reagente consiste em uma solução monofásica de fenol e guanidina isotiocianato, que deriva da melhoria do método de isolamento de RNA em um único passo desenvolvido por Chomczynski e Sacchi (55), conforme descrito a seguir:

- Adição de 200µl de clorofórmio para cada 1ml de Trizol e homogeneização durante 15 segundos.
- Centrifugação durante 15 minutos a 4°C e 10500 rpm; retirar o RNA (sobrenadante) e transferir para um novo tubo de 1,5ml;
- Adição de 500µl de isopropanol e centrifugação por 10 minutos a 4°C, e 10500 rpm;
- Descarte do sobrenadante e adição 1ml de etanol 75% ao *pellet* de RNA formado; centrifugação por 5 minutos, a 4°C e 8400 rpm; descartar etanol e deixar secar em temperatura ambiente;
- Ressuspensão da amostra em 30µl de água tratada com dietil pirocarbonato (DEPC).

A integridade do RNAm foi avaliada por meio de eletroforese em gel de Agarose a 1,5%. Partiu-se de 3µg de RNAm para fazer o DNA complementar (cDNA), utilizando o *High Capacity cDNA Kit* (Applied Biosystems[®], CA, USA), de acordo com especificações do próprio reagente.

Posteriormente, com objetivo de se detectar especificamente o RNAm da IL-6 e TNFα, foi realizado o PCR em tempo real, que também permitiu comparar as quantidades de RNAm das amostras.

■ PCR em tempo real

As reações de PCR em tempo real foram realizadas utilizando-se o sistema TaqMan™ (Applied Biosystems®, CA, USA), que é constituído por um par de *primers* e uma sonda marcada com um fluoróforo. Para o gene IL-6 foi utilizado o *assay* HS00174131_m1 (Applied Biosystems®), enquanto para o gene TNF α utilizou-se o *assay* HS00174128_m1 (Applied Biosystems®). O gene *GAPD* (TaqMan™ - Applied Biosystems) foi escolhido como controle endógeno da reação, o qual serve para normalizar a expressão do gene de interesse nas diferentes amostras.

Para a quantificação relativa dos genes em estudo, as reações de PCR em tempo real foram realizadas em triplicata a partir de: 6,25 μ L de TaqMan Universal PCR Master Mix 2x, 0,625 μ L da solução de *primers* e sonda, 1,125 μ L de água e 4,0 μ L de cDNA, sendo que no controle negativo foi adicionado 4,0 μ L de água ao invés do cDNA. As condições de ciclagem utilizadas foram: 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos e 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Os valores da expressão gênica relativa foram obtidos pela análise dos resultados no programa *7500 System SDS Software* (Applied Biosystems®, CA, USA).

Antes de se iniciarem os experimentos de quantificação relativa da expressão de qualquer gene, realizou-se a validação do sistema gene-alvo, no caso, IL-6, TNF α com o controle endógeno *GAPD human*. Verificou-se que as eficiências de amplificação dos genes foram próximas a 100%. Esse passo é essencial para que o controle endógeno possa ser utilizado para normalizar os valores de expressão relativa do gene de interesse.

A validação consistiu na amplificação, tanto com os *primers* dos genes de interesse quanto com o do controle endógeno, dos cDNAs de triplicatas de concentrações diferentes (diluições seriadas) de uma amostra escolhida aleatoriamente. Em seguida, foi construída uma curva-padrão a partir do logaritmo da concentração das amostras pelo Ct [*Threshold Cycle*: ciclo em que cada curva de amplificação atravessa o limiar de detecção (*Threshold*), o qual é definido arbitrariamente]. Nessa curva, foram obtidos os valores da inclinação (*slope*) da curva e da confiabilidade das réplicas (R2). Dessa forma, a eficiência do um sistema foi calculada através da fórmula: $E = 10^{(-1/slope)} - 1$. Para a placa de validação do gene IL-6, TNF α e GAPD, foram feitas triplicatas de uma amostra de cDNA de hepatócito de rato em 7 concentrações diferentes (diluições seriadas de 2x).

Após o cálculo das eficiências de amplificação de cada gene de interesse e do controle endógeno, foi construído um gráfico de dispersão, o qual tem por finalidade definir qual é a amplitude de concentrações para as quais o sistema é eficiente. Para a construção do gráfico foram utilizados os mesmos valores de logaritmo da concentração das amostras no eixo X e a diferença entre as médias dos Cts do controle endógeno e as médias dos Cts do gene de interesse para cada concentração no eixo Y. Em seguida, obteve-se uma linha de tendência para estes valores, a qual possui uma equação de reta na qual é possível verificar o valor da inclinação desta reta. Para que um sistema seja considerado eficiente, o valor da inclinação deve ser menor que 0,1 (quanto mais próximo de zero for este valor, menor é a inclinação da curva e, portanto, mais constante é a diferença entre as médias dos Cts do gene de interesse e do controle endógeno).

Os pontos no gráfico, correspondentes às concentrações, que estiverem mais próximos à linha de tendência são considerados validados (o sistema tem 100% de eficiência nestas concentrações).

3.5.2. Avaliação clínica periodontal

Após coleta do sangue periférico foi realizada em todos os dentes pesquisa de biofilme dentário, retração gengival, sangramento à sondagem, profundidade de sondagem e perda de inserção clínica. Conforme os estudos já publicados, estas são as medidas que permitem adequado diagnóstico da periodontite (38,39,40,41,56). Ainda seguindo estes métodos, todas as medidas foram tomadas em seis pontos por dente, sendo três pontos na face vestibular (mésio-vestibular, centro-vestibular e disto-vestibular) e três pontos na face lingual/palatina (mésio-lingual, centro-lingual e disto-lingual). Os dentes terceiros molares não foram considerados para avaliação.

Todo exame periodontal foi realizado por um único profissional, gravado por meio de um gravador digital (Panasonic Rrus 470[®]) e posteriormente passado para a base de dados do Microsoft Office Excel 2007[®]. Para realização do exame periodontal, o cirurgião-dentista, devidamente paramentado, utilizou uma sonda periodontal milimetrada (Goldman-Fox/Willians - Hu-Friedy[®]), um espelho clínico, roletes de algodão (isolamento relativo do campo operatório) e um capacete com iluminação (Head Spot – MMO[®]). A gestante foi acomodada em uma maca-divã ou na cama de seu leito, permitindo adequada posição para avaliação. A variação intraexaminador foi testada após exames duplicados em 12 gestantes, em dois dias

consecutivos. A porcentagem de concordância foi de 95,2% para profundidade de sondagem e 95,9% para perda de inserção.

As médias dos valores das medidas citadas foram comparadas entre os grupos (41,47). Além disso, gestantes que apresentaram dois ou mais sítios com profundidade de sondagem e perda de inserção clínica ≥ 4 mm, com sangramento à sondagem, foram classificadas como portadoras de periodontite (41).

3.6. Coleta de dados

Para realização da pesquisa e avaliação das gestantes, o pesquisador deslocou-se semanalmente até os locais designados. No Centro de Saúde de Barão Geraldo e no Centro de Saúde de Serra Negra, onde foram avaliadas as gestantes do grupo-controle (normotensas), o pesquisador entrou em contato com os coordenadores e obstetras responsáveis pelo atendimento. Sabendo os dias e horários de marcação das consultas de pré-natal, o pesquisador pôde estar presente. As gestantes foram abordadas na sala de espera, enquanto aguardavam consulta de pré-natal, para responderem à lista de verificação (ANEXO 4) e, caso concordassem em participar, leram e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ANEXO 5). Posteriormente as mesmas foram encaminhadas a uma sala reservada da Unidade, onde foi realizada a aplicação do questionário, coleta do sangue periférico e avaliação periodontal. Em seguida a gestante foi dispensada pelo pesquisador, já que não havia necessidade de acompanhamento para esta pesquisa.

As gestantes do grupo-caso (pré-eclâmpsia), atendidas semanalmente (quartas-feiras de manhã) no ambulatório de pré-natal especializado do CAISM/UNICAMP, também foram abordadas na sala de espera para análise da lista de verificação e aplicação do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Posteriormente, aquelas incluídas no estudo foram encaminhadas para uma sala isolada para responderem ao questionário da pesquisa, terem sangue coletado e passarem por avaliação periodontal em maca com cabeceira regulável. Algumas gestantes deste grupo estavam internadas na Enfermaria de Patologia Obstétrica do CAISM ou na Maternidade de Campinas. O pesquisador entrava em contato diariamente com os médicos responsáveis, com o intuito de detectar as gestantes que pudessem participar da pesquisa. Após liberação do médico responsável, elas foram abordadas pelo pesquisador em seu leito, onde todo o processo foi realizado.

Nos dois grupos, caso fosse necessário, dados adicionais foram pesquisados no prontuário da gestante.

Para avaliação periodontal, a gestante deitou-se em uma maca presente na sala específica ou em seu leito, para ser submetida sequencialmente à coleta de 3ml de sangue venoso periférico do braço (pela enfermeira do local) e avaliação clínica periodontal (realizada pelo pesquisador). Após coleta, o material foi imediatamente encaminhado ao laboratório de Sinalização Celular da UNICAMP, onde foi realizado o exame de PCR em Tempo Real. Durante a avaliação clínica, o pesquisador esteve de posse de um gravador digital, sendo que todas as medidas encontradas foram faladas e gravadas. Posteriormente o pesquisador transcreveu os dados para o banco do Programa Microsoft Office Excel 2007.

O questionário aplicado às gestantes continha informações sobre idade materna, idade gestacional, estado civil, cor/raça, número de gestações anteriores, índice da massa corpórea pré-gravídico (IMC), classificação econômica, utilização de bebidas alcoólicas e cigarro durante a atual gestação e frequência à consulta de pré-natal (ANEXO 6).

3.7. Processamento e análise dos dados

Para avaliar as características estudadas nos grupos foram utilizados o teste exato de Fisher, teste de Mann-Whitney, teste T de Student e teste do qui-quadrado. Estimativas de risco foram calculadas para os fatores de exposição através de *odds ratio* (OR) bruto e ajustados através da regressão logística bivariada e multivariada, respectivamente. O nível de significância assumido foi de 5%. O software utilizado para análise foi o SAS versão 9.02.

A expressão das citocinas inflamatórias entre os grupos foi comparada pelo teste de Mann-Whitney. A correlação entre os diferentes parâmetros periodontais e as citocinas inflamatórias foi avaliada pelo Índice de Correlação de Spearman. O Risco Atribuível Populacional (RAP) foi avaliado pela fórmula de Levin.

3.8. Aspectos Éticos

As considerações éticas do presente estudo fundamentam-se na Declaração de Helsinki (1964) (57) e na Resolução 196 (1996) (58), respeitando todas as diretrizes sobre pesquisas que envolvem seres humanos. A gestantes avaliadas

tiveram sua autonomia respeitada, tendo sido convidadas a participar da pesquisa e podendo aceitar ou recusar.

Todas as gestantes foram adequadamente informadas sobre os objetivos, métodos, riscos, benefícios (dentre outros) da pesquisa. Além disso, foram informadas que a qualquer momento poderiam se retirar da pesquisa.

Para manutenção de todos os direitos dos sujeitos foi aplicado um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (ANEXO 5), que foi lido pelo pesquisador e relido pelas gestantes. Posteriormente, caso concordassem em participar do estudo, as mesmas assinariam o TCLE por livre e espontânea vontade e receberiam uma cópia do mesmo.

O sigilo da identidade das participantes do estudo foi assegurado pelo pesquisador, já que os dados analisados não foram associados ao nome da paciente. Estes dados foram utilizados exclusivamente para a presente pesquisa.

Caso a gestante se negasse a participar da pesquisa, seu atendimento na instituição não seria influenciado. Além disso, todos os casos diagnosticados de pré-eclâmpsia receberam tratamento e orientações adequadas nas unidades em que foram atendidas.

As gestantes que apresentaram doença periodontal foram convidadas a realizarem o tratamento odontológico por cirurgiões-dentistas especializados, gratuitamente, em duas instituições na cidade de Campinas.

4. Publicações

Artigo 1 – Passini Júnior R, Nomura ML, Politano GT. Doença periodontal e complicações obstétricas: há relação de risco? Rev Bras Ginecol Obstetr. 2007;29(7):372-7.

Artigo 2 – Correlation between periodontal disease, inflammatory alterations and preeclampsia

Politano GT, Passini Júnior R, Nomura ML, Velloso LA, Morari J, Couto E.

Enviado para Journal of Clinical Periodontology

4.1. Artigo 1

Doença periodontal e complicações obstétricas: há relação de risco?

Passini-Júnior R¹, Nomura ML², Politano GT³.

1. Professor Doutor do Departamento de Tocoginecologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas
2. Médico e Doutor do Departamento de Tocoginecologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas
3. Pós-graduando do Departamento de Tocoginecologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas

Departamento de Tocoginecologia da FCM/UNICAMP

Gabriel Tilli Politano

R. Antônio Lapa, 1032, Cambuí, Campinas/SP CEP 13025-242

Telefones: (19) 32522903, (19) 96350820

FAX: (19) 32522903

e-mail: gabrielp@mpcnet.com.br

Resumo

Estudos têm apontado possíveis relações de risco existentes entre doenças bucais, principalmente a doença periodontal, e complicações gestacionais, como parto prematuro, nascimento de recém-nascidos de baixo peso e pré-eclâmpsia. As explicações para tais hipóteses baseiam-se no fato da doença periodontal ser de origem infecciosa, o que poderia provocar aumento de citocinas inflamatórias no sangue materno, por sua liberação diretamente da bolsa periodontal ou por disseminação de bactérias patogênicas, induzindo a sua produção sistêmica. Esta suposição fundamenta-se no conhecimento de que a fisiopatologia das complicações obstétricas citadas está associada à presença de algumas citocinas no sangue materno. O presente trabalho teve como objetivo realizar uma revisão da literatura em busca de evidências para estas supostas associações. Apesar do número grande de estudos clínicos encontrados nesta revisão, observa-se a falta de padronização metodológica dos mesmos, fato que limita conclusões definitivas a respeito. Por outro lado, o fato da doença periodontal ainda não ser comprovadamente um fator de risco para as complicações obstétricas não diminui a importância da manutenção da saúde bucal das gestantes, já que devem apresentar condições orais que propiciem adequada alimentação sem dor e sangramento e assim manter o aporte nutricional adequado.

Palavras-chave: Periodontite, citocinas, complicações na gravidez, saúde bucal, gestantes

Abstract

Studies have showed possible risk relations among oral illnesses, mainly periodontal disease and adverse pregnancy outcomes, such as prematurity, low birth weight and preeclampsia. The explanation to this hypothesis are based on the fact that periodontal disease is a infectious state, which may increase maternal serum cytokines by release of such agents directly of the periodontal pocket or by dissemination of pathogenic bacteria, inducing systemic production. This assumption is based on the knowledge that the physiopathology of the pregnancy complications cited above are associated with the presence of some cytokines in the maternal serum. The present study has the objective to review literature in search of evidences to these alleged associations. Although a number of clinical studies had been found in this review, we noticed a lack of methodological standards that limit the conclusions about this topic. On the other side, the fact that periodontal disease isn't still a confirmed risk factor for adverse pregnancy outcomes does not reduce the importance of oral health maintenance during pregnancy, since it is important to allow adequate feeding without pain and bleeding in order to maintain an adequate nutritonal supply.

Keywords: Periodontitis, Cytokines, Pregnancy Complications, Oral Health, Pregnant women

Introdução

A gestação é um momento onde a saúde bucal deve ser acompanhada com muito cuidado, já que, neste período, algumas alterações mórbidas podem se tornar mais prevalentes. Anormalidades como hiperemia, edema e grande tendência ao sangramento gengival, têm sido classificadas como gengivite gravídica¹. A prevalência dessa alteração varia entre 35 e 100%, tendo sua severidade gradualmente aumentada até a 36ª semana de gestação².

É comumente aceita a teoria de que o brusco aumento dos hormônios femininos circulantes durante a gestação é responsável pela exacerbação da reação inflamatória gengival, principalmente por sua ação vasodilatadora³.

Apesar da gestação intensificar a reação inflamatória no tecido gengival, o biofilme dentário, acúmulo de bactérias no dente, é de fundamental importância para o desenvolvimento desta afecção, sendo que seu controle por meio de escovação apropriada parece evitar inflamação e sangramento⁴.

A necessidade dos cuidados bucais durante a gestação baseia-se em dois motivos principais: 1) gestantes devem se alimentar corretamente e, por isso não seria admissível que apresentassem dor e/ou mobilidade dentária; 2) infecções periodontais poderiam se disseminar pela corrente sanguínea e estimular a produção de citocinas inflamatórias. Em decorrência das atuais publicações que relacionam algumas importantes complicações gestacionais (parto prematuro, recém-nascidos de baixo peso e pré-eclâmpsia) com a presença de citocinas também produzidas no periodonto infeccionado, esta revisão buscou avaliar se a literatura disponível permite suportar tal relação de risco.

1) As citocinas inflamatórias periodontais e sua disseminação sistêmica

A doença periodontal é uma das infecções bucais mais prevalentes nos seres humanos, sendo caracterizada por inflamação e sangramento gengival. Quando os agentes causadores desta afecção não são removidos periodicamente, tendem a atingir o tecido de suporte dos dentes, o osso alveolar, e estimular sua reabsorção, por meio de reação inflamatória⁵.

Nas bolsas periodontais podem ser isoladas diversas espécies bacterianas, muitas delas gram-negativas e algumas se caracterizando por alta patogenicidade⁶.

Quando o organismo humano reconhece a presença destas bactérias, inicia-se a reação de imunidade inata, primeira linha de defesa contra os agentes agressores. Além da atuação dos macrófagos fagocitários há a liberação de algumas citocinas inflamatórias, proteínas que regulam e coordenam muitas das atividades das células responsáveis pela imunidade inata⁷.

Diversas são as citocinas inflamatórias encontradas na bolsa periodontal, destacando-se a Interleucina (IL) 1-Beta, Prostaglandina E₂⁸, Interleucina-6 e o Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF-alfa)⁹.

Se estas citocinas, ou mesmo os agentes infectantes, permanecessem exclusivamente no interior da bolsa periodontal, sem atingir a corrente sanguínea, não se justificariam preocupações buscando relações entre doença periodontal e alterações sistêmicas. No entanto, sabe-se que esta disseminação pode ocorrer, sendo o exemplo mais conhecido, o risco de desenvolvimento de endocardite bacteriana após procedimentos cirúrgicos bucais em pacientes com algumas alterações cardíacas, o que levou a American Heart Association (AHA) a preconizar a profilaxia antibiótica para estes casos¹⁰.

Em relação às citocinas, sabe-se que seus níveis sanguíneos podem estar aumentados em pacientes com a doença periodontal, sugerindo sua disseminação a partir destes focos. Há evidências de que, imediatamente após o tratamento periodontal ocorre elevação dos níveis séricos de IL-6 e TNF-alfa¹¹. Este aumento poderia ser explicado de duas maneiras: pela disseminação das citocinas durante a raspagem do tecido infectado ou pela ação circulante das próprias bactérias, induzindo produção das citocinas sistemicamente.

2) Doença periodontal e as complicações gestacionais

Baseando-se na comprovação da disseminação sanguínea das citocinas e/ou bactérias provenientes da infecção periodontal, acredita-se haver associação entre esta afecção e o aumento do risco de algumas alterações sistêmicas, principalmente diabetes melitus¹² e alterações cardiovasculares⁶.

Pode-se sugerir também a relação entre a doença bucal e outras alterações que estão comprovadamente relacionadas com a presença e aumento destas mesmas citocinas, como parto prematuro¹³, recém-nascidos de baixo peso¹⁴ e pré-eclâmpsia^{15,16,17,18,19}. Diversos tipos de estudo são desenhados para buscar estas relações de risco; no entanto, conforme discutido adiante, há fortes restrições nas conclusões destas pesquisas.

2.1) Parto prematuro e recém-nascidos de baixo peso

Em 1996, um estudo do tipo caso-controle com 124 gestantes foi realizado para avaliar se a doença periodontal poderia ser considerada fator de risco para

nascimento de prematuros com baixo peso (<2500g)¹⁴. Para diminuir a influência dos fatores de risco conhecidos associados (cigarro, álcool, drogas, infecções gênitó-urinárias, cuidado pré-natal, paridade, dentre outros) os autores usaram métodos estatísticos para evitar a interferência de variáveis confundidoras. Todas as gestantes tiveram o periodonto avaliado, sendo que aquelas do grupo de casos apresentaram piores condições periodontais que as do grupo controle. Tal achado foi estatisticamente significativo, com odds ratio de 7,9.

Esta pesquisa pioneira estimulou os pesquisadores dessa área a estudar as relações entre doença periodontal, prematuridade e outras complicações gestacionais. Atualmente, centenas de artigos já foram publicados neste sentido, mas os resultados persistem conflitantes²⁰.

Sugere-se que infecções podem ser consideradas um dos fatores etiológicos do parto pré-termo espontâneo^{21,22}. Mesmo que a literatura considere como principais infecções relacionadas a esta complicação gestacional, aquelas da região gênitó-urinária, não se devem desmerecer sítios infecciosos em outros locais do organismo.

Focos infecciosos em atividade, independente da relação topográfica dos órgãos ou de vizinhança, têm potencial de espalhar para outras regiões, principalmente pela corrente sanguínea^{10, 23}. Mas mesmo assim, ainda não se tem certeza de que as bactérias presentes em infecções periodontais são realmente perigosas para a gestação.

Com objetivo de resolver esta dúvida, alguns autores realizaram pesquisa onde injetaram os lipopolissacarídeos das principais bactérias periodontopatogênicas (*Porphyromonas gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium*

nucleatum) no líquido amniótico de ovelhas prenhas. Puderam confirmar a patogenicidade destas bactérias, demonstrando que a maioria dos fetos foi a óbito. Apenas seis fetos do total de 22 infectados com os lipopolissacarídeos da bactéria *Porphyromonas gingivalis* sobreviveram, e nestes casos foi possível observar características de inflamação presentes no líquido amniótico e no sangue do cordão umbilical²⁴.

Apesar do fato de estudos em ovelhas não necessariamente poderem ser transpostos com as mesmas evidências para seres humanos, os resultados da pesquisa devem ser considerados. Algumas dúvidas que ainda permanecem: qual a quantidade de lipopolissacarídeos que teria capacidade de induzir alterações gestacionais em humanos? Esta quantidade conseguiria ser produzida e disseminada a partir do periodonto infeccionado?

Algumas revisões sistemáticas da literatura têm sido realizadas, buscando encontrar evidências suficientes para confirmar estas suspeitas. A associação entre doença periodontal e risco de parto pré-termo/nascimento de baixo peso foi avaliada em uma metanálise em 2002. Segundo os autores, poucas pesquisas puderam ser incluídas na revisão, sendo uma do tipo coorte e duas do tipo caso-controle. Apesar de concluírem que a relação de risco existe, sugeriram mais pesquisas com métodos semelhantes, principalmente no que se refere à classificação das alterações periodontais, que vem sendo muito questionadas nas diversas pesquisas publicadas²⁵.

Em outra revisão sistemática, os autores avaliaram se o controle da doença periodontal durante a gestação teria algum impacto sobre a iniciação ou progressão de complicações gestacionais. Após incluírem apenas 12 das 660 pesquisas

encontradas na busca bibliográfica, concluíram que: 1. A doença periodontal pode ser um fator de risco para nascimento pré-termo e/ou de baixo peso; 2. São necessários mais estudos longitudinais e intervencionais, buscando responder se as associações poderiam ser causais. 3. Estudos intervencionais preliminares sugerem que a terapêutica periodontal reduz o risco de complicações gestacionais²⁶.

As possíveis evidências na relação entre doença periodontal e complicações na gestação foram avaliadas em uma revisão de 25 estudos (13 casos-controle, nove coortes e três ensaios clínicos), sendo que 18 encontraram evidências da associação e sete não puderam confirmá-las. As três pesquisas clínicas sugeriram que o tratamento periodontal pode reduzir em 50% o nascimento de prematuros. Apesar destas conclusões, os autores também ressaltaram a necessidade de padronizações metodológicas nas pesquisas²⁷.

Outros autores concluíram em uma metanálise que gestantes com doença periodontal têm 4,28 mais chances de desenvolver parto prematuro do que as gestantes saudáveis (4,28; 95% IC, 2,62 a 6,99; $p < 0,005$)²⁸. No entanto, como a maioria das pesquisas encontradas foi do tipo caso-controle e coorte, os autores não acreditam estar comprovada a suspeita de que o tratamento periodontal reduz os riscos durante a gestação.

Ensaio clínicos controlados são estudos preferenciais para sanarem as dúvidas existentes. Algumas pesquisas com estas características têm sugerido que o tratamento periodontal poderia reduzir o risco de parto prematuro baseado na diminuição dos lipopolissacarídeos presentes na bolsa periodontal infeccionada²⁹.

Outra pesquisa onde se avaliou o efeito do tratamento periodontal no nascimento de recém-nascidos prematuros e/ou de baixo peso selecionou 870

gestantes com gengivite, entre 18 e 42 anos. Destas, 580 receberam tratamento até a 28ª semana de gestação e 290 após o nascimento. A incidência das complicações obstétricas citadas no grupo de tratamento foi menor que no grupo controle, mesmo após ajuste estatístico para outros fatores de risco, sugerindo que a alteração bucal seja um fator de risco independente para parto prematuro/recém-nascidos de baixo peso naquela população³⁰.

No entanto, outro estudo não confirmou esta evidência. As mulheres selecionadas tinham entre 13 e 17 semanas de gestação. As gestantes do grupo experimental (n=413) receberam tratamento antes da 21ª semana, enquanto aquelas do grupo controle (n=410), após o parto. Apesar de o tratamento melhorar as condições gengivais, não houve diferença estatística entre os grupos estudados no que se refere à época de nascimento e peso do recém-nascido²⁰.

Há uma grande heterogeneidade dos estudos disponíveis para aferir a relação dos métodos de mensuração da doença periodontal e os desfechos indesejáveis da gestação, não sendo possível realizar uma meta-análise. Em 36 pesquisas selecionadas, foram utilizadas treze diferentes definições para a doença periodontal. Pelas limitações metodológicas das pesquisas, os autores não puderam afirmar adequadas conclusões sobre o real efeito da doença periodontal nos desfechos da gestação³¹.

2.2) Pré-eclâmpsia

A pré-eclâmpsia acomete 5% a 8% das gestantes dos países em desenvolvimento e está relacionada à alta morbimortalidade materna e fetal³². Gestantes que desenvolvem pré-eclâmpsia têm maior risco de morte se comparadas

com as pacientes sem esta condição³³. Por outro lado, o nascimento de recém-nascidos prematuros e/ou de baixo peso em decorrência de condições mórbidas maternas pode causar prejuízos permanentes nas crianças, tais como: asma³⁴, alterações visuais, motoras e cognitivas³⁵, dentre outras.

Apesar da etiologia da pré-eclâmpsia ainda permanecer parcialmente desconhecida, relacionam-se alguns fatores de risco, tais como: primiparidade, obesidade, alterações renais, dentre outras. No entanto, nos últimos anos tem-se estudado a influência das infecções na pré-eclâmpsia, incluindo-se como possível sua relação com a doença periodontal¹⁶.

Poucos estudos publicados relacionaram o risco entre periodontite e pré-eclâmpsia, mas a maioria encontrou aumento do risco relativo de desenvolvimento de pré-eclâmpsia em gestantes com doença periodontal^{15,16,17,,18,19}. Mais recentemente, outros autores conduziram estudo tipo caso-controle, em que associaram a doença periodontal com a pré-eclâmpsia apresentando razão de chances de 4.10³⁶ e 7.9³⁷.

Por outro lado, em pesquisa reunindo 345 pacientes (115 casos e 230 controles) não se encontrou sustentação para a relação de risco, sugerindo que as outras pesquisas talvez tenham falhas metodológicas, como tamanho amostral inadequado e análises estatísticas inapropriadas³⁸.

As explicações para esta relação poderiam se basear, por exemplo, nas lesões endoteliais frequentemente encontradas em gestantes com pré-eclâmpsia. Sabe-se que algumas citocinas inflamatórias, principalmente o TNF-alfa, têm capacidade de lesar o endotélio vascular³⁹, sendo este fator uma das citocinas presentes e disseminadas na doença periodontal.

Outras pesquisas encontraram patógenos periodontais em placas de ateroma após análises laboratoriais⁴⁰, sugerindo relação da doença periodontal com aterosclerose, sendo sugerida também a similaridade entre as lesões vasculares placentárias e as lesões ateroscleróticas¹⁸.

Após avaliação da presença de bactérias periodontopatogênicas em placentas humanas, observou-se que 50% daquelas pertencentes a gestantes com pré-eclâmpsia tiveram colonização positiva para *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum* ssp., *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythensis* e *Treponema denticola*, enquanto no grupo controle (sem pré-eclâmpsia) as bactérias foram encontradas em apenas 14,3% das placentas, sendo estas diferenças estatisticamente significantes⁴¹. Esta parece ser uma evidência importante a favor da disseminação hematogênica de bactérias bucais; no entanto, o estudo não descreveu associação com infecção amniótica e prematuridade, que poderia ser uma correlação mais plausível do ponto de vista biológico do que com pré-eclâmpsia.

Deve-se lembrar que gestantes com pré-eclâmpsia, independente de afecções bucais, apresentam aumento dos níveis plasmáticos de algumas citocinas tais como: IL-6⁴², IL-8⁴³, TNF-alfa⁴⁴, IL-10⁴³. Este aumento seria decorrente de um estado inflamatório generalizado, embora a significância destas alterações na patogênese da pré-eclâmpsia ainda permaneça obscura⁴³.

Alguns autores analisaram a relação entre doença periodontal e pré-eclâmpsia em revisão sistemática, e, apesar de encontrarem associação entre as duas afecções, os autores sugerem mais pesquisas neste sentido, já que, até o momento, a literatura é escassa²⁷.

Conclusões

A relação de risco entre infecção periodontal e complicações gestacionais tem merecido atenção na atualidade. Há muitos resultados já publicados, onde os próprios autores discutem as limitações de suas conclusões. É possível que esta situação decorra da complexidade das complicações obstétricas com as quais se encontraram ou se buscam associações com a doença periodontal. A pré-eclâmpsia, por exemplo, é uma alteração que apresenta etiologia ainda desconhecida, com diversos fatores de risco.

O papel das citocinas, principal elo entre doença periodontal e complicações gestacionais, também não foi totalmente desvendado. Não se pode esquecer que o principal fator a ser estudado no momento é a produção ou mesmo disseminação destas citocinas do sítio periodontal para o sangue da gestante. Apesar da dificuldade em se realizar alguns tipos de estudos que possam suportar com credibilidade as evidências das associações suspeitas, é obrigatório que se desenhem novas pesquisas que avaliem a concentração exata das citocinas capazes de causar complicações obstétricas e determinar se esta quantidade pode ser produzida e disseminada pelo periodonto durante a vigência da infecção. Novos estudos clínicos que realizem tratamento em gestantes com infecção periodontal, também auxiliariam na correlação da diminuição da taxa de complicações obstétricas e a relação com este tratamento. Os conceitos atuais apontam para etiologia multifatorial, tanto da prematuridade quanto da pré-eclâmpsia, e a doença periodontal pode ser um aspecto importante para mulheres com determinado tipo de resposta imunológica. O estudo da interação

genético-ambiental é um caminho interessante para elucidar a conexão plausível entre inflamação, pré-eclâmpsia e prematuridade.

Embora a literatura disponível atual não permita concluir efetivamente que infecções bucais podem influenciar na ocorrência de complicações obstétricas, a atenção com a saúde bucal da gestante não poderá ser dispensada durante os cuidados pré-natais e, se possível, pré concepcionais. Deve-se recomendar que todas as mulheres grávidas atentem para sua saúde bucal, com os cuidados de higiene, pesquisando sistematicamente sangramento gengival, dor e mobilidade dentária. A avaliação odontológica periódica da gestante pode permitir que o cuidado com a saúde dentária seja mais efetivo em prevenir eventuais repercussões de afecções bucais sobre sua saúde como um todo.

Referências

1. Raber-Durlacher JE, van Steenbergem TJ, van der Velden U, de Graaff J, Abraham-Inpijn L. Experimental gingivitis during pregnancy and post-partum: clinical, endocrinological, and microbiological aspects. *J Clin Periodontol.* 1994; 21(8):549-558.
2. Loe, H, & Silness, J. Periodontal disease In pregnancy (I). Prevalence and severity. *Acta Odontologica Scandinavia.* 1963;21:533-551.
3. Hugoson, A. Gingivitis in pregnant women, A longitudinal clinical study, *Odontologisk Revy.* 1971; 22, 65-84.
4. Mascarenhas P, Gapski R, Al-Shammari K, Wang H-L: Influence of sex hormones on the periodontium. *J Clin Periodontol.* 2003; 30(8): 671–681.

5. Nyman S, Lindhe J. Exames em pacientes com doença periodontal. In: Lindhe J. Tratado de periodontia clínica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1999. p.271-280.
6. Beck JD, Offenbacher S. Systemic effects of periodontitis: epidemiology of periodontal disease and cardiovascular disease. *J Periodontol.* 2005; 76(11 suppl): 2089-100.
7. Hofling JF, Gonçalves RB, Kamiya RU. Histórico e introdução à imunologia. In: Hofling JF, Gonçalves RB. *Imunologia para odontologia.* Porto Alegre: Artmed; 2006 cap. 1, p.13-28.
8. Konopka T, Rutkowska M, Hirnle L, Kopec W. IL-1beta and PGE2 production in whole blood and gingival fluid in women with periodontitis and preterm low birth weight. *Ginekol Pol.* 2004; 75(5): 352-60.
9. Erdemir EO, Duran I, Haliloglu S. Effects of smoking on clinical parameters and the gengival crevicular fluid levels of IL-6 and TNF-alpha in patients with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2004; 31(2):99-104
10. Yang ML, Chen YH, Chen TC, Lin WR, Lin CY, Lu PL. Case report: Infective endocarditis caused by *Brevundimonas vesicularis*. *BMC Infect Dis.* 2006;29(6):179.
11. Ide M, Jagdev D, Coward PY, Crook M, Barclay GR, Wilson RF. The short-term effects of treatment of chronic periodontitis on circulating levels of endotoxin, C-reactive protein, tumor necrosis factor-alpha, and interleukin-6. *J Periodontol.* 2004;75(3):420-8.
12. Promsudthi A, Pimapsansri S, Deerochanawong C, Kanchanasavita W. The effect of periodontal therapy on uncontrolled type 2 diabetes mellitus in older subjects. *Oral Dis.* 2005; 11(5): 293-98.

13. Offenbacher S, Boggess KA, Murtha AP, Jared HL, Lief S, McKaig RG, et al. Progressive periodontal disease and risk of very preterm delivery. *Obstet Gynecol.* 2006; 107(1): 29-36.
14. 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(10 suppl):1103-13.
15. Boggess KA, Lief S, Murtha AP, Moss K, Beek J, Offenbacher S. Maternal periodontal disease is associated with an increased risk for preeclampsia. *Obstet Gynecol.* 2003;101(2):227-31.
16. Canakci V, Canakci CF, Canakci H, Canakci E, Cicek Y, Ingec M, et al. Periodontal disease as a risk factor for pre-eclampsia: a case control study. *Aust N Z J Obstet Gynaecol.* 2004;44(6):568-73.
17. Contreras A, Herrera JA, Soto JE, Arce RM, Jaramillo A, Botero JE. Periodontitis Is Associated With Preeclampsia in Pregnant Women. *J Periodontol.* 2006; 77(2):182-188.
18. Oettinger-Barak O, Barak S, Ohel G, Oettinger M, Kreutzer H, Peled M, et al. Severe pregnancy complication (preeclampsia) is associated with greater periodontal destruction. *J Periodontol.* 2005; 76(1):134-7.
19. Riche EL, Boggess KA, Lief S, Murtha AP, Auten RL, Beck JD, et al. Periodontal disease increases the risk of preterm delivery among preeclamptic women. *Ann periodontol.* 2002; 7(1): 95-101.
20. Michalowicz BS, Hodges JS, DiAngelis AJ, Lupo VR, Novak MJ, Ferguson JE, et al. Treatment of periodontal disease and the risk of preterm birth. *N Engl J Med.* 2006;355(18):1885-94.

21. Perroni AG, Bittar RE, Zugaib M. Corioamnionite como causa de trabalho de parto prematuro espontâneo. *Femina*. 2006; 34(1): 67-71.
22. Nomura ML, Passini Jr, Oliveira UM. Group B Streptococcus colonization in preterm labor and preterm premature rupture of membranes. *Int J Gynecol Obstet* 2005; 91(1): 69-70.
23. Teles EPB, Latham AEF, Passini Jr R, Barini R. Fatores de risco para parto prematuro numa amostra de gestantes brasileiras: I. Fatores pré-gestacionais. *RBGO* 1992; 14(4): 161-4.
24. Newnham JP, Shub A, Jobe AH, Bird PS, Ikegami M, Nitsos I, Moss TJM. The effects of intra-amniotic injection of periodontopathic lipopolysaccharides in sheep. *Am J Obstet Gynecol*. 2005; 193(2): 313–21.
25. Madianos PN, Bobetsis GA, Kinane DF. Is periodontitis associated with an increased risk of coronary heart disease and preterm and/or low birth weight births? *J Clin Periodontol*. 2002;29 suppl 3: 22-36.
26. Scannapieco FA, Bush RB, Paju S. Periodontal disease as a risk factor for adverse pregnancy outcomes. A systematic review. *Ann Periodontol*. 2003;8(1):70-78.
27. Xiong X, Buekens P, Fraser WD, Beck J, Offenbacher S. Periodontal disease and adverse pregnancy outcomes: a systematic review. *BJOG* 2006; 113(2):135–143.
28. Khader YS, Ta'ani Q. Periodontal diseases and the risk of preterm birth and low birth weight: A meta-analysis. *J Periodontol*. 2005;76(2):161-165.
29. Shub A, Swain JR, Newnham JP. Periodontal disease and adverse pregnancy outcomes. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2006;19(9):521-8.

30. Lopez NJ, Da Silva, I, Ipinza J, Gutierrez J. Periodontal therapy reduces the rate of preterm low birth weight in women with pregnancy-associated gingivitis. *J Periodontol* 2005;76(11 suppl):2144-53.
31. Vettore MV, Lamarca GA, Leão ATT, Thomaz FB, Sheiham A, Leal MC. Infecção periodontal e desfechos indesejáveis da gestação: uma revisão sistemática dos estudos epidemiológicos. *Cad. Saúde Pública* 2006;22(10):2041-2053.
32. Report of the National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy. *A J Obstetr Gynecol.* 2000; 183 (1 suppl): S1 – S22
33. Irgens HU, Reisaeter L, Irgens LM, et al. Long term mortality of mothers and fathers after pre-eclampsia: population based cohort study. *BMJ.* 2001;323 (7323):1213–7.
34. Chatkin MN, Menezes AM. The association between low birthweight and asthma: a systematic literature review. *Rev Panam Salud Publica.* 2005; 17(2): 102-109.
35. Graziano RM, Leone CR. Frequent ophthalmologic problems and visual development of extremely preterm newborn infants. *J Pediatr.* 2005; 81(1 suppl): 95-100.
36. Cota LO, Guimarães AN, Costa JE, Lorentz TC, Costa FO. Association between maternal periodontitis and an increased risk of preeclampsia. *J Periodontol.* 2006;77(12):2063-9
37. Kunnen A, Blaauw J, van Doormaal JJ, et al. Women with a recent history of early onset pre-eclampsia have a worse periodontal condition. *J Clin Periodontol* 2007; 34: 202–207.

38. Khader YS, Jibreal M, Al-Omiri M, Amarin Z. Lack of association between periodontal parameters and preeclampsia. *J Periodontol.* 2006; 77(10): 1681-1687.
39. Daher S, Mattar R, Sass N. Doença hipertensiva específica da gravidez: aspectos imunológicos. In: Sass N, Camano L, Moron AF. Hipertensão arterial e nefropatias na gravidez. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2006. p.45-56.
40. Haraszthy VI, Zambon JJ, Trevisan M, Zeid M, Genco RJ. Identification of periodontal pathogens in atheromatous plaques. *J Periodontol.* 2000; 71(10): 1554-60.
41. Barak S, Oettinger-Barak O, Machtei EE, Sprecher H, Ohel G. Evidence of periopathogenic microorganisms in placentas of women with preeclampsia. *J Periodontol.* 2007 Apr;78(4):670-6.
42. Afshari JT, Ghomian N, Shameli A, et al. Determination of Interleukin-6 and Tumor Necrosis Factor-alpha concentrations in Iranian-Khorasanian patients with preeclampsia. *BMC Pregnancy Childbirth.* 2005;1:5:14.
43. Madazli R, Aydin S, Uludag S, Vildan O, Tolun N. Maternal plasma levels of cytokines in normal and preeclamptic pregnancies and their relationship with diastolic blood pressure and fibronectin levels. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2003;82(9):797-802.
44. Hayashi M, Ueda Y, Yamaguchi T, Sohma R, Shibazaki M, Ohkura T. Tumor necrosis factor-alpha in the placenta is not elevated in pre-eclamptic patients despite its elevation in peripheral blood. *Am J Reprod Immunol.* 2005;53(3):113-9.

4.2. Artigo 2

Journal of Clinical Periodontology - PROOF



Correlation between periodontal disease, inflammatory alterations and preeclâmpsia.

Journal:	<i>Journal of Clinical Periodontology</i>
Manuscript ID:	CPE-11-09-2343
Manuscript Type:	Original Article Clinical Periodontology
Date Submitted by the Author:	13-Nov-2009
Complete List of Authors:	Politano, Gabriel; São Leopoldo Mandic, Pediatric Dentistry Passini Jr, Renato; School of Medical Sciences, University of Campinas, Department of Obstetrics and Gynecology Nomura, Marcelo; School of Medical Sciences, University of Campinas, Department of Obstetrics and Gynecology Velloso, Lício; University of Campinas, Department of Internal Medicine Morari, Joseane; University of Campinas, Department of Internal Medicine Carvalho, Egle; School of Medical Sciences, University of Campinas, Department of Obstetrics and Gynecology
Topic:	Aetiology
Keywords:	Periodontal disease, Preeclampsia, Risk, Tumor necrosis factor- alpha, Interleukin-6
Main Methodology:	Epidemiology



Correlation between periodontal disease, inflammatory alterations and preeclampsia

Politano GT¹, Passini Júnior R², Nomura ML², Velloso L³, Morari J³, Couto E².

1. Dental School São Leopoldo Mandic, Department of Pediatric Dentistry. Campinas, São Paulo, Brazil.

2. School of Medical Sciences, University of Campinas, Department of Obstetrics and Gynecology. Campinas, São Paulo, Brazil

3. School of Medical Sciences, University of Campinas, Department of Internal Medicine. Campinas, São Paulo, Brazil

Running title: Periodontitis and preeclampsia

Key-words: periodontal disease, preeclampsia, risk, tumor necrosis factor-alpha, interleukin-6.

Gabriel Tilli Politano

Adress: Antônio Lapa, 1032, Cambuí, Campinas – São Paulo, Brasil CEP 13025-242

Phones: (55) (19) 32522903, (55) (19) 96350820

FAX: (19) 32522903

e-mail: gabrielp@mpcnet.com.br

This study was supported by FAPESP: Protocol: 2007/58124-6

“The authors declare that they have no conflict of interests”

Abstract

Aim: To evaluate the association between periodontal disease and preeclampsia, as well as the correlation of both with cytokines interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor-alpha (TNF α) messenger RNA (mRNA) expression. **Materials and Methods:** A case-control analysis of 116 pregnant women, 58 with preeclampsia (cases) and 58 normotensive pregnant women (controls) was performed. In addition to socio-demographic data collection and periodontal evaluation, peripheral blood samples were also collected for laboratorial analysis of IL-6 and TNF α messenger RNA (mRNA) expression, through real-time polymerase chain reaction (PCR). **Results:** There was an association between periodontitis and preeclampsia [OR= 3.73 (IC 95% 1.32 to 10.58)]. Increased TNF α mRNA expression from preeclamptic women was observed. However, there was no correlation between periodontitis and systemic cytokines expression. In the case group, systemic cytokine levels were similar in pregnant women with and without periodontitis: 0.73 (\pm 0.24) x 0.82 (\pm 0.38) for TNF α e 1.31 (\pm 1.49) x 1.09 (\pm 0.74) for IL-6, respectively. **Conclusions:** Periodontitis was clinically related to preeclampsia; however, the supposed mechanism which correlates both diseases, i.e., systemic inflammatory process in the presence of periodontal disease could not be confirmed in this study.

Clinical Relevance

Scientific rationale for the study: Several studies have hypothesized that periodontal disease may increase the risk of preeclampsia. The correlation of both diseases would be probably based on hypertensive-related cytokines liberation in the local periodontal environment. We evaluated the influence of periodontitis on the IL6 and TNF α mRNA expressions in leukocytes.

Principal findings: Prevalence of periodontitis and preeclampsia were correlated statistically, but cytokine expression was not influenced by oral infection.

Practical implications: clinical correlation between oral infection and preeclampsia in pregnant women suggests the importance of expectant mothers taking extra care of their oral health.

Introduction

Preeclampsia, a pregnancy-specific disorder, is characterized by an increase in systolic arterial pressure ($\geq 140\text{mmHg}$) and/or diastolic pressure ($\geq 90\text{mmHg}$) and proteinuria ($\geq 300\text{mg}/24$ hours) , after 20 weeks of gestation. This condition is potentially dangerous for both the mother and the fetus and control measures must be must be taken in the aim of reducing the risk of progression to eclampsia condition, which is characterized by convulsions (Report of the National High blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy, 2000).

Although the etiology of preeclampsia remains obscure, several risk factors can be associated, such as maternal infection. Conde-Agudelo et al. (2008) performed a systematic review and meta-analysis to address whether maternal infection is associated with the risk of pre-eclampsia. Between all infectious processes (urinary tract infection, periodontal disease, Chlamydia pneumoniae infection, HIV infection, malaria, periodontal infection and cytomegalovirus), periodontal disease showed the highest odds ratio (OR = 1.76; 95% CI, 1.43-2.18). Even though, they emphasized the lack of studies concerning the etiology of preeclampsia, as well as the difficulty in establishing a cause-effect relation between this disorder and periodontal disease.

Several studies have found an relationship between preeclampsia and periodontal disease (Contreras et al., 2006, Kunnen et al., 2007, Ruma et al., 2008, Vergnes et al., 2008). However, most of them presented methodological deficiencies and difficulties in proving clinical findings.

There is increasing evidence for systemic dissemination of bacteria from periodontal infection. Intra-oral manipulations such as chewing may result in endotoxemias in people with periodontitis (Geerts et al., 2002). Furthermore, Barak et al. (2007) showed that 50% of placenta specimens were positive for one or more periopathogenic bacteria in the preeclampsia group, compared to only two of the 14 samples (14.3%) from controls (women without preeclampsia), a statistically significant difference.

Besides the risk of bacteremia of oral origin, chronic periodontitis may increase C-reactive protein levels in peripheral blood. Herrera et al. (2007) evaluated the concentrations of serum high-sensitivity C-reactive protein (hs-CRP), and its association with preeclampsia. The authors found high levels of hs-CRP in women with preeclampsia and confirmed periodontal disease, suggesting that oral infections may lead to complications such as preeclampsia.

Although there is some controversy in the literature concerning preeclampsia, some studies have concluded that this disorder has a pronounced systemic inflammatory character, once higher levels of TNF α and IL-6 were found in preeclamptic pregnant woman, which are especially known to cause endothelial damage (Teran et al., 2001).

Forner et al. (2006) found increased plasma levels of IL-6 in bacteremic periodontitis patients after scaling. They also emphasized the possible systemic implications of this induction, once IL-6 exerts many biological functions. Canakci et al. (2007) evaluated the clinical and immunologic correlation between periodontal disease and preeclampsia, concluding that severe oral infection seems to increase the risk for occurrence of pre-eclampsia. The authors also by

enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) that systemic TNF α levels were correlated to bleeding on probing.

The aim of the present study was to perform a clinical and immunologic evaluation of the association between periodontal disease and preeclampsia, as well as the correlation of both with cytokines interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor-alpha (TNF α) messenger RNA (mRNA) expression, through real-time polymerase chain reaction (PCR).

Materials and Methods

Study Sample

A case-control methodology was used in this study, previously approved by the Institutional Review Boards of the Faculty of Medical Sciences University of Campinas (UNICAMP), Brazil (protocol number 055/2007). Research was conducted in accordance with the World Medical Association Declaration of Helsinki (1964). A total of 58 women with preeclampsia (cases) attending two reference hospitals in Campinas, São Paulo, Brazil, and 58 normotensive women taking prenatal care at two basic health units in the same region were enrolled in this study between July 2007 and July 2009. Normotensive and preeclamptic woman had volunteered to participate during prenatal visit or if they were hospitalized for treatment of hypertension. All pregnant women are allowed to have ten scheduled dental care visits for free at reference institutions of Campinas. Treatment for preeclampsia and prenatal care were conducted normally.

Women were diagnosed with preeclampsia if they had blood pressure $\geq 140/90$ mmHg after 20 weeks' gestation and proteinuria, which was considered

present when one 24 – hour urine collection showed a total protein excretion \geq 300mg (Report of the National High blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy, 2000). Women were diagnosed normotensive if they had blood pressure under 140/90mmHg, also during the pre-gestational period.

Exclusion criteria were as follows: evidence of maternal infection (except for periodontal infection); pregnant and < 20 weeks gestation; multiple gestation; previous diagnosis of preeclampsia; gestacional diabetes or pre-gestational diabetes; nephropathy; patients with cardiac abnormalities requiring antibiotic prophylaxis before dental interventions; current undergoing periodontal treatment (during gestational period); < 15 teeth.

Once the medical authorization form was obtained, all study participants signed a written informed consent. In addition, included women were interviewed using a structured questionnaire including information on the participant's age at delivery, gestational age, prepregnancy body mass index (BMI), number of previous pregnancies, utilization of prenatal care, use of alcohol, color/race, tobacco use and Brazilian socio-economic status (2003).

Blood sample and laboratory analysis for detection of IL-6 and TNF α messenger RNA

Blood samples (3.0mL) from each pregnant patient were collected in tubes containing Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA). The material was then processed within 24 hours at the Laboratory of cellular sinalization of UNICAMP.

Leukocytes were isolated from whole blood samples by centrifugation at 2500 rpm and 4°C. The supernatant (plasma) was discarded and 1.0 mL of ammonium chloride (2M) and 140µl of Ammonium Bicarbonate (1M) were added. Leukocytes were resuspended and isolated by vortexing for ten seconds and centrifugation.

RNA Isolation from leucocyts was performed using Trizol (Invitrogen, Brazil), according to the strict manufacturer's instructions. RNA integrity was confirmed by 1% agarose gel electrophoresis. RNA samples (3µg) were reverse transcribed using the High-Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). As a consequence, complementary DNA (cDNA) was obtained.

Real time PCR

The primers and probes for IL-6 and TNF α were obtained from Applied Biosystems (TaqMan Gene Expression Assay ID Hs00174131_m1 and Hs00174128_m1, respectively), using the *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* (GAPD) gene as endogenous control.

System validation was performed before relative quantification experiments in order to ensure similarity of the amplification efficiency (near to 100%) of both genes (relevant genes X endogenous control).

Relative real-time PCR was performed in triplicate for the quantification of relevant genes expression. CR. Reactions were set-up using 6.75 µL Taqman Universal PCR Master Mix 2x , 0,625 µL primer and probe mix, 1,125 µL water and 4,0 µL cDNA. Thermal cycling was initiated with denaturing for 2 min at 50 C, 10 min at 95 C followed by 40 cycles at 95.8C for 15s and at 60 C for 1 min.

Relative gene expression values were obtained by an ABI Prism1 7500 Sequence Detector System (SDS - Applied Biosystems[®], CA, USA).

Clinical Periodontal examination

All participants underwent a clinical periodontal examination that was carried out by one dental clinician with patients lying on a specific litter or hospital bed. Intra-examiner variability was tested by performing repeated measurements in 12 pregnant women, on two consecutive days. Percentage agreement was 95.2% for probing depth and 95.9% for clinical attachment loss.

Each tooth was measured and examined for plaque index (scored as being present or absent), probing depth (PD) in millimeters, bleeding on probing (BOP) (deemed positive if it occurred within 15 seconds after probing), clinical attachment loss (CAL) in millimeters, gingival recession (GR) in millimeters at six sites per tooth (mesio-buccal, buccal, disto-buccal, lingual, disto-lingual and mesio-lingual) with a Williams probe (Hu-Friedy, Chicago, USA). Patients were classified as having periodontitis when two or more sites showed pocket formation (≥ 4 mm), periodontal attachment loss (≥ 4 mm) and bleeding on probing, according to Contreras et al (2006).

Statistical analysis

Calculation of an appropriate sample size (maximum sample size of $n = 58$ cases and 58 controls) was based on studies evaluating the incidence of periodontal disease parameters (probing depth, bleeding on probing, prevalence of periodontitis and clinical attachment loss) in pre-eclamptic/normotensive women (Canakci et al., 2004). Furthermore, studies addressing the presence of cytokines (IL-6 e TNF α) in

pregnant women with or without preeclampsia were reviewed (Madazli et al., 2006, Jonsson et al., 2006, Afshari et al., 2005, Hayashi et al., 2005); thus, the sample size was determined ($n = 26$ for IL-6 and $n = 50$ for TNF α). A sample size of 116 (58 in each group) was chosen, once it was the largest sample size value.

A statistical program and software (SAS version 9.2) were used for data processing and data analysis. The difference between case and control groups of normally distributed continuous variables was assessed using a Student's t-test. The Mann-Whitney U-test was used to evaluate the differences among the groups in other variables (non-normal distribution). Fischer exact and Chi-square tests were used to analyze the nominal data.

Bivariate association between periodontitis and preeclampsia was analyzed using Chi-square test. A multivariable logistic regression model was used to assess the relationship between both diseases adjusting for age, gestational age, socio-economic status, BMI and absence of a companion. Crude and adjusted odds ratios and their 95% confidence intervals (CIs) were calculated. A value of $p < 0.05$ was considered to be significant. The Mann-Whitney U-test was used to compare periodontal variables between groups, individually.

The Mann-Whitney U-test was also used to compare cytokines interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor-alpha (TNF α) messenger RNA (mRNA) expression between groups and to analyze the relationship between periodontitis and cytokines messenger RNA (mRNA) expression. Correlations between periodontal data (plaque index, PD, BOP, CAL and gingival recession) and cytokines expression were determined by Spearman rank test. Population attributable risk was estimated using Levin's Formula.

Results

Patient characteristics from both groups are given in Table 1. Mean age, mean gestational age and mean prepregnancy body mass index (BMI) were significantly higher in the preeclamptic group compared to those in the normotensive group ($p < 0.05$). Presence of a companion was significantly associated with the absence of preeclampsia ($p < 0.05$). No significant association was found between the other variables studied (utilization of prenatal care, use of alcohol, color/race, tobacco use and socio-economic status) and preeclampsia.

Regarding cytokine-mRNA expression from leucocytes, TNF α levels were significantly higher in the preeclamptic group compared to those in the normotense group ($p < 0.05$). However, there were no statistically significant differences in relation to IL-6 levels (Table 2).

In relation to periodontal parameters, probing depth and clinical attachment loss were individually associated to preeclampsia (Table 3), thus prevalence of periodontitis was significantly higher in the case group [adjusted odds ratio = 3.73 (IC 95% 1.32 to 10.58 – Table 4)]. Adjusted population-attributable risks (PARs) estimated for our sample showed that in the case of the elimination of periodontitis would be 29.3% before and 45.9% after adjusting for the effect of those variables which differ between groups.

Table 5 shows similar levels of cytokine expression for TNF- α and IL-6 in the groups of preeclamptic and normotensive women with and without periodontitis.

Spearman's rank correlation index showed that gingival retraction was the only periodontal disease parameter associated with systemic cytokine expression

(IL-6) in women with preeclampsia. However, this correlation was negative, i.e., the higher gingival recession, the lower IL-6 expression.

Discussion

There is a growing evidence that suggests an association between maternal periodontal disease and the risk for adverse pregnancy outcomes, such as preterm birth (Offenbacher et al., 2006), low birth weight (Offenbacher et al., 1996) and preeclampsia (Contreras et al., 2006, Canakci et al., 2007, Boggess et al., 2003, Oettinger-Barak et al., 2005, Riche et al., 2002).

The present study also found an association between periodontal disease parameters (probing depth, clinical attachment loss and prevalence of periodontitis) and preeclampsia. As a consequence, it remains appropriate to advise women in fertile period or during early pregnancy about the importance of good oral health. Our findings provide further evidence that there is an association between maternal periodontitis and preeclampsia (Adjusted Odd Ratio of 3.73). This odds ratio value was considered very meaningful, once preeclampsia (as well as other multifactorial diseases) is related to several risk factors, showing an OR similar to that one for periodontitis. Taken together, these factors are the responsible for increased risk of preeclampsia. Thus, it would be presumptuous to offer periodontal treatment to pregnant women in the aim of reducing the risk of general health problems.

Adjusted population-attributable risks (PARs) estimated for our sample showed that in the case of the elimination of periodontitis, the risk for preeclampsia would be excluded in 49.5% of the cases. Although these data emphasize the importance of periodontal disease in pregnancy, additional work is

needed to evaluate the influence of periodontal treatment in pregnant women, especially within the conduct of larger, prospective investigations. The results of our study show that there is sound scientific justification to recommend regular follow-up dental examinations prior to or during pregnancy as a means to eliminate periodontal infection since the first day of gestation.

In the present study, clinical periodontal examination was performed on all the women by one calibrated examiner, thus eliminating intra-examiner variability and improving data quality. Intra-examiner variability was tested by performing repeated measurements in 12 pregnant women, on two consecutive days. Thus, percentage agreement was 95.2% for probing depth and 95.9% for clinical attachment loss.

The possibility that periodontal disease is associated with gestational health problems is ensured by the fact that oral infection can stimulate the inflammatory process. Some studies showed bacterial colonization of the amniotic fluid in patients with preterm labor (Leon et al., 2005), as well as periopathogenic microorganisms in placentas of women with preeclampsia (Barak et al., 2007), suggesting systemic dissemination of these periodontopathogens. In this same regard, systemic dissemination of periodontopathogens to the vascular area involved in cytotrophoblast (CTB) invasion and placentation could have a role in the development of preeclampsia. Utilizing the first trimester extravillous cytotrophoblast cell line, Lamarca et al. (2006) showed that Human cytomegalovirus (HCMV) impaired placentation by its inhibitory effect on CTB invasiveness. These data emphasize the effects of infection on placentation; however, it is inevitable that there are some differences between virus and bacterias (Schiessl, 2007, Sharma et al., 2007).

On the other hand, once preeclampsia has a pronounced systemic inflammatory character, as shown in the present study by the analysis of TNF α levels, periodontitis may indirectly contribute to this systemic process, increasing the risk of endothelial damage (Madazli et al., 2003, Jonsson et al., 2006, Afshari et al., 2005, Hayashi et al., 2005, Sharma et al., 2007, Heyl et al., 1999, Freeman et al., 2004, Azizieh et al., 2005, Casart et al., 2007).

Finally, more studies are necessary to provide unequivocal evidence about an increased systemic inflammatory response due to periodontal infection in pregnant women with preeclampsia. Canakci et al. (2007) found a significant correlation between the plasma levels of TNF- α and bleeding on probing in women with preeclampsia. In contrast, the present study failed to detect this association. Gingival retraction was the only periodontal disease parameter associated with systemic cytokine expression (IL-6) in women with preeclampsia. However, this correlation was negative. This could, in part, be attributed to the absence of periodontal pockets in some pregnant women presenting gingival recession or to the presence of healed gingival crevice after periodontal treatment. In the absence of periodontal pockets, the initial colonization of gingival pockets with periodontal bacteria is impaired and consequently reducing systemic inflammatory response.

Instead of evaluating cytokine plasma levels (Canakci et al., 2007), the present study was designed to carry out RNA isolation from leucocytes, through real-time polymerase chain reaction (PCR). In the case of cytokine detection, there are some disadvantages, once most cytokines have short circulating half-lives and they are rapidly caught by receptors. Thus, the results may not truly represent an accurate cytokine quantification (Navikas et al., 1995). Real-time PCRs were

developed for mRNA analysis thus enabling the identification of the gene activation for specific protein production at extremely low levels (Giulietti et al., 2001).

The observed relationship between periodontitis and preeclampsia (OR 3.73; IC 95% 1.32 a 10.58) is consistent with the previous literature (Contreras et al., 2006, Boggess et al., 2003, Oettinger-Barak et al., 2005, Riche et al., 2002). This data emphasizes the importance of expectant mothers taking extra care of their oral health. However, the results of the present research as well as other studies should also be interpreted with caution because of data limitations and varying methodologies, once periodontitis prevalence can vary quite a lot inside the same population depending upon the classification system used (Lohsoonthorn et al., 2009). In this study, periodontal disease was categorized according to the classification used in study of Contreras et al. (2006), once this method was consistent with the previous literature.

There are nevertheless some limitations to this case-control study that warrant consideration: small sample size, varying times in their pregnancy at which the subjects were evaluated and differences between two groups concerning mean maternal age. Recently, large case-control studies have added further evidence to the association between periodontal disease and this hypertension alteration. Nevertheless, even with the relatively small number of pregnant women enrolled in this study, we had statistical power to detect cytokines messenger RNA (mRNA) expression, through real-time polymerase chain reaction (PCR). To date, the influence of maternal age and gestational age on IL-6 e TNF α expression could not be assessed due to the absence of controle trials addressing cytokines pattern in pregnancy.

We conclude that although clinical signs of periodontal disease during pregnancy was clinically related to preeclampsia, the results of the immunological analysis showed similar peripheral blood levels of IL-6 e TNF α in pregnant women with and without periodontitis. It is, therefore, imperative that all pregnant women undergo a screening examination to provide detailed assessment of periodontal status, once treatment of periodontal disease in pregnancy is feasible and must be carried out, mainly for patients at risk of Hypertension Syndrome. On the other hand, future studies are needed to further explore the nature of the association between periodontitis and preeclampsia.

Acknowledgments: The authors express their sincere gratitude to FAPESP (2007/58124-6) for the financial support and to professor Aníbal Faúndes, of School of Medical Sciences (University of Campinas), for his help in initiation of this study.

References

1. Afshari, J.T., Ghomian, N., Shameli, A., Shakeri, M.T., Fahmidehkar, M.A., Mahajer, E., Khoshnavaz, R. & Emadzadeh, M. (2005) Determination of Interleukin-6 and Tumor Necrosis Factor-alpha concentrations in Iranian-Khorasanian patients with preeclampsia. *BMC Pregnancy and Childbirth*, **5**,14.
2. Azizieh, F., Raghupathy, R. & Makhseed, M. (2005) Maternal Cytokine Production Patterns in Women with Pre-eclampsia. Maternal cytokine production patterns in women with pre-eclampsia. *American Journal of Reproductive Immunology* **54**, 30–37.

3. Barak, S., Oettinger-Barak, O., Machtei, E.E., Sprecher, H. & Ohel, G. (2007) Evidence of periopathogenic microorganisms in placentas of women with preeclampsia. *Journal of Periodontology* **78**, 670-6.
4. Boggess, K.A., Lieff, S., Murtha, A.P., Moss, K., Beek, J. & Offenbacher, S. (2003) Maternal periodontal disease is associated with an increased risk for preeclampsia. *Obstetrics and Gynecology* **101**, 227-31.
5. Brazilian socio-economic status (2003). Brazilian Association of researches [WWWdocument].
URL: http://www.abep.org/codigosquias/ABEP_CCEB_2003.pdf [accessed on 12 may 2006].
6. Canakci, V., Canakci, C.F., Canakci, H., Canakci, E., Cicek, Y., Ingec, M., Ozgoz, M. Demir, T. Dilsiz, A. & Yagiz, H. (2004) Periodontal disease as a risk factor for pre-eclampsia: a case control study. *The Australian and New Zealand Journal of Obstetrics & Gynaecology* **44**, 568-73.
7. Canakci, V., Canakci, C.F., Yildirim, A., Ingec, M., Eltas, A. & Erturk, A. (2007) Periodontal disease increases the risk of severe pre-eclampsia among pregnant women. *Journal of Clinical Periodontology* **34**, 639-45.
8. Casart, Y.C., Tarrazzi, K. & Camejo, M.I. (2007) Serum levels of interleukin-6, interleukin-1beta and human chorionic gonadotropin in pre-eclamptic and normal pregnancy. *Gynecological Endocrinology* **23**, 300-3.
9. Conde-Agudelo, A., Villar, J. & Lindheimer, M. (2008) Maternal infection and risk of preeclampsia: systematic review and metaanalysis. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* **198**, 7-22.

10. Contreras, A., Herrera, J.A., Soto, J.E., Arce, R.M., Jaramillo, A. & Botero, J.E. (2006) Periodontitis Is Associated With Preeclampsia in Pregnant Women. *Journal of Periodontology* **77**, 182-188.
11. Forner, L., Nielsen, C.H., Bendtzen, K., Larsen, T. & Holmstrup P. (2006) Increased plasma levels of IL-6 in bacteremic periodontitis patients after scaling. *Journal of Clinical Periodontology* **33**, 724-9.
12. Freeman, D.J., McManus, F., Brown, E.A., Cherry, L., Norrie, J., Ramsay, J.E., Clark, P., Walker, I.D., Sattar, N. & Greer, I.A. (2004) Short- and long-term changes in plasma inflammatory markers associated with preeclampsia. *Hypertension* **44**, 708-14.
13. Geerts, S.O., Nys, M., De, M.P., Charpentier, J., Albert, A., Legrand, V. & Rompen, E.H. (2002) Systemic release of endotoxins induced by gentle mastication: association with periodontitis severity. *Journal of Periodontology* **73**, 73-8.
14. Giulietti, A., Overbergh, L., Valckx, D., Decallonne, B., Bouillon, R. & Mathieu, C. (2001) An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods* **25**, 386-401.
15. Hayashi, M., Ueda, Y., Yamaguchi, T., Sohma, R., Shibazaki, M., Ohkura, T. & Inaba, N. (2005) Tumor necrosis factor-alpha in the placenta is not elevated in pre-eclamptic patients despite its elevation in peripheral blood. *American Journal of Reproductive Immunology* **53**, 113-9.
16. Herrera, J.A., Parra, B., Herrera, E., Botero, J.E., Arce, R.M., Contreras, A. & López-Jaramillo, P. (2007) Periodontal disease severity is related to high levels of C-reactive protein in pre-eclampsia. *Journal of Hypertension* **25**, 1459-64.

17. Heyl, W., Handt, S., Reister, F., Gehlen, J., Schröder, W., Mittermayer, C. & Rath, W. (1999) Elevated soluble adhesion molecules in women with pre-eclampsia. Do cytokines like tumour necrosis factor-alpha and interleukin-1beta cause endothelial activation. *European Journal of Obstetrics, Gynecology and Reproductive Biology* **86**, 35-41.
18. Jonsson, Y., Rubèr, M., Matthiesen, L., Berg, G., Nieminen, K., Sharma, S., Ernerudh, J. & Ekerfelt, C. (2006) Cytokine mapping of sera from women with preeclampsia and normal pregnancies. *Journal of Reproductive Immunology* **70**, 83-91.
19. Kunnen, A., Blaauw, J., van Doormaal, J.J., van Pampus, M.G., van der Schans, C.P., Aarnoudse, J.G., van Winkelhoff, A.J. & Abbas, F. (2007) Women with a recent history of early-onset pre-eclampsia have a worse periodontal condition. *Journal of Clinical Periodontology* **34**, 202-7.
20. Lamarca, H.L., Nelson, A.B., Scandurro, A.B., Whitley, G.S. & Morris, C.A. (2006) Human cytomegalovirus-induced inhibition of cytotrophoblast invasion in first trimester extravillous cytotrophoblast cell line. *Placenta* **27**, 137-47.
21. León, R., Silva, N., Ovalle, A., Chaparro, A., Ahumada, A., Gajardo, M., Martínez, M. & Gamonal, J. (2007) Detection of Porphyromonas gingivalis in the amniotic fluid in pregnant women with a diagnosis of threatened premature labor. *Journal of Periodontology* **78**, 1249-55.
22. Lohsoonthorn, V., Kungsadalpipob, K., Chanchareonsook, P., Limpongsanurak, S., Vanichjakvong, O., Sutdhibhisal, S., Sookprome, C., Wongkittikraiwan, N., Kamolpornwijit, W., Jantarsaengaram, S., Manotaya, S., Siwawej, V., Barlow, W.E., Fitzpatrick, A.L. & Williams, M.A. (2009) Maternal periodontal

- disease and risk of preeclampsia: a case-control study. *American Journal of Hypertension* **22**, 457-63.
23. Madazli, R., Aydin, S., Uludag, S., Vildan, O. & Tolun, N. (2003) Maternal plasma levels of cytokines in normal and preeclamptic pregnancies and their relationship with diastolic blood pressure and fibronectin levels. *Acta Obstetrica and Gynecologica Scandinavica* **82**, 797-802.
24. Navikas, V., Link, J., Persson, C., Olsson, T., Höjeberg, B., Ljungdahl, A., Link, H. & Wahren, B. (1995) Increased mRNA expression of IL-6, IL-10, TNF-alpha, and perforin in blood mononuclear cells in human HIV infection. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology Association* **9**, 484-9.
25. Oettinger-Barak, O., Barak, S., Ohel, G., Oettinger, M., Kreutzer, H., Peled, M. & Machtei, E.E. (2005) Severe pregnancy complication (preeclampsia) is associated with greater periodontal destruction. *Journal of Periodontology* **76**, 134-7.
26. Offenbacher, S., Boggess, K.A., Murtha, A.P., Jared, H.L., Lieff, S., McKaig, R.G., Mauriello, S.M., Moss, K.L. & Beck, J.D. (2006) Progressive periodontal disease and risk of very preterm delivery. *Obstetrics and Gynecology* **107**, 29-36.
27. Offenbacher, S., Katz, V., Fertik, G., Collins, J., Boyd, D., Maynor, G., McKaig, R. & Beck, J. (1996) Periodontal infection as a possible risk factor for preterm low birth weight. *Journal of Periodontology* **67**, 1103-13.
28. Report of the National High blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy. (2000) *American Journal of Obstetrics and Gynecology* **183**, S1-S22.

29. Riche, E.L., Boggess, K.A., Lieff, S., Murtha, A.P., Auten, R.L., Beck, J.D. & Offenbacher, S. (2002) Periodontal disease increases the risk of preterm delivery among preeclamptic women. *Annals of periodontology* **7**, 95-101.
30. Ruma, M., Boggess, K., Moss, K., Jared, H., Murtha, A. & Beck, J. & Offenbacher, S. (2008) Maternal periodontal disease, systemic inflammation, and risk for preeclampsia. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* **198**,1-5.
31. Schiessl, B. (2007) Inflammatory response in preeclampsia. *Molecular Aspects of Medicine* **28**, 210-9.
32. Sharma, A., Satyam, A. & Sharma, J.B. (2007) Leptin, IL-10 and inflammatory markers (TNF-alpha, IL-6 and IL-8) in pre-eclamptic, normotensive pregnant and healthy non-pregnant women. *American Journal of Reproductive Immunology* **58**, 21-30.
33. Teran, E., Escudero, C., Moya, W., Flores, M., Vallance, P. & Lopez-Jaramillo, P. (2001) Elevated C-reactive protein and pro-inflammatory cytokines in Andean women with pre-eclampsia. *International Journal of Gynaecology and Obstetrics*. **75**, 243-9.
34. Vergnes, J.N. (2008) Studies suggest an association between maternal periodontal disease and pre-eclampsia. *Evidence-Based Dentistry* **9**, 46-7.
35. World Medical Association Declaration of Helsinki – Ethical principles for medical research involving human subjects (2009) [WWW document]. URL: <http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index.html> [accessed on 28 october 2009].

Table 1 – Personal characteristics of preeclamptic cases and normotensive controls

Variable	Preeclamptic cases (n=58)	Normotensive controls (n=58)	p-value
Age (years) mean ± SD	28.62 ± 6.93	24.69 ± 5.37	0,0009**
Gestacional age (semanas) – mean ± SD	32.24 ± 4.24	28.92 ± 6.01	0,0035*
Absence of a companion n (%)	19 (32.8)	8 (13.8)	0,0157
Economic status – n (%)			0,1716
Good economic situation	4 (6.9)	11 (19.0)	
Regular economic situation	44 (75.9)	42 (72.4)	
Bad economic situation	10 (17.2)	5 (8.6)	
Race – n (%)			0,0632
Caucasian	23 (39.7)	33 (56.9)	
No caucasian	35 (60.3)	25 (43.1)	
Primiparous - n (%)	21 (36.2)	28 (48.3)	0,1882***
Use of alcohol – n (%)	3 (5.2)	3 (5.2)	1,0000
Proper utilization of prenatal care – n (%)	58 (100%)	58 (100%)	–
Tobacco use – n (%)	6 (10.3)	8 (13.8)	0,7767
Prepregnancy body mass index (BMI) – mean ± SD	27.69 ± 6.44	23.03 ± 4.17	<0,0001*

Fischer exact test, *Mann-Whitney U-test, **Student's t-test.

***Chi-Square test.

Table 2 – Expression of TNF- α and IL-6 mRNA in pregnant preeclamptic and normotensive women

Variable	Preeclamptic cases (n=58)	Normotensive controls (n=58)	<i>p-value</i> *
IL-6 (Mean + SD)	1.2 \pm 1.17	1.2 \pm 1.5	0,3332
TNF α (Mean + SD)	0.77 \pm 0.32	0.63 \pm 0.34	0,0063

* Mann-Whitney Test

Table 3 – Periodontal parameters in preeclamptic and normotensive groups

Variable	Preeclamptic cases (n=58)	Normotensive controls (n=58)	p-value	OR (IC 95%)
Probing depth (mm) (mean ± SD)	2.03 (0.54)	1.85 (0.39)	0,0123*	
Gingival recession (mm) (mean ± SD)	0.03 (0.06)	0.02 (0.07)	0,2191*	
Bleeding on probing (percentage of sites)	12 (0.16)	9 (0.13)	0,0794*	
Plaque index (percentage of sites)	53 (0.27)	44 (0.23)	0,0540*	
Clinical attachment loss (mm) (mean ± SD)	2.06 (0.55)	1.87 (0.39)	0,0187*	
Presence of periodontitis (%)	41 (70.3)	29 (50)	0,0227**	2.41 (1.12; 5.18)

* Mann Whitney Test , **Chi-Square test.

Table 4 – Relation between periodontitis and risk of preeclampsia after adjusting for the effect of those variables which differ between groups

Variable	Preeclamptic cases (n=58) n(%)	Normotensive controls (n=58) n(%)	OR**(IC 95%)
Periodontitis			
Absent	29 (50)	41 (70,7)	1.00
Present	29 (50)	17 (29,3)	3.73 (1.32 to 10.58)

* Adjustment for age, gestational age, BMI, absence of companion and economic status.

**Chi-Square test.

Table 5 – Comparison between cytokines expression and its relation to the presence/absence of periodontitis

Variable	Absence of periodontitis				Presence of periodontitis				<i>*p-value</i>
	n	mean	SD	median	n	mean	SD	median	
Control									
TNF α	41	0.63	0.31	0.60	17	0.64	0.43	0.46	0,7661
IL-6	41	1.14	1.31	0.82	17	1.33	1.91	0.69	0,6771
Preeclampsia									
TNF α	29	0.82	0.38	0.75	29	0.73	0.24	0.71	0,4492
IL-6	29	1.09	0.74	0.86	29	1.31	1.49	0.79	0,9383

*Mann-Whitney test

Table 6 – Correlations between periodontal data and cytokines expression by Spearman rank test

Variable	Preeclamptic cases				Normotensive Control			
	TNF α		IL-6		TNF α		IL-6	
	r	p-value	r	p-value	r	p-value	r	p-value
Probing depth	0.08	0.54	0.01	0.94	0.15	0.25	-0.08	0.56
Gingival Recession	-0.04	0.76	-0.28*	0.04	0.16	0.22	0.12	0.38
Bleeding on probing	0.02	0.87	0.02	0.87	0.04	0.79	0.06	0.63
Plaque index	-0.02	0.88	-0.04	0.77	0.06	0.66	0.13	0.34
Clinical attachment loss	0.09	0.48	-0.02	0.86	0.16	0.23	-0.06	0.65

* statistical significant difference

5. Discussão

Neste estudo objetivou-se revisar a literatura no que se refere à relação entre a doença periodontal e as complicações obstétricas e, além disso, pesquisar a influência do processo inflamatório e da periodontite na fisiopatologia da pré-eclâmpsia. Foi observado que diversas pesquisas evidenciaram associação entre infecções periodontais e parto prematuro, recém-nascidos de baixo peso e pré-eclâmpsia. No entanto, ainda há necessidade de estudos que comprovem as formas como as doenças se relacionam, principalmente no que se refere às citocinas inflamatórias. Na população analisada, a periodontite foi altamente prevalente e esteve associada de forma significativa com a pré-eclâmpsia, embora a análise de marcadores inflamatórios IL-6 e TNF α não tenha se mostrado diferente entre pacientes normotensas e com pré-eclâmpsia, com e sem periodontite. Ao mesmo tempo, verificamos que a análise da expressão do RNAm dessas citocinas em gestantes com pré-eclâmpsia e gestantes normotensas evidenciou relação entre o TNF α , mas não da IL-6, com o quadro hipertensivo.

Em relação à influência das citocinas na patogênese da pré-eclâmpsia, estudos que avaliaram sua associação com o TNF α (2,5,7,8,11,12), e com a IL-6 (2,3,6,7,9,10,12) apresentaram resultados discordantes. Um dos motivos destas possíveis discrepâncias pode ser o método empregado para detecção das citocinas. A grande maioria deles realizou exames que detectaram os níveis plasmáticos da própria proteína, utilizando o método de ELISA, por exemplo. Por outro lado, sabe-se que estas proteínas apresentam curta meia-vida plasmática e rápida captação pelos receptores, o que, em muitos casos, inviabilizaria sua detecção. Um outro exame que não detecta especificamente a proteína, mas sim o RNAm produzido pelos leucócitos (PCR em Temo Real) poderia ser utilizado para auxiliar na resolução destas divergências (26,27). O presente estudo evidenciou aumento da expressão do RNAm do TNF α no sangue de gestantes, resultado também encontrado por diversos autores que avaliaram a proteína.

A discussão sobre os mecanismos que envolvem as citocinas no quadro da pré-eclâmpsia ainda é inconclusiva. No entanto, as fontes do TNF α parecem ser monócitos e neutrófilos estimulados por fatores derivados da placenta, e que, por sua vez, causam disfunção endotelial levando a gestante ao quadro completo da síndrome hipertensiva (12). Assim, mais pesquisas sobre a influência destas proteínas na iniciação e/ou continuação do processo inflamatório e da disfunção endotelial devem continuar sendo realizadas. A intenção deste estudo foi a de detectar proteínas por processos laboratoriais diferentes da quase totalidade dos outros estudos, a fim de ampliar os conhecimentos e possivelmente abrir novos campos de trabalho.

Seria muito importante que pesquisas pudessem detectar a origem destas citocinas produzidas exacerbadamente em gestantes com pré-eclâmpsia. O fato de já haver comprovações de que as placentas destas mulheres apresentam maior expressão do TNF α (25) poderia sugerir que todo processo possa estar acontecendo localmente. A detecção sistêmica das citocinas, por sua vez, conforme já foi realizado neste estudo, é muito importante, auxilia no conhecimento da etiopatogenia da afecção, mas falha ao tentar comprovar a origem de sua produção e não traz grande aplicabilidade clínica.

Apesar de Erzen et al. (24) relaterem que o IL-6 é o mais valioso marcador para disfunção endotelial, neste estudo não foi encontrada diferença nos níveis plasmáticos desta citocina entre as gestantes normotensas e com pré-eclâmpsia. Esta diferença de resultado em relação aos estudos que avaliaram diretamente a proteína pode gerar dúvidas quanto à real atuação do IL-6 no quadro hipertensivo.

A atuação das citocinas no processo inflamatório da pré-eclâmpsia ainda poderia ser esclarecida pelo estudo do polimorfismo dos genes codificadores. Assim o aumento dos níveis sistêmicos do TNF α encontrados poderia ser explicado pela origem genética. No entanto, alguns autores afirmam que estas correlações ainda não podem ser comprovadas e, muito menos, utilizadas clinicamente (15,16).

Dessa maneira, devido à importância do quadro imunológico na patogênese da pré-eclâmpsia, principalmente no que se refere à atuação danosa das citocinas inflamatórias no endotélio vascular, diversos estudos têm buscado correlacionar o quadro hipertensivo com infecções localizadas (46).

A possível influência de infecções orais na iniciação e/ou potencialização da pré-eclâmpsia tem sido amplamente discutida. A associação entre estas doenças parece ser biologicamente plausível, já que a periodontite promove aumento dos níveis das mesmas citocinas inflamatórias correlacionadas à pré-eclâmpsia, o TNF α e a IL-6 (2,3,5,6,7,8,9,10,11,12,31).

A estimativa de risco entre a periodontite e a pré-eclâmpsia foi evidenciada por um valor de OR ajustado de 3,73, considerado relevante. Por outro lado, sabe-se que a pré-eclâmpsia tem origem multifatorial, assim como acontece com outras doenças. Portanto, da mesma maneira que a periodontite, diversos outros fatores estão associados com estimativas de risco próximas ao valor encontrado, sendo que, se somados, contribuirão para o desenvolvimento do quadro hipertensivo. Ainda, a análise do Risco Atribuível Populacional ajustado mostrou que a eliminação da periodontite contribuiria para redução de 45,9% das gestantes com pré-eclâmpsia. Este valor é relevante. No entanto, para que se possa realmente definir a influência da eliminação da periodontite nesta população há desenhos de estudo mais adequados, como por exemplo, estudos clínicos prospectivos com grande tamanho amostral, incluindo tratamento periodontal e avaliação do desfecho.

A avaliação clínica dos parâmetros periodontais em pesquisas que correlacionam doença periodontal e pré-eclâmpsia pode apresentar diferenças quando mais de um pesquisador a realiza. Neste estudo, apenas um avaliador ficou responsável por realizar o exame periodontal de todas as gestantes. Além disso, foi realizado um teste para que se pudesse detectar a concordância intraexaminador, ou seja, 12 gestantes foram avaliadas, em dois dias consecutivos,

sendo que a porcentagem de concordância foi de 95,2% para profundidade de sondagem e de 95,9% para perda de inserção.

Ficou evidente que a doença periodontal esteve associada à pré-eclâmpsia por meio da profundidade de sondagem, perda de inserção e periodontite, da mesma maneira que relatado por diversos autores (38,39,40,41,42,43,44,45). Para que este resultado fosse possível de ser analisado, optou-se por adotar uma definição de periodontite que concordasse razoavelmente com as outras. Assim, foi utilizada a classificação de Contreras et al. (41), que considera periodontite quando dois ou mais sítios apresentam profundidade de sondagem e perda de inserção $\geq 4\text{mm}$, com sangramento à sondagem.

No entanto, Lohsoonthorn et al. (59) evidenciaram que a prevalência de periodontite pode variar dentro de uma mesma população quando diferentes classificações periodontais são utilizadas. Isto pode colocar em dúvida os resultados, correlações de risco e implicações clínicas baseadas em evidências (60). Dessa maneira, pode-se supor que, se determinado estudo que comprovou haver associação entre estas afecções alterasse seu critério de classificação periodontal, a relação de risco poderia não ser confirmada.

Também houve o objetivo de tentar estabelecer a correlação imunológica entre a periodontite e a pré-eclâmpsia. Se realmente a doença periodontal tiver condições de promover um estado inflamatório sistêmico a ponto de interferir no quadro de pré-eclâmpsia, teríamos que comprovar que gestantes com doença periodontal e pré-eclâmpsia apresentam maior expressão das citocinas TNF α e

IL-6 sistemicamente do que aquelas com pré-eclâmpsia e sem doença periodontal. No entanto, esta associação não pôde ser confirmada, já que os níveis das citocinas não diferiram estatisticamente.

Dos pontos de vista clínico e imunológico, cabe a discussão das características periodontais que implicariam em complicações obstétricas. A possível correlação entre estas afecções está, muito provavelmente, na atuação do processo inflamatório local (periodontal) como fonte de microorganismos e/ou citocinas que se disseminariam (39). Por isso, parece claro que em quanto mais sítios houver infecção periodontal, maior será a contaminação e, portanto, maior a possibilidade de disseminação de microorganismos e citocinas. Nas gestantes com boa saúde periodontal, fica mais fácil imaginar que essa disseminação será muito pequena, senão inexistente. Como exemplo, Canakci et al. (42) encontraram correlação entre os níveis sanguíneos do TNF α e o sangramento gengival à sondagem, sugerindo que onde há maior inflamação (sangramento) há também maior contaminação e possível disseminação de citocinas. O presente estudo não confirmou estas diferenças ao analisar a correlação (teste de Spearman) entre as diversas variáveis periodontais e a expressão do RNAm das citocinas. A diferença na sensibilidade do teste que detecta o RNAm (PCR), utilizado no presente estudo, em relação àquele que detecta a proteína (método ELISA) poderia explicar os discrepantes resultados e alertar para a necessidade de mais estudos.

Em relação à disseminação de bactérias do tecido periodontal, fato que poderia influenciar as complicações sistêmicas (61), Barak et al. (62) evidenciaram, por meio de PCR, a presença de microorganismos estritamente

periodontopatogênicos em placentas de gestantes com pré-eclâmpsia. Estes microorganismos poderiam, sistemicamente, aumentar o estado inflamatório naturalmente existente nas gestantes com hipertensão. Por outro lado, a comprovação deste fato, seria a maior expressão das citocinas em gestantes com pré-eclâmpsia e periodontite, o que não se pôde confirmar nesta pesquisa.

O fato de bactérias periodontopatogênicas terem sido encontradas no líquido amniótico (63) e em maior quantidade na placenta de gestantes com pré-eclâmpsia (62), não necessariamente significa que a doença periodontal contribui para o desenvolvimento da hipertensão. Por outro lado, a literatura apresenta algumas evidências da influência da contaminação da unidade feto-placentária por microorganismos da flora oral. Por exemplo, Romero et al. (64), ao relatarem a primeira imagem de biofilme bacteriano no líquido amniótico por meio de exame transvaginal, detectaram que dentre os três principais microorganismos encontrados em sua cultura esteve o *Streptococcus mutans*, principal causador das lesões de cárie. Ou seja, de alguma maneira os microorganismos atingiram a cavidade uterina e tiveram participação no parto prematuro de 28 semanas relatado no caso clínico.

A metodologia proposta neste estudo trouxe algumas dificuldades específicas. O cálculo da amostra indicou a necessidade de 58 casos e 58 controles para que se pudesse atingir um resultado satisfatório e relevante. Houve, no entanto, dificuldade na captação dos casos, principalmente, de gestantes com pré-eclâmpsia pura. Muitas das gestantes internadas na Maternidade de Campinas e no CAISM, locais de referência, apresentavam outras doenças que

exigiam exclusão da amostra, já que poderiam interferir nos resultados da pesquisa, como por exemplo, o diabetes e as nefropatias.

Além disso, a opção por realizar a análise da expressão do RNAm, por meio do PCR, ao invés de utilizar o método ELISA para detecção das citocinas, fez com que houvesse perda de amostra por diversos motivos. O RNAm é bastante instável e degradável, por isso, toda amostra de sangue deveria ter seu processamento iniciado, no máximo, 24 horas após a coleta, o que dificultou a captação dos pacientes. Ainda, mesmo que a coleta e processamento fossem iniciados a tempo, o RNAm, em muitos casos, foi degradado no meio do processo laboratorial, levando à exclusão do sujeito da pesquisa.

Também houve dificuldades em encontrar um centro de atendimento de gestantes normotensas, onde as mesmas estivessem concentradas em dias específicos e que os médicos e enfermeiras estivessem disponíveis a auxiliar na divulgação, captação e coleta de sangue das pacientes em dias e horários compatíveis com o funcionamento do laboratório em que seria extraído o RNAm.

Para que pudessem ser comparadas ao grupo caso (pré-eclâmpsia), as gestantes normotensas deveriam ter idade gestacional superior a 20 semanas. Pela dificuldade de captação, muitas delas apresentaram idade gestacional próxima a este limite inferior, fazendo com que, após análise estatística, fosse detectado que o grupo-controle obteve médias de idade gestacional e idade menores do que no grupo de casos. Isso aconteceu porque a pré-eclâmpsia dificilmente é diagnosticada por volta da 20ª semana de gestação. Por outro lado, a

literatura não evidencia claramente o padrão das citocinas inflamatórias estudadas em diferentes idades maternas e diferentes idades gestacionais, o que dificulta a afirmação de que a menor média (por volta de 4 semanas para as duas variáveis) entre os grupos da pesquisa possam ter influenciado nos resultados.

Após avaliação das gestantes para realização deste estudo, houve a certeza de que a condição periodontal das mesmas não condiz com o que desejaríamos para esta população. Sangramento gengival, perda óssea e dor à mastigação, sintomas característicos da doença periodontal, podem interferir na alimentação e conseqüentemente na qualidade do processo gestacional. Por isso, independente da comprovação da associação entre infecções periodontais e complicações obstétricas, a saúde bucal da gestante deve ser sempre avaliada e, nesse sentido, está a importância da avaliação das grávidas por cirurgiões-dentistas.

Por outro lado, os resultados que evidenciam a associação entre a periodontite e a pré-eclâmpsia devem ser levados em consideração para a prática clínica privada e nas construções de modelos de saúde pública, focando o tratamento periodontal de gestantes e, conseqüentemente, a eliminação de um dos fatores associados à hipertensão. Programas de acompanhamento odontológico na gestação deveriam ser criados, sendo que os cirurgiões-dentistas e os médicos deveriam se atualizar constantemente para promover incentivo e atendimento com técnicas adequadas.

Em relação aos atendimentos privados, assim como já acontece em alguns países do mundo, os planos médicos de saúde deveriam incluir em sua

cobertura de procedimentos o atendimento odontológico durante o período gestacional. Afinal de contas, a boca e seus anexos constituem a única região do organismo na qual o médico não faz tratamentos e que, conforme, discutido, pode representar um problema à paciente.

O presente estudo apresentou resultados imunológicos até então não encontrados na literatura, analisando o RNAm das principais citocinas inflamatórias associadas à pré-eclâmpsia e à doença periodontal. Este método de análise do processo inflamatório, um dos mais sensíveis, pode auxiliar muito ao ser comparado com aqueles que detectam as citocinas no plasma sanguíneo, confirmando ou não sua atuação no mecanismo das doenças. Apesar do presente estudo não comprovar a influência da doença periodontal na expressão do RNAm das citocinas sistêmicas, estabeleceu-se uma linha de pesquisa que pode gerar novos projetos para pesquisas ainda mais específicas.

6. Conclusões

- A literatura revisada evidencia associação entre a infecção periodontal e a pré-eclâmpsia, mas ressalta a necessidade de mais estudos clínicos e laboratoriais.
- Embora a expressão do RNAm do IL-6 não tenha sido diferente entre os grupos estudados, a expressão do RNAm do TNF α esteve aumentada em gestantes com pré-eclâmpsia, indicando que pode haver alteração da resposta imune na patogênese da pré-eclâmpsia.
- Houve correlação entre a doença periodontal e a pré-eclâmpsia, o que ressalta a necessidade do cuidado odontológico durante o período gestacional. No entanto, não foi possível comprovar que a atuação das citocinas inflamatórias TNF α e IL-6 seja o elo entre as duas alterações.

7. Referências Bibliográficas

1. Report of the National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 2000;183(1),S1-S22.
2. Afshari JT, Ghomian N, Shameli A, Shakeri MT, Fahmidehkar MA, Mahajer E et al. Determination of Interleukin-6 and Tumor Necrosis Factor-alpha concentrations in Iranian-Khorasanian patients with preeclampsia. *BMC Pregnancy and Childbirth* 2005;5:14.
3. Freeman DJ, McManus F, Brown EA, Cherry L, Norrie J, Ramsay JE et al. Short- and long-term changes in plasma inflammatory markers associated with preeclampsia. *Hypertension*. 2004;44(5):708-14.
4. Ouyang YQ, Li SJ, Zhang Q, Cai HB, Chen HP. Interactions between inflammatory and oxidative stress in preeclampsia. *Hypertens Pregnancy*. 2009;28(1):56-62.
5. Heyl W, Handt S, Reister F, Gehlen J, Schröder W, Mittermayer C et al. Elevated soluble adhesion molecules in women with pre-eclampsia. Do cytokines like tumour necrosis factor-alpha and interleukin-1beta cause endothelial activation. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 1999;86(1):35-41.

6. Madazli R, Aydin S, Uludag S, Vildan O, Tolun N. Maternal plasma levels of cytokines in normal and preeclamptic pregnancies and their relationship with diastolic blood pressure and fibronectin levels. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2003;82(9):797-802.
7. Azizieh F, Raghupathy R, Makhseed M. Maternal Cytokine Production Patterns in Women with Pre-eclampsia. Maternal cytokine production patterns in women with pre-eclampsia. *Am J Reprod Immunol* 2005;54(1):30–37.
8. Hayashi M, Ueda Y, Yamaguchi T, Sohma R, Shibazaki M, Ohkura T, et al. Tumor necrosis factor-alpha in the placenta is not elevated in pre-eclamptic patients despite its elevation in peripheral blood. *Am J Reprod Immunol.* 2005;53(3):113-9.
9. Jonsson Y, Rubèr M, Matthiesen L, Berg G, Nieminen K, Sharma S et al. Cytokine mapping of sera from women with preeclampsia and normal pregnancies. *J Reprod Immunol.* 2006;70(1-2):83-91.
10. Casart YC, Tarrazzi K, Camejo MI. Serum levels of interleukin-6, interleukin-1beta and human chorionic gonadotropin in pre-eclamptic and normal pregnancy. *Gynecol. Endocrinol.* 2007;23(5):300-3.
11. Peraçoli JC, Rudge MV, Peraçoli MT. Tumor necrosis factor-alpha in gestation and puerperium of women with gestational hypertension and pre-eclampsia. *Am J Reprod Immunol.* 2007;57(3):177-85.
12. Sharma A, Satyam A, Sharma JB. Leptin, IL-10 and inflammatory markers (TNF-alpha, IL-6 and IL-8) in pre-eclamptic, normotensive pregnant and healthy non-pregnant women. *Am J Reprod Immunol.* 2007;58(1):21-30.
13. Schiessl B. Inflammatory response in preeclampsia. *Mol Aspects Med.* 2007;28(2):210-9.

14. Pridjian G, Puschett JB. Preeclampsia. Part 1: clinical and pathophysiologic considerations. *Obstet Gynecol Surv.* 2002;57(9):598-618.
15. Stonek F, Hafner E, Metzenbauer M, Katharina S, Stümpflen I, Schneeberger C et al. Absence of an association of tumor necrosis factor (TNF)-alpha G308A, interleukin-6 (IL-6) G174C and interleukin-10 (IL-10) G1082A polymorphism in women with preeclampsia. *J Reprod Immunol.* 2008;77(1):85-90.
16. Bombell S, McGuire W. Tumour necrosis factor (-308A) polymorphism in preeclampsia: meta-analysis of 16 case-control studies. *Aust N Z J Obstet Gynaecol.* 2008;48(6):547-51.
17. Sacks GP, Studena K, Sargent K, Redman CW. Normal pregnancy and preeclampsia both produce inflammatory changes in peripheral blood leukocytes akin to those of sepsis. *Am J Obstet Gynecol.* 1998;179(1):80-6.
18. Lok CA, Jebbink J, Nieuwland R, Faas MM, Boer K, Sturk A et al. Leukocyte activation and circulating leukocyte-derived microparticles in preeclampsia. *Am J Reprod Immunol.* 2009;61(5):346-59.
19. Greer IA, Lyall F, Perera T, Boswell F, Macara LM. Increased concentrations of cytokines IL-6 and IL-1 receptor antagonist in plasma of women with preeclampsia: a mechanism for endothelial dysfunction? *Obstet Gynecol.* 1994;84(6):937-940.
20. Vince GS, Starkey PM, Austgulen R, Kwiatkowski D, Redman CW. IL-6, tumour necrosis factor and soluble tumour necrosis factor receptors in women with preeclampsia. *Br J Obstet Gynaecol.* 1995;102(10):20-25.
21. Chen HL, Yang YP, Hu XL, Yelavarthi KK, Fishback JL, Hunt JS: Tumor necrosis factor mRNA and protein are present in human placental and uterine cells at early and late stages of gestation. *Am J Pathol* 1991;139(2):327-335.
22. Luppi P, Deloia JA. Monocytes of preeclamptic women spontaneously synthesize pro-inflammatory cytokines. *Clin Immunol* 2006;118(2-3):268-75.

23. Gabay C, Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med* 1999; 340(6):448–454.
24. Erzen B, Sabovic M, Sebestjen M, Keber I, Poredos P. Interleukin-6 correlates with endothelial dysfunction in young post-myocardial infarction patients. *Cardiology* 2007;107(2):111–116.
25. Rinehart BK, Terrone DA, Lagoo-Deenadayalan S, Barber WH, Hale EA, Martin JN Jr et al. Expression of the placental cytokines tumor necrosis factor alpha, interleukin 1beta, and interleukin 10 is increased in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 1999;181(4):915-20.
26. Blaschke V, Reich K, Blaschke S, Zipprich S, Neumann C. Rapid quantitation of proinflammatory and chemoattractant cytokine expression in small tissue samples and monocyte-derived dendritic cells: validation of a new real-time RT-PCR technology. *J Immunol Methods.* 2000;246(1-2):79-90.
27. Giulietti A, Overbergh L, Valckx D, Decallonne B, Bouillon R, Mathieu C. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods.* 2001;25(4):386-401.
28. American Academy of Periodontology. [on line]. [acesso em 28 out. 2009]. Disponível em URL: <http://www.perio.org/consumer/2a.html>
29. Beck JD, Offenbacher S. Systemic effects of periodontitis: epidemiology of periodontal disease and cardiovascular disease. *J Periodontol* 2005; 76(11 suppl): 2089-100.
30. Konopka T, Rutkowska M, Hirnle L, Kopec W. IL-1beta and PGE2 production in whole blood and gingival fluid in women with periodontitis and preterm low birth weight. *Ginekol Pol* 2004;75(5):352-60.

31. Erdemir EO, Duran I, Haliloglu S. Effects of smoking on clinical parameters and the gingival crevicular fluid levels of IL-6 and TNF-alpha in patients with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol* 2004;31(2):99-104.
32. Noack B, Genco RJ, Trevisan M, Grossi S, Zambon JJ, De Nardin E. Periodontal infections contribute to elevated systemic C-reactive protein level. *J Periodontol* 2001;72(9):1221-27.
33. Bretz WA, Weyant RJ, Corby PM, Ren D, Weissfeld L, Kritchevsky SB, et al. Systemic inflammatory markers, periodontal diseases and periodontal infections in an elderly population. *J Am Geriatr Soc* 2005;53(9):1532-37.
34. Ide M, Jagdev D, Coward PY, Crook M, Barclay GR, Wilson RF. The short-term effects of treatment of chronic periodontitis on circulating levels of endotoxin, C-reactive protein, tumor necrosis factor-alpha, and interleukin-6. *J Periodontol*. 2004;75(3):420-8.
35. Promsudthi A, Pimapan Sri S, Deerochanawong C, Kanchanasavita W. The effect of periodontal therapy on uncontrolled type 2 diabetes mellitus in older subjects. *Oral Dis* 2005;11(5):293-98.
36. Offenbacher S, Boggess KA, Murtha AP, Jared HL, Lief S, McKaig RG, et al. Progressive periodontal disease and risk of very preterm delivery. *Obstet Gynecol* 2006;107(1): 29-36.
37. 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(10 suppl):1103-13.
38. Boggess KA, Lief S, Murtha AP, Moss K, Beck J, Offenbacher S. Maternal periodontal disease is associated with an increased risk for preeclampsia. *Obstet Gynecol*. 2003;101(2):227-31.

39. Canakci V, Canakci CF, Canakci H, Canakci E, Cicek Y, Ingec M et al. Periodontal disease as a risk factor for pre-eclampsia: a case control study. *Aust N Z J Obstet Gynaecol.* 2004;44(6):568-73.
40. Oettinger-Barak O, Barak S, Ohel G, Oettinger M, Kreutzer H, Peled M et al. Severe pregnancy complication (preeclampsia) is associated with greater periodontal destruction. *J Periodontol.* 2005;76(1):134-7.
41. Contreras A, Herrera JA, Soto JE, Arce RM, Jaramillo A, Botero JE. Periodontitis is associated with preeclampsia in pregnant women. *J Periodontol.* 2006;77(2):182-8.
42. Canakci V, Canakci CF, Yildirim A, Ingec M, Eltas A, Erturk A. Periodontal disease increases the risk of severe pre-eclampsia among pregnant women. *J Clin Periodontol.* 2007;34(8):639-45.
43. Kunnen A, Blaauw J, van Doormaal JJ, van Pampus MG, van der Schans CP, Aarnoudse JG et al. Women with a recent history of early-onset pre-eclampsia have a worse periodontal condition. *J Clin Periodontol.* 2007;34(3):202-7.
44. Ruma M, Boggess K, Moss K, Jared H, Murtha A, Beck J et al. Maternal periodontal disease, systemic inflammation, and risk for preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 2008;198(4):389.e1-5.
45. Siqueira FM, Cota LO, Costa JE, Haddad JP, Lana AM, Costa FO. Maternal periodontitis as a potential risk variable for preeclampsia: a case-control study. *J Periodontol.* 2008;79(2):207-15.
46. Conde-Agudelo A, Villar J, Lindheimer M. Maternal infection and risk of preeclampsia: systematic review and metaanalysis. *Am J Obstet Gynecol.* 2008;198(1):7-22.
47. Khader YS, Jibreal M, Al-Omiri M, Amarin Z. Lack of association between periodontal parameters and preeclampsia. *J Periodontol.* 2006;77(10):1681-7.

48. Srinivas SK, Sammel MD, Stamilio DM, Clothier B, Jeffcoat MK et al. Periodontal disease and adverse pregnancy outcomes: is there an association? *Am J Obstet Gynecol.* 2009;200(5):497.e1-8.
49. Daher S, Mattar R, Sass N. Doença hipertensiva específica da gravidez: aspectos imunológicos. In: Sass N, Camano L, Moron AF. Hipertensão arterial e nefropatias na gravidez. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2006. p.45-56.
50. Haraszthy VI, Zambon JJ, Trevisan M, Zeid M, Genco RJ. Identification of periodontal pathogens in atheromatous plaques. *J Periodontol* 2000; 71(10): 1554-60.
51. Silva P. Farmacoterapia Biotecnológica. In: Silva P. Farmacologia. Rio de Janeiro; Guanabara Koogan; 2002. p. 1285-92.
52. Critério de Classificação Econômica Brasil. Associação Brasileira de Empresas de Pesquisa 2003 [on line]. [acesso em 12 mai. 2006]. Disponível em URL: http://www.abep.org/codigosguias/ABEP_CCEB_2003.pdf
53. IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Classificação de cor / raça [on line]. [acesso em 05 set. 2009]. Disponível em URL: <http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/20122002censo.shtm>
54. Global Database on Body Mass Index. World Health Organization [on line]. [acesso em 07 set. 2009] Disponível em URL: http://www.who.int/bmi/index.jsp?introPage=intro_3.html.
55. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987;162(1):156-9.
56. Riché EL, Boggess KA, Lieff S, Murtha AP, Auten RL, Beck JD et al. Periodontal disease increases the risk of preterm delivery among preeclamptic women. *Ann Periodontol.* 2002;7(1):95-101.

57. World Medical Association Declaration of Helsinki – Ethical principles for medical research involving human subjects [on line] [acesso em 28 out. 2009]. Disponível em URL: <http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index.html>
58. Brasil. Ministério da Saúde. Conselho Nacional de Saúde. Resolução n. 196, de 10 de outubro de 1996. [on line] [acesso em 14 abr. 2006]. Disponível em URL: http://www.icb.usp.br/etica/etica_res196.html.
59. Lohsoonthorn V, Kungsadalpipob K, Chanchareonsook P, Limpongsanurak S, Vanichjakvong O, Sutdhibhisal S et al. Maternal periodontal disease and risk of preeclampsia: a case-control study. *Am J Hypertens.* 2009;22(4):457-63.
60. Tonetti MS, Claffey N. Advances in the progression of periodontitis and proposal of definitions of a periodontitis case and disease progression for use in risk factor research. *J Clin Periodontol* 2005. 32 (Suppl. 6), 210–213.
61. Beck JD, Offenbacher S. Relationships among clinical measures of periodontal disease and their associations with systemic markers. *Ann Periodontol.* 2002 Dec;7(1):79-89.
62. Barak S, Oettinger-Barak O, Machtei EE, Sprecher H, Ohel G. Evidence of periopathogenic microorganisms in placentas of women with preeclampsia. *J Periodontol.* 2007;78(4):670-6.
63. León R, Silva N, Ovalle A, Chaparro A, Ahumada A, Gajardo M et al. Detection of *Porphyromonas gingivalis* in the amniotic fluid in pregnant women with a diagnosis of threatened premature labor. *J Periodontol.* 2007;78(7):1249-55.
64. Romero R, Schaudinn C, Kusanovic JP, Gorur A, Gotsch F, Webster P et al. Detection of a microbial biofilm in intraamniotic infection. *Am J Obstet Gynecol.* 2008;198(1):135.e1-5.

8. Anexos

8.1. Anexo 1 – Carta de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da FCM-UNICAMP

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html

CEP, 25/03/07.
(Grupo III)

PARECER PROJETO: Nº 055/2007 (Este nº deve ser citado nas correspondências referente a este projeto)
CAAE: 0032.0.146.000-07

I-IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “DOENÇA PERIODONTAL COMO FATOR DE RISCO PARA PRÉ-ECLÂMPZIA: ESTUDO CASO-CONTROLE”

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Gabriel Tilli Politano

INSTITUIÇÃO: CAISM/UNICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP: 06/02/2007

APRESENTAR RELATÓRIO EM: 27/02/08 (O formulário encontra-se no *site* acima)

II - OBJETIVOS

Avaliar a associação entre doença periodontal e o desenvolvimento de pré-eclâmpsia.

III - SUMÁRIO

Este estudo pretende avaliar a associação entre doença periodontal e o desenvolvimento de pré-eclâmpsia nas pacientes atendidas no Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher - CAISM da Faculdade de Ciências Médicas - Unicamp (grupo caso) e em centros de saúde da cidade de Campinas (grupo controle). Trata-se de uma pesquisa tipo caso-controle que será realizada com gestantes com e sem pré-eclâmpsia. Estas terão o periodonto avaliado para se estabelecer a presença ou ausência da doença em questão. Será realizada, também, a coleta de sangue periférico para avaliação laboratorial da expressão sistêmica do RNAm das citocinas inflamatórias interleucina-6 e Fator de Necrose Tumoral Alfa (PCR em tempo real) e comparação entre os grupos. Para avaliação da homogeneidade entre os grupos serão utilizados os testes de qui-quadrado e T de Student, além de calculados odds ratio bruto e ajustados através da regressão logística pareada para os fatores de exposição. O nível de significância assumido será de 5%. Espera-se obter resultados de maior prevalência da doença periodontal e aumento das citocinas sanguíneas em gestantes com pré-eclâmpsia quando comparadas com as gestantes do grupo controle.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

O projeto é relevante já que pretende identificar a real relação entre a doença periodontal e a pré-eclâmpsia, podendo contribuir para diminuição da morbimortalidade materna. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido explica completa e pormenorizadamente, a natureza da pesquisa, seus objetivos, métodos, benefícios, potenciais riscos e incômodos eventuais, além de garantir a liberdade do sujeito em participar ou não da pesquisa e assegurar o sigilo dos sujeitos envolvidos. O pesquisador atendeu às solicitações dos assessores, estando apto a aprovação.

V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa supracitada.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

VII - DATA DA REUNIÃO

Homologado na II Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 27 de fevereiro de 2007.


Prof. Dra. Carmen Silvia Bertuzzo
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

8.2. Anexo 2 – Carta de Aprovação da Prefeitura Municipal de Campinas



PREFEITURA MUNICIPAL DE CAMPINAS
Secretaria Municipal de Saúde



AUTORIZAÇÃO

Autorizo a realização da Pesquisa em nível de Doutorado, intitulada **“Doença Periodontal como fator de risco para pré-eclâmpsia: estudo de caso-controle”**, que tem por objetivo avaliar a associação entre doença periodontal e o desenvolvimento de pré-eclâmpsia.

Declaro estar ciente que a pesquisa será desenvolvida pelo pesquisador Gabriel Tilli Polítano, aluno do Programa de Pós-Graduação, nível Doutorado do Departamento de Tocoginecologia da FCM/ UNICAMP, junto a 58 gestantes sem pré-eclâmpsia (Grupo Controle) atendidas no Centro de Saúde Barão Geraldo, sob a orientação do Professor Doutor Renato Passini Júnior.


Dr. JOSÉ FRANCISCO KERR SARAIVA
Secretário Municipal de Saúde.

Campinas, 03 de abril de 2007.

8.3. Anexo 3 – Carta de Aprovação da Prefeitura Municipal de Serra Negra



Secretaria Municipal de Saúde

AUTORIZAÇÃO

Autorizo a realização da Pesquisa em nível de Doutorado, intitulada " Doença Periodontal como fator de risco para pré-eclâmpsia", que tem por objetivo avaliar a associação entre doença periodontal e o desenvolvimento de pré-eclâmpsia.

Declaro estar ciente que a pesquisa será desenvolvida pelo pesquisador Gabriel Tilli Politano, aluno do Programa de pós-Graduação, nível Doutorado, do Departamento de Tocoginecologia da FCM/UNICAMP, junto a 58 gestantes sem hipertensão (grupo controle) atendidas na UBS Praça Lyons sob a orientação do Professor Dr. Renato Passini Júnior.

A handwritten signature in black ink, appearing to read "ARSF", is written over a horizontal line.

Dr. Antonio Roberto Siqueira Filho
Secretário Municipal de Saúde

Serra Negra, 10 de Janeiro de 2009

8.4. Anexo 4 – Lista de Verificação

Lista de Verificação - Grupo Pré-eclâmpsia (caso)

Dados da gestante	Inclui	Exclui
Pré-eclâmpsia diagnosticada	SIM	NÃO
Pré-eclâmpsia em gestação(ões) anterior(es)	NÃO	SIM
Diabetes gestacional ou pré-gestacional	NÃO	SIM
Nefropatia	NÃO	SIM
Gestação múltipla	NÃO	SIM
Alteração cardíaca que requeira profilaxia antibiótica em odontologia	NÃO	SIM
Tratamento periodontal realizado durante atual gestação	NÃO	SIM
HIV positivo	NÃO	SIM
Presença de menos de 15 dentes na boca	NÃO	SIM
Alguma patologia uterina ou de ovário	NÃO	SIM
Apresenta alguma infecção sistêmica	NÃO	SIM

Lista de Verificação – Grupo Normotensa (controle)

Dados da gestante	Inclui	Exclui
Hipertensão pré-gestacional ou durante a atual gestação	NÃO	SIM
Diabetes gestacional ou pré-gestacional	NÃO	SIM
Nefropatia	NÃO	SIM
Gestação múltipla	NÃO	SIM
Alteração cardíaca que requeira profilaxia antibiótica em odontologia	NÃO	SIM
Tratamento periodontal realizado durante atual gestação	NÃO	SIM
HIV positivo	NÃO	SIM
Presença de menos de 15 dentes na boca	NÃO	SIM
Alguma patologia uterina ou de ovário	NÃO	SIM
Apresenta alguma infecção sistêmica	NÃO	SIM

8.5. Anexo 5 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

DOENÇA PERIODONTAL COMO FATOR DE RISCO PARA PRÉ-ECLÂMPSIA: ESTUDO CASO-CONTROLE

Nº |__|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|

Pesquisador Responsável: Dr. Gabriel Tilli Politano

Orientador: Prof. Dr. Renato Passini

Nome da Participante: _____ RG: _____

Idade: ____ Anos. Endereço: _____ No. _____

Bairro: _____ Cidade: _____ UF: _____

Telefone: _____ Telefone p/ recados: _____ com: _____

Nós gostaríamos de convidar você para participar, voluntariamente, de uma pesquisa que pretende avaliar se a doença presente na gengiva (periodontite) em gestantes pode facilitar o aparecimento da hipertensão na gestação. Para isso, esta pesquisa contará com a participação de dois grupos diferentes de gestantes, aquelas sem aumento de pressão arterial e aquelas com pré-eclâmpsia, um tipo de hipertensão específica.

Esta pesquisa se faz necessária porque, caso a doença da gengiva facilite o aparecimento da pressão alta, muitas gestantes poderiam ser beneficiadas se tivessem a gengiva tratada antes ou durante a gestação. Você não terá qualquer benefício direto em participar deste estudo; no entanto, os resultados conseguidos com sua participação poderão melhorar o atendimento de muitas outras gestantes que tenham pré-eclâmpsia e/ou doenças da gengiva.

Os procedimentos que iremos realizar serão os seguintes:

- Realização de algumas perguntas;
- Avaliação da sua gengiva, para saber se há ou não a presença de doença gengival. Esta avaliação consistirá em inserir suavemente um instrumento entre a sua gengiva e todos os seus dentes, o que permitirá avaliar se nessa região houve ou não perda do osso que segura o dente.
- Coleta de uma pequena quantidade de sangue (5ml) da veia que passa pelo seu braço.

A avaliação da gengiva e da coleta de sangue não são procedimentos doloridos, apesar de poderem causar um leve desconforto.

Se houver sangramento após a avaliação da sua gengiva, o mesmo deve parar naturalmente, sem necessidade de qualquer tratamento. No entanto, qualquer desconforto posterior que lhe preocupe você poderá entrar em contato comigo (Gabriel) em horário comercial, pelo telefone 32522903.

Caso você tenha alguma doença do coração grave que ainda não tenha sido descoberta, há o risco de você desenvolver endocardite bacteriana, uma alteração que acomete uma região específica do coração, mas é tratável com antibióticos.

Para realização de todos estes procedimentos, eu precisarei de apenas um contato com você, sendo que a avaliação completa será realizada neste mesmo local, em uma sala próxima, e levará cerca de 30 minutos, acontecendo no momento de espera para o atendimento pré-natal, ou seja, a consulta de pré-natal para qual você veio não será prejudicada.

Todas as gestantes que participarem da pesquisa serão informadas dos resultados referentes à saúde da sua gengiva. Se você não quiser participar da pesquisa tem todo o direito de recusar, antes, durante ou após a avaliação bucal. Esta decisão não trará qualquer tipo de prejuízo no curso normal do atendimento pré-natal que já era realizado anteriormente. Você também pode se recusar a responder qualquer pergunta ou mesmo interromper a entrevista em qualquer momento.

Todos os casos de hipertensão diagnosticados terão garantia de tratamento e orientações na unidade em que estão sendo atendidas.

Não haverá nenhuma forma de reembolso de dinheiro, já que com a participação na pesquisa você não terá nenhum gasto.

Você será identificada apenas por um número, portanto quem tiver acesso às suas informações não saberá de quem são. Nem mesmo quando os resultados forem publicados seu nome será divulgado.

Qualquer dúvida que você tenha, mesmo depois de ter concluído sua participação no estudo, entre em contato com Gabriel pelo telefone (32522903), em horário comercial. Se você tiver qualquer pergunta relacionada aos seus direitos como voluntária de um estudo, poderá contatar a secretária do Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp (3521-8936). Você receberá uma cópia deste Termo.

Data: __/__/__

Nome da participante _____

Assinatura da participante _____

Data: __/__/__

Nome do profissional responsável: Gabriel Tilli Politano

Assinatura do Pesquisador Responsável:



8.6. Anexo 6 – Questionário aplicado às gestante

DOENÇA PERIODONTAL COMO FATOR DE RISCO PARA PRÉ-ECLÂMPZIA: ESTUDO CASO-CONTROLE

[] [] [] [] [] []

Nome da paciente: _____ R.G: _____

HC: _____ Entrevistador: _____

Data: ____ / ____ / ____

[] [] [] [] [] []

Idade gestacional: [] [] semanas completas

1) Quantos anos completos você tem?

Resposta: _____ anos completos

2) Atualmente a senhora é solteira, casada, divorciada ou viúva?

[1] Solteira [2] Casada [3] Divorciada [4] Viúva

3) Qual sua Cor/Raça

[1] Branca [2] Preta [3] Parda
[4] Amarela [5] Indígena [6] Outra: _____

4) Você ingeriu bebida alcoólica durante a atual gestação?

[1] Não [passar para a questão 6] [2] Sim [passar para a questão 5]

5) Com qual frequência média?

[1] Diária [2] Semanal [3] Mensal

6) Você está indo às consultas de pré-natal corretamente?

[1] Sim [2] Não

7) Você fumou cigarro durante a atual gestação?

[1] Sim [responder a questão 8] [2] Não [passar à questão 9]

8) Quantos cigarros você fuma, em média, por dia?

Resposta: _____ cigarros/dia

9) você já engravidou outra(s) vez(es)?

[1] Sim [responder à questão 10]

[2] Não [passar à questão 11]

10) Quantas vezes você engravidou anteriormente à atual gestação?

Resposta: _____ vezes

11) Quantos partos você já teve anteriormente?

[0] Nenhum parto

[1] Um parto

[2] Mais de um parto

12) Índice de massa corpórea (IMC) pré-gravídico

ENTR.: COPIE OS DADOS DO PRONTUÁRIO MÉDICO

Peso da gestante na primeira consulta: _____ Kg

Altura da gestante na primeira consulta: _____ cm

IMC = _____

I. 13.1 ENTR. DIGA: Agora vamos fazer algumas perguntas sobre sua família e sua casa

INSTRUÇÃO: Nas questões abaixo, considerar que a pessoa tem o bem, também nos seguintes casos: bem alugado em caráter permanente; bem emprestado de outro domicílio a mais de 6 meses; bem quebrado a menos de 6 meses.

14) Em relação a possuir aparelho(s) de televisão em cores na sua casa, responda:

[0] Não tem

[1] Tem um

[2] Tem dois

[3] Tem três

[4] Tem quatro

[5] Tem mais de quatro

15) Em relação à presença de banheiro com vaso sanitário na sua casa, responda:

[0] Não tem

[1] Tem um

[2] Tem dois

[3] Tem três

[4] Tem quatro

[5] Tem mais de quatro

16) Em relação à presença de empregada mensalista, que trabalhe na sua casa pelo menos 5 dias por semana, responda:

[0] Não tem

[1] Tem uma

[2] Tem duas

[3] Tem três

[4] Tem quatro

[5] Tem mais de quatro

17) Em relação a possuir máquina(s) de lavar roupa na sua casa, responda:

INSTRUÇÃO: Considerar possuidor do bem, caso a pessoa diga ter “tanquinho”

[0] Não tem

[1] Tem uma

[2] Tem duas

[3] Tem três

[4] Tem quatro

[5] Tem mais de quatro

18) Em relação a possuir qualquer tipo de aparelho de rádio na sua casa, inclusive walkman, responda:

- | | | |
|--------------|----------------|------------------------|
| [0] Não tem | [1] Tem um | [2] Tem dois |
| [3] Tem três | [4] Tem quatro | [5] Tem mais de quatro |

19) Em relação a possuir automóvel próprio, que não seja de utilização profissional, responda:

- | | | |
|--------------|----------------|------------------------|
| [0] Não tem | [1] Tem um | [2] Tem dois |
| [3] Tem três | [4] Tem quatro | [5] Tem mais de quatro |

20) Em relação a possuir aspirador de pó ou máquina de limpar à vapor na sua casa, responda:

- | | | |
|--------------|----------------|------------------------|
| [0] Não tem | [1] Tem um | [2] Tem dois |
| [3] Tem três | [4] Tem quatro | [5] Tem mais de quatro |

21) Em relação a possuir videocassete e/ou DVD na sua casa, responda:

- | | | |
|--------------|----------------|------------------------|
| [0] Não tem | [1] Tem um | [2] Tem dois |
| [3] Tem três | [4] Tem quatro | [5] Tem mais de quatro |

22) Em relação a possuir geladeira na sua casa, responda:

- | | | |
|--------------|----------------|------------------------|
| [0] Não tem | [1] Tem uma | [2] Tem duas |
| [3] Tem três | [4] Tem quatro | [5] Tem mais de quatro |

23) Em relação a possuir geladeira de duas portas na sua casa, responda:

- | | | |
|--------------|----------------|------------------------|
| [0] Não tem | [1] Tem uma | [2] Tem duas |
| [3] Tem três | [4] Tem quatro | [5] Tem mais de quatro |

24) Em relação a possuir freezer (ou geladeira duplex) na sua casa, responda:

- | | | | |
|----------------|------------------------|--------------|--------------|
| [0] Não tem | [1] Tem um | [2] Tem dois | [3] Tem três |
| [4] Tem quatro | [5] Tem mais de quatro | | |

25) O chefe de família da sua casa foi à escola?

- | | |
|----------------------------------|---------|
| [1] Sim [responder à questão 20] | [2] Não |
|----------------------------------|---------|

26) Qual a última série que o chefe de família completou na escola ou faculdade?

Resposta: _____ série da escola ou _____ ano da faculdade

Classe Econômica (CCEB): _____